



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DE
Toxoplasma gondii EN FAUNA SILVESTRE
EN MÉXICO**

TESIS:

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

CARLOS CEDILLO PELAEZ

TUTORA:

MARÍA DOLORES CORREA BELTRÁN

COMITÉ TUTORAL:

FERNANDO GUAL SILL

FERNANDO CONSTANTINO CASAS

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación, bajo la dirección de la Dra Maria Dolores Correa Beltrán, así como en el Laboratorio de Patología de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre del Gobierno del Distrito Federal, bajo la supervisión del Dr Ignacio Carlos Rangel Rodríguez.

El proyecto se realizo con apoyo del MSc David Espinosa Avilés y el Zoológico de Guadalajara, así como del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, de donde se obtuvieron parte de las muestras evaluadas durante el estudio.

Y fue financiado parcialmente por el proyecto CONACYT 43079.

El alumno fue becario del CONACYT de febrero del 2007 a enero de 2009 con número de registro 207415.

DEDICATORIA

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

A mis amigos, por aceptarme como soy y por seguir creyendo en mí.

A Agustín[†] y Ramón[†], por recordarme la fragilidad de las cosas y el valor que representa la vida.

Al “Jack”, que se encuentra en una “mejor vida” y con quien me hubiera gustado compartir este momento.

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

AGRADECIMIENTOS

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

A mi tutora, la Dra María Dolores Correa Beltrán, y mi comité tutorial, integrado por el MC Fernando Gual Sill y el Dr Fernando Constantino Casas, por la confianza, el apoyo y paciencia que tuvieron durante todo este tiempo y por creer en el proyecto que me permitió concluir esta etapa de mi vida, mi más sincero agradecimiento.

A mis profesores del posgrado, por colaborar en mi formación académica y compartir sus conocimientos: Dra Adriana Ducoing, MVZ Guadalupe Sánchez, Dr Carlos Galina, Dr Antonio Verdugo, Dra Xochitl Vega, Dr Raúl Vargas, Dra Guillermina Ávila y Dra Cristina Guerrero.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología Experimental del INP, por el tiempo compartido y por poder tener un lugar donde concluir mi trabajo de investigación de la maestría: Claudia, Alejandro, Héctor, Rafael, Mónica, Edith, Irma, Esther, José Luis, Sandra, Belinda, Heriberto, Armando, José Antonio y por supuesto Lola, gracias por hacerme sentir como uno más de ustedes.

Al personal de la División de Estudios de Posgrado de la FMVZ, actual y anterior, quienes me ayudaron a resolver todas las dudas y circunstancias administrativas que se me presentaron durante este tiempo: Dr Francisco Suarez, Dr Edgar Alfonseca, Dr Francisco Monroy, Dr José Ivan Sanchez, Dr Juan José Pérez, Araceli Moreno, Mercedes Arriaga, Elsa, Elizabeth Simeone, Rosy, Angelica Dorantes, Luci Favila, Verónica Rojas y Librado Torres.

Al Zoológico de Guadalajara y al MSc David Espinosa Avilés, por las facilidades otorgadas para la selección de casos y obtención de muestras.

Al Zoológico de Chapultepec y al personal del Laboratorio de Patología de la DGZVS, Dr Ignacio Rangel, MVZ Osvaldo López y a la QFB María de los Angeles Pintado, por permitirme participar en los estudios de necropsia, recolección de muestras y apoyarme en el procesamiento de tejidos.

Al Departamento de Patología de la FMVZ, UNAM, por los casos recuperados y por lo que viví durante el tiempo que pertencí a la UME y al Departamento.

Al Laboratorio de Toxicología Experimental del INP y todo su personal, por las facilidades prestadas para la cuantificación de DNA y visualización de geles.

A la Dra Lourdes Juárez, al Dr Roberto Cervantes y a la Dra Sara Caballero, por creer en mí, defender mi causa y apoyarme incondicionalmente en una de las etapas más difíciles de mi vida, se los agradezco eternamente.

Al jurado de mi examen, por el tiempo invertido en la revisión de tesis y por los comentarios proporcionados para mejorar su edición final: Dr Julio V Figueroa Millán, Dr Gerardo Suzán Azpiri, Dr Ignacio Carlos Rangel Rodríguez y Dr Fernando Alba Hurtado.

A mi hermano, el Arq Gustavo Cedillo Pelaez, por todas las desveladas escribiendo la tesis, por su constante apoyo para que la concluyera, por los momentos buenos y los no tantos, gracias por ser siempre mi amigo.

A mi amiga, Mariela Diaz Negrete, por estar junto a mí en las situaciones no tan gratas, por compartir mis logros y apoyarme en mis caídas, por tener el tiempo para escucharme, por creer y confiar en mis ideales, gracias Mariela.

A mis amigos de “La Garza” y anexos: Ricardo y Lorena, Eliseo, Carlos, Juan, Abraham, Hetzabel, Luis, David e Ivonne, Jorge y Diana, Alejandro y Betty, Beto, Alan, Pedro y Paty, Cuahutemoc y Aida, Efraín y Gustavo, porque uno no puede olvidar su origen y porque siempre estarán ahí.

A mis amigos de Veterinaria y de Medicina: Gerardo Salas, Carmen Ramos, Joel Rodríguez, Lorenzo Martínez, Nadia Garibaldi, Yunuen Animas, Emiy Yokohama, Lizbeth Xicotencatl, Oscar Gutierrez, Paty López, Liliana Ordoñez, Lupita Nuñez, Ivonne, Aurora Ramos, Ana Laura Tapia, Diego, Antonio, Hector Monterde, Francisco Altamirano, Gabriela Resendiz, Sara, Nora, Mónica de la Fuente, Mireya Alvarez y Félix Sánchez, gracias por caminar junto a mí en esta etapa de mi vida.

A mis amigos de la carrera: Alma y Miguel, Norma, Abner y Ariadna, Felipe y Zoi, Mario y Graciela, Alfredo y Martha, Leandro, Alvaro, Claudia, Verónica, Marisol, Karla, Pedro Pablo, Sandra, Marco Antonio, Erika, Isabel y Arturo, que aunque cada vez sean más largos los episodios en que nos vemos, siempre estaremos cerca y podre contar ustedes cuando sea necesario, gracias.

A todas aquellos amigos, compañeros del posgrado y personas, que de una u otra manera “generaron” que este propósito llamado Maestría fuera posible: Lorena Reyes, Lucila Cabrera, Elizabeth Bailón, Yazmin López, Gabriel Rueda, Diana Carolina Rodríguez, Sarahi, Adriana Castañeda, Susana Rodríguez, Esmeralda Pérez, Adrian Chávez, Diego Ochoa, Sara Herrera, Oscar Rico, Said Serrano, Oscar, Paco, José Antonio Fitz, Paola González, Salome Cabrera, Enrique Yarto, Beto Sanchez, Mauricio Amaro, Noe Pacheco, Eduardo Resendiz, Alicia Arrona, Christopher Padua, Ayin Q, Saul Paz, Wendy Fonseca, Blanca Aranda, Oralia Medina, Adriana Montiel, Luz Maria Rodríguez, Karla Selene González y Julia Alejandra Rios, gracias por “darme” motivos para seguir adelante.

Por ultimo, a la biblioteca de la FMVZ y todo su personal, donde habite este ultimo año de la maestria y me permitió concluir la tesis, sin su ayuda las cosas hubieran sido muy diferentes, gracias.

Himno Universitario

¡Oh Universidad!, escucha con qué ardor
Entonan hoy tus hijos, este himno en tu honor
Al darte la victoria, honramos tus laureles
Conservando tu historia, que es toda tradición
Unidos venceremos, y el triunfo alcanzaremos
Luchando con tesón, por ti Universidad
Universitarios, lícemos siempre airosos
El pendón victorioso, de la Universidad
Por su Azul y Oro, Lucharemos sin cesar
Cubriendo así de gloria, tu nombre inmortal
¡¡México, Pumas, Universidad!!

Goya, goya,
Cachún, Cachún, Ra Ra,
Cachún, Cachún, Ra Ra,
Goya,
¡Universidad!

RESUMEN

Cedillo Pelaez Carlos. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México. (Tutora Dra María Dolores Correa Beltrán; Comité Tutorial MC Fernando Gual Sill, Dr Fernando Constatino Casas).

Hasta hace unos años, los aislamientos de *T. gondii* se consideraban clonas con discreta diversidad genética, agrupándose dentro de uno de los tres linajes predominantes denominados I, II y III. La variabilidad genética entre las cepas se consideraba baja, siendo del 1 % o menor, sin embargo, estudios recientes en diferentes partes del mundo, han revelado una mayor variabilidad genética. En fauna silvestre, estudios de genotipificación se han realizado a partir de muestras de animales terrestres y marinos, identificándose incluso en nutrias marinas, dos nuevos genotipos denominados X y A, distintos a los genotipos predominantes. En nuestro país los estudios de genotipificación son escasos, describiéndose en la actualidad la presencia de genotipos I y III circulando en gallinas de traspatio del valle de México y genotipos III y recombinantes en perros y gatos en el estado de Durango. El objetivo de este trabajo fue determinar los genotipos de *T. gondii* que circulan en animales de fauna silvestre en México. Se realizaron estudios de necropsia y se revisaron los archivos de diagnóstico de tres entidades que contaban con antecedentes de diagnóstico de toxoplasmosis en fauna silvestre, recuperándose secciones de histopatología e inmunohistoquímica (IHQ), cortes de microscopía electrónica (MET) y tejidos, de 29 casos sospechosos, pertenecientes a 10 especies: mono ardilla, mono saraguato, lémur, león africano, oso negro, canguro rojo, canguro gris, wallaby de Bennet, wallaby de Tammar y delfín del atlántico. Las muestras recuperadas se reevaluaron por técnicas anatomopatológicas, observándose microscópicamente lesiones asociadas a toxoplasmosis, incluyendo miocarditis linfoplasmocitaria e histiocítica, neumonía intersticial con edema pulmonar, enteritis necrótica o linfoplasmocitaria; hepatitis, esplenitis y linfadenitis necrótica; encefalitis y meningoencefalitis linfoplasmocitaria con cambios neuronales y gliales. Los tejidos evaluados presentaron taquizoítos, pseudoquistes y quistes tisulares sugerentes de *T. gondii*. Por IHQ, 13 de 16 casos presentaron inmunopositividad a *T. gondii*, mientras que por MET, 4 casos presentaron estructuras parasitarias compatibles. A partir de los 29 casos sospechosos, se procesaron tejidos de 25 casos para la detección del genoma de *T. gondii* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando iniciadores para los genes B1, GRA6 y SAG3, resultando 12 casos positivos a uno o dos genes. El DNA de un wallaby de Bennet amplificado por PCR con GRA6, que posterior a la digestión con la enzima *Msel*, se observó un patrón de alelos genotipo I, similar al de la cepa RH de referencia. El estudio de genotipificación llevado a cabo en esta especie, difiere con el único informe descrito en la literatura científica a la fecha, siendo distinto a los genotipos determinados (genotipo III) en tres wallabys de los Estados Unidos.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, genotipos, fauna silvestre, wallaby.

ABSTRACT

Cedillo Pelaez Carlos. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* in wild animals in Mexico. (Tutor Dr Maria Dolores Correa Beltrán; Tutorial Committe MC Fernando Gual Sill, Dr Fernando Constatino Casas).

Until a few years ago, the isolates of *T. gondii* were considered discrete genetic diversity with clones, grouped into one of three predominant lineages known as I, II and III. The genetic variability between strains was considered low, 1% or less, however, recent studies in new isolates from different parts of the world have revealed a high genetic variability. Genotyping studies of wildlife have been made from samples of marine and land animals, identifying in sea otters two new genotypes called X and A, than genotypes predominate. In our country genotyping studies are scarce, describing at present the presence of genotypes I and III circulate mainly in backyard chickens and genotypes III y recombinants in dogs and cats of the Durango state. The aim of this study was to determine the genotypes of *T. gondii* circulating in wildlife animals in Mexico. Participating in studies and necropsy records were reviewed for diagnosis of three entities that had a history of diagnosis of toxoplasmosis in wild animals recovering lamella (HP e IHQ), cuts of MET and tissues, of 29 suspected cases, 10 belong species: squirrel monkey, saraguato monkey, lemur, African lion, black bear, red kangaroo, gray kangaroo, wallaby of Bennet, wallaby of Tammar and Atlantic dolphin. The samples recovered were re-evaluated by histopathological techniques, microscopically observed lesions associated with toxoplasmosis, including myocarditis lymphoplasmocytic and histiocytes, interstitial pneumonia with pulmonary edema, or necrotic enteritis lymphoplasmocytic, hepatitis, splenitis and necrotic lymphadenitis, encephalitis and meningoencephalitis limphoplasmocytic with neuronal and glial changes. The evaluation showed taquizoítos tissues, suggesting tissue cysts and pseudocysts of *T. gondii*. By IHQ, 13 of 16 cases submitted to inmunopositividad *T. gondii*, whereas MET, 4 cases had parasitic structures compatible. From the 29 suspected cases were processed tissues (both fresh and formaldehyde) in 25 cases for the detection of the genome of *T. gondii* by PCR using the B1 gene, GRA6 and SAG3, resulting in 12 positive cases, one or two genes. The DNA of a wallaby of Bennet amplified GRA6, whose digestion with the enzyme *MseI*, displayed a polymorphic pattern with allele genotype I, similar to the reference strain RH. The genotyping study conducted in this species, differs with the only report described in the literature to date, being identified genotype I, unlike certain genotypes (genotype III) in three wallabys from the United States.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, genotypes, wildlife, wallaby.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Antecedentes históricos	1
1.3 Biología	4
1.4 Ciclo de vida y estadios de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
1.5 Genoma, genotipos y genotipificación	15
1.6 Patogenia	21
1.6.1 Invasión celular	21
1.6.2 Relación Parásito-Hospedador	24
1.7 Infección por <i>Toxoplasma gondii</i> y genotipos relacionados	28
1.7.1 Toxoplasmosis en humanos	28
1.7.2 Toxoplasmosis en animales domésticos	31
1.7.3 Toxoplasmosis en fauna silvestre	36
1.8 Diagnóstico	43
1.8.1. Serología	47
1.8.2 Anatomopatología	47
1.8.3 Pruebas biológicas	50
1.8.4 Biología molecular	52
1.9 Toxoplasmosis en México	55
2. JUSTIFICACIÓN	63
3. HIPÓTESIS	64
4. OBJETIVOS	64
5. MATERIAL Y MÉTODOS	65
5.1 Tipo de estudio	65
5.2 Estrategia general	65
5.3 Entidades de donde se obtuvo el material de estudio	65
5.4 Selección y evaluación del material de estudio	65
5.4.1 Selección retrospectiva de casos sospechosos o compatibles con toxoplasmosis	65
5.4.2 Recuperación de laminillas y cortes de microscopía electrónica de casos seleccionados	67
5.4.3 Criterios de revisión y confirmación de casos seleccionados	68
5.4.4 Recuperación de tejidos en formaldehído de casos seleccionados para estudios de biología molecular	70
5.4.5 Recolección de muestras de estudios postmortem	70

5.5 Técnicas de laboratorio	71
5.5.1 Necropsia	71
5.5.2 Histopatología	73
5.5.3 Inmunohistoquímica	73
5.5.4 Microscopia electrónica	75
5.5.4 PCR	76
5.5.6 PCR-RFLP	81
6. RESULTADOS	83
6.1 Selección del material de estudio	83
6.2 Anatomopatología	83
6.2.1 Necropsia y hallazgos macroscópicos	83
6.2.2 Hallazgos microscópicos	89
6.2.3 Inmunohistoquímica	103
6.2.4 Microscopia electrónica	103
6.3 Biología molecular	110
6.3.1 PCR	110
6.3.2 PCR-RFLP	115
6.4 Comparación de casos sospechosos y positivos por anatomopatología y biología molecular	115
7. DISCUSIÓN	118
7.1 Animales evaluados durante el estudio	118
7.2 Presentación de lesiones	119
7.3 Casos positivos por biología molecular	123
7.4 Genotipos	125
8. CONCLUSIONES	127
9. LITERATURA CONSULTADA	128

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resumen de algunas características biológicas y epidemiológicas de los principales genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	5
Cuadro 2. Marcadores genotípicos y fenotípicos empleados en estudios de diversidad genética de <i>Toxoplasma gondii</i> .	20
Cuadro 3. Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> aislados a partir de gallinas de diferentes partes del mundo.	34
Cuadro 4. Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en carnívoros silvestres.	38
Cuadro 5. Detección de anticuerpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> en animales de zoológico (por orden y familia) de la Republica Checa.	40
Cuadro 6. Detección de anticuerpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> en animales de zoológico (por especie) de la Republica Checa.	41
Cuadro 7. Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> aislados a partir de fauna silvestre (terrestre) y animales ferales.	44
Cuadro 8. Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> aislados a partir de mamíferos marinos.	46
Cuadro 9. Criterios para clasificación de lesiones microscópicas.	69
Cuadro 10. Criterios para la identificación ultraestructural de taquizoítos o bradizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	69
Cuadro 11. Iniciadores empleados para la amplificación de DNA (PCR) de <i>Toxoplasma gondii</i> y enzimas de digestión utilizadas para genotipificación (RFLP).	79
Cuadro 12. Casos seleccionados como sospechosos de toxoplasmosis, diagnosticados entre los años 1999 a 2008.	84
Cuadro 13. Alteraciones microscópicas en corazón y pulmón. asociadas a toxoplasmosis	90
Cuadro 14. Alteraciones microscópicas en intestino delgado e hígado asociadas a toxoplasmosis.	94

Cuadro 15. Alteraciones microscópicas en sistema nervioso central asociadas a toxoplasmosis.	100
Cuadro 16. Relación de casos procesados y positivos para IHQ con diferente grado de positividad.	104
Cuadro 17. Relación de casos procesados para PCR y positivos para alguno de los genes (<i>B1</i> , <i>GRA6</i> y <i>SAG3</i>) evaluados.	111
Cuadro 18. Comparación de casos sospechosos y positivos por anatomopatología y biología molecular.	117

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	2
Figura 2. Estructura de taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> .	7
Figura 3. Esquema del complejo apical de <i>Toxoplasma gondii</i> .	9
Figura 4. Estructura de bradizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> .	10
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .	12
Figura 6. Mapas genéticos de 14 cromosomas de <i>Toxoplasma gondii</i> .	17
Figura 7. Etapas de invasión celular de <i>Toxoplasma gondii</i> .	22
Figura 8. División por endodiogenia de <i>Toxoplasma gondii</i> .	25
Figura 9. Respuesta de anticuerpos específicos ante una primo-infección por <i>Toxoplasma gondii</i> .	27
Figura 10. Aborto ovino asociado a toxoplasmosis congénita.	32
Figura 11. Identificación microscópica de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	49
Figura 12. Identificación microscópica de quistes tisulares conteniendo bradizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	51
Figura 13. RFLP, digestión del gen GRA6 con <i>Msel</i> y electroforesis de los productos obtenidos.	54
Figura 14. Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en humanos en México en 1987.	56
Figura 15. Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en gatos en México	59
Figura 16. Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en animales domésticos	60
Figura 17. Estrategia general del estudio.	66

Figura 18. Necropsia de mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>).	85
Figura 19. Edema pulmonar generalizado, necropsia de mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>).	87
Figura 20. Cambios macroscópicos en sistema nervioso central de marsupiales.	88
Figura 21. Miocarditis linfoplasmocitaria e histiocítica con presencia de quistes tisulares de <i>Toxoplasma gondii</i> en canguro rojo (<i>Macropus rufus</i>).	91
Figura 22. Neumonía intersticial con presencia de pseudoquistes y taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> fagocitados, en mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>).	92
Figura 23. Enteritis necrótica severa difusa en delfín del atlántico (<i>Tursiops truncatus</i>) asociada a infección por <i>Toxoplasma gondii</i> .	95
Figura 24. Enteritis linfoplasmocitaria leve difusa con edema intersticial en mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>) asociada a infección por <i>Toxoplasma gondii</i> .	96
Figura 25. Hepatitis necrótica severa zonal en mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>) asociada a infección por <i>Toxoplasma gondii</i> .	97
Figura 26. Invasión, proliferación y diseminación de estructuras parasitarias sugerentes de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> en parénquima hepático de mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>).	98
Figura 27. Atrofia linfoide esplénica con presencia de pseudoquiste de <i>Toxoplasma gondii</i> en mono ardilla (<i>Saimiri sciuresus</i>).	99
Figura 28. Cambios microscópicos en sistema nervioso central de marsupiales asociados a infección por <i>Toxoplasma gondii</i> .	101
Figura 29. Ependimitis de plexos coroideos de ventrículos laterales con pseudoquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> en mono ardilla (<i>Saimiri sciuresus</i>).	102
Figura 30. Inmunohistoquímica positiva a <i>Toxoplasma gondii</i> en tejidos de diferentes especies de mamíferos.	105

Figura 31. Inmunohistoquímica positiva a <i>Toxoplasma gondii</i> en intestino delgado de delfín del Atlántico (<i>Tursiops truncatus</i>).	106
Figura 32. Identificación ultraestructural de <i>Toxoplasma gondii</i> en intestino delgado de delfín del Atlántico (<i>Tursiops truncatus</i>).	107
Figura 33. Identificación ultraestructural de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> en tejidos de diferentes especies de mamíferos.	108
Figura 34. Identificación ultraestructural de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> en parénquima pulmonar de canguro rojo (<i>Macropus rufus</i>).	109
Figura 35. PCR semianidada para la detección del gen B1 de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de wallaby de Tammar (<i>Macropus eugenii</i>).	112
Figura 36. PCR semianidada para la detección del gen B1 de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de león africano (<i>Panthera leo</i>).	112
Figura 37. PCR para la amplificación del gen SAG3 de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de oso negro (<i>Ursus americanus</i>), mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>) y wallaby (<i>Macropus</i> sp).	113
Figura 38. PCR para la amplificación del gen SAG3 de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de canguros rojos (<i>Macropus rufus</i>).	113
Figura 39. PCR para la amplificación del gen GRA6 de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de wallabys (<i>Macropus</i> spp), canguro gris (<i>Macropus giganteus</i>) y mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>).	114
Figura 40. PCR para la reamplificación del gen GRA6 de <i>Toxoplasma gondii</i> a partir de muestras de mono ardilla (<i>Saimiri sciureus</i>) y wallaby de Bennet (<i>Macropus rufogriseus</i>).	114
Figura 41. Patrón de bandas obtenido por RFLP, posterior a la digestión del gen GRA6 de <i>Toxoplasma gondii</i> con la enzima de restricción <i>MseI</i> .	116

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Toxoplasma gondii es un protozooario intracelular obligado con capacidad de infectar a vertebrados de sangre caliente, incluyendo animales domésticos, silvestres y al hombre (Green, 2000; Tenter *et al*, 2000; Fowler y Miller, 2003; Ferguson, 2004; Hill *et al*, 2005; Saeij *et al*, 2005; Thiangtum *et al*, 2006; Fowler y Miller, 2008; Kim y Weiss, 2008).

Su nombre se 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) (Black y Boothroyd, 2000; Rico-Torres, 2005; Hill *et al*, 2005; Kim y Weiss, 2008).

La importancia médica y veterinaria de *T. gondii* radica en su capacidad de producir aborto o enfermedad congénita en los huéspedes afectados. La toxoplasmosis se considera una zoonosis de distribución mundial, cuyo impacto ha generado que sea el protozooario mayormente estudiado, existiendo a la fecha, más de 15000 publicaciones originales y más de 500 revisiones en el tema (Dubey y Beattie, 1988; Tenter *et al*, 2000).

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 el protozooario en tejidos de conejos de laboratorio en Brasil y, Darling en Panamá, identificó quistes tisulares en humanos, denominándolos como sarcosporidiosis en ese tiempo. Nicolle y Manceux denominaron al género como *Toxoplasma* debido a la morfología que presentaban los protozoarios y *gondii* por el animal en el que lo encontraron (Black y Boothroyd, 2000; Tenter *et al*, 2000; Fowler y Miller, 2003; Rico-Torres, 2005; Correa *et al*, 2006; Sukthana, 2006; Kim y Weiss, 2008). Las primeras descripciones de casos clínicos en humanos fueron en 1913 por

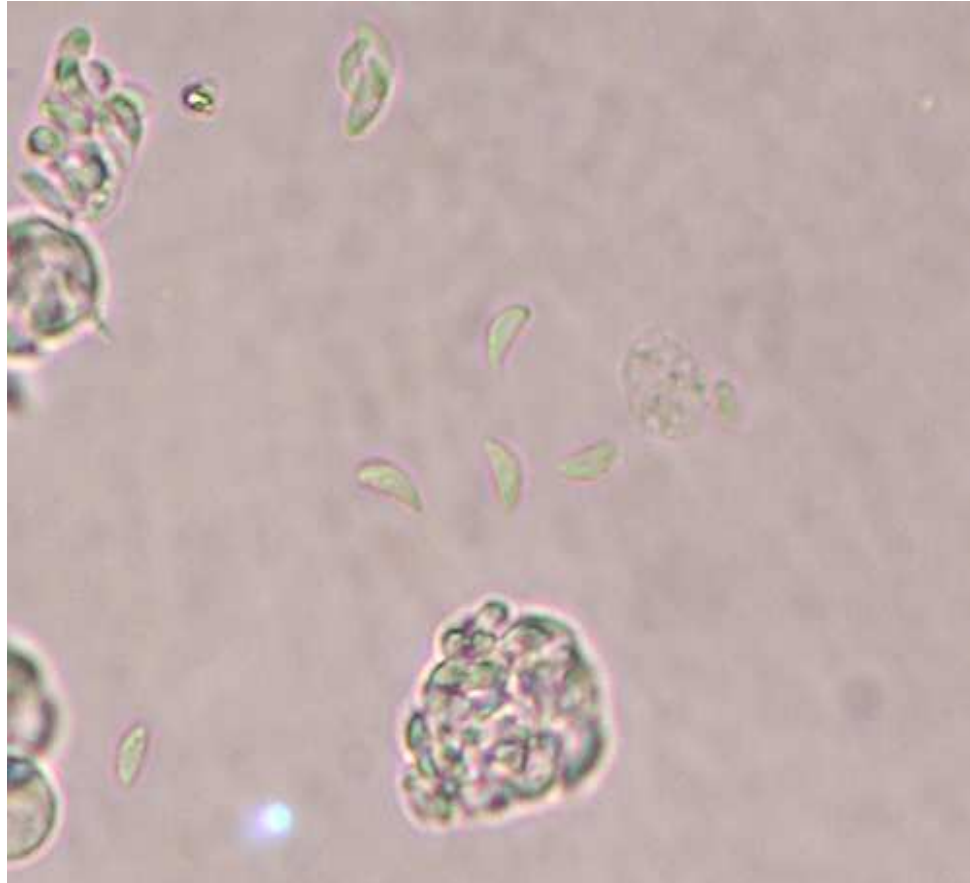


Figura 1. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Lavado peritoneal de ratón, inoculado con cepa de referencia RH, apreciándose en el centro de la imagen cuatro estructuras libres de aspecto “arqueado”. En la parte inferior y en el extremo superior izquierdo se observan conglomerados de zoítos sin apreciarse morfología definida.

Fuente: Héctor Luna Pastén y Rafael López Reboseño. Suspensión de taquizoítos en PBS, 400x. Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría.

Castellani y en 1923 por Janku, quien tras el estudio postmortem de un niño de 11 meses con microoftalmia e hidrocefalia, se identificó al parásito en el ojo, reconociéndose como el primer caso asociado a enfermedad congénita (Tenter *et al*, 2000; Correa *et al*, 2006; Sukthana, 2006). En 1937, Wolf y Cowen informaron el primer caso de toxoplasmosis diseminada como causa de muerte de un humano adulto de 22 años de edad, así mismo, documentaron por primera vez el mecanismo de transmisión congénita (Tenter *et al*, 2000; Correa *et al*, 2006). En 1939 se describió la triada “clásica” de síntomas asociados a toxoplasmosis congénita en humanos (retinocoroiditis, hidrocefalia y encefalitis seguida por calcificaciones cerebrales). Entre 1940 y 1942 se identificó a *T. gondii* como agente causal de enfermedad aguda adquirida en humanos, describiéndose cuadros de encefalitis en niños y se reconoció su transmisión vertical en personas (Tenter *et al*, 2000; Sukthana, 2006).

En 1952 se reconoció a *T. gondii* como causante de linfadenopatía y retinocoroiditis en humanos. Entre 1954 y 1956 se planteó la hipótesis de transmisión horizontal a humanos a partir de la ingestión de carne mal cocida conteniendo quistes tisulares. En 1958 el comité mixto de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (OMS/FAO) incluyeron a la toxoplasmosis como una zoonosis de importancia en la salud pública (Tenter *et al*, 2000; Correa *et al*, 2006).

En 1970 Dubey y Frenkel describieron los estadios sexuales en el intestino delgado de gatos, como parte del ciclo biológico de dicho protozooario. Entre 1969 y 1972 se evidenció la participación epidemiológica de los gatos en la diseminación de *T. gondii* en diferentes partes del mundo. En 1982 se documentó el primer caso de toxoplasmosis cerebral en un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y en 1984 se reconoció a *T. gondii* como agente oportunista en pacientes con este síndrome. Entre 1995 y 1998, se documentó un brote de toxoplasmosis aguda en humanos, afectando a 100 individuos de entre 6 y 83 años, asociado al consumo de agua contaminada con ooquistes de felinos silvestres (Tenter *et al*, 2000; Kim y Weiss, 2008).

1.3 Biología

Toxoplasma gondii pertenece al Phylum Apicomplexa (protozoarios cuyo estadio móvil presenta complejo apical), Clase Sporozoasida, Subclase Coccidiasina, Orden Eucoccidiorida y Familia Sarcocystidae; describiéndose solamente una especie para el género (Montoya y Liesenfeld, 2004; Rico-Torres, 2005).

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 *et al*, 1988; Sibley, 2003; Khan *et al*; 2005; Saeij *et al*, 2005; Nishi *et al*, 2008).

Las diferentes cepas de *T. gondii* han sido ampliamente estudiadas y descritas en la literatura científica, clasificándose, en un inicio, en tres genotipos o linajes predominantes denominados I, II y III, con base en estudios realizados a partir de aislamientos en Europa y Norteamérica. Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado la presencia de nuevos genotipos con características particulares en diversas partes del mundo. (Dardé, 2004; Saeij *et al*, 2005; Switaj *et al*, 2005; Su *et al*, 2006; Dubey, Quirk *et al*, 2008; Dubey y Jones, 2008).

El establecimiento de los diferentes tipos de *T. gondii* se determinó en un principio, al estudiar sus características biológicas *in vivo* e *in vitro*, como el comportamiento en ratones y cultivo celular, manteniéndose dichos criterios vigentes, empleados actualmente para determinar las cualidades de nuevos aislamientos (Cuadro 1). El aislamiento tipo I se considera el más virulento en ratones ($DL_{100}=1$) y tiende a generar casos clínicos de toxoplasmosis humana. Los aislamientos tipo II y III son considerados menos virulentos para ratones ($DL_{100}\geq 10^3$) y han sido aislados de humanos, animales domésticos y silvestres. Sin embargo, la virulencia en ratones no evidencia una correlación en la infección en humanos y otros animales (Darde, 2004; Saeij *et al*, 2005; Su *et al*, 2006).

Cuadro 1. Resumen de algunas características biológicas y epidemiológicas de los principales genotipos de *Toxoplasma gondii*.

Tipo I

Aislamiento poco frecuente, 10% de las cepas de origen humano de Europa y EU.
Alta virulencia para ratones: muerte de todos los ratones inoculados con menos de 10 taquizoitos.
In vitro: alto rango de multiplicación, reduce la interconversión taquizoíto- bradizoíto.

Tipo II

Comúnmente aislado de humanos, ovinos, cerdos; 80% de las cepas de origen de Europa y EU.
No virulento para ratones: infección crónica con persistencia de quistes tisulares.
In vitro: bajo rango de multiplicación, facilita la interconversión taquizoíto- bradizoíto y formación de quistes.

Tipo III, genotipos recombinantes y genotipos con alelos atípicos

Aislamientos raros originados en Europa y EU.
Aislamientos originados principalmente de animales silvestres y de cuadros de enfermedad inusual en humanos.
Usualmente más virulento para ratones que los tipo II

Tomado de: Darde ML. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanita. 2004; 40 (1): 57-63.

1.4 Ciclo de vida y estructura de estadios de *Toxoplasma gondii*

En el ciclo de vida de *T. gondii* los hospedadores definitivos corresponden a la familia Felidae, mientras que los hospedadores intermediarios pueden ser todos los animales de sangre caliente (Dubey, 1998; Tenter *et al*, 2000; Greene, 2000; Fowler y Miller, 2003; Ajzenberg *et al*, 2005; Hill *et al*, 2005; Sedlak y Bartová, 2006; Thiangtum *et al*, 2006; Fowler y Miller, 2008).

El ciclo comprende cuatro estadios infecciosos con aspectos particulares en su biología y estructura: taquizoíto (etapa de multiplicación rápida), bradizoíto (en quiste tisular, etapa de multiplicación lenta), merozoíto (estadio sexual intestinal) y esporozoitos (en ooquistes). Los estadios de taquizoíto y bradizoíto se encuentran generalmente dentro de tejidos de los hospedadores afectados, los merozoítos exclusivamente se desarrollan durante la fase sexual en el epitelio intestinal de felinos, mientras que los esporozoítos están confinados dentro de ooquistes fuera del hospedador (eliminados en las heces), cuya estructura les confiere una extremada resistencia a las condiciones ambientales (Dubey, 1988; Dubey, 1998; Greene, 2000; Ferguson, 2004; Hill *et al*, 2005; Correa *et al*, 2006).

El estadio de taquizoíto característicamente presenta forma de “media luna”, llegando a medir 6.0 x 2.0 μm aproximadamente, siendo similar su talla al diámetro de un eritrocito. El extremo anterior termina en forma de punta (complejo apical) mientras que el extremo posterior presenta forma redondeada. Externamente presenta una cubierta y en su interior contiene diferentes organelos e inclusiones (Figura 2) incluyendo anillos apicales, anillos polares (1 y 2), conoide, roptrias, micronemas, microporos, mitocondrias, microtúbulos, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, ribosomas, microporos, núcleo con acúmulos de cromatina y nucleolo, gránulos densos, gránulos de amilopectina (discretos o escasos) y apicoplasto (Dubey, Lindsay *et al*, 1998; Hill *et al*, 2005; Nishi *et al*, 2008).

La cubierta externa o cutícula está compuesta de tres membranas, la primera denominada plasmalema y dos más que se encuentran adheridas formando el complejo membranoso interno (CMI). El CMI es una estructura

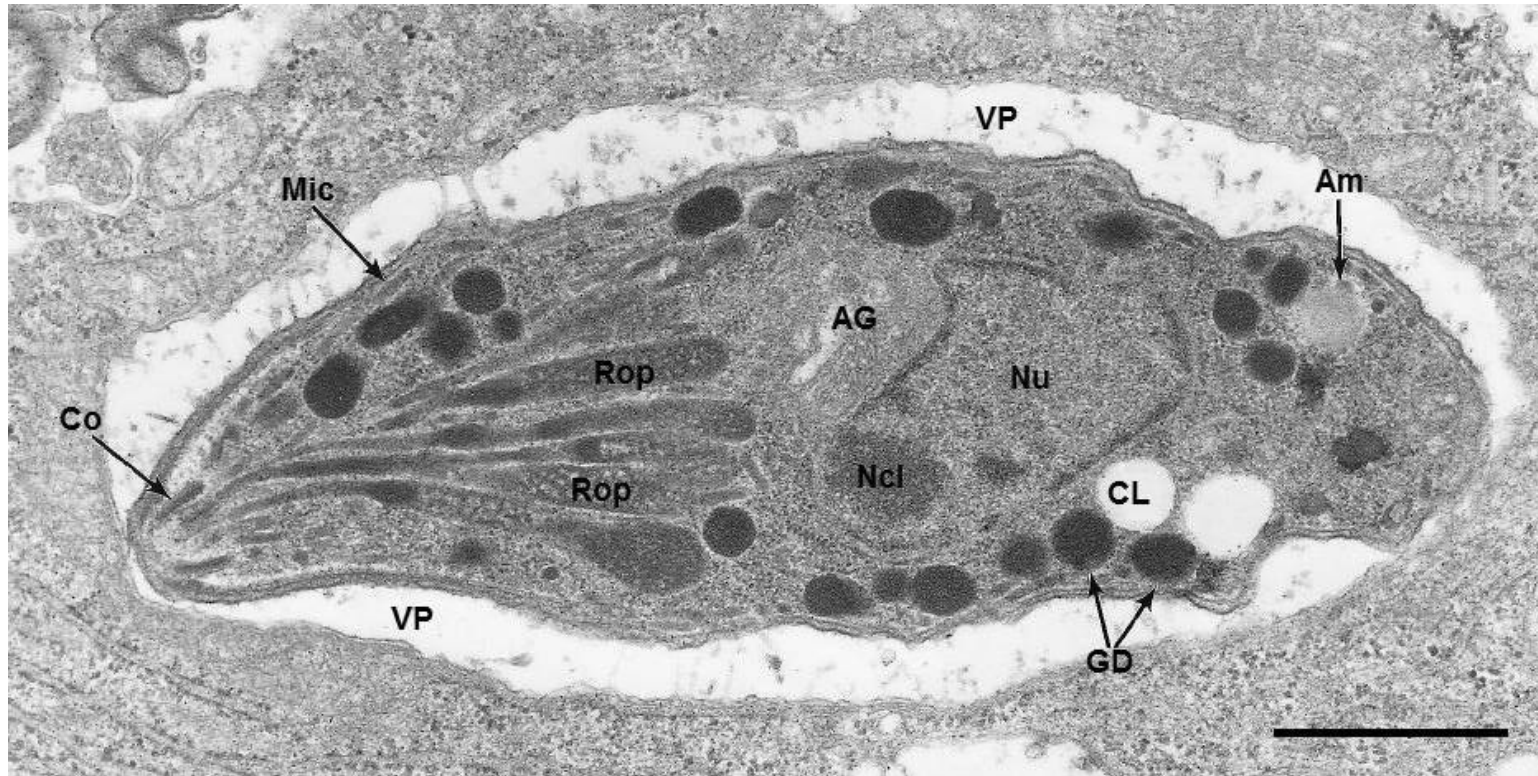


Figura 2. Estructura de taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Microscopia electrónica de transmisión de un taquizoíta proveniente de exudado peritoneal de ratón inoculado con la cepa VEG de *T. gondii*. El zoíta se aprecia intracelularmente dentro de la vacuola parasitófora (VP), exhibiendo diferentes organelos como son el conoide (Co), micronemas (Mic), roptrias (Rop), aparato de Golgi (AG), núcleo (Nu) y nucleolo (Ncl), gránulos densos (GD), cuerpos lipídicos (CL) y gránulos de amilopectina (Am). Ur-Pb, Barra: 1µm.

Tomado y modificado de: Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11(2): 267-299.

continúa a lo largo del protozoario, perdiendo esta característica a nivel de los microporos (ubicados lateralmente) y en el extremo posterior (poro posterior). El complejo apical (CA) está formado por los anillos apicales, anillos polares, conoide, microtubulos (del conoide, subcuticulares e internos), modificaciones del plasmalema y CMI (Figura 3). El anillo polar 1 es un plegamiento delgado electrodenso del complejo membranoso interno ubicado en el borde anterior del taquizoíto, el cual rodea y delimita un cono truncado cilíndrico (conoide), este a su vez está conformado por 6 a 8 microtúbulos compactados (compuestos de α -tubulina) dispuestos en espiral. El anillo polar 2 sirve de base a los microtúbulos del conoide, así mismo, de él se originan 22 microtúbulos subcuticulares, corriendo a lo largo del zoíto por debajo del complejo membranoso interno, hasta su extremo posterior. En adición, los protozoarios presentan dos microtúbulos internos que terminan a nivel del conoide. Los microtúbulos son parecidos a un cilindro disponiéndose en forma de espiral (Dubey, Lindsay *et al*, 1998; Patrón *et al*, 2005; Nishi *et al*, 2008).

El estadio de bradizoíto difiere ligeramente en su morfología con relación al taquizoíto, siendo discretos los cambios estructurales (Figura 4). La principal diferencia es la posición del núcleo, encontrándose en los bradizoítos en el extremo posterior, mientras que los taquizoítos lo presentan localizado en el centro. Así mismo, los bradizoítos presentan de una a tres roptrias con contenido electrodenso, el cual varía en densidad y aspecto (de contenido homogéneo a reticular) de acuerdo a la longevidad de los zoítos, contienen abundantes gránulos de amilopectina (positivos a la tinción de ácido peryódico de Shift, PAS) y son más delgados que los taquizoítos (7.0 x 1.5 μm aproximadamente) (Dubey, Lindsay *et al*, 1998; Hill *et al*, 2005).

Los bradizoítos generalmente se encuentran confinados dentro de una estructura citoplasmática denominada quiste tisular, que conforme se dividen y se incrementa la cantidad de zoítos, el quiste aumenta de tamaño, llegando a medir hasta 70 μm de diámetro cuando presentan forma esférica y hasta 100 μm de largo cuando adquieren forma alargada. Dichas estructuras inicialmente pueden

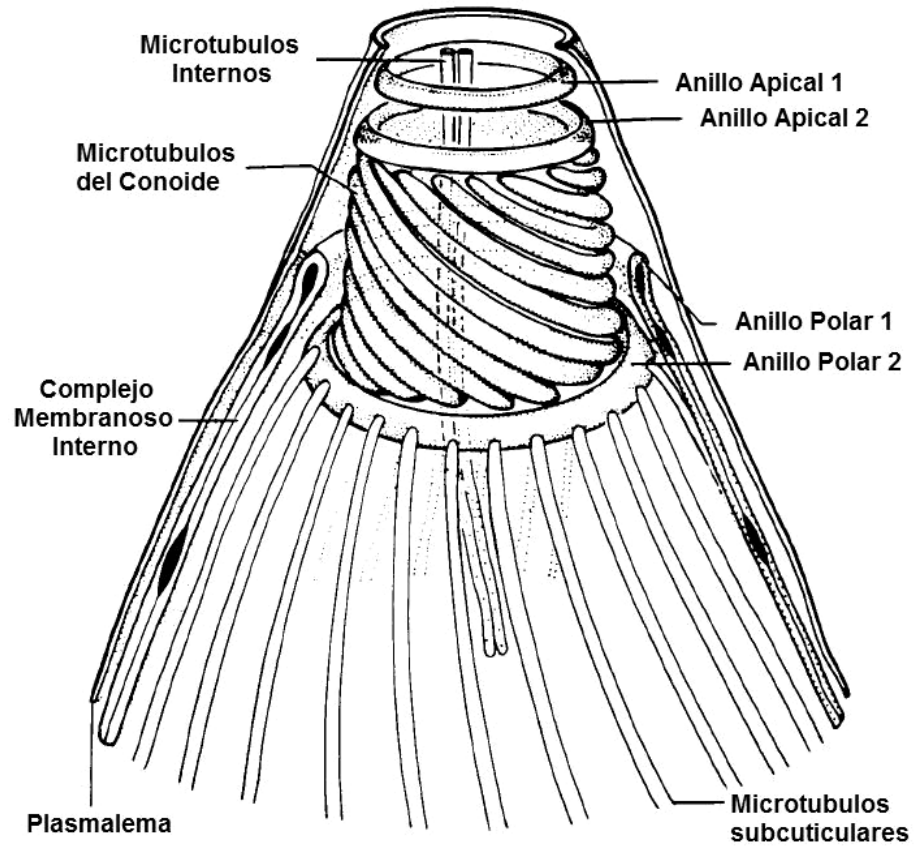


Figura 3. Esquema del complejo apical de *Toxoplasma gondii*.

Tomado y modificado de: Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11(2): 267-299.

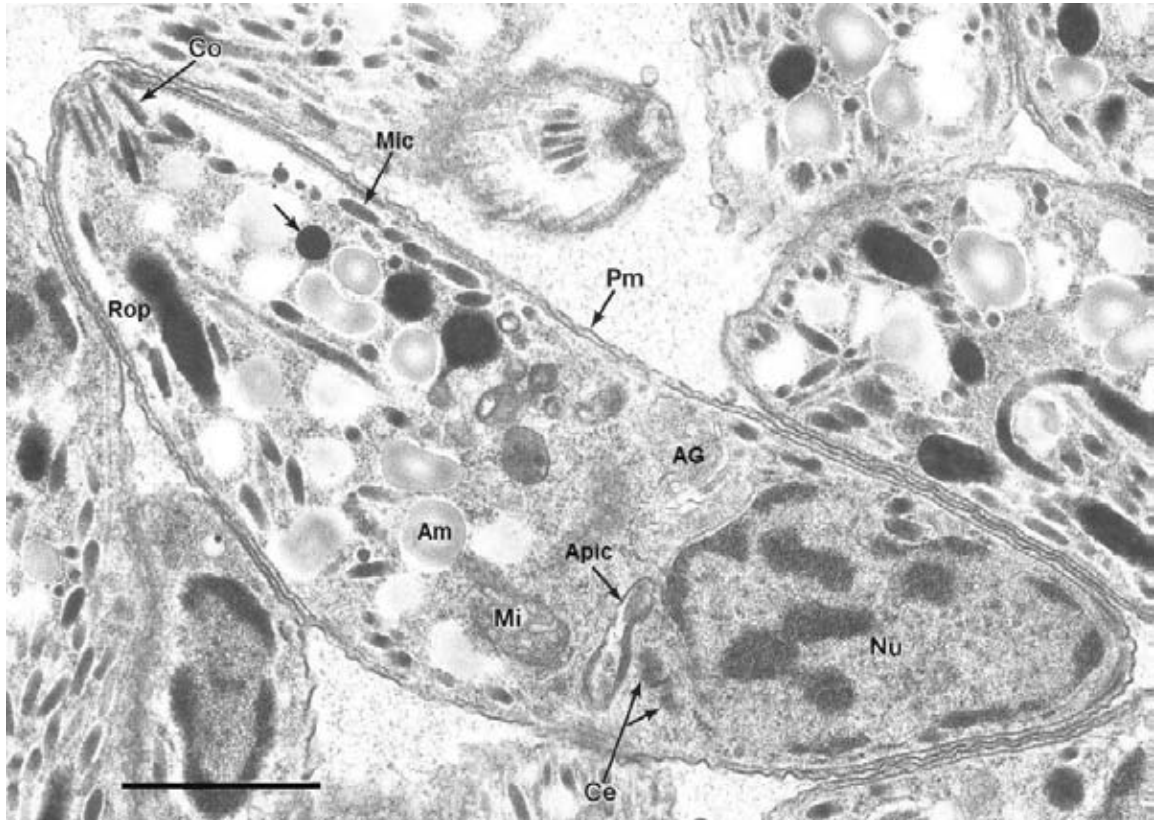


Figura 4. Estructura de bradizoíto de *Toxoplasma gondii*. Microscopia electrónica de transmisión de un bradizoíto en el interior de un quiste tisular, proveniente de encéfalo de ratón inoculado con la cepa VEG de *T. gondii*. El zoíto exhibe diferentes organelos y estructuras como el conoide (Co), micronemas (Mic), roptrias (Rop), plasmalema (PM), gránulos de amilopectina (Am), mitocondria (Mi), apicoplasto (Apic), aparato de Golgi (AG), centriolos (Ce) y núcleo (Nu). Ur-Pb, Barra: 1µm.

Tomado y modificado de: Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11(2): 267-299.

resguardar uno o dos protozoarios, pero conforme transcurre el tiempo, se pueden llegar a encontrar quistes con más de 60 000 protozoarios. Los quistes tisulares presentan una pared delgada ($\leq 0.5 \mu\text{m}$) y elástica, con afinidad débil a la tinción de PAS y variable a las tinciones de plata (argirofilica) dependiendo de la técnica empleada, indicativo de contener polisacáridos en su composición, provenientes tanto de la célula afectada como del parásito (Dubey, Lindsay *et al*, 1998; Hill *et al*, 2005).

Cuando un hospedador definitivo (gatos o felinos silvestres) ingiere tejidos con quistes tisulares (Figura 5), estos llegan al tracto digestivo y por la acción de los jugos gástricos y enzimas proteolíticas del intestino, los bradizoítos se liberan a la luz invadiendo el epitelio del intestino delgado. Ya en el interior de los enterocitos, se lleva a cabo una primera multiplicación asexual por endodiogenia, la cual es una forma especializada de reproducción generando dos progenies o clonas a partir de su antecesor, formando los merozoítos. Los estadios de merozoíto se desarrollan a nivel del epitelio intestinal, generando cinco tipos morfológicos diferentes, denominados A, B, C, D y E, teniendo diferencias discretas con los taquizoítos. Miden de $5.8 \times 2.9 \mu\text{m}$ aproximadamente, presentan proyecciones de la cutícula, con escasas (tipos A, B, D y E) a abundantes (tipo C) gránulos de amilopectina, escasas roptrias de aspecto reticular (tipos A a D) a electronomas (tipo E), escasos micronemas y gránulos densos, abundantes cuerpos lipídicos, abundantes mitocondrias pequeñas, núcleo y nucleolo prominente. Los tipos C, D y E se pueden dividir por otra modalidad llamada endopoliogenia, la cual es una forma especializada de reproducción donde se divide el núcleo en múltiples fragmentos generando varias progenies. El conjunto de merozoítos se denomina esquizontes, pudiendo estar presentes desde el tipo B hasta el E, independiente del tipo de reproducción que lleven a cabo. Al final de estas divisiones asexuales, la última multiplicación de parásitos (generaciones tipo D o E) da inicio a la fase de división sexual dentro del ciclo de vida y exclusiva de los hospederos definitivos, generando macro y microgamontes (gamontes

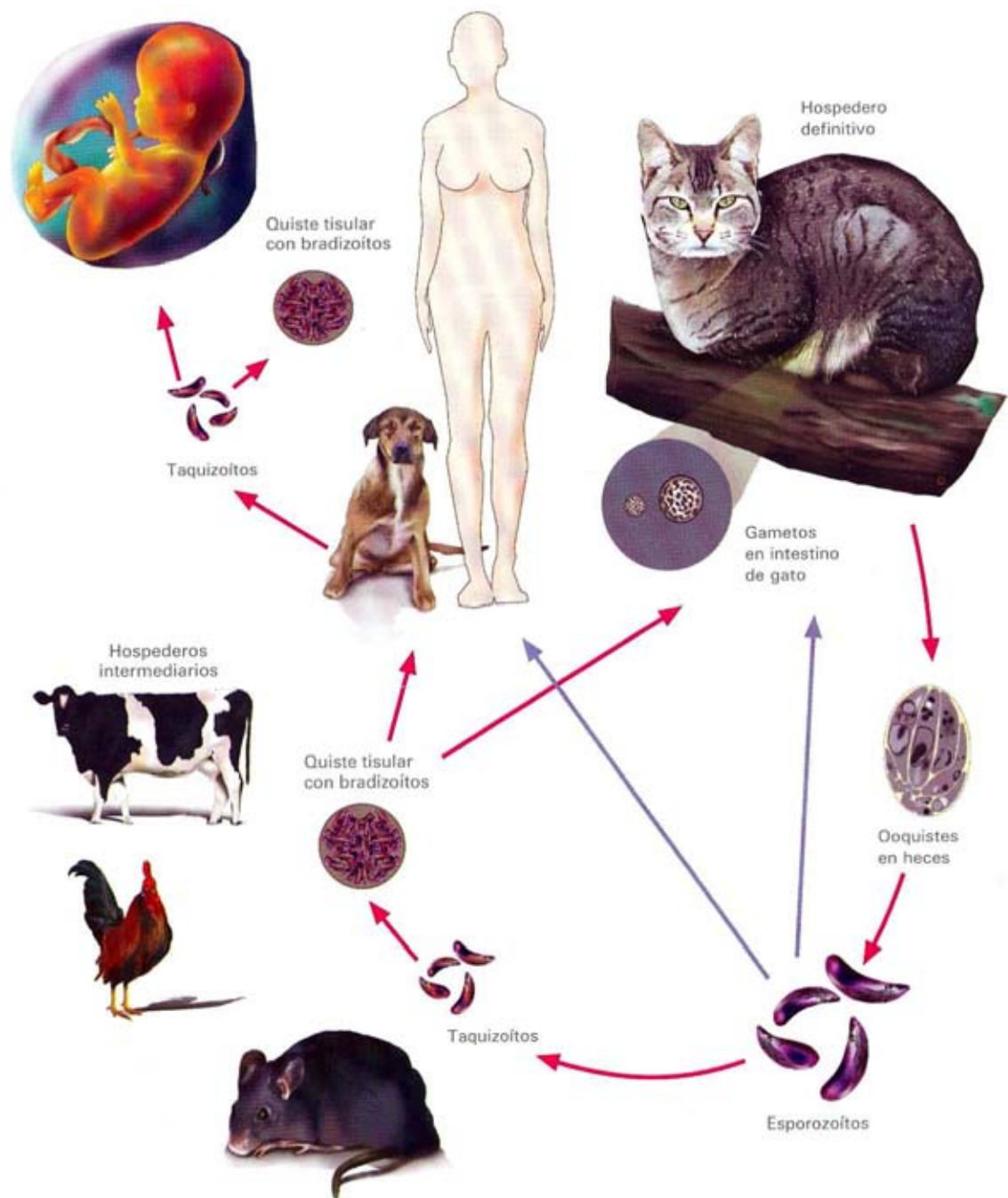


Figura 5. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.

Tomado de: Correa D, Coballase UE, Cañedo SI, Rico TC. Toxoplasmosis. En: Flisser A, Pérez TR, editores. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos. México, D.F., México. 2006: 355-367.

femenino y masculino) (Dubey, Lindsay *et al*, 1998; Hill *et al*, 2005; Speer y Dubey, 2005).

Los gamontes femeninos o macrogamontes presentan forma subesférica, con múltiples microporos en su membrana y en su citoplasma con núcleo central de gran tamaño, retículo endoplasmico rugoso y liso, numerosas mitocondrias, vesículas de doble membrana, cuerpos adyacentes a la membrana tipo I y II, así como abundantes gránulos PAS positivos en el citoplasma. Los gamontes masculinos o microgamontes son de forma ovoide a elipsoidal, que durante la microgametogenesis, su núcleo se fracciona en 10 a 21 nuevos núcleos, cuyas porciones se disponen a la periferia del gamonte generando protuberancias en su cutícula, dando pauta a la formación de los futuros microgametos; así mismo, en su citoplasma se pueden ver otros organelos y cuerpos de inclusión. Los microgametos son estructuras de forma alargada conteniendo principalmente material nuclear y una mitocondria de gran tamaño, en su extremo anterior presentan el perforatorium adyacente a los cuerpos basales, de donde emergen dos flagelos proyectados hacia el extremo posterior (Dubey, Lindsay *et al*, 1998; Hill *et al*, 2005; Speer y Dubey, 2005).

Cuando los microgametos fertilizan al microgameto maduro se genera el cigoto, presentando un núcleo grande con nucleoplasma amorfo delimitado por una membrana con algunos microporos. Conforme madura, el núcleo se divide generando cuatro nuevos núcleos situados a la periferia del cigoto, a su vez, durante esta etapa, se forma una segunda membrana. Después de la división del citoplasma, se forman dos esporoblastos con dos núcleos cada uno, al mismo tiempo se forma una segunda membrana limitante. Conforme continúa la maduración de la estructura, los esporoblastos adquieren forma alargada formando los esporoquistes, y su membrana externa forma la pared del esporoquiste. El ooquiste sin esporular mide de 10 a 12 μm de diámetro, presentando forma esférica con dos capas o paredes bien definidas independientes de la pared de los esporoquistes. La formación de los esporozoítos se lleva a cabo dentro de los esporoquistes conforme se alcanza la esporulación

en condiciones ambientales. El ooquiste esporulado mide de 11 a 13 μm de diámetro, su pared está constituida por tres capas de diferente densidad, conteniendo dos esporoquistes elipsoidales (8 x 6 μm) y cada uno con cuatro esporozoítos. Ultraestructuralmente los esporozoítos son similares a los taquizoítos excepto que presentan mayor cantidad de micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina (Dubey, Lindsay *et al*, 1998; Hill *et al*, 2005; Speer y Dubey, 2005). El conjunto de estas divisiones asexuales y sexuales en los enterocitos, representa el ciclo enteroepitelial dentro del ciclo biológico. Conforme los ooquistes maduran y crecen, generan la ruptura del enterocito afectado, liberándose a la luz intestinal, los cuales se eliminarán posteriormente al ambiente a través de las heces del hospedador como ooquistes no esporulados (Tenter *et al*, 2000; Hill *et al*, 2005). La carga parasitaria de ooquistes generalmente llega a millones durante el periodo en que se eliminan (Montoya, 2004; Saeij *et al*, 2005; Fowler y Miller, 2008). Bajo condiciones de laboratorio, gatos infectados pueden llegar a eliminar 500 millones de ooquistes aproximadamente. En condiciones ambientales, se ha estimado que se pueden encontrar hasta 13 millones de ooquistes por gramo de material fecal de felino infectado (Dubey, Jones *et al*, 2008).

En el exterior, los ooquistes esporulan al exponerse al aire y la humedad durante uno a cinco días, conteniendo dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos. La totalidad del ciclo enteroepitelial de *T. gondii* puede completarse en el transcurso de 3 a 10 días cuando se ingieren quistes tisulares (bradizoítos); en el caso de la ingesta de taquizoítos, se excretan ooquistes a los 13 días o más y cuando ingieren ooquistes, se eliminan estos a los 18 días o más (Dubey y Beattie, 1988; Dubey, 2002; Hill, 2005; Greene, 2000; Correa, 2006). Simultáneamente con el progreso del ciclo enteroepitelial, los bradizoítos también pueden penetrar la lamina propia de la pared intestinal, multiplicándose como taquizoítos. En el lapso de unas cuantas horas postinfección, *T. gondii* puede diseminarse a tejidos extraintestinales, tanto por vía linfática como sanguínea (Dubey y Beattie, 1988; Dubey, 1998; Hill *et al*, 2005).

Cuando los hospedadores definitivos ingieren taquizoítos u ooquistes de otros felinos, los protozoarios alcanzan el tracto intestinal y desarrollan el ciclo enteroepitelial de forma similar a la ingesta de quistes tisulares (Dubey y Beatie, 1988; Black y Boothroyd, 2000).

En los hospedadores intermediarios, tras la ingestión de cualquiera de los estadios infecciosos, éstos se diferencian a taquizoítos a nivel intestinal y posteriormente se diseminan extraintestinalmente de forma similar a los hospedadores definitivos, desarrollándose bajo dos fases de multiplicación asexual. En la primera fase, los taquizoítos se multiplican rápidamente por endodiogenia, en células de múltiples tejidos del hospedador, hasta alcanzar varias generaciones y formar pseudoquistes. Los taquizoítos de última generación son los iniciadores de la segunda fase de desarrollo asexual, resultando en la generación de bradizoítos de multiplicación lenta por endodiogenia, contenidos en un quiste tisular. Los quistes tisulares predominan en el sistema nervioso central, ojo, músculo cardíaco y esquelético; sin embargo, también es posible encontrarlos, en menor cantidad, en órganos viscerales como hígado, pulmón y riñón. Se consideran a los quistes tisulares como el estadio final del ciclo de vida en los huéspedes intermedios, con capacidad infecciosa inmediata, pudiendo persistir de por vida en varios hospedadores. En hospederos intermedios, tras el desarrollo de quistes tisulares, pueden transcurrir episodios largos de tiempo (meses o incluso años) y romperse esporádicamente algunos quistes tisulares con la liberación de bradizoítos, los cuales se transforman nuevamente a taquizoítos teniendo la capacidad de reinfectar diferentes tejidos. (Tenter *et al*, 2000; Hill *et al*, 2005).

1.5 Genoma, genotipos y genotipificación

La biología molecular contemporánea se ocupa principalmente de la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética, que en último termino determinan la estructura y función celular (Cooper y Hausman, 2007).

Se define como genoma a la totalidad de la información genética perteneciente a una célula u organismo, en otras palabras, está constituido por la totalidad de genes que componen el DNA de dicho organismo, dispuestos dentro de los cromosomas. Los genes son las unidades físicas y funcionales de la herencia, que transmiten la información de una generación a otra, correspondiendo habitualmente a un segmento de DNA que codifica para una macromolécula (una sola proteína o un solo RNA) con función celular específica. Los cromosomas son las estructuras portadoras de los genes, consistentes en moléculas largas de DNA y proteínas asociadas (Alberts *et al*, 2004; Cooper y Hausman, 2007). El genotipo corresponde al conjunto específico de alelos que conforman el genoma de un individuo. Los alelos son las formas alternativas de un gen que se pueden presentar en un *locus*. Los *locus* corresponden al lugar de un gen dentro del genoma (Alberts *et al*, 2004).

Khan y colaboradores (2005) estudiaron el genoma de *T. gondii*, desarrollando un mapa genético (Figura 6) donde analizaron la segregación de marcadores polimórficos de DNA en progenies recombinantes (71 progenies) de distintas cruzas de genotipos predominantes (tipo II con III y tipo I con III), analizándolas con 250 marcadores genéticos. Los resultados de dicho estudio determinaron un mapa geonómico de *T. gondii* compuesto por 14 cromosomas, mayor cantidad que los 11 cromosomas descritos en los trabajos de Sibley *et al* (1992) y Su *et al* (2002). Los cromosomas determinados se denominaron Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI y XII; teniendo un tamaño físico de 61 645 498 pb y un tamaño genético de aproximadamente 592 cM.

Hasta hace unos años, la mayoría de los aislamientos de *T. gondii* fueron considerados clonas, con una discreta diversidad genética, derivándose la mayor parte de la información a partir de humanos y animales, tanto enfermos o aparentemente sanos dentro de un ciclo doméstico o urbano, provenientes de Europa y Norteamérica, agrupándose en uno de los tres tipos genéticos o linajes predominantes denominados I, II y III, con base en electroforesis de isoenzimas, el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) del gen *SAG2* (entre otros

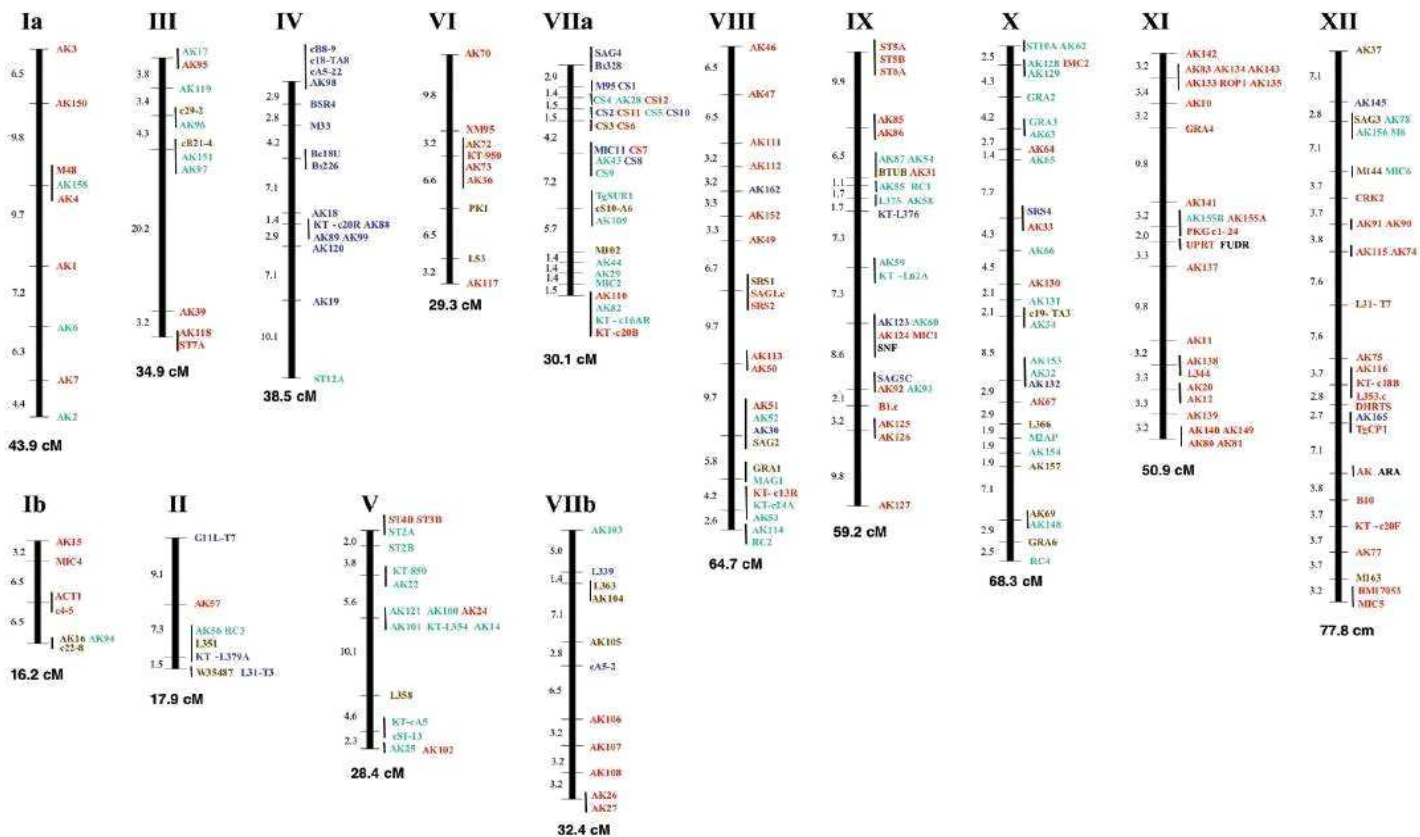


Figura 6. Mapas genéticos de 14 cromosomas de *Toxoplasma gondii*. Representación de cromosomas y marcadores genéticos, observándose los números asignados a cada mapa en la parte superior y su tamaño en centimorgan (cM) en la parte inferior. Los nodos de diferentes marcadores se indican a la derecha del cromosoma y la distancia genética entre cada nodo se expresa a la izquierda. Marcadores que se encuentran en un mismo nodo se indican a la derecha con una barra vertical. Polimorfismos únicos para el genotipo I se encuentran en color rojo, para genotipos II en verde, para genotipos III en azul y marcadores con múltiple polimorfismo se observan en color café.

marcadores) y la tipificación de microsatélites. La diferenciación de genotipos o genotipificación ha sido estudiada también por otras técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación de DNA y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de polipéptidos polimórficos de antígenos de gránulos densos, entre otros. La variabilidad genética entre las cepas se consideraba relativamente baja, siendo del 1% o menor. Sin embargo, estudios recientes, basados en nuevos marcadores para la caracterización de genotipos de nuevos aislamientos en diferentes partes del mundo, han revelado una alta variabilidad genética (Ajzenberg *et al*, 2002a; Ajzenberg *et al*, 2004; Darde, 2004; Saeij *et al*, 2005; Switaj *et al*, 2005; Su *et al*, 2006; Dubey, Quirk *et al*, 2008; Dubey y Jones, 2008)

Los linajes presentan distribución diversa en diferentes partes del mundo, variando su patogenicidad en las diferentes especies afectadas. Algunos estudios recientes en cepas aisladas de pacientes humanos en la Guinea Francesa y cepas de gallinas de Brasil, sugieren un alto rango de transmisión y cruzamiento, en contraste con lo observado en aislamientos de pacientes humanos y animales domésticos en Norteamérica y Europa. En áreas donde los sistemas de crianza de ganado es reciente o extensivo (como Brasil o África) y el ciclo silvestre de *T. gondii* ocurre entre felinos silvestres y una alta diversidad de huéspedes intermediarios no domésticos (selva del Amazonas o Guayana Francesa), los genotipos atípicos o recombinantes prevalecen, debido al intercambio genético y la alta diversidad de variantes que se pueden generar. Sin embargo, también se han encontrado en raras ocasiones cepas atípicas o recombinantes en Europa y Estados Unidos, (Darde, 2004; Saeij *et al*, 2005; Su *et al*, 2006).

En la actualidad, gracias al estudio del genoma de *T. gondii*, *Toxoplasma* Genome Map Database, (http://toxomap.wustl.edu/Toxo_Genetic_Map_Table.html), se han descrito más de 200 marcadores genéticos, facilitando su disposición para estudios de genotipificación. Más de 73 000 genes y secuencias expresadas se encuentran disponibles en el Gen Bank y pueden ser analizadas a través de paginas web del genoma de *T. gondii* (Darde, 2004).

La diversidad de alelos detectados para la mayoría de estos marcadores es bajo (2 a 4 alelos). Este es el caso para marcadores de isoenzimas, como el sistema enzimático polimórfico 6 (aspartato aminotransferasa, glutatión reductasa, amilasa, glucosa fosfato isomerasa, fosfatasa ácida, propionil esterasa) que presenta solo 2 o 3 isoformas en una población de 83 aislamientos (Cuadro 2) (Darde, 2004; Sundar *et al*, 2008)

De igual manera, esto aplica para la diversidad alélica detectada por PCR-RFLP o por secuencia de copias sencillas de genes, como los genes que codifican antígenos mayores (antígenos de superficie, gránulos densos o antígenos de roprotrias), genes que codifican otros productos de *T. gondii* (α -tubulina, β -tubulina, actina, nucleosido trifosfatasa, DNA polimerasa- α) o genes con función no conocida (*850*, *L320*, *62B*, *226*, *C19*, *B1*) (Cuadro 2). Una proporción de polimorfismo alto es detectado por algunos microsatélites localizados en el intrón de genes conocidos (*TUB2* codificando para β -tubulina, *TgM-A* codificando para miosina-A) o en una secuencia expresada (*EST W35487*) (Darde, 2004).

La secuenciación de DNA de diferentes aislamientos puede ser empleada como un método de tipificación para detectar polimorfismo de nucleótidos o deleciones en diversos niveles de pares de bases (Darde, 2004; Sundar *et al*, 2008).

Dependiendo la metodología empleada, un mismo marcador puede poner en evidencia polimorfismo variable entre diversas cepas y distinguir entre los tres tipos principales (Darde, 2004); sin embargo algunos autores han empleado para genotipificación de *T. gondii* (mediante PCR-RFLP), desde tres hasta once marcadores, que dependiendo el origen de las cepas (por ejemplo Europa o Sudamérica) y el hospedero afectado (humanos, gallinas, gatos o fauna silvestre), en unas ocasiones distinguen entre los genotipos predominantes, mientras que en otras solo se logra poner en evidencia diversos tipos recombinantes o atípicos (Ajzenberg *et al*, 2002; Djurkovic-Djakovic *et al*, 2006; Miller, Miller *et al*, 2008; Pena *et al*, 2008)

Cuadro 2. Marcadores genotípicos y fenotípicos empleados en estudios de diversidad genética de *Toxoplasma gondii*.

Marcadores fenotípicos o genéticos con bajo polimorfismo

Isoenzimas

Aspartato aminotransferasa, amilasa, propionil esterasa, glucosa fosfato isomerasa, glutation reductasa, fosfatasa ácida

Genes codificantes para antígenos mayores

Antígenos de superficie: *SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *SAG4*, *MAG1*, *BSR4*, *SRS1*, *SRS2*, *SRS3*

Antígenos de organelos: *GRA1*, *GRA2*, *GRA3*, *GRA4*, *GRA6*, *ROP1*

Nucleosido trifosfatasa: *NTP*

Otros genes con función conocida

Actina (*ACT1*), α -tubulina (*TUB1*), β -tubulina (*TUB2*), *B10*, Dihidrofolato reductasa (*FOL1*), DNA polimerasa (*POL1*)

Genes con función desconocida

850, *L328*, *62B*, *226*, *C19*, *B1*

Microsatélites:

β -tubulina (*TUB2*), miosina-A (*TgM-A*), EST *W35487*

Marcadores genéticos con alto polimorfismo

Secuencias repetidas en el genoma:

BS, *TGR*, *REP* (elementos genéticos móviles)

Microsatélites

ESTs: N60608, N82375, N83021, N61191, AA519150

Loci: M6, M33, M48, M95, M102, M163

Tomado de: Darde ML. Genetic análisis of diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanita. 2004; 40 (1): 57-63.

1.6 Patogenia

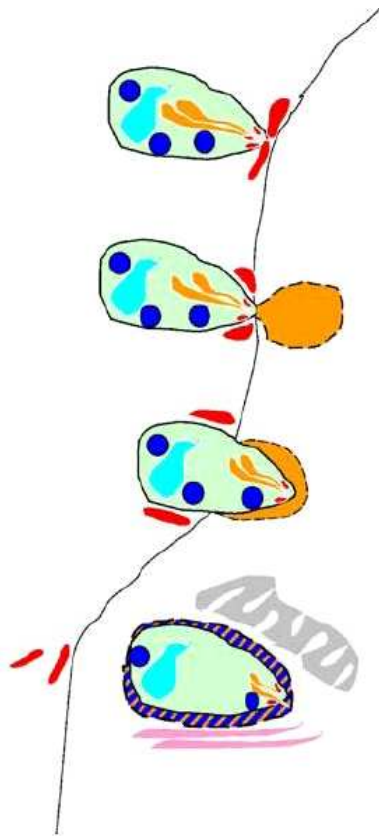
La patogenia de la infección por *T. gondii* en humanos como en animales depende de diversos factores donde se incluyen la virulencia de la cepa, la dosis infectante, el estadio del que se trate, el estatus inmunológico y la susceptibilidad del hospedador involucrado, entre otros factores (Montoya y Liesenfeld, 2004; Hill *et al*, 2005).

1.6.1 Invasión celular

Con el fin de comprender la capacidad de invasión celular de los estadios infecciosos de *T. gondii* y como participan sus diferentes organelos, se describirá la invasión celular por el estadio de taquizoíto.

La disposición polarizada en la que se encuentran los diferentes organelos y estructuras internas, permite a los taquizoítos moverse y desplazarse activamente, para llevar a cabo la invasión de diferentes células nucleadas, mediante eventos dependientes de calcio: 1) motilidad por deslizamiento (así como flexión, rotación y adaptar forma ondulada) sin necesidad de otros medios de locomoción como los cilios, flagelos o pseudópodos; 2) extrusión del conoide y 3) secreción de productos a partir de diferentes organelos (micronemas, roptrias y gránulos densos) (Dubey, 1998; Sibley, 2003).

La invasión celular por parte de *T. gondii* es un evento esencial para la sobrevivencia, replicación y manipulación de la célula hospedera; siendo dependiente del complejo apical y del contenido de organelos secretores que favorecen el contacto, anclaje, penetración, formación de la vacuola parasitofora (VP) y biogénesis de organelos. La invasión inicia cuando el parásito hace contacto con la célula del hospedador y logra desplazarse sobre su superficie (Figura 7). El mecanismo de locomoción es manejado por el parásito a través del complejo apical (considerado como un sistema motor intracuticular de actina-miosina), el cual está íntimamente relacionado con el complejo membranoso interno y las proteínas de adhesión transmembranosa secretadas por los micronemas. Los micronemas son organelos que descargan su contenido por la



Adherencia del taquizoito por la acción del contenido de los micronemas

Secreción del contenido (proteínas) de las roptrias
Entrada del parásito por el efecto de rotación del conoide: motor de actina-miosina

Formación de la vacuola parasitofora (VP)
Las proteínas de los micronemas se delimitan al exterior sin tener contacto con la VP

El parásito en la VP secreta el contenido de los gránulos densos, favoreciendo la adquisición de nutrientes y regulando el tráfico de proteínas
La VP se delimita por mitocondrias y retículo endoplasmico de la célula hospedadora
Las proteínas de los micronemas se eliminan al medio

Figura 7. Etapas de invasión celular de *Toxoplasma gondii*. En la imagen se resumen las etapas de invasión celular, siendo un proceso rápido y dinámico, orquestado por la secuencia de la secreción del contenido de los micronemas (rojo), roptrias (naranja) y gránulos densos (azul), aunado a la acción del conoide, la formación de la vacuola parasitofora, concluyendo con la manipulación y control de la célula afectada.

Tomado y modificado de: Kim K. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. Acta Tropica. 2004; 91: 69-81.

fusión de la porción final del extremo apical con la membrana plasmática de la célula del hospedero. La secreción de proteínas ocurre continuamente conforme el parásito se desliza sobre la superficie, cubriendo la membrana celular del hospedador y el plasmalema parasitario. Una vez que se logra un ambiente adecuado para la invasión, el parásito libera una descarga secuencial del contenido de otros organelos secretores para mediar su entrada a la célula (Carruthers, 1999; Carruthers, 2002; Sibley, 2003; Kim, 2004; Muñiz *et al*, 2005; Patrón *et al*, 2005; Carruthers, 2006; Bradley y Sibley, 2007; Dubremetz, 2007; Boothroyd y Dubremetz, 2008; Kim y Weiss, 2008; Laliberte y Carruthers, 2008).

En el primer evento, el contenido de los micronemas se congrega en la superficie anterior del parásito, ligando receptores del hospedador y mediando la adherencia apical. Inmediatamente después de este evento, el contenido de roptrias (segunda clase de organelos de secreción) es extruído a través del conducto apical que se forma, movilizándolo a la superficie por lo menos tres diferentes proteínas secretadas de las roptrias (Figura 7), que se asocian con proteínas de los micronemas, a nivel del punto de unión en movimiento constante, aposicionando estrechamente las membranas plasmáticas de la célula del hospedador y la del parásito. Con el movimiento rotatorio constante y la acción secretoria, el zoíto presiona la membrana plasmática de la célula hasta lograr penetrarla y formar la VP. Las proteínas y lípidos de las roptrias son inyectados al interior de la célula del hospedador y una vez dentro, se reconfiguran formando pequeñas vesículas (evacuolas) que se fusionan con la VP, favoreciendo la entrada del parásito a la célula del hospedador. El movimiento rotatorio excluye la mayoría de los componentes de la superficie, siendo pieza clave de la estrategia de sobrevivencia evitando la acidificación y fusión con los sistemas endocíticos y lisosomales. Minutos después de la penetración del parásito, la tercera clase de organelos de secreción llamados gránulos densos, vierte su contenido proteínico al interior (Figura 7), modificando las condiciones de la VP, participando en la adquisición de nutrientes y considerándose también como reguladores del tráfico de proteínas (Carruthers, 1999; Carruthers, 2002; Sibley, 2003; Kim, 2004; Muñiz

et al, 2005; Nopal-Guerrero *et al*, 2005; Carruthers, 2006; Bradley y Sibley, 2007; Boothroyd y Dubremetz, 2008; Kim y Weiss, 2008; Laliberte y Carruthers, 2008).

Después de entrar, el taquizoíto mantiene su forma arqueada o puede adquirir forma ovoide, quedando delimitado en la VP con la formación de un sistema membranoso tubulovesicular interno, confiriéndole estabilidad y protección contra los mecanismos de defensa del hospedero. Dentro de la célula afectada el taquizoíto se multiplica asexualmente por repetidas divisiones (endodiogenia) (Figura 8), hasta que la célula queda repleta de parásitos. Los protozoarios raramente se dividen simultáneamente, por lo que la progenie se dispone aleatoriamente sin algún arreglo en particular, sin embargo, en ocasiones se dividen sincronizadamente disponiéndose en forma de rosetas (Dubey y Beattie, 1988; Hill *et al*, 2005; Correa *et al*, 2006; Carruthers, 2006; Kim y Weiss, 2008; Laliberte y Carruthers, 2008).

Independientemente de coordinar la secreción de una serie de sustancias para la invasión celular, estabilidad dentro de la VP, mantenimiento de nutrientes y eludir los mecanismos de defensa del hospedero, los taquizoítos tiene la capacidad de evitar la muerte celular de las células afectadas por apoptosis, mediante la inactivación de las vías intrínsecas y extrínsecas: inhibición del apoptosoma y caspasas 3, 8 y 9; incremento del Bcl-2, Bfl-1, Bcl-xL y Mcl-1; decremento del Bax y Bad entre otras sustancias (Fernández-Presas; 2000; Kim *et al*, 2006; Carmen, 2007; Kim y Weiss, 2008; Laliberte y Carruthers, 2008).

1.6.2 Relación Parásito-Hospedador

Toxoplasma gondii usualmente parasita al hospedador, definitivo e intermediario, sin producir enfermedad clínica, siendo poco frecuentes los casos clínicos severos. Independiente del tipo de estadio con el que se infecte, ya sea por la ingestión de carne infectada con quistes tisulares o por alimento contaminado con ooquistes, al alcanzar la luz intestinal tanto los bradizoítos como esporozoítos, penetran las células epiteliales multiplicándose dentro de las primeras 24 horas postinfección, generando múltiples taquizoítos. Estos se

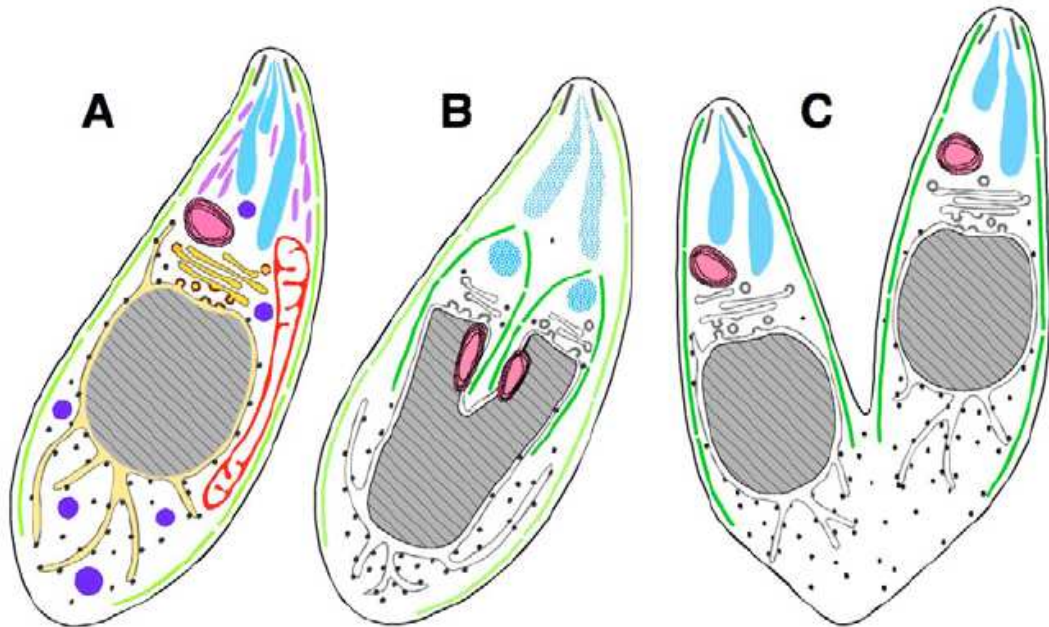


Figura 8. División por endodiogenia de *Toxoplasma gondii*. La imagen representa diferentes etapas durante la división de tachizoítos (secciones longitudinales) generando nuevas clonas a partir de un zoíto antecesor. En la imagen A se observa el tachizoíto en interfase, presentándose las estructuras subcelulares como se distribuyen habitualmente: conoide (líneas negras), complejo membranoso interno (CMI, línea verde claro), roptrias (turquesa), micronemas (lavanda), gránulos densos (azul), apicoplasto (rosa), mitocondria (rojo), aparato de Golgi (dorado) y núcleo (gris), rodeado por retículo endoplasmático (amarillo claro). Al iniciar la división (B), se empieza a formar en el interior del tachizoíto el CMI (verde fuerte) de las futuras células hijas, al mismo tiempo que el apicoplasto y el aparato de Golgi se dividen y el núcleo se empieza a bifurcar. El aspecto granular de las roptrias (célula madre) indica la fragmentación de su contenido y su síntesis *de novo* en las roptrias de las células hijas. En C, el CMI de las células hijas se forma casi en su totalidad, emergiendo la formación de dos nuevos zoítos, adquiriendo el CMI de la célula madre, fraccionándose por completo el núcleo y redistribuyéndose el resto de las estructuras subcelulares.

Tomado y modificado de: Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*. 2008; 121: 1559-1568.

diseminan a linfonodos mesentéricos y después a través de vasos linfáticos y sanguíneos, alcanzan diferentes órganos, multiplicándose virtualmente en cualquier célula del cuerpo del hospedero. El cuadro clínico es determinado por la extensión del daño en los tejidos afectados y las lesiones necróticas son causadas por el crecimiento intracelular de los taquizoítos, acompañado por una respuesta inflamatoria franca. Los taquizoítos proliferan indiscriminadamente en cualquier célula nucleada y se diseminan a cualquier tejido del hospedador, incrementando la densidad parasitaria. El hospedador puede morir por un cuadro de toxoplasmosis aguda debido a las lesiones necróticas de intestino y linfonodos mesentéricos, aunado a la lesión en otros tejidos, sin embargo, en la mayoría de los casos, el hospedero se recupera adquiriendo inmunidad con la aparición de anticuerpos humorales (Dubey y Beattie, 1988; Ferguson, 2004; Hill *et al*, 2005).

La infección en un individuo inmunocompetente estimula una respuesta innata seguida de una adaptativa humoral y celular que restringe el crecimiento parasitario, por lo que la infección puede pasar inadvertida y autolimitante. En la fase aguda hay producción de anticuerpos de clase IgM e IgA, que alcanzan su máximo nivel a las dos o tres semanas y posteriormente decaen. Algunas observaciones recientes indican que los anticuerpos IgM pueden durar hasta dos años, por lo que su presencia no siempre se liga a la fase aguda de la infección (Figura 9). La IgG aparece dos o tres semanas después de la IgM, y alcanza su concentración máxima dos meses más tarde, persistiendo en bajos niveles de por vida, manteniéndose la parasitosis por los quistes tisulares (Correa *et al*, 2006).

Todas las formas extracelulares del parásito son afectadas directamente por los anticuerpos, pero no las formas intracelulares tras la formación de los quistes tisulares (alrededor de la tercera semana postinfección), los cuales se localizan en sistema nervioso y muscular principalmente, donde pueden persistir por varios años (Dubey y Beattie, 1988; Hill *et al*, 2005).

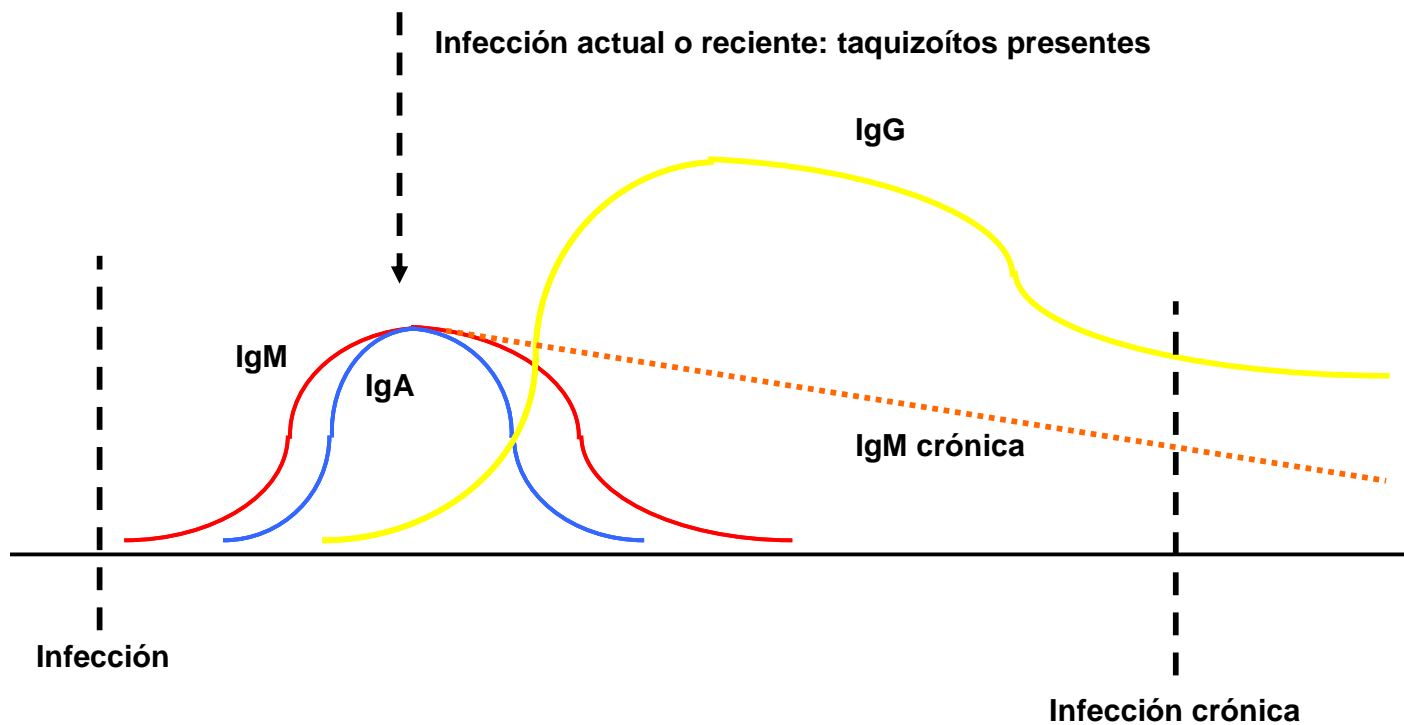


Figura 9. Respuesta de anticuerpos específicos ante una primo-infección por *Toxoplasma gondii*. Al inicio de la infección los primeros anticuerpos en aparecer son los de clase IgM (línea roja) e IgA (línea azul), desapareciendo a los tres o cuatro meses postinfección, aunque actualmente se sabe que en cierta proporción de casos, es posible detectar anticuerpos IgM hasta los dos años o más (líneas naranjas punteadas). En la fase aguda de la infección, tras incrementarse la producción de los primeros anticuerpos, los de clase IgG (línea amarilla) se empiezan a formar, siendo de baja avidéz. Conforme la infección tiende a la cronicidad, los anticuerpos IgG alcanzan su título más alto manteniéndose estables y con avidéz alta.

Tomado y modificado de: Correa D, Coballase UE, Cañedo SI, Rico TC. Toxoplasmosis. En: Flisser A, Pérez TR, editores. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos. México, D.F., México. 2006: 355-367.

1.7 Infección por *T. gondii* y genotipos relacionados

1.7.1 Toxoplasmosis en humanos

T. gondii es un protozooario prevalente en la mayoría de las zonas del mundo y se considera que más de un tercio de la población mundial se encuentra infectada crónicamente por este parásito. La prevalencia en humanos depende de la localización geográfica, oscilando entre el 15 y 85 % de la población adulta. En Estados Unidos y el Reino Unido se estima una prevalencia en personas del 16 al 40%, mientras que en Centro y Sudamérica, así como el resto de Europa, la prevalencia alcanza del 50 al 80% (Tenter *et al*, 2000; Dubey, 2004; Ajzenberg *et al*, 2004; Ajzenberg *et al*, 2005; Su *et al*, 2006).

Las infecciones humanas son causadas principalmente por la ingestión de carne no cocida conteniendo quistes tisulares viables o por la ingesta de alimentos o agua contaminada con ooquistes. La mayoría de los individuos se infectan inadvertidamente, por lo que no puede ser establecida la ruta específica de transmisión en la mayoría de los casos (Dubey, 2004; Montoya y Liesenfeld, 2004; Su *et al*, 2006). La transmisión de *T. gondii* asociada a, transplante de órganos, es una fuente potencial de causa de enfermedad en pacientes receptores seronegativos con transplante de corazón, pulmón, riñón, hígado y páncreas. Pacientes seropositivos a *T. gondii* que son sometidos a este tipo de intervenciones quirúrgicas, pueden desarrollar la reactivación de una infección latente (Montoya y Liesenfeld, 2004). Taquizoítos de *T. gondii* han sido encontrados en leche de varios huéspedes intermediarios (ovinos, cabras y vacas), así como, en otros fluidos corporales incluyendo sangre, saliva, esputo, orina, lágrimas y semen (Tenter *et al*, 2000).

En niños y adultos inmunocompetentes, la infección es usualmente asintomática; sin embargo, en un porcentaje bajo de los casos se puede llegar a presentar linfadenopatía cervical u occipital, fiebre, fatiga, dolor muscular, dolor de garganta, rigidez de cuello, cefalea y anorexia, entre otros signos. Así mismo, se han descrito cuadros clínicos con desarrollo de coriorretinitis o presentación

pulmonar (Montoya y Liesenfeld, 2004; Ajzenberg *et al*, 2005; Hill *et al*, 2005; Su *et al*, 2006; Correa *et al*, 2006).

Los aislamientos tipo II son los más predominantes (alrededor del 80%) en casos de toxoplasmosis sintomática y en menor proporción en casos asintomáticos y asociados a consumo de carne (bovino, ovino, cerdo o ave), en Europa y Estados Unidos. Sin embargo otros estudios sugieren que aislamientos tipo I o recombinantes de tipos I y III, son más probables de causar toxoplasmosis clínica (Darde, 2004; Dubey y Jones, 2008).

En pacientes inmunocomprometidos la reactivación de infecciones latentes pueden generar encefalitis clínica mortal, siendo la toxoplasmosis la primera causa de muerte en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los pacientes pueden presentar cefalea, somnolencia, desorientación, cambio en los reflejos, hemiparesis, convulsiones e incluso caer en estado de coma, siendo la lesión predominante en el encéfalo focos de necrosis localizados principalmente a nivel del tálamo (Dubey, 2004; Ajzenberg *et al*, 2005; Hill *et al*, 2005; Su *et al*, 2006). El estudio de genotipos en pacientes inmunocomprometidos llevado a cabo por Howe y colaboradores (1997) basado en el análisis de un *locus* (SAG2, PCR-RFLP), determinó al genotipo II como el más predominante (75%) en casos de toxoplasmosis cerebral y extracerebral, en pacientes con SIDA y con otras entidades (linfoma, trasplante de órganos). Ferreira y colaboradores (2008) evaluaron 87 cepas de *T. gondii* aisladas de pacientes con toxoplasmosis cerebral y SIDA, en el estado de Sao Paulo, Brasil. A partir de muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo, se llevaron a cabo estudios de PCR empleando cuatro marcadores (5´-SAG2, 3´-SAG2, SAG3 y GRA6), cuyos productos de amplificación se digirieron posteriormente con enzimas de restricción (PCR-RFLP) resultando 40 pacientes (46%) infectados con aislamientos tipo I, cuatro (4%) con tipo III, 13 (15%) con cepas polimórficas, seis (6.8%) pacientes con cepas que presentaban alelos tipo I o II y 15 (17%) con cepas que no pudieron ser identificadas con los marcadores empleados.

La infección congénita puede ocurrir posterior a la infección materna durante la gestación. La frecuencia y gravedad dependen del periodo del embarazo en el cual se infecta la madre. La infección durante el primer trimestre de gestación se transmite en baja frecuencia al embrión en desarrollo (2 al 15% de los casos), pero si se presenta, generalmente se desencadena aborto. Durante el segundo trimestre, la tasa de transmisión vertical aumenta y los fetos infectados suelen nacer prematuramente o con problemas clínicos severos, incluyendo cuadro neurológico prominente con secuelas graves (meningoencefalitis granulomatosa con hipertensión intracraneana, hidrocefalia secundaria a ependimitis y ventriculitis y calcificaciones cerebrales difusas). En el tercer trimestre de gestación, la tasa de transmisión madre-hijo es de 50 a 80% pero la mayoría de los bebés nacen asintomáticos y a término. Sin embargo, se pueden presentar posteriormente secuelas neurológicas, oftalmológicas o auditivas en un tiempo que puede ser de tres meses a 20 años (Dubey, 2004; Su *et al*, 2006; Correa *et al*, 2006). La toxoplasmosis congénita es la principal fuente de aislamientos en humanos, aislándose el parásito a partir de fluido amniótico, placenta, sangre de cordón umbilical y de tejidos de fetos abortados. El genotipo predominante ha sido el tipo II, encontrándose bajo diferentes aspectos de la enfermedad congénita: infección mortal, afección neuro-ocular grave, corioretinitis o infección latente. El principal factor que condiciona la severidad de la infección congénita implica el periodo de gestación en el que se infecta la madre y/o el producto. Sin embargo, se ha visto que cepas tipo II pueden ser no virulentas para ratones y muy patógenas para fetos humanos, y de igual manera, estas cepas se han encontrado en casos latentes o asintomáticos. Cepas tipo I o atípicas han sido aisladas también de casos de toxoplasmosis congénita, generando usualmente casos clínicos severos (Darde, 2004).

A la fecha hay poca información sobre la diversidad genética de los aislamientos de *T. gondii* circulando en la población humana en general. La información generada tiene que ser evaluada con precaución, considerando con cautela la relación del genotipo con el hospedador afectado y el desarrollo de

enfermedad. En Brasil, cepas atípicas de gallinas y gatos sin signos clínicos, son virulentas para ratones, con comportamiento similar al de aislamientos de casos clínicos en humanos (Dubey y Jones, 2008).

1.7.2 Toxoplasmosis en animales domésticos

En muchos animales domésticos, *T. gondii* puede desencadenar enfermedad clínica grave y causar pérdidas económicas importantes, principalmente en ovinos y caprinos por muerte embrionaria y reabsorción del producto, muerte fetal, momificación, abortos (Figura 10), mortinatos y muerte neonatal. Los ovinos son particularmente susceptibles a la infección por *T. gondii*, siendo su presentación de distribución mundial. Además de la transmisión congénita, los ovinos se pueden infectar a partir de la ingestión de ooquistes, siendo suficiente ingerir 20 ooquistes aproximadamente para desarrollar una infección franca (Owen y Trees, 1999; Dubey, 2004).

Se han descrito brotes de toxoplasmosis en cerdos en varios países, causando cuadros de neumonía, miocarditis, encefalitis y necrosis placentaria, con alta mortalidad en animales jóvenes. Así mismo, se han presentado brotes esporádicos y diseminados en liebres, aves y otros animales domésticos. (Dubey, 2004; Hill *et al*, 2005).

En animales de compañía, posterior a la infección por el virus de moquillo canino, se puede presentar toxoplasmosis sistémica mortal en perros inmunosuprimidos y en el caso de los gatos posterior a la infección por diferentes retrovirus (Hill *et al*, 2005). Toxoplasmosis cutánea también ha sido descrita en estas especies, presentándose nódulos solitarios o múltiples, con o sin úlceras, con la posibilidad de desarrollar toxoplasmosis sistémica si cursan bajo alguna condición de inmunosupresión, ya sea por enfermedad o tratamiento (Anfray *et al*, 2005).

En los animales domésticos, genotipos de *T. gondii* se han determinado en gallinas de América, Europa, África y Asia; gatos de Brasil, Colombia y China;



Figura 10. Aborto ovino asociado a toxoplasmosis congénita.

Fuente: Carlos Cedillo Pelaez, Departamento de Patología, FMVZ de la UNAM.

perros de Brasil, Colombia, Vietnam y Sri Lanka; cerdos de Japón y Brasil y en ovinos de Estados Unidos e Inglaterra, principalmente (Dubey y Quirk, 2008).

Owen y Trees (1999) estudiaron el genotipo de *T. gondii* en abortos de ovinos del Reino Unido, evaluando muestras de placenta (cotiledones) mediante PCR-RFLP empleando el marcador SAG2. El análisis de los 13 casos estudiados determinó el genotipo II en todas las muestras evaluadas.

Mondragón y colaboradores (1998) analizaron 43 aislamientos de *T. gondii* provenientes de cerdos, usando el marcador SAG2, determinando al genotipo II como el más común, sin embargo, varios aislamientos fueron identificado como tipo III (16.3% de los casos). Zakimi *et al* (2006) evaluaron 91 linfonodos de cerdos provenientes de Okinawa, Japón, los cuales presentaban cambios de tipo hemorrágico o necrótico sugerentes de toxoplasmosis. Los tejidos fueron evaluados por microscopía óptica para la detección de los parásitos y por PCR para la detección de DNA del protozoario usando el gen SAG2, resultando 54 y 57 muestras positivas a *T. gondii*, respectivamente. Posteriormente, mediante PCR-RFLP y secuenciación del gen *GRA6*, 29 muestras pudieron genotipificarse resultando 13 tipo I (44.8%), 14 tipo II (48.3%) y 2 tipo III (6.9%).

En el caso de las gallinas, es la especie doméstica donde más se ha estudiado la distribución y variación genética de *T. gondii*. Lehmann y colaboradores (2006) analizaron la estructura poblacional de *T. gondii* de 275 aislamientos provenientes de gallinas de traspatio de cuatro continentes, mediante el análisis de siete *loci* polimórficos, incluyendo un microsatélite y cinco *loci* de segmentos cortos repetitivos (STR), así como el marcador SAG2. Los resultados revelaron discreta diversidad genética entre las poblaciones de Eurasia, África y Norteamérica, pero gran diferencia entre estas y Sudamérica. Las poblaciones de Norteamérica fueron notablemente similares con las de Eurasia y África, independiente de las distancias entre las regiones.

Actualmente, se continúan estudiando los genotipos en este tipo de aves, habiendo sido analizados (empleando de uno a once marcadores genéticos) a la fecha, más de 631 aislamientos provenientes de 29 países (Cuadro 3).

Cuadro 3. Genotipos de *Toxoplasma gondii* aislados a partir de gallinas.

Continente	Pais y año	Cantidad de aislamientos	Genotipo (s)	Referencia
América	Brasil (Sao Paulo), 2002	25	I y III	Dubey, Graham <i>et al</i> , 2002
	Brasil (Rio de Janeiro), 2003	48	I, III y RE	Dubey, Graham <i>et al</i> , 2003
	Brasil (Parana), 2003	13	I y III	Dubey, Navarro <i>et al</i> , 2003
	Argentina, 2003	9	I, II y III	Dubey, Venturini <i>et al</i> , 2003
	Estados Unidos, 2003	22	II, III y ND	Dubey, Graham <i>et al</i> , 2003
	México, 2004	6	I y III	Dubey, Morales <i>et al</i> , 2004
	Perú, 2004	10	I y III	Dubey, Levy <i>et al</i> , 2004
	Colombia, 2005	24	I y III	Dubey, Gómez-Marín <i>et al</i> , 2005
	Granada, 2005	44	I, III y RE	Dubey, Bhaiyat <i>et al</i> , 2005
	Guatemala, 2005	8	I y III	Dubey, López <i>et al</i> , 2005
	Venezuela, 2005	13	II y III	Dubey, Lenhart <i>et al</i> , 2005
	Argentina, 2005	17	I, II y III	Dubey, Marcel <i>et al</i> , 2005
	Brasil (Amazonas), 2006	24	I y III	Dubey, Gennan <i>et al</i> , 2006
	Chile, 2006	22	I, II y III	Dubey, Patitucci <i>et al</i> , 2006
	Costa Rica, 2006	32	I, III y RE	Dubey, Su <i>et al</i> , 2006
	Nicaragua, 2006	47	I, II, III, RE y AT	Dubey, Sundar <i>et al</i> , 2006
	Brasil (Para y Rio Grande do Sul), 2007	34	AT	Dubey, Sundar <i>et al</i> , 2007
	Guyana, 2007	35	III, RE y AT	Dubey, Applewhaite <i>et al</i> , 2007
	Estados Unidos, 2008	12	II	Dubey, Webb <i>et al</i> , 2008
	Europa	Austria, 2005	67	II
Portugal, 2006		16	II, III y ND	Dubey, Vianna <i>et al</i> , 2006
Italia, 2008		3	I y II	Dubey, Huong <i>et al</i> , 2008
Polonia, 2008		2	AT	Dubey, Huong <i>et al</i> , 2008

RE, recombinantes; ND, no determinados; AT, atípicos.

Cuadro 3. Genotipos de *Toxoplasma gondii* aislados a partir de gallinas (Continuación).

Continente	Pais y año	Cantidad de aislamientos	Genotipo	Referencia
África	Egipto, 2003	21	I, II y III	Dubey, Graham <i>et al</i> , 2003
	Mali, 2005	5	II y III	Dubey, Karhemere <i>et al</i> , 2005
	Kenia, 2005	1	II	Dubey, Karhemere <i>et al</i> , 2005
	Burkina Faso, 2005	1	III	Dubey, Karhemere <i>et al</i> , 2005
	Republica Democrática del Congo, 2005	10	I, II y III	Dubey, Karhemere <i>et al</i> , 2005
	Sri Lanka, 2005	11	II y III	Dubey, Rajapakse <i>et al</i> , 2005
	Ghana, 2006	2	RE y AT	Dubey, Huong <i>et al</i> , 2008
	Uganda	19	I, II, III, RE y AT	Lindström, Sundar, 2008
	Asia	India, 2003	7	I y III
Israel, 2004		19	II y III	Dubey, Salant <i>et al</i> , 2004
Indonesia, 2008		1	RE	Dubey, Huong <i>et al</i> , 2008
Vietnam		1	AT	Dubey, Huong <i>et al</i> , 2008

RE, recombinantes; ND, no determinados; AT, atípicos.

En gatos y perros, se han iniciado estudios similares al de las gallinas, prevaleciendo genotipos atípicos y recombinantes en 32 aislamientos de gatos y 73 de perros (Dubey, Su *et al*, 2006; Dubey, Zhu *et al*, 2007; da Silva *et al*, 2005; Dubey, Cortes-Vecino *et al*, 2007; Dubey, Gennari *et al*, 2007; Dubey, Huong *et al*, 2007; Dubey, Rajapakse *et al*, 2007).

1.7.3 Toxoplasmosis en fauna silvestre

En fauna silvestre, la toxoplasmosis se ha descrito de forma clínica o subclínica en una amplia gamma de hospedadores, tanto en animales carnívoros o herbívoros, en cautiverio o en vida libre, así como en mamíferos (terrestres y marinos) y aves. Algunas *taxa* presentan aparente resistencia a la enfermedad como los primates del viejo mundo, mientras que otras se consideran susceptibles como los marsupiales australianos, donde por lo general conlleva a la muerte de los animales afectados. Así mismo, existen informes sobre la presentación de brotes esporádicos de enfermedad en diferentes grupos de animales silvestres, sin la presencia de un factor inmunosupresor como tal (Fowler y Miller, 2003; Dubey, 2004; Hill, 2005).

En los animales silvestres, la toxoplasmosis se puede llegar a presentar de forma particular en ciertas familias, con curso y afección variable de órganos o sistemas, generando cuadros clínicos diversos, por ejemplo toxoplasmosis aguda en primates de nuevo mundo y wallabies (Dietz *et al*, 1997, Epiphonio *et al*, 2000; Basso *et al*, 2007;), toxoplasmosis diseminada en suricatas y lémures (Juan-Salles *et al*, 1997; Spencer *et al*, 2004), toxoplasmosis ocular en mustélidos y aves (Dubey, 2002a; Burns *et al*, 2003), toxoplasmosis crónica en canguros y zorrillos (Dubey y Beattie, 1988), toxoplasmosis cerebral en mamíferos marinos (Dubey, Zarnke *et al*, 2003; Miller, Miller *et al*, 2004; Thomas *et al*, 2007) y toxoplasmosis congénita en cérvidos (Dubey, Lewis, 2002; Lindsay *et al*, 2005; Dubey, Velmurugan *et al*, 2008). Sin embargo, dichas presentaciones no son predominantes de cada familia de animales afectados, pudiéndose presentar otros

cuadros clínicos en las mismas especies o bien incluso desarrollar cuadros asintomáticos y presentarse mortalidad asociada a otra etiología.

En los Estados Unidos y en algunos países de Europa, un porcentaje significativo de aves rapaces, osos, cérvidos, cánidos silvestres, felinos, mapaches, mustélidos, zarigüeyas y cerdos silvestres son seropositivos a *T. gondii* (Cuadro 4), lográndose aislamientos en diferentes especies. Toxoplasmosis mortal ha sido diagnosticada en animales remitidos para estudio de necropsia con diagnóstico diferencial de rabia, así mismo, se han descrito varios casos con presentación concomitante con infección por el virus de moquillo canino (Fowler y Miller, 2003; Hill *et al*, 2005).

Dubey, Graham y colaboradores (2004), evaluaron sueros de animales silvestres de Estados Unidos para la detección anticuerpos contra *T. gondii* y posteriormente realizaron aislamiento de animales seropositivos. El parásito fue aislado en 21 de 34 venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*), 7 de 29 mapaches (*Procion lotor*), 5 de 6 gatos monteses (*Lynx rufus*), un zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*), un zorro rojo (*Vulpes vulpes*), un coyote (*Canis latrans*) y de varios osos negros (*Ursus americanus*). Se han detectado quistes tisulares de *T. gondii* en carne de venado, liebre, cerdos silvestres, canguros, osos, caribú y otros cervidos, siendo una fuente potencial de transmisión para humanos. En Québec, Canadá, se diagnosticó seroprevalencia en linceos (44%) y gatos montes (40%) de vida libre (Fowler y Miller, 2003; Tenter *et al*, 2000; Hill *et al*, 2004).

Sedlak y Bartola (2006), evaluaron muestras serológicas de 556 animales representativos de 4 órdenes, 14 familias y 114 especies o subespecies, para la determinación de anticuerpos contra *T. gondii* y *N. caninum*. La seroprevalencia de *T. gondii* para todas las especies de mamíferos evaluados fue de 34.7% (193 de 556 animales) y la seropositividad fue en 72 de 114 especies evaluadas. Se apreció alta prevalencia en las familias hyaenidae, mustelidae, ursidae y viveridae de la orden carnívora, encontrándose los títulos más altos en gatos de pallas. Se

Cuadro 4. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en carnívoros silvestres.

Especie	Seroprevalencia	País
Oso negro (<i>Ursus americanus</i>)	15-84%	Estados Unidos
Oso pardo (<i>Ursus arctos</i>)	18-25%	Estados Unidos
Mink (<i>Mustela vison</i>)	3%	Dinamarca
	24.8%	Checoslovaquia
	54.2%	Estados Unidos
	66%	Reino Unido
Mapache (<i>Procyon lotor</i>)	13-70%	Estados Unidos
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	26-62%	Estados Unidos
Zorra roja (<i>Vulpes vulpes</i>)	85.9-90%	Estados Unidos
Zorra gris (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	25-75.3%	Estados Unidos
Zorrillos (<i>Mephitis mephitis</i>)	50%	Estados Unidos
Tlacuaches (<i>Didelphys marsupiales</i>)	13%	Estados Unidos

Tomado de: Hill, DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biological and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Animal Health Research Rev. 2004; 6(1): 41-61.

encontraron anticuerpos contra *T. gondii* en 89.7% de animales carnívoros, 45.5% de primates, 32.6% de perissodactyla y 22.4% de artidactyla (Cuadros 5 y 6).

Toxoplasmosis clínica ha sido diagnosticada raramente en felinos de vida libre, presentándose la mayoría de los casos en zoológicos: leones (*Panthera leo*) de 4 a 6 meses en Nigeria; en *Felis manul* de 6 años del zoológico de Milwaukee y en un colonia en el zoológico de California, Estados Unidos; en un gato montés de una semana y otro de 6 meses de edad en Estados Unidos; en un chita (*Acinonyx jubatus*) de 9 meses en Sudáfrica; entre otros. Ooquistes de *T. gondii* han sido descritos en *Prionailurus iriomotensis* infectados naturalmente, en jaguares (*Panthera onca*), en ocelotes (*Felis pardalis*), en chitas y en gato montés (*Lynx rufus*) (Hill *et al*, 2004).

En marsupiales, la toxoplasmosis es una de las enfermedades más comunes que afectan a macrópodos australianos bajo condiciones de cautiverio, siendo descrita su presentación en wallabies y canguros de zoológicos de diferentes partes del mundo. En vida libre, se ha informado la enfermedad clínica en *Thylogale billardiellii* y *M. rufogriseus* que habitaban zonas empleadas para el pastoreo de ovinos. La contaminación de las praderas con ooquistes de *T. gondii* a partir de felinos domésticos y silvestres, se considera la principal causa de transmisión a marsupiales (Dubey, Ott-Joslin *et al*, 1998; Hill *et al*, 2004).

La presentación de la toxoplasmosis no se limita a organismos terrestres, sino también abarca organismos con hábitat marino. Migaki y colaboradores (1977) describen toxoplasmosis en el corazón y estómago de un león marino (*Zalophus californianus*), bajo condiciones de cautiverio. Holshuh *et al* (1985) encontró *T. gondii* en lobos marinos (*Callorhinus ursinus*) que cursaron y murieron por cuadro de encefalitis. Lambourn y colaboradores (2001) describen prevalencia serológica de 7.6% en focas (*Phoca vitulina*) expuestas naturalmente en las costas de Washington, Estados Unidos. Toxoplasmosis ha sido diagnosticada en delfín del Atlántico o nariz de botella (*Tursiops truncatus*) en Canadá y Estados Unidos; en dos delfines (*Stenella coeruleoalba*) de España y en un delfín listado (*Stenella longirostris*) de Estados Unidos (Inskeep *et al*, 1990; Hill *et al*, 2004).

Cuadro 5. Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en animales de zoológico (por orden y familia) de la República Checa.

Orden	Animales evaluados	Animales positivos (%)	Familia	Animales evaluados	Animales positivos (%)
Primates	22	10 (45.5)	Cercopithecidae	11	2 (18.2)
			Hominidae	11	8 (72.7)
Carnivora	87	78 (89.7)	Canidae	32	28 (87.7)
			Felidae	41	38 (92.7)
			Hyaenidae	3	3 (100)
			Mustelidae	2	2 (100)
			Otariidae	2	0
			Ursidae	5	5 (100)
			Viviridae	2	2 (100)
Perissodactyla	46	15 (32.6)	Equidae	46	15 (32.6)
Artiodactyla	401	90 (22.4)	Bovidae	265	53 (20.0)
			Camelidae	19	5 (26.3)
			Cervidae	110	30 (27.3)
			Suidae	7	2 (28.6)

Tomado y modificado de: Sedlak K, Bartová E. Seroprevalencia of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*. 2006; 136: 223-231.

Cuadro 6. Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en animales de zoológico (por especie) de la República Checa.

Orden y familia	Especie o subespecie	Animales positivos	Rango de títulos
Primates			
Cercopithecidae	Barbary macaque (<i>Macaca sylvanus</i>)	2/10	1:640
Hominidae	Gorila (<i>Gorilla gorilla</i>)	4/5	1:320-1:1280
	Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)	1/1	1:80
	Orangután (<i>Pongo pygmaeus</i>)	3/5	1:320-1:640
Carnivora			
Canidae	Dingo (<i>Canis lupus dingo</i>)	1/2	1:160
	Lobo eurasiático (<i>C. lupus lupus</i>)	10/10	1:40-1:80
Felidae	Perro salvaje africano (<i>Lycaon pictus</i>)	6/9	1:40-1:80
	Fennec (<i>Vulpes zerda</i>)	2/2	1:320-1:2560
	Chita (<i>Acinonyx jubatus</i>)	13/15	1:320-1:5120
	Jaguarundi (<i>Herpailurus yaguarundi</i>)	1/1	1:5120
	Ocelote (<i>Leopardos pardales</i>)	1/1	1:320
	Serval (<i>Leptailurus serval</i>)	1/1	1:320
	Lince eurasiático (<i>Lynx lynx</i>)	2/2	1:2560-1:20480
	Manul o gato de Pallas (<i>Otocolobus manul</i>)	2/2	1:5120-1:40960
	León africano (<i>Panthera leo</i>)	2/2	1:40-1:80
	León asiático (<i>P. l. goojratensis</i>)	2/2	1:640-1:1280
Hyanidae	Jaguar (<i>P. onca</i>)	1/1	1:160
	Tigre siberiano (<i>P. tigris altaica</i>)	2/2	1:160-1:1280
	Tigre de Sumatra (<i>P. t. sumatrae</i>)	6/6	1:160-1:10240
	Tigre de Bengala (<i>P. t. tigris</i>)	1/1	1:160
	Hiena café (<i>Parahyaena brunnea</i>)	3/3	1:320-1280
	Musteliadae	Marta pescadora (<i>Martes pennanti</i>)	2/2
Ursidae		Panda rojo (<i>Ailurus fulgens</i>)	1/1
	Oso negro (<i>Ursus americanus</i>)	3/3	1:80-1:320
Oso polar (<i>U. maritimus</i>)	1/1	1:320	
Perissodactyla			
Equidae	Cebra de Grant (<i>Equus burchellii boehmi</i>)	4/4	1:40-1:160
	Cebra de Grevy (<i>E. b. chapmani</i>)	1/3	1:40
Artiodactyla			
Bovidae	Blesbok (<i>Damaliscus pygargus phillipsi</i>)	3/11	1:60-1:320
	Oryx de Arabia (<i>Oryx dammah</i>)	1/9	1:320
	Oryx Gemsbok (<i>Oryx gazella</i>)	1/6	1:320
	Antílope lechwe (<i>Kobus leche</i>)	2/7	1:40-1:80
	Blacbuck (<i>Antílope cervicapra</i>)	2/9	1:40
	Cabra montés (<i>Oreamnos americanus</i>)	2/3	1:80-1:320
	Thar del Himalaya (<i>Hemitragus jemlahicus</i>)	6/13	1:80-1:320
	Borrego cimarrón (<i>Ovis canadensis</i>)	2/3	1:80-1:320
	Bharal (<i>Pseudois nayaur</i>)	3/5	1:80-1:160

Cuadro 6. Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en animales de zoológico (por especie) de la Republica Checa (Continuación).

Orden y familia	Especie o subespecie	Animales positivos	Rango de títulos
Artiodactyla			
Bovidae (continua)	Bisonte americano (<i>Bison bison</i>)	6/9	1:80-1:320
	Bisonte europeo (<i>Bison bonasus</i>)	4/4	1:160-1:2560
	Yak (<i>B. mutus</i> f. <i>grunniens</i>)	4/10	1:320-1:640
	Búfalo africano (<i>Syncerus caffer caffer</i>)	1/5	1:80
	Búfalo acuático (<i>Bubalus arnee</i> f. <i>bubalis</i>)	1/4	1:640
	Antílope Nyala (<i>Tragelaphus angasii</i>)	3/10	1:40-1:5120
Camelidae	Camello (<i>Camelus ferus</i> f. <i>bactrianus</i>)	1/10	1:160
	Guanaco (<i>Lama guanicoe</i>)	1/2	1:80
	Llama (<i>L. glama</i>)	1/3	1:1280
	Alpaca (<i>L. pacos</i>)	1/3	1:320
	Vicugna (<i>Vicugna vicugna</i>)	1/1	1:80
Cervidae	Muntíaco de Reeves (<i>Muntiacus reevesi</i>)	3/6	1:320-1:640
	Ciervo de Thorold (<i>Cervus albirostris</i>)	3/7	1:160-1:320
	Ciervo moteado (<i>C. alfredi</i>)	1/3	1:160
	Elk de Manitoba (<i>C. e. manitobensis</i>)	7/14	1:40-1:160
	Alce (<i>Alces alces</i>)	8/13	1:160-1:2560
	Caribu (<i>Rangifer tarandus</i>)	1/9	1:80
	Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	2/4	1:80-1:320

Tomado y modificado de: Sedlak K, Bartová E. Seroprevalencia of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*. 2006; 136: 223-231.

En nutrias marinas (*Enhydra lutris nereis*), la toxoplasmosis se considera una causa significativa de encefalitis (Hill, 2004). Miller y colaboradores (2002, 2004) documentaron alta prevalencia de infección (42-62%) en este tipo de animales, a lo largo de diferentes zonas de la costa del Pacífico de los Estados Unidos. Sin embargo, en otro estudio, *T. gondii* fue considerado como causa de muerte en solo 3 de 37 casos (27 casos de California y 12 de Washington), teniendo participación incidental en los otros 34 animales afectados, descritos en el estudio. (Dubey y Jones, 2008).

Estudios de genotipificación en fauna silvestre, se han realizado en animales terrestres (Cuadro 7) y mamíferos marinos (Cuadro 8), efectuados principalmente en Norteamérica y en otras regiones de América: Colombia, Guayana Francesa y Costa Rica; e incluso en regiones remotas como en el Ártico, en el archipiélago de Svalbard, Noruega.

En los últimos años, a partir de aislamientos en nutrias marinas de las costas de California y Washington, Estados Unidos, se han descrito dos nuevos genotipos denominados X y A (con variaciones genéticas en alelos de los genes *B1*, *SAG1* y *GRA6*, entre otros marcadores), distintos a los genotipos I, II y III. En estos mamíferos marinos, los aislamientos correspondieron a 26 del tipo X, 19 tipo II, 14 tipo A y 12 recombinantes, sin evidenciarse los tipos I, III o atípicos (Cole *et al*, 2000; Miller *et al*, 2004; Conrad *et al*, 2005; Sundar *et al*, 2008).

1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de *T. gondii* se puede establecer mediante métodos serológicos, anatomopatológicos, biológicos y moleculares, siendo recomendable emplear más de una prueba de laboratorio y llevar a cabo un diagnóstico integral, con el fin de tener la mayor cantidad de elementos para la toma de decisiones clínicas y de tratamiento, así como recomendaciones y medidas para su prevención en otros hospedadores potencialmente expuestos. En cualquiera de las presentaciones de toxoplasmosis, los signos clínicos no son específicos de

Cuadro 7. Genotipos de *Toxoplasma gondii* aislados a partir de fauna silvestre (terrestre) y animales ferales.

País y año	Especie	Cantidad de aislamientos	Genotipo (s)	Referencias
Canadá, 1998	Puma de Isla Vancouver (<i>Felis concolor vancouverensis</i>)	1	Atípico	Aramini <i>et al</i> , 1988 Su <i>et al</i> , 2006
	Mapache (<i>Procyon lotor</i>)	7	I, II y III	
Estados Unidos, 2004	Coyote (<i>Canis latrans</i>)	1	II	Dubey, Graham <i>et al</i> , 2004
	Zorro gris (<i>Urocyon sp</i>)	1	II	
	Zorro rojo (<i>Vulpes vulpes</i>)	1	II	
	Gato montés (<i>Lynx rufus</i>)	5	II	
	Venado cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	21	II	
	Oso negro (<i>Ursus americanus</i>)	7	I, II y III	
Estados Unidos, 2004	Zorrillo (<i>Mephitis sp</i>)	3	III	Dubey, Parnell <i>et al</i> , 2004
	Ganso (<i>Branta canadensis</i>)	1	III	
	Lori (<i>Eos cyanogenia</i>)	5	III	
	Gato (<i>Felis domesticus</i>)	2	II	
Colombia, 2006	Mosquero (<i>Myarchus cephalotes</i>)	2	I	Gallego <i>et al</i> , 2006
	Zarigueya (<i>Didelphys marsupialis</i>)	1	I	
Estados Unidos, 2007	Mapache (<i>Procyon lotor</i>)	6	II y recombinantes	Dubey, Sundar <i>et al</i> , 2007
	Coyote	6	II y recombinantes	
	Zorrillo (<i>Mephitis sp</i>)	1	Recombinante	
Estados Unidos, 2007	Pájaro carpintero (<i>Melanerpes carolinus</i>)	1	III	Gerhold y Yabsley, 2007

Cuadro 7. Genotipos de *Toxoplasma gondii* aislados a partir de fauna silvestre (terrestre) y animales ferales (Continuación).

País y año	Especie	Cantidad de aislamientos	Genotipo (s)	Referencias
Canadá, 2008	Mapache (<i>Procyon lotor</i>)	1	Atípico	Dubey, Quirk <i>et al</i> , 2008
	Zorrillo (<i>Mephitis</i> sp)	1	Atípico	
	Oso negro (<i>Ursus americanus</i>)	1	Recombinante	
	Puma (<i>Felis concolor</i>)	1	Atípico	
	Gato (<i>Felis domesticus</i>)	2	I y III	
Estados Unidos, 2008	Venado cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	15	II, III y recombinantes	Dubey, Velmuguran <i>et al</i> , 2008
Guayana Francesa, 2008	Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	1	Atípico	Demar <i>et al</i> , 2008
Svalbard, 2008	Zorro del Ártico (<i>Vulpes lagopus</i>)	1	II	Prestrud <i>et al</i> , 2008
Estados Unidos, 2008	Puma (<i>Puma concolor</i>)	5	I, II y X	Miller, Miller <i>et al</i> , 2008
	Gato montés (<i>Lynx rufus</i>)	2	X y recombinantes	
	Gato (<i>Felis domesticus</i>)	3	I y II	
	Zorro rojo (<i>Vulpes vulpes</i>)	3	II, X y recombinantes	
	Nutria de río (<i>Lontra</i> sp)	2	II	

Cuadro 8. Genotipos de *Toxoplasma gondii* aislados a partir de mamíferos marinos.

País y año	Especie	Cantidad de aislamientos	Genotipo (s)	Referencia
Estados Unidos, 2000	Nutria marina (<i>Enhydra lutris nereis</i>)	13	II y recombinantes	Cole <i>et al</i> , 2000
Estados Unidos, 2004	Nutria marina (<i>Enhydra lutris nereis</i>)	35	II y X	Miller, Grigg <i>et al</i> , 2004
Costa Rica, 2007	Delfin listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	1	II	Dubey, Morales <i>et al</i> , 2007
Estados Unidos, 2008	Nutria marina (<i>Enhydra lutris nereis</i>)	1	X	Miller, Conrad <i>et al</i> , 2008
Estados Unidos, 2008	Nutria marina (<i>Enhydra lutris nereis</i>)	34	II, A, X y recombinantes	Sundar, Cole <i>et al</i> , 2008
Estados Unidos, 2008	Delfin del Atlántico (<i>Tursiops truncatus</i>)	3	II y recombinante	Dubey, Fair <i>et al</i> , 2008

una infección como tal, siendo necesario llevar cabo pruebas de laboratorio (Hill y Dubey, 2002).

1.8.1 Serología

Las pruebas serológicas para la demostración específica de anticuerpos contra *T. gondii*, son las primeras técnicas a emplear para detectar la infección, tanto en humanos como animales domésticos y silvestres. Debido a la persistencia por gran tiempo de los quistes tisulares, la detección de anticuerpos contra *T. gondii* es sugerente de infección. El panel de pruebas serológicas incluyen la prueba de Sabin y Feldman, las pruebas de aglutinación, la inmunofluorescencia, las pruebas de ELISA y el western blot (WB). Sin embargo, el hallazgo de anticuerpos en suero indica que el hospedador fue infectado en alguna ocasión a lo largo de su vida, sin poderse asociar directamente con la signología clínica que se presente, debido a que en algunos hospedadores pueden persistir títulos elevados de anticuerpos por meses después de la infección, recomendándose recolectar una segunda muestra con una diferencia de tres a cuatro semanas para establecer una variación en la cantidad de anticuerpos circulantes. Un incremento en el título de anticuerpos en la segunda muestra es indicativa de una infección aguda (Montoya, 2002; Rico-Torres, 2005; Correa *et al*, 2006; Fowler y Miller, 2008).

1.8.2 Anatomopatología

Las pruebas y técnicas anatomopatológicas requieren ser llevadas a cabo por personal capacitado y con experiencia en el reconocimiento de lesiones por parásitos Apicomplexa, siendo la inmunohistoquímica la prueba que generalmente permite distinguir a *T. gondii* de los demás diagnósticos diferenciales (*Neospora* spp, *Besnoitia* sp y *Sarcocystis* spp principalmente). Las lesiones desarrolladas por la infección de *T. gondii* se pueden presentar de forma similar tanto en humanos como en animales, siendo el patrón general, lesiones de tipo necróticas

en los tejidos afectados. La identificación de alguno de los estadios infecciosos de *T. gondii* es la clave para poder emitir un diagnóstico anatomopatológico certero.

Macroscopicamente, durante el estudio postmortem, las lesiones que se llegan a presentar no son específicas de una infección por *T. gondii*, debiéndose tomar con reserva los cambios encontrados y recolectar muestras de diferentes tejidos para realizar pruebas complementarias. Las lesiones se pueden encontrar en varios órganos incluyendo pulmones, sistema linfoide, corazón, músculo esquelético, hígado, páncreas, ojo, intestino y sistema nervioso central (Fowler y Millar, 2003).

En humanos, las lesiones macroscópicas que se detectan con mayor frecuencia en el sistema nervioso central de pacientes inmunocomprometidos son la necrosis y abscesos corticales, mientras que en la enfermedad congénita son la hidrocefalia, retinocoroiditis y la linfadenopatía cervical (Hill *et al*, 2005; Rico-Torres, 2005; Correa *et al*, 2006).

En animales domésticos y silvestres, durante el estudio postmortem, las alteraciones pulmonares son los hallazgos encontrados con mayor frecuencia, presentándose gran variedad de patrones, incluyendo edema pulmonar, focos necróticos multifocales, neumonía hemorrágica o neumonía intersticial. En animales con signología nerviosa, los cambios son limitados a congestión y edema cerebral, hemorragias y/o discretos infartos cerebrales. Otros hallazgos comunes son esplenomegalia, linfadenomegalia; efusión pleural, pericárdica y peritoneal; adrenalitis y necrosis renal cortical. En caso de aborto, en ruminantes y cérvidos principalmente, los cotiledones de la placenta pueden llegar a presentar focos necróticos blanquecinos (Fowler y Miller, 2003; Hill *et al*, 2005)

Microscópicamente, la demostración de taquizoítos en secciones de tejidos (biopsia o tejido recolectado a la necropsia) o extendidos de líquidos corporales (líquido cefalorraquídeo, amniótico o de lavado broncoalveolar) permite establecer el diagnóstico de una infección aguda. En los cortes histológicos generalmente las estructuras parasitarias presentan forma redondeada u oval, mientras que en los extendidos se pueden encontrar las formas características arqueadas (Figura 11).

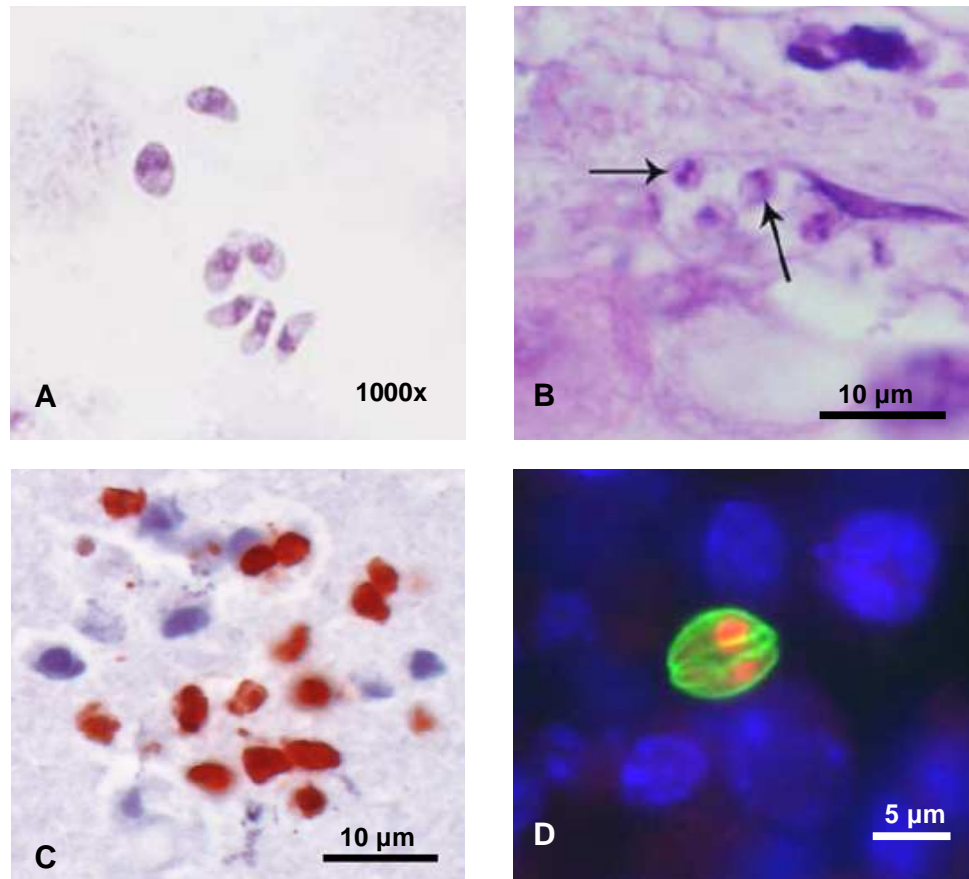


Figura 11. Identificación microscópica de tachizoítos de *Toxoplasma gondii*.

A) Citología de líquido cefalorraquídeo apreciándose zoítos extracelulares; Hemacolor. B) Corte histológico de intestino delgado (lamina propia), observándose zoítos en división (flechas); HE. C) Inmunopositividad de tachizoítos por IHQ; CAB-peroxidasa. D) Inmunofluorescencia de tachizoítos en división, citoplasma marcado con anti-SAG1 (verde) y núcleo marcado con anti-ENO2 (rojo).

Tomado de:

- A)** Brogi E, Cibas ES. Microbiology and Infectious Disease. Am J Clin Pathol. 2000; 114: 951-955.
B) Dubey JP, Pas A. Veterinary Parasitology. 2008; 153: 147-151.
C) Thomas NJ *et al.* Journal of Comparative Pathology. 2007; 137: 102-121.
D) Ferguson DJP. International Journal for Parasitology. 2004; 34: 347-360.

La presencia de quistes tisulares (Figura 12) conteniendo bradizoítos sin respuesta inflamatoria son indicativos de infección crónica, sin embargo, en los casos de reactivación, la presencia de necrosis, degeneración celular, acúmulos de microglia, infiltrado mononuclear perivascular y meningitis son cambios generalmente presentes. Las lesiones pulmonares se caracterizan por neumonía intersticial difusa con engrosamiento de septos alveolares y focos aleatorios de necrosis en alvéolos, bronquiolos y vasos sanguíneos. En hígado y otros órganos parenquimatosos, los focos de necrosis coagulativa pueden prevalecer multifocalmente con diferente grado de infiltración de células inflamatorias (Fowler y Miller, 2003; McGavin, 2007).

La técnica de inmunohistoquímica (complejo avidina-biotina peroxidasa) empleando diferentes antisueros policlonales o monoclonales, permite identificar los diferentes estadios infecciosos, confirmando el diagnóstico histopatológico (Figura 11) (Fowler y Miller, 2003; McGavin, 2007; Maxie, 2007).

1.8.3 Pruebas biológicas

Toxoplasmosis gondii puede ser aislado de casos clínicos tanto *in vitro* (cultivo celular) como *in vivo* (inoculación en ratones), a partir de muestras de secreciones, excreciones, fluidos corporales, biopsias y tejido con lesiones macroscópicas tomadas a la necropsia (Hill y Dubey, 2002). Las células Vero o cultivos de fibroblastos pueden ser empleados para el aislamiento de los parásitos, teniendo división y propagación de estos en un lapso de 6 a 8 días, con la posible formación característica de “rosetas” producidas por la división sincronizada de estos parásitos. Para el aislamiento *in vivo*, los ratones son los organismos que se emplean con mayor frecuencia, infectándose subcutánea o intraperitonealmente con macerado o fluido de las muestras sospechosas. Dependiendo de la virulencia del aislamiento, el ratón puede desarrollar una infección aguda con abundante carga parasitaria de taquizoítos en 8 a 12 días, o bien, desarrollar infección crónica con baja o nula mortalidad y formación de quistes tisulares principalmente en sistema nervioso central (Montoya, 2002; Rico-Torres, 2005).

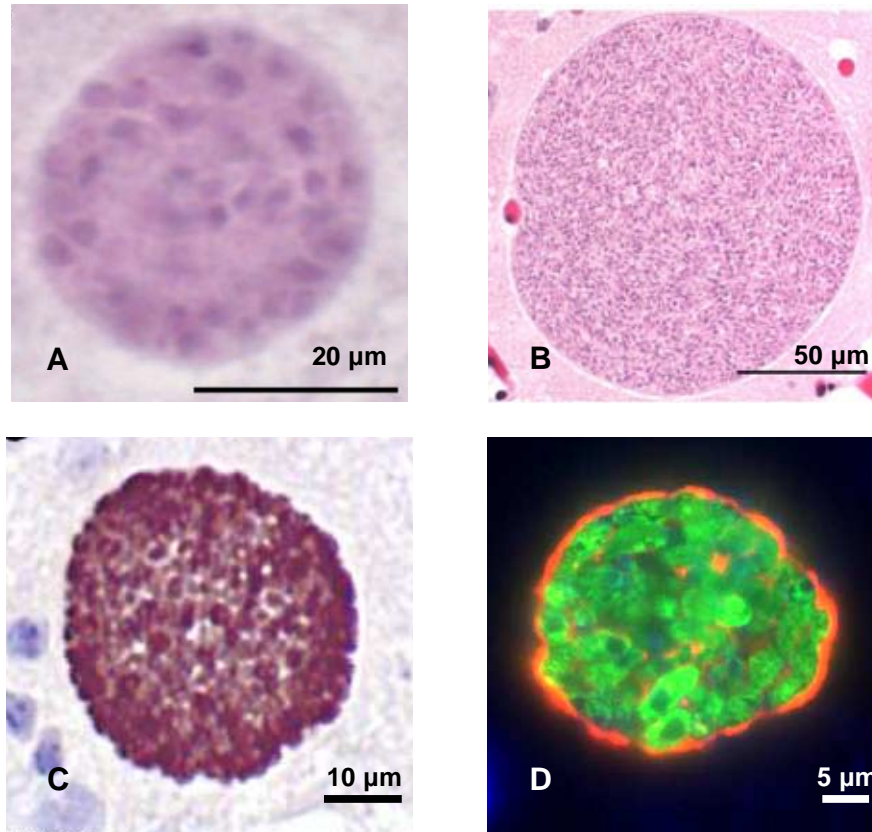


Figura 12. Identificación microscópica de quistes tisulares conteniendo bradizoítos de *Toxoplasma gondii*. Cortes histológicos de encéfalo, observándose un quiste tisular (A) con bradizoítos sin definir su morfología y otro de mayor tamaño (B) con bradizoitos enlongados bien definidos; HE. C) Inmunopositividad de bradizoitos por inmunohistoquímica; CAB-peroxidasa. D) Inmunofluorescencia de quiste tisular estando marcada su pared con AbCC2 (rojo) y el citoplasma de los bradizoítos con anti-BAG1 (verde).

Tomado de:

A) y B) Thomas NJ *et al.* Journal of Comparative Pathology. 2007; 137: 102-121.
C) y D) Ferguson DJP. International Journal for Parasitology. 2004; 34: 347-360.

1.8.4 Biología molecular

Los métodos moleculares o basados en el análisis de DNA han permitido complementar la identificación y diagnóstico de diferentes agentes infecciosos, superando los problemas generados al aplicar los métodos convencionales para el diagnóstico de parásitos, principalmente los protozoarios (Singh, 1997; Cooper y Hausman, 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite generar millones de copias de DNA a partir de una región específica del genoma, a través de sucesivos ciclos de amplificación enzimática, es una de las técnicas empleadas de rutina como técnica diagnóstica, incluso en medicina veterinaria, debido a su alta sensibilidad y especificidad. La PCR se ha utilizado para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita, ocular, cerebral, diseminada y cutánea. La variedad de muestras que se pueden emplear permite incluso minimizar procedimientos invasivos al poder evaluar diferentes fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, humor vítreo y acuoso, líquido amniótico, sangre (paquete celular) e incluso líquido proveniente de lavados broncoalveolares, así como diversos tejidos, tanto en fresco, congelados o incluso en formol y parafina (Burg, 1989; Greer *et al*, 1994; Hyman *et al*, 1995; Singh, 1997; Montoya, 2002; Fowler y Miller, 2003; Montoya *et al*, 2004; Anfray *et al*, 2005; Rico-Torres, 2005).

Como blanco de amplificación generalmente se emplean genes altamente conservados como el *B1*, *SAG1* (P30) o DNA ribosomal, entre otros. En el caso del gen *B1*, este se ha empleado extensamente tanto para investigación como para diagnóstico por presentar 35 copias dentro del genoma de *T. gondii* y por estar ausente en las células de mamíferos (Hyman *et al*, 1995; Jones *et al*, 2000; Montoya, 2002; Fowler y Miller, 2003; Montoya *et al*, 2004; Rico-Torres, 2005). Existen diferentes variantes de PCR que conservan el mismo principio como son la PCR anidada y semianidada con dos ciclos de amplificación, la PCR en tiempo real la cual es una técnica automatizada detectando los productos de amplificación por sondas marcadas con fluorescencia y la PCR múltiple que emplea sondas

marcadas para distintos genes, emitiendo diferentes rangos de color en ensayos múltiples en una misma reacción (Rico-Torres, 2005)

Estas técnicas pueden detectar una cantidad pequeña de DNA equivalente al material genético de un taquizoíto por muestra, sin requerir anticuerpos específicos de especie como las técnicas serológicas. Sin embargo, la técnica tiene limitaciones, dependientes del tipo y tamaño de muestra, tiempo de almacenamiento del material de estudio y el protocolo de extracción de DNA y amplificación empleados. Si el protozooario se encuentra localizado en discretas regiones del tejido u órgano, existe la posibilidad de que no sea detectado por PCR, siendo entonces menos sensible que las pruebas serológicas (Hyman *et al*, 1995; Jones *et al*, 2000; Montoya, 2002; Fowler y Miller, 2003; Montoya *et al*, 2004; Rico-Torres, 2005).

El empleo de estudios de RFLP para el análisis del DNA de *T. gondii* se considera actualmente otra herramienta diagnóstica que permite caracterizar el DNA amplificado, tras definirse patrones únicos con esta metodología. En el caso del genoma de *T. gondii*, el análisis mediante RFLP permite identificar si el DNA evaluado corresponde a alguno de los genotipos predominantes, genotipos recombinantes e incluso variantes atípicas o particulares como son los genotipos X o A, descritos en nutrias marinas. (Miller *et al*, 2004; Alberts *et al*, 2004; Sundar *et al*, 2008). El método permite detectar variaciones menores en un gen, incluyendo la variación en la sustitución de una sola base dentro de la secuencia de DNA (Singh *et al*, 1997).

El principio de la técnica (Figura 13) consiste en exponer el DNA amplificado (previamente por PCR) con enzimas de restricción, las cuales pueden cortar la doble cadena de la molécula de DNA en puntos específicos definidos por la secuencia de nucleótidos, produciendo así fragmentos de DNA de diversos tamaños. Los fragmentos que se producen, generalmente se visualizan por electroforesis en gel (agarosa o poliacrilamida) y dependiendo la distribución que presenten pueden denotar un patrón polimórfico particular de un genotipo, así

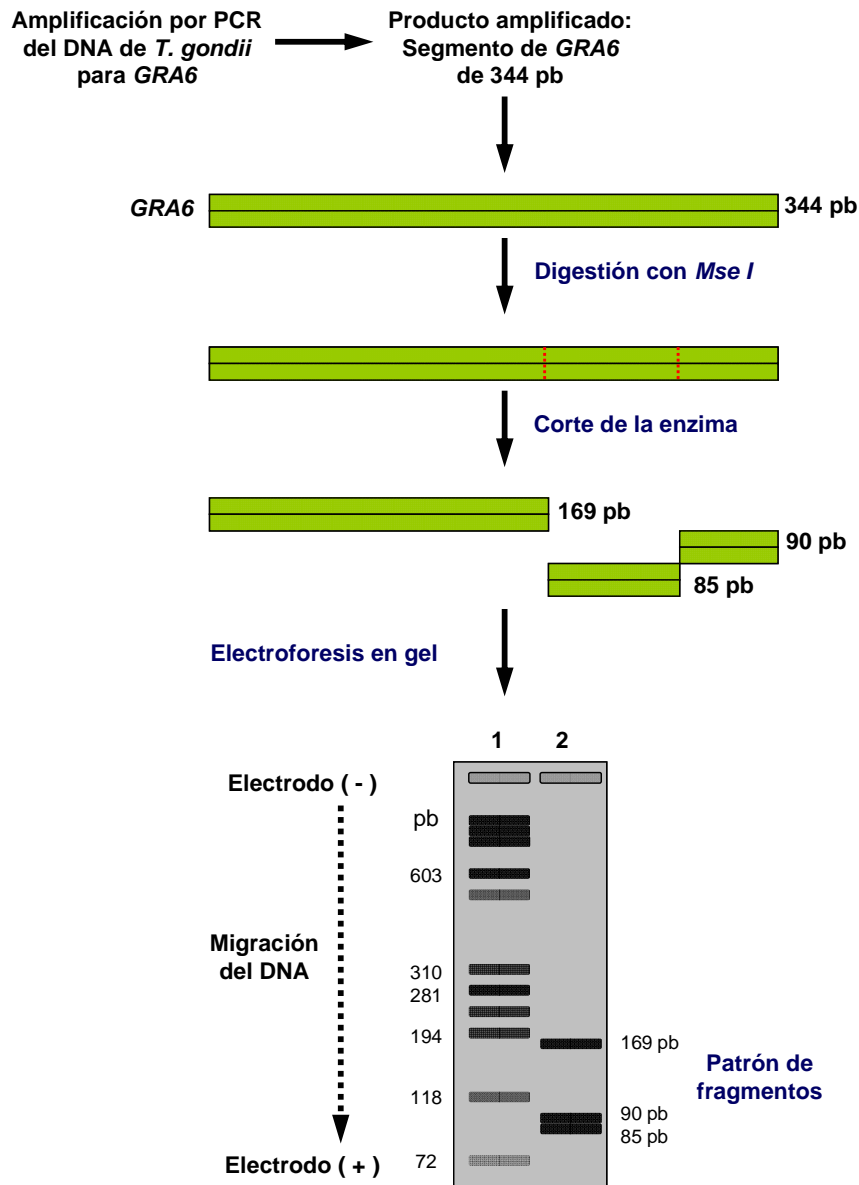


Figura 13. RFLP, digestión del gen *GRA6* con *Mse I* y electroforesis de los productos obtenidos. La enzima de restricción *Mse I* corta el gen *GRA6* (genotipo III) en dos sitios (líneas rojas) produciendo tres fragmentos de DNA. Estos fragmentos se separan por electroforesis en gel de agarosa (1, MPM y 2, DNA digerido). Los fragmentos migran hacia el electrodo positivo, desplazándose con mayor rapidez los de menor tamaño. Tras la electroforesis el DNA se tiñe con bromuro de etidio, se visualizan en transiluminador y se documentan con fotografía (instantánea o digital).

Tomado y modificado de: Cooper GM, Hausman RE. La célula. 3ra ed. Marban Libros SL. Madrid, España. 2007

como deleciones o mutaciones en la secuencia del DNA analizado (Alberts *et al*, 2004; Cooper y Hausman, 2007)

1.9 Toxoplasmosis en México

En nuestro país, se han realizado diferentes estudios a lo largo del tiempo, para determinar la presencia de *T. gondii* en humanos, animales domésticos y silvestres, siendo la mayoría de los estudios de tipo serológico, empleando diferentes técnicas y con resultados variables en cada estado de la República.

Roch y Varela (1966) emplearon la técnica de Sabin y Feldman para evaluar 14 869 sueros de humanos entre los años de 1953 y 1965, detectando seropositividad para *T. gondii* del 30%.

En 1976 el Instituto Mexicano del Seguro Social llevó a cabo una encuesta seroepidemiologica nacional en 51 localidades urbanas de México, utilizando inmunofluorescencia indirecta, describiendo seropositividad del 26%, siendo más elevada en las zonas costeras de ambos litorales del país (Velasco *et al*, 1992).

Velasco y colaboradores (1992), en la encuesta nacional seroepidemiológica, estudiaron 29 935 sueros de humanos de todos el país, con un rango de edad de uno a 98 años, detectando anticuerpos contra *T. gondii* mediante inmunofluorescencia indirecta, encontrando seropositividad del 32% (dilución 1:16) y 19.5% (dilución 1:128) en general en la República Mexicana (Figura 14). Quintal y Navarrete (1975) detectaron seropositividad del 11.48% mediante hemaglutinación indirecta en el estado de Yucatán. Galván-Ramírez y colaboradores (2005) estudiaron muestras de suero de donadores de sangre con un rango de edad de 17 a 57 años, siendo el 76% mujeres; detectando en el 29% de las muestras anticuerpos IgG anti-*T. gondii* y 13% con anticuerpos IgM.

En estudios realizados en el estado de Jalisco en mujeres embarazadas para la detección de anticuerpos contra *T. gondii*, la seropositividad determinada para IgM fue del 20.7% y para IgG del 34.9%. En un grupo de mujeres con antecedentes de aborto, se detectaron en el 44.9% anticuerpos IgG y el 33.3% anticuerpos IgM (Ortiz-Alegria, 2004).



Figura 14. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en humanos en México (1992).

Tomado y modificado de: Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C et al. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. *Salud Pública México*. 1992; 34 (2): 222-229.

Vela-Amieva *et al* (2005) llevaron a cabo un estudio piloto para determinar la frecuencia de anticuerpos contra *T. gondii* en 1003 infantes de la ciudad de México, siendo el 53.1% varones con un peso promedio de 3.116 kg. Las muestras se evaluaron por ELISA de captura confirmándose posteriormente por western blot. Dos recién nacidos asintomáticos, uno de ellos prematuro, presentaron anticuerpos IgM e IgG. Con base en los resultados obtenidos, los autores sugieren una frecuencia aproximada de dos casos de toxoplasmosis congénita por cada 1000 nacimientos en la Ciudad de México.

Cañedo-Solares *et al* (2008) determinaron diferentes subclases de anticuerpos IgG contra *T. gondii* en recién nacidos y sus madres. Las subclases IgG1 (detectada en madres) y la IgG3 (en recién nacidos) fueron relacionadas con problemas clínicos en resolución; las subclases IgG2 e IgG3 fueron detectadas en bebés, asociándose su presentación a transmisión vertical y la subclase IgG4 se detectó en madres o niños con presentación clínica de toxoplasmosis congénita.

Alvarado-Esquivel, Cruz-Magallanes *et al* (2008) estudiaron la presencia de anticuerpos IgM e IgG en suero de personas adultas provenientes de tres comunidades rurales del estado de Durango, por medio de ELISA. De 463 personas evaluadas, 110 (23.8%) presentaron anticuerpos IgG contra *T. gondii*, diez de estas personas (2.2%) también presentaron anticuerpos IgM. La prevalencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii* varió en las tres comunidades de 14.8 a 35.8%. La prevalencia mas alta se observó en personas de alrededor de 70 años con hábitat pobre. La infección por *T. gondii* se asoció significativamente al consumo de carne de ardilla y pavo.

Dubey, Morales y Lehmann (2004) evaluaron la prevalencia de *T. gondii* en 208 gallinas (*Gallus domesticus*) de México, encontrándose positividad en 13 (6.2%) de ellas. De las 13 gallinas seropositivas, se recolectó sangre, corazón y encéfalo para aislamiento en ratones, aislándose *T. gondii* de 6 gallinas. Los 6 aislamientos fueron avirulentos para ratones. La genotipificación de los aislamientos de gallinas de *T. gondii* usando el locus SAG2 indicaron 5 como tipo III y uno como tipo I.

Figuroa-Castillo y colaboradores (2006) determinaron anticuerpos contra *T. gondii* en muestras de suero de conejos provenientes de tres granjas, por medio de ELISA. De 286 animales evaluados se detectaron anticuerpos en 77 de ellos (26.9%). La prevalencia encontrada fue similar a la descrita en otros países.

Estudios de seroprevalencia en gatos domésticos (Figura 15) se han realizado en diferentes estados de la República Mexicana. En Guadalajara, Galván-Ramírez *et al* (1999) detectaron la presencia de anticuerpos contra *T. gondii* en gatos y sus propietarios para determinar si había alguna relación entre la infección por *T. gondii* y propietarios que tuvieran gatos infectados. De 59 gatos evaluados por ELISA, 24 animales presentaron anticuerpos IgG, IgM e IgA, mientras que 38 propietarios (64%) presentaron anticuerpos IgG contra *T. gondii*. Los autores concluyeron que la cohabitación con animales alimentados con vísceras y bajo control en la eliminación de las heces de los felinos, contribuyen como factores de riesgo para favorecer la infección por *T. gondii*. En Colima, se evaluaron sueros de 80 gatos domésticos de diferentes zonas de la ciudad para la detección de anticuerpos IgG contra *T. gondii* mediante la prueba de ELISA, encontrándose una seroprevalencia de 28.8%, con una mayor prevalencia significativa en las zonas del centro y sur (33.8%) en comparación con la zona norte (6.6%) (García-Márquez, 2007). En Durango, la detección de anticuerpos en suero de 105 gatos domésticos empleando la técnica de aglutinación modificada, evidenció una seroprevalencia del 21% (Alvarado-Esquivel *et al*, 2007). Besné-Mérida y colaboradores (2008) determinaron la frecuencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii* en gatos de la ciudad de México, evaluando muestras de suero de 169 animales de 16 municipios, mediante ELISA indirecta. Se encontraron 37 (21.8%) animales seropositivos con un incremento en la frecuencia relacionada con la edad, sugiriendo una activa transmisión dentro de un ambiente urbano.

Estudios de seroprevalencia en rumiantes se representan en la figura 16.

Vidal-Hernández (1996) detectó anticuerpos contra *T. gondii* a partir de suero de wallaby de cuello rojo (*Macropus rufogriseus*) de diversas edades, compartiendo el mismo albergue, alimentación y manejo. Se evaluaron doce

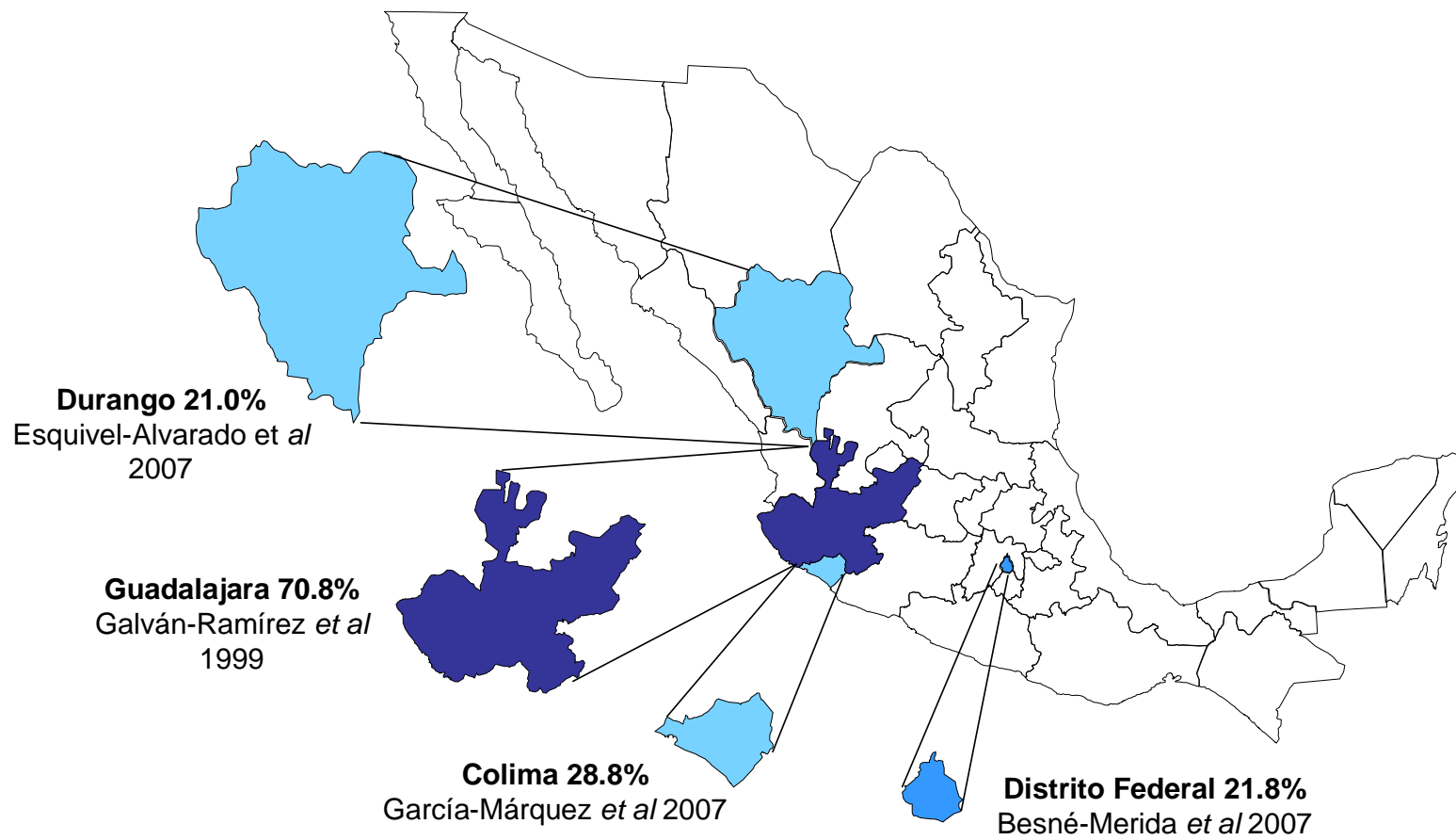


Figura 15. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en gatos en México.

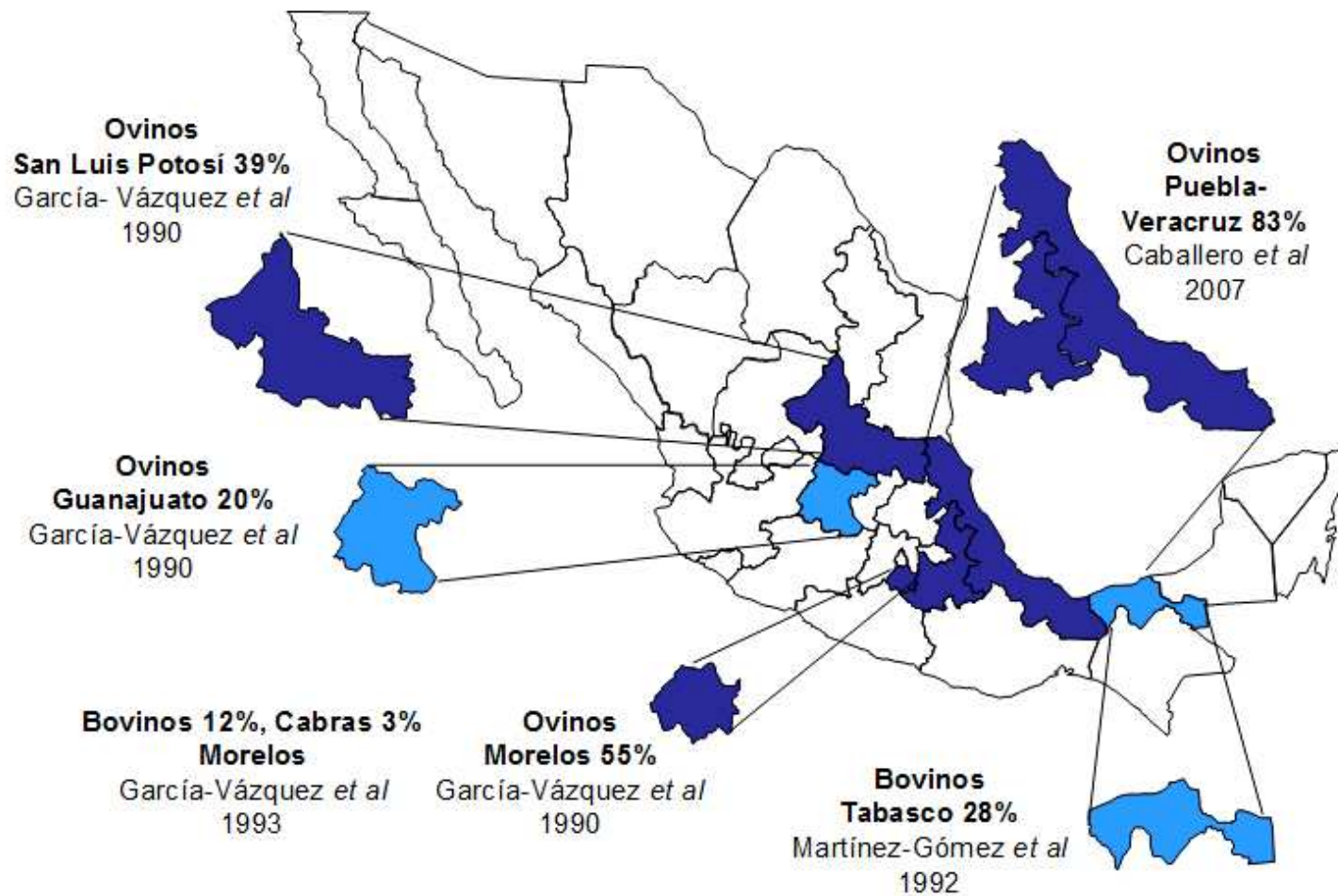


Figura 16. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en rumiantes en México.

sueros mediante fijación de complemento, siendo todos positivos. 21 meses después del estudio, se presentó mortalidad en el grupo de animales, los cuales tenían signología nerviosa, respiratoria y/o digestiva, confirmándose por histopatología la presencia de estructuras parasitarias.

Kikuchi y colaboradores (2004), estudiaron la seroprevalencia de *T. gondii* en 438 muestras de pumas (*Felis concolor*) y 58 de gatos monteses (*Lynx rufus*), en libertad y cautiverio, procedentes del norte, centro y Sudamérica. De los animales procedentes de México se encontró seroprevalencia en ambas especies: 2 de 12 pumas y 4 de 6 gatos monteses (16.7 y 66.6% respectivamente), siendo discreta la cantidad de animales de los que se tomaron muestras en el país para dicho estudio.

Suzán y Ceballos (2005) estudiaron el papel de mamíferos en la prevalencia de enfermedades infecciosas en animales silvestres. A partir de muestras de suero de animales silvestres y ferales de dos áreas naturales protegidas dentro de los límites de la ciudad de México, se detectaron anticuerpos contra tres agentes infecciosos incluyendo *T. gondii*. Un total de 68 individuos fueron capturados incluyendo tlacuaches (*Didelphys virginiana*), cacomixtles (*Bassariscus astutus*), zorrillos (*Spilogale gracilis*), comadrijas (*Mustela frenata*), ardillas (*Spermophilus variegatus* y *Sciurus aureogaster*), gatos (*Felis catus*) y perros (*Canis familiaris*) ferales. La seroprevalencia para *T. gondii* fue del 23.9%, sin haber diferencia significativa entre la prevalencia de ambas zonas. Los perros y gatos ferales fueron los que presentaron mayor seroprevalencia (67%) para *T. gondii* en comparación con el resto de los animales.

Espinosa y Morales (2006) describen un brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) de Guadalajara, Jalisco; afectando en un lapso de tres semanas a 23 de 25 animales (92%), muriendo 16 de ellos (64%) con signos clínicos y cambios patológicos similares, asociados a infección por *T. gondii*.

Entre las principales causas de la pérdida de la diversidad en México se encuentran la destrucción de hábitats, el cambio de uso de suelo, la

sobreexplotación de recursos, la recolecta y caza ilegal de especies, la ganadería extensiva y la presentación de enfermedades infecciosas, entre otros factores (Suzán-Azpiri, 1998).

Las crecientes condiciones del deterioro ambiental y el incremento de las enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes requieren el desarrollo de programas sistemáticos de evaluación de la diversidad de agentes infecciosos en todos los ecosistemas y lugares donde exista la interacción de animales domésticos, silvestres y seres humanos, tanto en vida libre como en cautiverio, con el fin de encaminar estudios para la detección y prevención de posibles epizootias y epidemias que puedan comprometer la diversidad biológica en el país y su repercusión en la salud pública (Suzán-Azpiri, 1998; Macpherson, 2005).

En años recientes, las diferentes alternativas en pruebas de laboratorio incluyendo las técnicas de biología molecular, se han empleado de forma amplia para determinar la frecuencia de un agente infeccioso en un momento determinado en una población humana o de animales, tanto en cautiverio como de vida libre. La determinación sistemática de anticuerpos o estudio de genotipos de *T. gondii* en diferentes hospedadores ubicados en distintas regiones del país, épocas del año, o en un entorno rural o urbano, favorecen un mejor conocimiento de la dinámica de un proceso infeccioso, si el agente es endémico o epidémico, su situación en una región, así como su incidencia y prevalencia, e incluso su filogenia y participación en el desarrollo de casos clínicos. Los resultados de estos estudios pueden aportar información para sugerir medidas de conservación y prevención, siendo necesario estudiar de manera detallada las implicaciones de las enfermedades a través del tiempo y sus consecuencias a nivel comunitario (Suzán-Azpiri, 1998; Macpherson, 2005; Correa *et al*, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

Los estudios serológicos para la detección de *Toxoplasma gondii* realizados en el país tanto en animales como en humanos, indican la interacción con dicho parásito desde décadas pasadas, que aunado a estudios moleculares y de genotipificación recientes, se ha podido determinar por lo menos, la circulación de dos linajes predominantes (I y III) y recombinantes en animales domésticos. La descripción de estos linajes en estas especies, aunado a las recientes publicaciones de diversidad de cepas en Centro y Sudamérica, permiten plantear la posibilidad de que los tres linajes de *T. gondii* así como cepas recombinantes y atípicas, pudieran estar circulando en el país en diferentes especies animales, tanto domésticas como fauna silvestre, En estas últimas especies, los estudios relacionados son escasos, tanto en animales en cautiverio como en vida libre.

El estudio de los genotipos circulantes de *T. gondii* en fauna silvestre, permitirá un mejor entendimiento del comportamiento biológico de dicho protozooario en la amplia gamma de hospedadores en los que se pueda presentar, su frecuencia en dichas especies, su capacidad para producir enfermedad en animales en cautiverio y silvestres, establecer la posible relación del linaje con el desarrollo de lesión y la especie afectada, así como su papel en la transmisión a los animales domésticos y al hombre. De igual forma, permitirá generar un punto de partida para la identificación adecuada de esta entidad, medidas de control y manejo de la misma o de animales infectados crónicamente (en cautiverio y vida libre), factores que favorecen su dispersión y su impacto en ecosistemas y zonas protegidas.

3. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA

Existen los linajes I y III de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México.

HIPÓTESIS ALTERNA

Existen diferentes linajes de *Toxoplasma gondii* así como cepas recombinantes y atípicas en fauna silvestre en México.

4. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Determinar los genotipos presentes de *Toxoplasma gondii* en animales de fauna silvestre en México.

OBJETIVO ESPECIFICO

Describir las lesiones asociadas a la infección por los genotipos de *Toxoplasma gondii* en animales de fauna silvestre de diferentes órdenes en México.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

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

5.2 Estrategia general

Se recuperaron casos de fauna silvestre de diferentes entidades diagnosticados como sugerentes o compatibles con toxoplasmosis, confirmándose primeramente por anatomopatología y posteriormente por biología molecular. Se obtuvo el DNA de *T. gondii* y se analizó por RFLP para determinar los posibles genotipos circulantes en este tipo de especies (Figura 17).

5.3 Entidades de donde se obtuvo el material de estudio

Las muestras para realizar el trabajo de investigación se obtuvieron de diferentes laboratorios de diagnóstico (entidades) donde se contaba con antecedentes de diagnóstico de toxoplasmosis en fauna silvestre, los cuales fueron el Departamento de Patología (DP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el Zoológico de Guadalajara (ZG) y la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre (DGZVS) del Gobierno del Distrito Federal, que contempla el Zoológico de Chapultepec, el Zoológico de San Juan Aragón y el Zoológico de los Coyotes.

5.4 Selección y evaluación del material de estudio

5.4.1 Selección retrospectiva de casos sospechosos o compatibles con toxoplasmosis.

Se revisaron los registros de diagnóstico de las entidades mencionadas, considerándose como criterios de selección de primera instancia, casos que

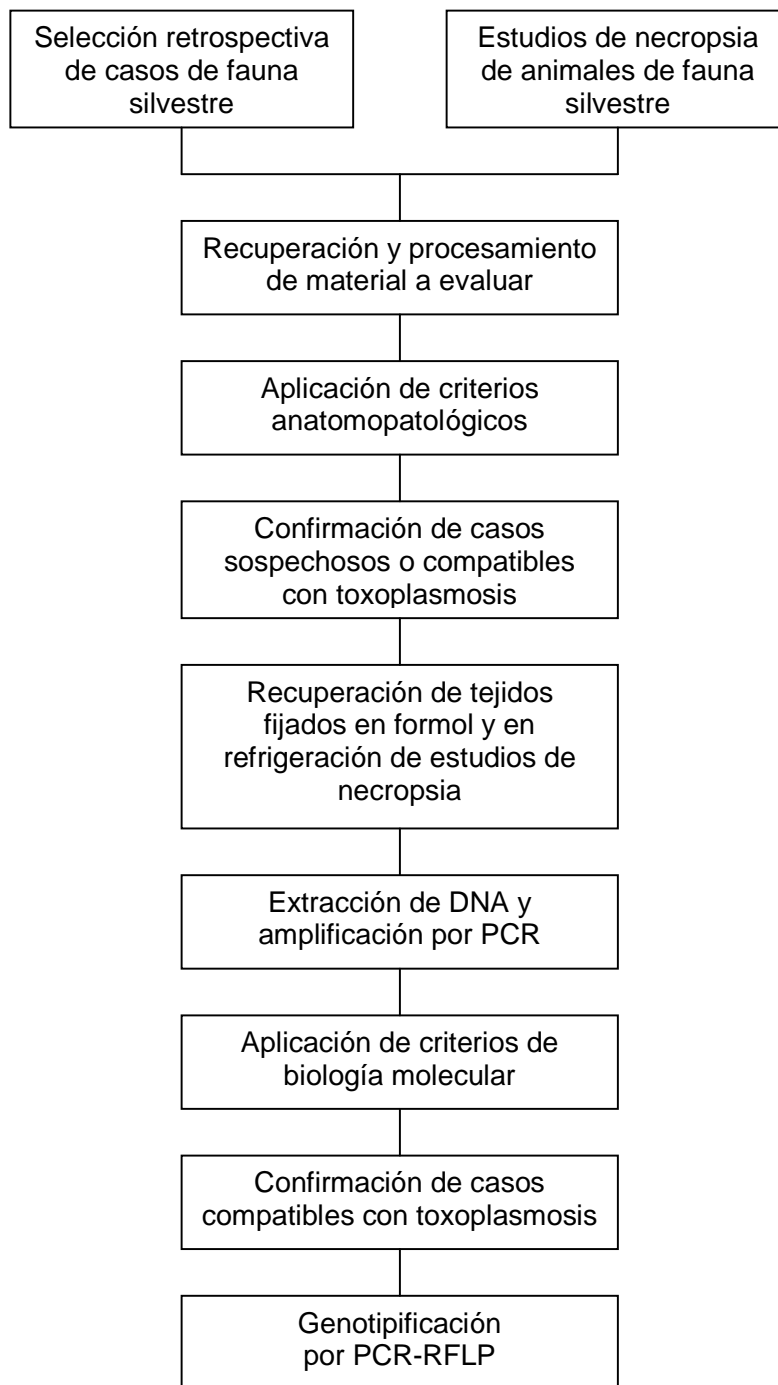


Figura 17. Estrategia general del estudio. Secuencia de la recuperación de casos de toxoplasmosis en fauna silvestre para su confirmación anatomopatológica y molecular, y genotipificación por PCR-RFLP.

tuvieran referido diagnóstico anatomopatológico de toxoplasmosis (aguda, diseminada, crónica o congénita), sospecha de toxoplasmosis o lesiones con presencia de estructuras parasitarias sugerentes de parásitos apicomplexa. Como segunda alternativa, con base en la literatura científica, se seleccionaron casos de animales donde se han descrito lesiones asociadas a toxoplasmosis: animales susceptibles (primates de nuevo mundo y marsupiales australianos), felinos como huéspedes definitivos (león africano, tigre de bengala, tigre de Sumatra, pantera, jaguar, ocelote, etc.) y otros carnívoros (oso americano, lobo gris mexicano, etc.). Como última opción, se seleccionaron animales cuyo diagnóstico morfológico fuera de lesiones que pudieran ser diagnóstico diferencial de infección por *T. gondii*: encefalitis o meningoencefalitis linfoplasmocitaria (no supurativa), neumonía intersticial y edema pulmonar, aborto o enfermedad congénita en neonatos (rumiantes y cérvidos).

Del DP de la FMVZ de la UNAM, se revisaron los registros de la Sección de Patología entre los años 2005 a 2007 y de la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) entre los años 1993 a 2007. De la DGZVS, se revisaron los registros de diagnóstico del Laboratorio de Patología (LP) entre los años 1999 a 2008. Del ZG, se remitieron 12 casos con diagnóstico anatomopatológico de toxoplasmosis, diagnosticados entre los años 2000 a 2008.

De los casos considerados sospechosos o compatibles, así como de los casos remitidos del ZG, se registraron los datos del animal estudiado incluyendo nombre común y científico, género, edad, tipo de espécimen remitido para el estudio (cadáver, órgano, tejido o material procesado). De igual manera, se registraron los datos del remitente, lugar de procedencia y la fecha (año) en que se realizó el estudio postmortem.

5.4.2 Recuperación de laminillas y cortes de microscopía electrónica de casos seleccionados

De los casos seleccionados del DP y de la DGZVS, se recuperaron de los archivos de diagnóstico, las laminillas que se emplearon para la emisión de

resultados de cada caso, tanto de histopatología (HP) como de inmunohistoquímica (IHQ). En los casos donde no se contaba con las laminillas, se realizaron nuevos cortes a partir de los bloques de parafina originales o por la inclusión de nuevas secciones de tejido preservadas en formalina amortiguada, procesadas con la metodología de rutina para histopatología.

En el caso de microscopía electrónica de transmisión (MET), se recuperaron los cortes semifinos montados en portaobjetos convencionales y los cortes finos en rejillas de cobre.

5.4.3 Criterios de revisión y confirmación de casos seleccionados

Una vez recuperadas las laminillas o rejillas con cortes finos, se volvió a revisar por triplicado el material recuperado (todos los cortes histológicos de cada caso) para la confirmación, modificación del diagnóstico o descarte del caso evaluado, con base en los criterios descritos por Lindsay y Dubey (1989), Gardiner *et al* (1998), Cheville (1999), Fowler y Miller (2003), Hill *et al* (2004), King *et al* (2005), Maxie (2007) y McGavin (2008) para el diagnóstico microscópico de toxoplasmosis en alguna de sus presentaciones. Se consideró como caso sospechoso por HP, aquellos casos que presentaron lesiones en uno o más aparatos y sistemas afectados, clasificando las lesiones de acuerdo a su tipo, grado y distribución (Cuadro 9) con o sin la presencia de estructuras compatibles con parásitos apicomplexa (taquizoítos, pseudoquistes o quistes tisulares). Para IHQ, se consideró como caso positivo la presencia de pseudoquistes o quistes tisulares con inmunopositividad marcada y definida, tanto para los zoítos como para la pared de la estructura delimitante. En MET se consideraron como casos positivos, aquellos donde en el tejido se apreciara de forma definida estructuras parasitarias con características ultraestructurales propias de taquizoítos o bradizoítos de *T. gondii* (Cuadro 10).

Los casos que presentaran lesiones y/o presencia de estructuras parasitarias, aunado a positividad por IHQ o MET de los zoítos en cualquiera de

Cuadro 9. Criterios para clasificación de lesiones microscópicas.

Criterio	Tipos
Tipo cambio	Necrótico (N) Inflamatorio: supurativa (IS), linfoplasmocitario (IL), granulomatoso (IG) Hemorrágica (H) Sin lesiones (SL)
Grado	Leve (+), Moderado (++), Severo (+++),
Extensión	Local (Lo), Multifocal (Mul) Multifocal coalescente (MulC) Segmentaria (S), Difusa (D)

Tomado de: King JM, Roth JL, Dodd DC, Newson ME. The necropsy book. Charles Louis Davis, DVM Foundation Publisher. Illinois USA. 2005.

Cuadro 10. Criterios para la identificación ultraestructural de taquizoítos o bradizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Criterio	Características
Morfología unicelular	Arqueada alargada o corta, oval o piriforme
Organelos	Presencia de conoide, roptrias, micronemas, gránulos densos, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias, microporos y núcleo.
Quiste tisular	Parásitos contenidos en quiste tisular de pared delgada continua definida
Pseudoquiste o vacuola parasitofora	Parásitos contenidos en estructura vacuolar de pared delgada con una a tres capas bien definidas

Tomado de:

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cyst. Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11(2): 267-299 y Cheville NF. Ultrastructural pathology: an introduction to interpretation. Ames, Iowa State University. USA. 1999.

los estadios infectantes, se consideraron como casos compatibles o positivos de toxoplasmosis por anatomopatología.

5.4.4 Recuperación de tejidos en formaldehído de casos seleccionados para estudios de biología molecular

De los casos donde se confirmó o revaloró el diagnóstico de toxoplasmosis, se recuperaron los tejidos en formaldehído que presentaron lesiones sugerentes (casos sospechosos) o compatibles con infección por *T. gondii*. Posteriormente, los tejidos fijados en formaldehído fueron remitidos al Laboratorio de Inmunología Experimental (LIE) del Instituto Nacional de Pediatría (INP), procesándose con la metodología propuesta (ver sección de técnicas de laboratorio) para PCR y PCR-RFLP. De cada caso remitido se incluyeron secciones de uno o más tejidos incluyendo corazón, pulmón, estómago, intestino, hígado, bazo, linfonodo, riñón y/o encéfalo.

Del total de casos sospechosos o compatibles con toxoplasmosis recuperados, cuatro casos contaban con diagnóstico de IHQ, seleccionándose tejidos de otros 12 casos con lesiones representativas de toxoplasmosis, remitiéndose los bloques de parafina al laboratorio de inmunohistoquímica (LIHQ) del DP para llevar a cabo el complejo avidina-biotina peroxidasa en las secciones de tejido seleccionadas. Los casos remitidos incluían secciones de tejidos de corazón, pulmón, hígado, páncreas, estómago, intestino delgado, bazo, linfonodo, riñón y encéfalo.

5.4.5 Recolección de muestras de estudios postmortem.

De julio a noviembre de 2008, a partir de la mortalidad remitida para su estudio postmortem en el LP de la DGZVS, se participó en el estudio de necropsia de casos sospechosos de toxoplasmosis, seleccionándose con base en los mismos criterios aplicados para la selección de los casos retrospectivos. Así mismo, se participó en el estudio de necropsia de dos casos en monos ardilla, efectuados en el DP de la FMVZ de la UNAM previamente en el año de 2006.

En cada caso, se recolectaron muestras representativas de diferentes tejidos para estudios anatomopatológicos y/o moleculares. La metodología del estudio postmortem y la recolección de tejidos se describe en la sección de técnicas de laboratorio.

5.5 Técnicas de laboratorio

Las técnicas anatomopatológicas empleadas para evaluar y determinar los casos sospechosos o compatibles fueron el estudio de necropsia, HP, IHQ y/o MET (en los casos que fue posible); mientras que las de biología molecular para la detección del genoma de *T. gondii*, se empleó la técnica de PCR a partir de tejido en fresco y tejido conservado en formalina amortiguada y para genotipificación se utilizó la técnica de PCR-RFLP.

5.5.1 Necropsia

Los animales que fueron remitidos para estudio *postmortem*, se les practicó el estudio sistemático de necropsia con base en lo descrito en los manuales de técnicas de necropsia para animales domésticos de Aluja y Constantino (2002), King *et al* (2005) y de fauna silvestre (Cooper, 2002; Cooper, y Cooper, 2007), realizando las modificaciones recomendadas para cada familia u orden de animales a estudiar. El examen de necropsia se llevó a cabo en la sala de necropsias del DP de la FMVZ, UNAM y en la sala de necropsias del LP de la DGZVS.

Para cada cadáver evaluado, se inspeccionó externamente la piel, el pelo o las plumas y los orificios naturales. Posteriormente se realizó una incisión por línea media separando la piel y se procedió a evaluar el tejido subcutáneo. Se continuó la disección de los tejidos exponiendo la cavidad oral y la región orofaríngea. Se separó el esternón cortando las uniones costocondrales en el caso de los mamíferos, así como seccionando los músculos pectorales en el caso de la aves; en ambos casos se continuó cortando los músculos de la cavidad abdominal y

celómica respectivamente. Se expusieron los órganos de las cavidades, los cuales se revisaron *in situ* y posteriormente se extrajeron para su revisión individual. Una vez retirados los órganos de las cavidades, éstos se disecaron y se revisaron macroscópicamente con base en lo referido por King *et al* (2005), describiendo las lesiones presentes, su localización, tamaño, extensión, cantidad, forma, consistencia y color.

Durante los estudios de necropsia, se recolectaron muestras representativas de diferentes aparatos y sistemas de tejidos de mamíferos, incluyendo secciones de pulmón, corazón (ventrículos y septo interventricular), estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso (ciego y colon), hígado, páncreas, bazo, linfonodos, riñón, encéfalo y ojo; en el caso de las aves, además de los tejidos referidos para los mamíferos se recolectaron secciones de faringe, sacos aéreos, proventrículo, molleja y cloaca.

Para HP e IHQ, de los órganos parenquimatosos se recolectaron secciones de tejido de 1.0 a 4.0 cm de largo y ancho por 0.5 cm de grosor; mientras que de los órganos tubulares se recolectaron secciones de 0.5 a 2.0 cm de largo con exposición de la mucosa. Ambos tipos de muestras se fijaron por inmersión en formalina amortiguada al 10% (pH 7.2), por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez fijados los tejidos se remitieron para su procesamiento a los laboratorios de histopatología del DP de la FMVZ, UNAM y del LP de la DGZVS, respectivamente.

Para MET, se recolectaron fragmentos de tejido de 1 a 3 cm³ de pulmón, corazón (miocardio), hígado, bazo, linfonodo y encéfalo, fijándose por inmersión en glutaraldehído al 2.5% (pH 7.4, 0.1M), por 2 a 6 horas a 4°C. En los casos donde el tejido se fijó previamente en formalina amortiguada, secciones de los órganos se recuperaron lavándose con solución amortiguadora de cacodilatos, fraccionándose y refijándose con la misma metodología antes descrita. Una vez fijadas las muestras, se remitieron para su procesamiento a la UME del DP de la FMVZ, UNAM.

Para PCR y PCR-RFLP, se recolectaron secciones de tejido 4.0 x 2.0 x 0.5 cm de diferentes órganos incluyendo pulmón, corazón (ventrículos), hígado, bazo,

linfonodo y encéfalo. Los tejidos recolectados se depositaron en tubos tipo Falcon de 50 ml manteniéndose a 4°C hasta su remisión al LIE del INP, en un lapso no mayor de 48 horas.

5.5.2 Histopatología

Para la evaluación microscópica de los tejidos, éstos se procesaron con la técnica de rutina para histopatología, con base en lo descrito por Heffess y Mullick (1995). Una vez fijados los tejidos, se cortaron secciones de 0.3 a 0.5 cm de grosor y se incluyeron en casetes de plástico, depositándose para su procesamiento automatizado en un histoquejete convencional (Leica). Los tejidos incluidos se deshidrataron con serie ascendente de etanoles (80, 95 y 100%), alcohol absoluto-xileno (relación 1:1) y posteriormente se depositaron en dos cambios xilol y uno final en parafina. Después de la primera exposición en parafina, los tejidos se retiraron del casete y se incluyeron en el fondo de un molde metálico o en el mismo casete y se embebieron en parafina líquida, dejando solidificar a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C, por 15 a 40 minutos. Una vez procesados los tejidos y solidificada la parafina, se cortaron secciones con un microtomo estándar (Leica), de 5 a 7 µm de grosor. Los cortes se extendieron en baño de flotación, se recuperaron montándose en portaobjetos convencionales y se colocaron en platina caliente (37 a 40°C) para su desparafinación. Finalmente los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE), para su posterior revisión por microscopía óptica convencional.

5.5.3 Inmunohistoquímica

Para la identificación específica y morfológica de taquizoítos, pseudoquistes o quistes tisulares de *T. gondii* en los tejidos afectados, se empleó la técnica de inmunohistoquímica con el método de detección complejo avidina-biotina peroxidasa, con base en lo referido por Lindsay y Dubey (1989), Heffess y Mullick (1995) y Ramos-Vara (2005). Como testigo positivo se emplearon secciones de tejido pulmonar de mono ardilla (*Saimiri* sp), en las cuales se identificó

previamente la presencia de taquizoítos y pseudoquistes de *T. gondii* con la misma técnica. Como testigo negativo se emplearon secciones del mismo tejido, sustituyendo el anticuerpo primario con agua destilada.

De cada tejido a evaluar, se realizaron de 2 a 3 cortes seriados de 5 µm de grosor con un microtomo estándar. Los cortes se colocaron en laminillas tratadas previamente con Poli-L-Lisina (Sigma, Chemical Company) y posteriormente se desparafinaron con calor y con dos lavados de xilol. Los residuos de xilol se eliminaron con alcohol absoluto, se inhibió la peroxidasa de las secciones de tejido con peróxido de hidrógeno y se rehidrataron con serie descendente de etanoles (96, 80 y 70%) y agua destilada. Para la recuperación antigénica los tejidos se trataron con pronasa (Sigma-Aldrich) al 1.0%, lavándose con agua destilada y solución amortiguadora TRIS (pH 7.6, 0.05 M). Se bloquearon la avidina y biotina endógenas con soluciones comerciales (Zymed, Cat.: 95-6543B) en cámara húmeda (37°C), así como los sitios de adherencia inespecífica de los anticuerpos 1^{ro} y 2^{ro} con suero de conejo no inmune (Sigma-Aldrich) al 5%.

Posteriormente para cada sección de tejido, se aplicó antisuero policlonal comercial anti-*Toxoplasma gondii* de origen caprino (VMRD Cat.210-70-TOXO) como anticuerpo 1^{ro} y anticuerpo biotinilado IgG de ratón anti-cabra (Biocare Medical, Ref: MG610H) como anticuerpo 2^{ro}. Finalmente se aplicó estreptoavidina comercial (HRP-Streptavidin, Zymed 95-6143). Cada uno de los anticuerpos y la estreptoavidina se incubó en cámara húmeda a 37°C.

Para determinar la presencia o ausencia de antígeno en los tejidos, a cada corte se agregó solución comercial de revelado compuesta por cromógeno (aminoetilcarbazol) (3B, AEC chromogen solution, Zymed 95-6143), solución amortiguadora de la reacción (3A, AEC substrate buffer, Zymed 95-6143) y peróxido de hidrógeno (3C, AEC substrate solution, Zymed 95-6143) al 0.6%. Tras agregar la solución reveladora, se observó la reacción del colorante por microscopía óptica (2 a 3 min aproximadamente) hasta que viró y se detuvo la reacción colocando la laminilla en agua destilada. Los cortes se contrastaron con

hematoxilina de Meyer, se lavaron con agua destilada y solución TRIS, cubriéndose con cubreobjetos convencionales.

Las laminillas de HP e IHQ se revisaron en un microscopio óptico Zeiss Axiostar plus, documentándose representativamente las zonas evaluadas de cada corte con una cámara digital (Power Shot A640, Canon) integrada al equipo.

5.5.4 Microscopía electrónica

Para la identificación ultraestructural de taquizoítos y bradizoítos de *T. gondii*, a partir de casos previamente diagnosticados por HP y/o IHQ, se procesaron tejidos mediante microscopía electrónica de transmisión, con base en la metodología descrita por Hunter (1993), Hayat (2000), Vázquez y Echeverría (2000) y Cedillo (2006).

Los tejidos una vez fijados se colocaron en caja de petri con parafina dental como soporte, agregando de 2 a 3 ml de solución amortiguadora de cacodilatos para mantener su hidratación y de los bordes periféricos de cada tejido se cortaron de 4 a 5 fragmentos de 2 a 3 mm³, depositándose por separado en tubos tipo vacutainer con 3.0 ml de la misma solución amortiguadora para su lavado y eliminación de residuos de la solución fijadora.

Una vez lavadas las muestras, se posfijaron con 2 ml de OsO₄ al 1%, se deshidrataron con serie ascendente de etanoles (50, 70, 80, 96, 100, 100 y 100%), se expusieron a solución intermediadora (óxido de propileno), se preincluyeron con mezcla de resina-óxido (relación 2:1 y 1:1) y finalmente se incluyeron en resinas epoxicas (EMbed 812, Electrón Microscopy Sciences, EMS 14120). Ya procesadas las muestras, se realizaron cortes semifinos de 150 a 180 nm de grosor, montándose en portaobjetos convencional y tiñéndose con azul de Toluidina mediante la metodología de rutina y se revisaron por microscopía convencional (mismo equipo empleado para las laminillas de HP e IHQ); posteriormente se efectuaron cortes finos de 70 a 80 nm de grosor, montándose en rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes semifinos y finos se realizaron con apoyo de un

ultramicrotomo (Reichert Ultracut E). Los cortes finos una vez contrastados se revisaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 (a 50 kv) con la metodología de rutina empleada en la UME del DP de la FMVZ de la UNAM.

5.5.5 PCR

De cada caso a evaluar, se seleccionaron uno o más tejidos (en fresco o fijados formalina amortiguada) para la extracción y amplificación de DNA, con base en lo descrito por Hyman (1995), Jones *et al* (2000), Fan y Gulley (2001), Shi *et al* (2002), Cao *et al* (2003), Gillis (2003), Wastling y Mattsson (2003), Shi *et al* (2004), Coura *et al* (2005), Rico-Torres (2005) y Sánchez (2006); donde previamente se habían confirmado por HP y/o IHQ, lesiones y estructuras parasitarias (taquizoítos, pseudoquistes o quistes tisulares) compatibles con *T. gondii*. Los órganos seleccionados incluyeron secciones de corazón, pulmón, hígado, bazo, linfonodo y/o encéfalo (corteza-hipocampo, tálamo, mesencéfalo, puente o cerebelo).

Para la amplificación de DNA de *T. gondii* por PCR se emplearon los genes B1 mediante una PCR semianidada y los genes GRA6 y SAG3 con una PCR convencional.

Extracción de DNA a partir de tejidos en formalina amortiguada.

De cada órgano evaluado, se cortó 200 mg de tejido, se maceró en mortero con 1 ml de solución PBS, se transfirió el macerado a un microtubo de 1.5 ml y se lavaron con la misma solución (5 lavados con 1 ml de solución PBS en cada lavado) para eliminar los residuos de fijador. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se eliminó la solución PBS y el tejido se resuspendió en 1300 µl de solución comercial de lisis celular (Puregene Cell Lysis Solution, GENTRA, Cat. D-50K2). El tejido se calentó en termoblock (Boekel Scientific) por una hora a 65°C y transcurrido el tiempo se agregó 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma, Cat. 39450-01-6), dejándose incubar a 55°C durante toda la noche.

Una vez lisado el tejido, se calentó el microtubo a 95°C por 10 minutos para inactivación de la proteinasa K, dejándose enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente el contenido se transfirió por separado a un tubo tipo Conrning de 15 ml, agregando 1 ml de solución comercial de precipitación de proteínas (Puregene Protein Precipitation solution, GENTRA, Cat. D-50K3), se mezcló en vortex y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se recuperó el líquido y se transfirió a un nuevo tubo, agregando 2 ml de isopropanol (Sigma, Cat. I9516-500ML) para la precipitación de DNA, se mezcló generosamente por inversión 20 veces y se mantuvo a -20°C por 48 horas.

Transcurrido el tiempo, el tubo se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, se eliminó la solución por decantación y se agregaron 2 ml de etanol frío al 70%, se mezcló en vortex y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Se decantó el etanol y el tubo se invirtió dejándolo secar sobre papel absorbente por un lapso de 30 a 40 minutos. Una vez evaporado el etanol, el botón de material formado en el fondo del tubo se hidrató con 100 µl de solución de hidratación comercial (Puregene DNA Hydration Solution, GENTRA, Cat. D-50K4), transfiriendo posteriormente el DNA hidratado a microtubo de 1.5 ml, almacenándose a -20°C hasta su empleo.

Extracción de DNA a partir de tejidos en fresco

De los órganos recolectados durante el estudio postmortem, se cortó 200 mg de cada tejido, se maceró en mortero con 1300 µl de solución comercial de lisis celular y posteriormente el tejido macerado se transfirió a microtubo de 1.5 ml. El tejido se calentó en termoblock por una hora a 65°C y transcurrido el tiempo se agregaron 15 µl de proteinasa K (20 mg/ml), dejándose incubar a 55°C por toda la noche. El resto del proceso se continuó de forma similar a lo descrito en la metodología para la extracción de DNA de tejidos en formalina amortiguada, a excepción de la precipitación de DNA con isopropanol, donde después de mezclar generosamente por inversión, los tejidos se continuaron procesando con la etapa de exposición a etanol, sin mantenerse en isopropanol a -20°C por 48 horas.

Cuantificación y pureza de DNA

La concentración y pureza de DNA se determinó mediante espectrofotometría convencional (DU650 Beckman Coulter), diluyendo el DNA de cada muestra en agua desionizada a una relación 1:125, leyendo en microcubeta de cuarzo las longitudes de onda a 260 nm (absorbancia para ácidos nucleicos) y 280 nm (absorbancia para proteínas).

La concentración de DNA extraído se calculó con base en la siguiente fórmula: [] de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)= $\text{OD}_{260} \times 125 \times 50$; donde “ OD_{260} ” es el promedio de las absorbancias a 260 nm, “125” es el factor de dilución de la muestra y “50” el factor de lectura del equipo. La pureza del DNA extraído se calculó con base en la siguiente fórmula: pureza de DNA= $\text{OD}_{260}:\text{OD}_{280}$. El ratio de pureza de DNA se estableció entre 1.7 a 2.0, valores por debajo de 1.7 se consideraron como contaminación con proteínas, mientras que valores por encima de 2.0 se consideraron como contaminación por RNA.

Amplificación del DNA

El DNA extraído de los diferentes tejidos en fresco y formalina amortiguada, se evaluaron mediante PCR para la amplificación de los genes B1, GRA6 o SAG3. Para el gen B1, se llevó a cabo una PCR semianidada empleando los iniciadores TM1, TM2 y TM3, con base en lo descrito por Rico (2005), los cuales amplifican una región de 619 y 362 pb respectivamente, del mencionado gen. Para el gen GRA6, se emplearon los iniciadores GRA6-F1 y GRA6-R1x, amplificando un producto de 344 pb, mientras que para el gen SAG3, se emplearon los iniciadores P43S1 y P43AS1, amplificando un producto de 311 pb (Cuadro 11). Para los genes GRA6 y SAG3 se empleó la metodología descrita por Su *et al* (2006). Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM y fueron verificados por el programa NCBI/BLAST. Como control positivo *T. gondii* se emplearon diluciones de DNA de las cepas de referencia RH y Wiktor, como control negativo se empleó agua desionizada.

Cuadro 11. Iniciadores empleados para la amplificación de DNA (PCR) de *Toxoplasma gondii* y enzimas de digestión utilizadas para genotipificación (RFLP).

Cromosoma	Marcador	Iniciadores	Tamaño (pb)	Enzimas de restricción	Referencia
IX	B1	TM1: 5'-GAGAGGTCCGCCCCACAAG TM2: 5'-CTGCTGGTGCACGGGAGTG	619	---	Rico-Tores, 2005
IX	B1	TM2: 5'-CTGCTGGTGCACGGGAGTG TM3: 5'-CAGGAGTTGGATTTGTAGA	362	---	Rico-Torres, 2005
X	GRA6	GRA6-F1: TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6-R1x: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	<i>Msel</i>	Su <i>et al</i> , 2006
XII	SAG3	P43SS1: CAACTCTCACCATTCCACCCC P43AS1: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	311	<i>NciI</i>	Su <i>et al</i> , 2006

Para la primera parte de la PCR semianidada, las condiciones de la mezcla maestra fueron las siguientes: para un volumen final de 50 μ l se emplearon 5.0 μ l de amortiguador de PCR (10x PCR Gold Buffer, Roche), 5.0 μ l de MgCl₂ (25 mM, Roche), 1.0 μ l de dNTP's mix (10 mM, Roche), 3.0 μ l de cada oligonucleótido (TM1 y TM2, dilución 1:50, 400 pmol), 1.5 μ l de DMSO (Dimetil sulfoxido, 5%, SIGMA), 0.5 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l Ampli Taq Gold, Roche) y 1.0 μ g/ μ l de cada DNA a evaluar. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de gradiente (Veriti, Applied Biosystem) con un paso inicial de desnaturalización de 95°C por 3 minutos y 40 ciclos con desnaturalización (94°C por 30 segundos), alineamiento (65°C por 60 segundos) y extensión (72°C por 60 segundos), concluyendo con una elongación final a 72°C por 10 minutos. Una vez terminados los ciclos, las muestras se mantuvieron a 4°C en el interior del equipo y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su empleo. La segunda parte de la PCR semianidada incluyó una nueva amplificación con el mismo protocolo antes descrito, con las siguientes modificaciones: para la mezcla maestra los oligonucleotidos empleados fueron el TM2 y TM3 (mismas concentraciones) y como templado de DNA se empleó 1.0 μ l del DNA amplificado durante la primera parte de la PCR semianidada. Para la reacción en el termociclador se mantuvieron condiciones similares, modificando solamente la temperatura de alineamiento a 55°C por 60 segundos.

Para los genes GRA6 y SAG3 las condiciones de la mezcla maestra fueron similares que para la primera parte de la PCR semianidada para el gen B1, sustituyendo los iniciadores para cada gen respectivamente, empleándose a una dilución 1:20 de una concentración base a 400 pmol. La reacción en el termociclador fue similar a la empleada en ambos ciclos de la PCR semianidada, manejándose una temperatura de alineamiento de 60°C por 60 segundos para ambos genes. En los casos donde no se visualizaban productos de amplificación o las bandas obtenidas eran muy tenues, se consideró reamplificar el DNA de cada gen, empleando las mismas condiciones que la PCR convencional, tomando como templado de DNA 1.0 μ l del amplificado original de cada gen.

Visualización de productos de amplificación

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis (cámara horizontal; Biorad) en gel de azarosa (Gibco) al 1% con bromuro de etidio (0.5 mg/1.0 ml, Invitrogen), observándose en un transiluminador (Herolab) con luz ultravioleta y documentándose digitalmente con software comercial.

Casos positivos por biología molecular

Se consideró como órgano positivo por biología molecular, aquellos tejidos que amplificaron con bandas tenues o bien definidas, para uno o más genes. Como caso positivo, se consideró la amplificación de por lo menos un tejido, con cualquiera de los genes evaluados.

5.5.6 PCR-RFLP

Para identificar el genotipo en cada caso confirmado por PCR, el polimorfismo de cada locus fue analizado por los patrones generados por el RFLP, a partir de los productos de amplificación de los genes GRA6 y SAG3, con base en la metodología descrita por Su *et al* (2006).

Digestión del DNA genómico con enzimas de restricción

Los productos de amplificación de los genes GRA6 y SAG3 fueron digeridos con las enzimas *MseI* y *NciI*, respectivamente (Cuadro 11). Para el marcador GRA6, la reacción de digestión incluyó para un volumen final de 50 µl: 5.0 µl de DNA amplificado por PCR, 5.0 µl de solución amortiguadora de digestión (NEB2 10x), 0.5 µl de BSA (10 mg/ml), 1.0 µl de la enzima *MseI* (10U/µl) y el volumen restante de agua desionizada. Para el marcador SAG3, la reacción incluyó: 5.0 µl de DNA amplificado por PCR, 5.0 µl de solución amortiguadora de digestión (NEB4 10x), 0.5 µl de BSA (10 mg/ml), 0.5 µl de la enzima *NciI* (20U/µl) y el volumen restante de agua desionizada. La reacción de digestión para ambos marcadores se incubó a 37°C en termoblock durante toda la noche. Como

controles positivos se incluyeron productos de amplificación de diluciones de DNA de las cepas de referencia RH y Wiktor y como control negativo se empleó agua desionizada sustituyendo el DNA a digerir.

Visualización de productos de digestión

Los productos de digestión se visualizaron de forma similar a lo descrito para los productos de amplificación por PCR, modificando solamente la concentración del gel de agarosa al 3%.

6. RESULTADOS

6.1 Selección del material de estudio

De los registros y archivo de diagnóstico de las tres entidades (Departamento de Patología, Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre y Zoológico de Guadalajara), así como los estudios de necropsia realizados durante el periodo mencionado, se seleccionaron 222 casos de animales de fauna silvestre pertenecientes a 6 órdenes, 16 familias y 36 especies (incluyendo carnívoros, herbívoros, primates del nuevo y viejo mundo, marsupiales australianos y americanos, mamíferos marinos y aves), con base en los criterios mencionados anteriormente. De los casos seleccionados, 71 presentaban lesiones o diagnóstico sugerente de infección por parásitos apicomplexa.

6.2 Anatomopatología

De los 222 casos revisados, se participó en 15 necropsias de mamíferos y aves llevadas a cabo en el DP de la FMVZ, UNAM y en el LP de la DGZVS. De los 71 casos con lesiones referidas o diagnóstico sugerente de infección, se recuperaron las laminillas o generaron nuevos cortes de 56 casos, considerándose 29 casos como sospechosos (Cuadro 12) y de estos, 13 casos fueron compatibles con toxoplasmosis por anatomopatología, con base en los criterios anatomopatológicos establecidos.

6.2.1 Necropsia y hallazgos macroscópicos

De los 15 casos evaluados *postmortem*, en 13 de ellos se presentaron lesiones asociadas a entidades de tipo nutricional, físico-traumáticas o infecciosas (bacterianas o micóticas), presentándose solamente en dos monos ardilla (*Saimiri sciureus*), lesiones macroscópicas sugerentes de infección por *T. gondii*.

En ambos primates se presentó condición corporal regular y el pelo hirsuto (Figura 18), las fosas nasales y cavidad oral tenían líquido espumoso

Cuadro 12. Casos seleccionados sospechosos de toxoplasmosis, diagnosticados entre los años 1999 a 2008.

No. de Caso	Entidad	Nombre común	Nombre científico	Edad	Genero	Diagnóstico emitido en la entidad	Año de deceso
1	FMVZ, UNAM	Delfín del Atlántico	(<i>Tursiops truncatus</i>)	Cría	NR	Toxoplasmosis intestinal	2003
2	FMVZ, UNAM	Mono ardilla	(<i>Saimiri sciureus</i>)	Adulto	Macho	Toxoplasmosis aguda	2006
3	FMVZ, UNAM	Mono ardilla	(<i>Saimiri sciureus</i>)	Adulto	Hembra	Toxoplasmosis aguda	2006
4	FMVZ, UNAM	Canguro	(<i>Macropus spp</i>)	NR	Macho	Neumonía	2007
5	DGZVS	Wallaby	(<i>Macropus spp</i>)	5 años	Macho	Síndrome paraneoplásico	2000
6	DGZVS	Wallaby	(<i>Macropus spp</i>)	Adulto	Macho	NR	2001
7	DGZVS	Wallaby	(<i>Macropus spp</i>)	Adulto	Hembra	NR	2001
8	DGZVS	Wallaby de Bennet	(<i>Macropus rufogriseus</i>)	NR	NR	NR	2002
9	DGZVS	Wallaby de Bennet	(<i>Macropus rufogriseus</i>)	NR	NR	NR	2003
10	DGZVS	Wallaby	(<i>Macropus spp</i>)	3 años	Hembra	Multifactorial	2005
11	DGZVS	Wallaby	(<i>Macropus spp</i>)	NR	NR	NR	2007
12	DGZVS	Wallaby de Tammar	(<i>Macropus eugenii</i>)	Adulto	Macho	Choque neurogenico	2008
13	DGZVS	León africano	(<i>Panthera leo</i>)	19 años	Hembra	Cuadro multiorganico	2008
14	DGZVS	Canguro gris	(<i>Macropus giganteus</i>)	5 años	Macho	Insuficiencia cardiopulmonar	2008
15	DGZVS	Oso negro	(<i>Ursus americanus</i>)	24 años	Hembra	Insuficiencia renal crónica	2008
16	DGZVS	Wallaby	(<i>Macropus spp</i>)	4 años	Macho	Neumonía	2008
17	DGZVS	Canguro gris	(<i>Macropus giganteus</i>)	NR	NR	NR	1999
18	ZG	Mono saraguato	(<i>Alouatta spp</i>)	NR	NR	NR	2000
19	ZG	Mono ardilla	(<i>Saimiri sciureus</i>)	NR	NR	NR	2000
20	ZG	Mono ardilla	(<i>Saimiri sciureus</i>)	NR	NR	NR	2006
21	ZG	Mono ardilla	(<i>Saimiri sciureus</i>)	NR	NR	NR	2006
22	ZG	Lémur	(<i>Lemur catta</i>)	NR	NR	NR	2008
23	ZG	Lémur	(<i>Lemur catta</i>)	NR	NR	NR	2008
24	ZG	Canguro rojo	(<i>Macropus rufus</i>)	NR	NR	NR	2007
25	ZG	Canguro rojo	(<i>Macropus rufus</i>)	NR	NR	NR	2007
26	ZG	Canguro rojo	(<i>Macropus rufus</i>)	NR	NR	NR	2007
27	ZG	Canguro rojo	(<i>Macropus rufus</i>)	NR	NR	NR	2007
28	ZG	Canguro rojo	(<i>Macropus rufus</i>)	NR	NR	NR	2007
29	ZG	Canguro rojo	(<i>Macropus rufus</i>)	NR	NR	NR	2007

NR: datos no referidos



Figura 18. Necropsia de mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Aspecto macroscópico del cadáver, presentando condición corporal regular y pelo hirsuto.

serosanguinolento en moderada cantidad. Al incidir la piel y separarla del cuerpo, se apreció escaso tejido subcutáneo de forma generalizada, los linfonodos de la región orofaríngea se encontraban aumentados de tamaño y a nivel de la faringe, el líquido espumoso antes referido provenía de vías respiratorias. Los lóbulos pulmonares presentaban coloración rosa difusa con zonas rojas aleatoriamente; se encontraban aumentados de tamaño ligeramente, de aspecto brillante y los septos interlobulillares eran evidentes (Figura 19). Al corte del parénquima se apreció salida de líquido espumoso serosanguinolento en abundante cantidad. El hígado tenía coloración café ocre generalizada con patrón lobular incrementado moderadamente, con presencia de focos blanquecinos multifocales en ligera cantidad. Los linfonodos gastroesplénicos y mesentéricos así como el bazo se apreciaron aumentados de tamaño ligeramente, de color café rojizo oscuro. El resto de los órganos de las cavidades no presentaron lesiones macroscópicas evidentes. El diagnóstico *postmortem* emitido para ambos animales fue de insuficiencia respiratoria por edema pulmonar generalizado.

De los casos remitidos del ZG, algunos órganos presentaron cambios macroscópicos evidentes. Las secciones de pulmón de los 3 monos ardilla presentaban separación marcada de los septos interlobulillares y la superficie de los tejidos fijados denotaba múltiples zonas de color grisáceo, dando aspecto de mosaico a nivel pleural. Secciones de parénquima hepático de dos canguros rojos presentaron en su superficie múltiples puntos y zonas blanquecinas multifocales, las cuales al corte del tejido, se extendían al interior del parénquima, dichos cambios fueron sugerentes de zonas de necrosis multifocales de origen infeccioso. En los tejidos recuperados de la DGZVS, se apreciaron discretos cambios macroscópicos en sistema nervioso central de marsupiales. Algunas secciones coronales de encéfalo a nivel del tálamo, mesencéfalo y puente, presentaron puntos de color café rojizo multifocales en sustancias blanca y gris, siendo sugerentes de congestión y hemorragia perivascular multifocal (Figura 20).

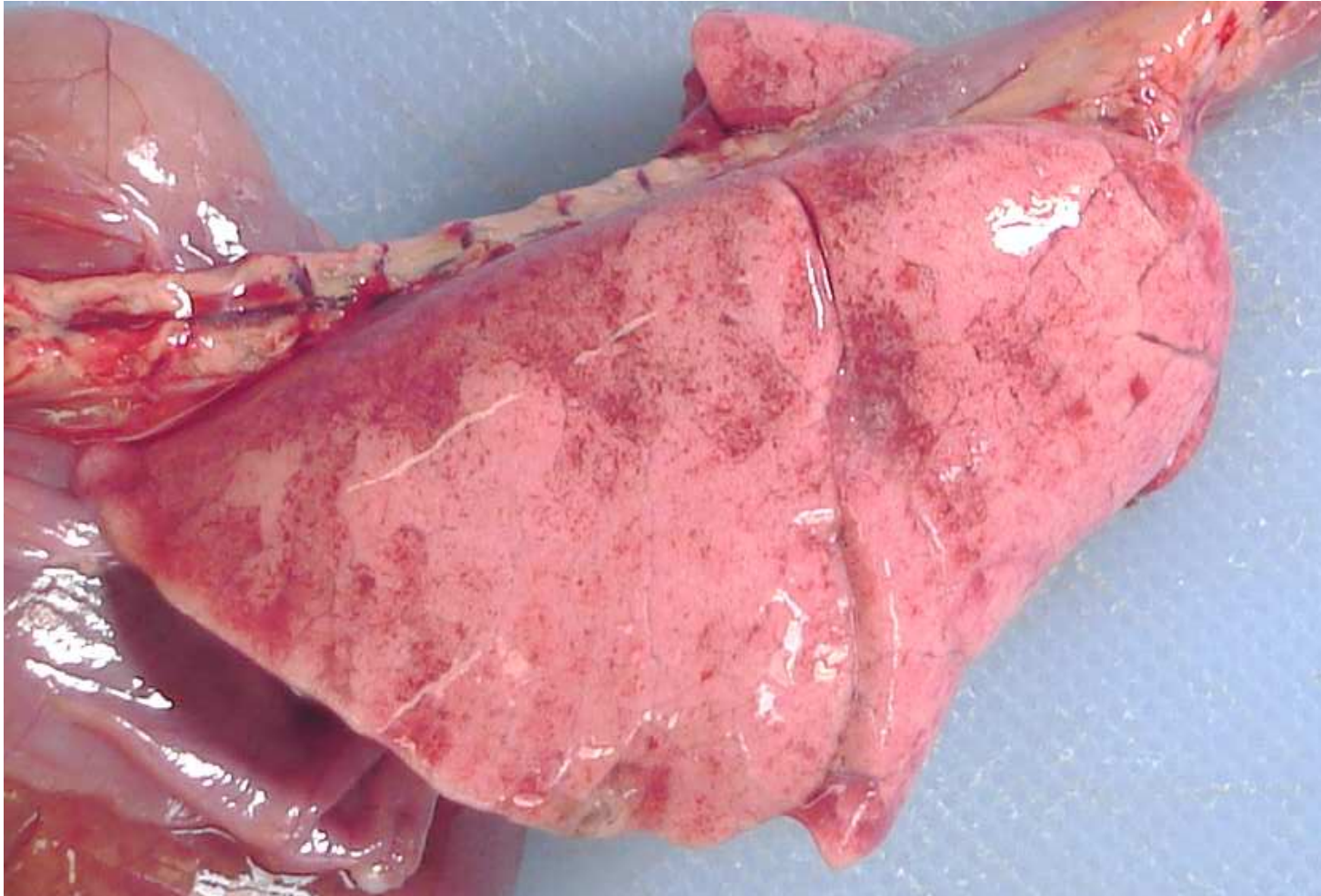


Figura 19. Edema pulmonar generalizado, necropsia de mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Vista lateral de lóbulos pulmonares del lado derecho, presentando coloración rosa difusa con zonas rojas aleatoriamente, de aspecto brillante y septos Interlobulillares notorios.

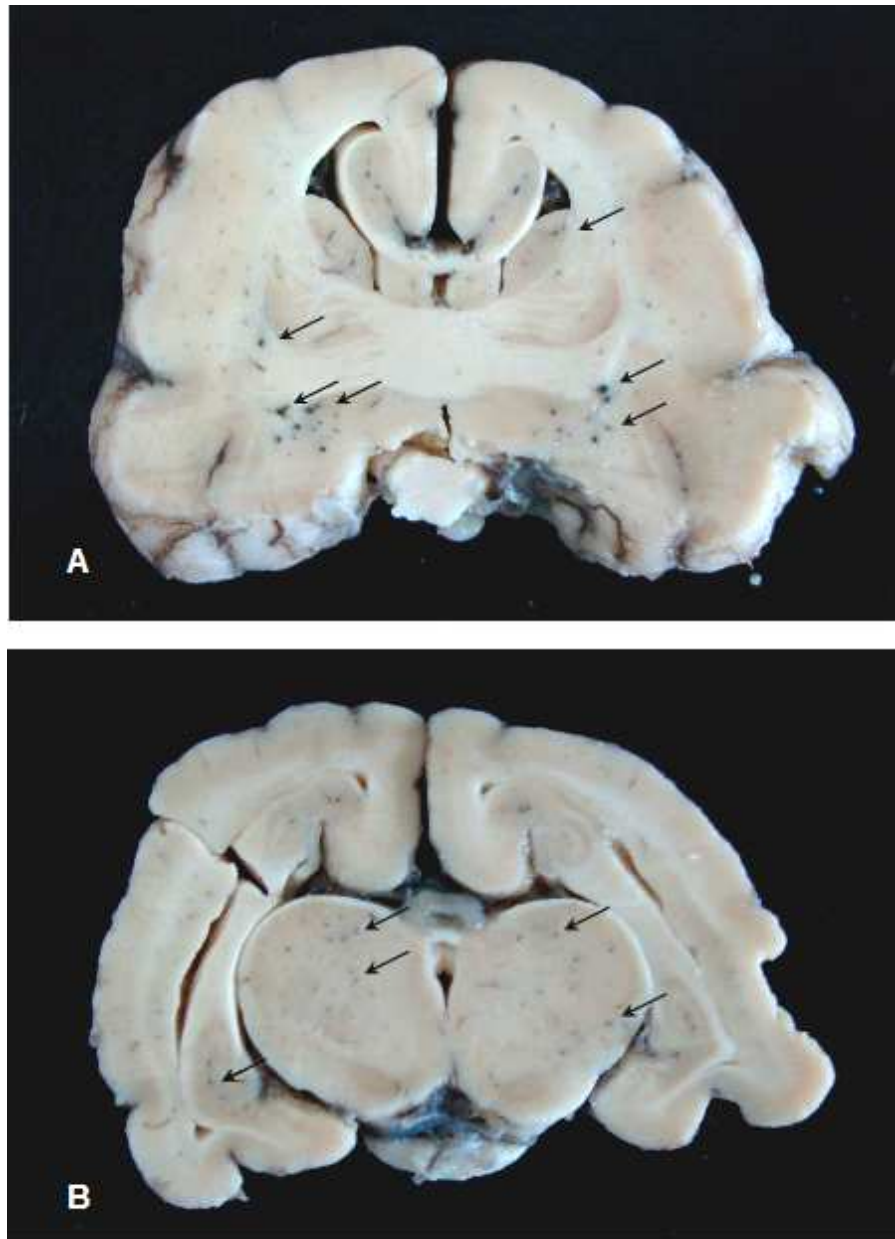


Figura 20. Cambios macroscópicos en sistema nervioso de marsupiales. Se observan cortes coronales de encéfalo a nivel de cerebro medio (A) y tálamo (B), observándose tanto en sustancia gris como blanca, puntos de color café rojizo (flechas) multifocales en las sustancias blanca y gris, sugerentes de congestión y hemorragia perivascular multifocal.

6.2.2 Hallazgos microscópicos

A partir de los 56 casos donde se obtuvieron cortes histológicos, las laminillas fueron evaluados con base en la metodología descrita para confirmación, modificación o descarte del diagnóstico emitido. Los casos evaluados microscópicamente incluyeron secciones histológicas de corazón, pulmón, estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas, hígado, bazo, linfonodos regionales, riñón y encéfalo (corteza, hipocampo, tálamo, mesencéfalo, puente y médula oblonga). Se descartaron 27 casos posteriores a su revisión histopatológica, tras confirmarse el diagnóstico emitido previamente en cada laboratorio. En ninguno de los casos descartados se apreciaron lesiones de tipo necróticas con el patrón de distribución de infección por *T. gondii* o la presencia de parásitos de la familia Apicomplexa.

Los 29 casos considerados sospechosos, presentaron alteraciones en diferentes órganos, con grado y distribución variable.

En el sistema cardiovascular, dos canguros rojos (*Macropus rufus*) presentaron lesiones en corazón (Cuadro 13), observándose a nivel del miocardio infiltrado linfoplasmocitario e histiocítico ligero multifocal, degeneración y necrosis de miofibrillas, así como presencia de abundantes quistes tisulares (Figura 21).

En monos ardilla, mono saraguato (*Alouatta* spp), lémures (*Lemur catta*) y canguros (Cuadro 13) se observó neumonía intersticial (exfoliativa o necrótica) de moderada a severa difusa con congestión y edema pulmonar. En todos los casos, se apreciaron intracelularmente en neumocitos y macrófagos alveolares, pseudoquistes con estructuras parasitarias en leve a abundante cantidad, así como taquizoítos fagocitados, tanto viables como en degeneración (Figura 22).

En el sistema digestivo (Cuadro 14), se apreciaron a nivel de intestino delgado, dos patrones de lesión tisular. El primer patrón se observó en un delfín del Atlántico (*Tursiops truncatus*), apreciándose enteritis necrótica severa difusa con presencia de abundantes estructuras parasitarias intracelulares en diferentes estadios de división (Figura 23). El segundo patrón se presentó en monos ardilla, observándose enteritis linfoplasmocitaria de leve a moderada difusa, edema ligero

Cuadro 13. Alteraciones microscópicas en corazón y pulmón asociadas a toxoplasmosis.

No de Caso	Especie	Corazón			Pulmón		
		Miocarditis	Degeneración y necrosis de miofibrillas	Quistes tisulares	Edema y congestión	Neumonía intersticial	Taquizoítos y pseudoquistes
2	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
3	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
4	Canguro	ND	ND	ND	(+++)	(+++)	(+++)
12	Wallaby de Tammar	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	León africano	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
14	Canguro gris	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
15	Oso negro	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
16	Wallaby	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
18	Mono saraguato	ND	ND	ND	(++)	(++)	(+)
19	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
20	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(++)
21	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
22	Lémur	(+)	(-)	(-)	(++)	(++)	(+)
23	Lémur	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
24	Canguro rojo	(+)	(++)	(+)	(+++)	(+++)	(++)
25	Canguro rojo	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
26	Canguro rojo	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)
27	Canguro rojo	ND	ND	ND	(+++)	(+++)	(++)
28	Canguro rojo	ND	ND	ND	(+++)	(+++)	(++)
29	Canguro rojo	ND	ND	ND	(+++)	(+++)	(+++)

Grado de la lesión o cantidad de estructuras parasitarias: (+) leve, (++) moderado, (+++) severo o abundante, (-) negativo
 ND: no determinado

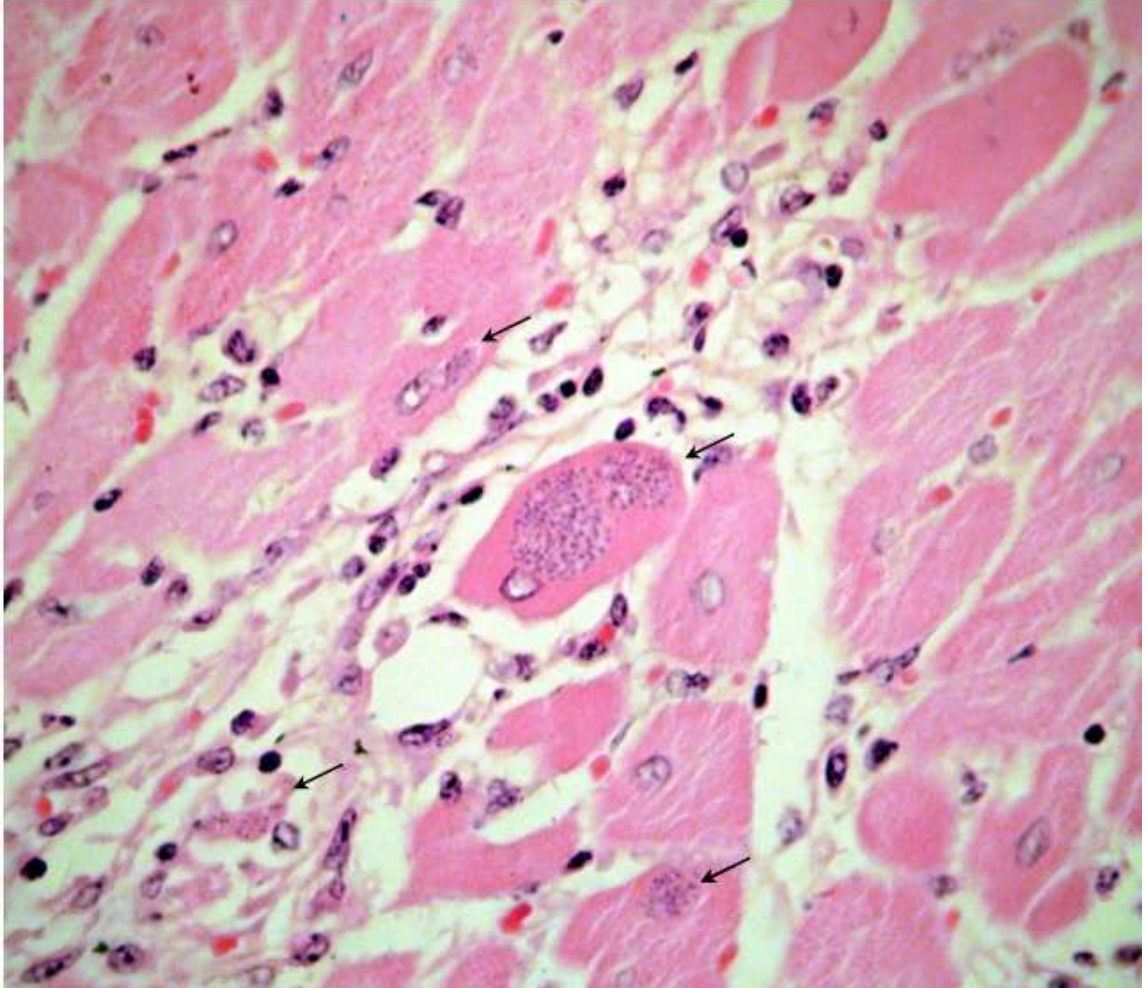


Figura 21. Miocarditis linfoplasmocitaria e histiocítica con presencia de quistes tisulares de *Toxoplasma gondii* en canguro rojo (*Macropus rufus*). Se aprecia sección de miocardio, presentando las miofibrillas degeneración y necrosis con presencia de quistes tisulares de diferentes tamaños (flecha), así mismo se observa infiltrado intersticial linfoplasmocitario y algunos macrófagos. HE, 400x.

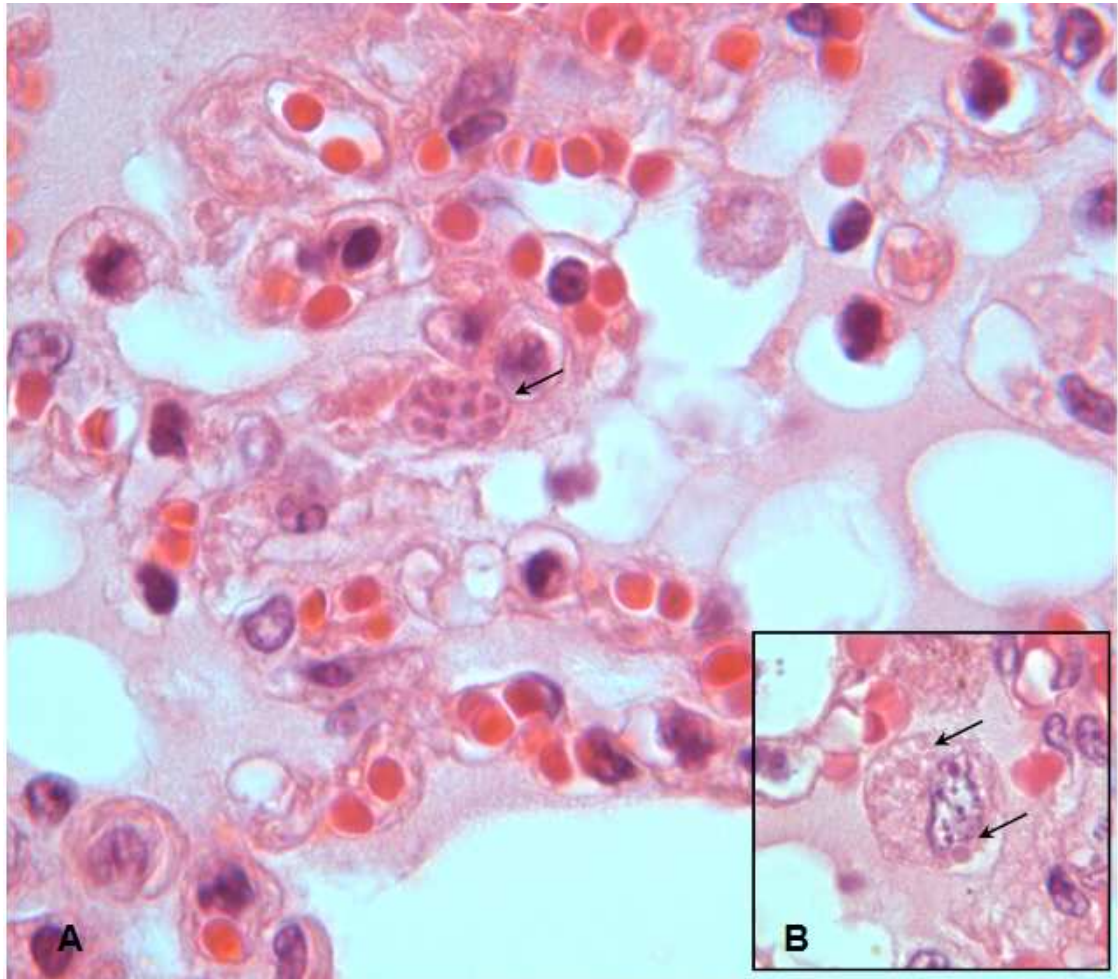


Figura 22. Neumonía intersticial con presencia de pseudoquistes y tachizoítos de *Toxoplasma gondii* fagocitados, en mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Detalle de la pared alveolar (A) con presencia de un pseudoquiste (flecha) conteniendo tachizoítos viables de aspecto redondeados y basofílicos, con delimitación de su citoplasma. En el recuadro (B) se aprecia un macrófago con tachizoítos en degeneración fagocitados, los cuales presentan aspecto redondeado, eosinofílicos refringentes. HE, 1000x.

difuso y descamación epitelial leve segmentaria con presencia aleatoria de estructuras parasitarias intra y extracelularmente (Figura 24).

Monos ardilla, mono saraguato, lémures y canguros (Cuadro 14) presentaron hepatitis necrótica con infiltrado linfoplasmocitario de leve a severo multifocal con presencia en todos los casos de pseudoquistes intralesionales y adyacentes a las zonas de necrosis, así mismo, se observaron taquizoítos libres en sinusoides hepáticos e intralesionales (Figuras 25 y 26).

Los órganos linfoides incluyendo bazo y linfonodos, presentaron extensas zonas de necrosis multifocal con congestión y hemorragias de los órganos, así como la presencia de pseudoquistes y taquizoítos libres en moderada a abundante cantidad (Figura 27). También se observó despoblación linfoide y edema medular moderado difuso en los casos de monos ardilla. Dichos cambios se apreciaron en los mismos casos que presentaron lesiones pulmonares y hepáticas.

En el sistema nervioso central se apreciaron diferentes cambios de tipo inflamatorio y degenerativo (Cuadro 15). En secciones de corteza, hipocampo, tálamo, mesencéfalo y puente de wallabys, monos ardilla, un león africano (*Panthera leo*) y canguros, se observó degeneración, necrosis neuronal, satelitosis y neuronofagia de leve a moderada multifocal. En sustancia blanca y gris de las mismas regiones, se observaron focos y zonas de gliosis, así como infiltrado linfoplasmocitario perivascular en parénquima y meninges, siendo dichos cambios de leves a moderados multifocales, prevaleciendo a nivel de encéfalo medio. Zonas francas de necrosis multifocal se presentaron en la mayoría de los marsupiales referidos, así como presencia de quistes tisulares de diferentes tamaños, localizados adyacentes a las zonas de gliosis, inflamación y necrosis (Figura 28). Así mismo, en algunas regiones se observaron quistes tisulares sin presencia de respuesta celular. En un mono ardilla, se apreciaron cambios degenerativos neuronales con gliosis ligera multifocal y presencia de pseudoquistes en células endoteliales de ventrículos laterales (Figura 29) con ligero infiltrado linfoplasmocitario zonal.

Cuadro 14. Alteraciones microscópicas en intestino delgado e hígado asociadas a toxoplasmosis.

No de Caso	Especie	Intestino delgado				Hígado		
		Edema y descamación	Infiltrado LPØ	Necrosis multifocal o difusa	Taquizoítos	Necrosis multifocal	Infiltrado LPØ	Taquizoítos y pseudoquistes
1	Delfin del Atlántico	(++)	(++)	(+++)	(+++)	ND	ND	ND
2	Mono ardilla	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)
3	Mono ardilla	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)
12	Wallaby de Tammam	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	León africano	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	Canguro gris	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	Oso negro	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	Wallaby	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	Mono saraguato	ND	ND	ND	ND	(++)	(++)	(++)
19	Mono ardilla	(+)	(+)	(-)	(-)	(++)	(++)	(++)
20	Mono ardilla	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)
21	Mono ardilla	(+)	(+)	(-)	(+)	(++)	(++)	(++)
22	Lémur	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
23	Lémur	ND	ND	ND	ND	(++)	(+)	(+)
24	Canguro rojo	ND	ND	ND	ND	(-)	(+)	(-)
25	Canguro rojo	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+++)	(+)
26	Canguro rojo	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) a (++)	(+)	(++)

Grado de la lesión o cantidad de estructuras parasitarias: (+) leve, (++) moderado, (+++) severo o abundante, (-) negativo. ND: no determinado

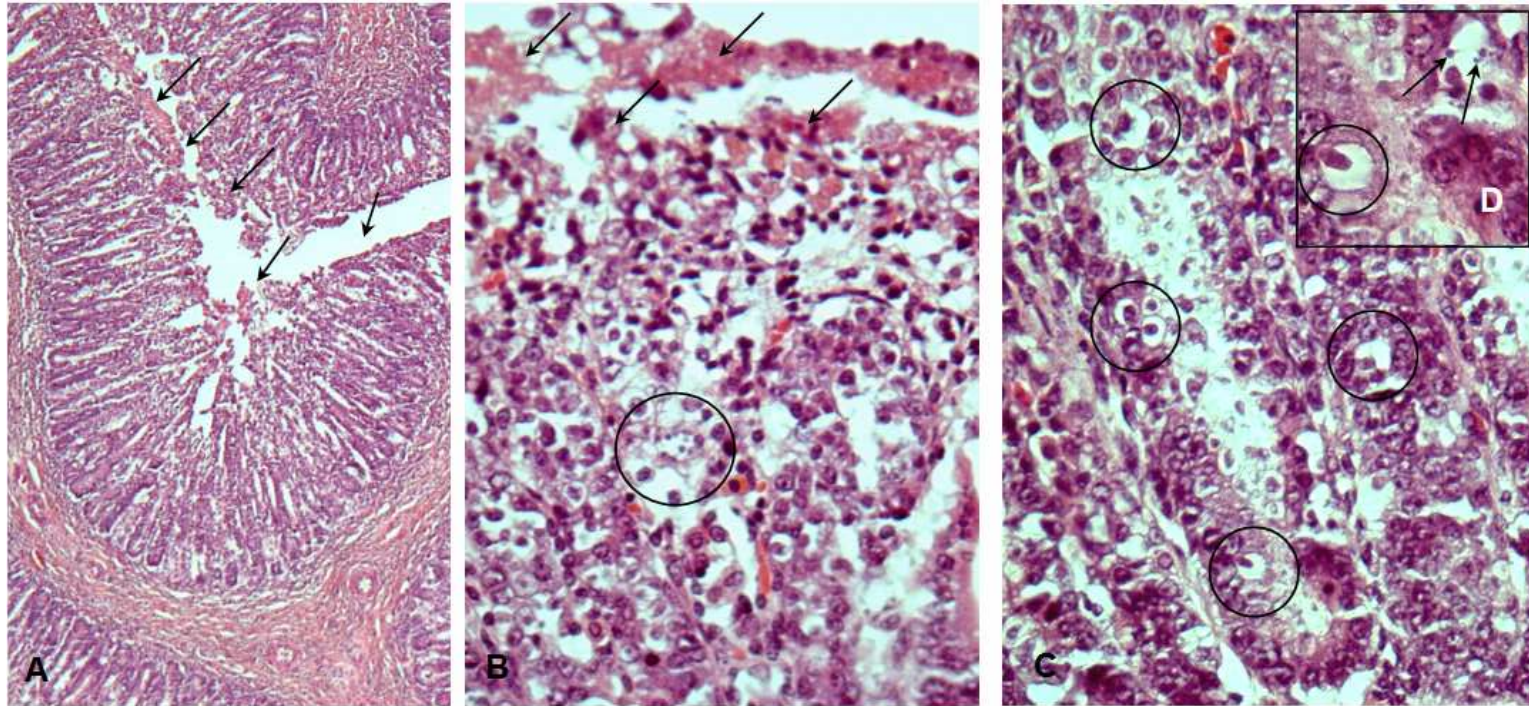


Figura 23. Enteritis necrótica severa difusa en delfín del atlántico (*Tursiops truncatus*). A) Vista panorámica de sección de intestino delgado presentando en la mucosa mayor celularidad y borde con material necrótico (flecha), HE, 40x; B) Borde de mucosa con necrosis superficial (flecha) con infiltrado linfoplasmocitario y presencia de estructuras parasitarias (circulo) intralesionales, H&E, 200x; C) Criptas intestinales con descamación, infiltrado linfoplasmocitario y estructuras parasitarias (círculos) sugerentes de *Toxoplasma gondii*, HE, 200x; D) Detalle de cripta intestinal con estructuras parasitarias (flechas) intracelulares (2 μ m de diámetro aproximadamente) y otras de forma oval (circulo) de mayor tamaño (10 μ m de diámetro aproximadamente), HE, 500x.

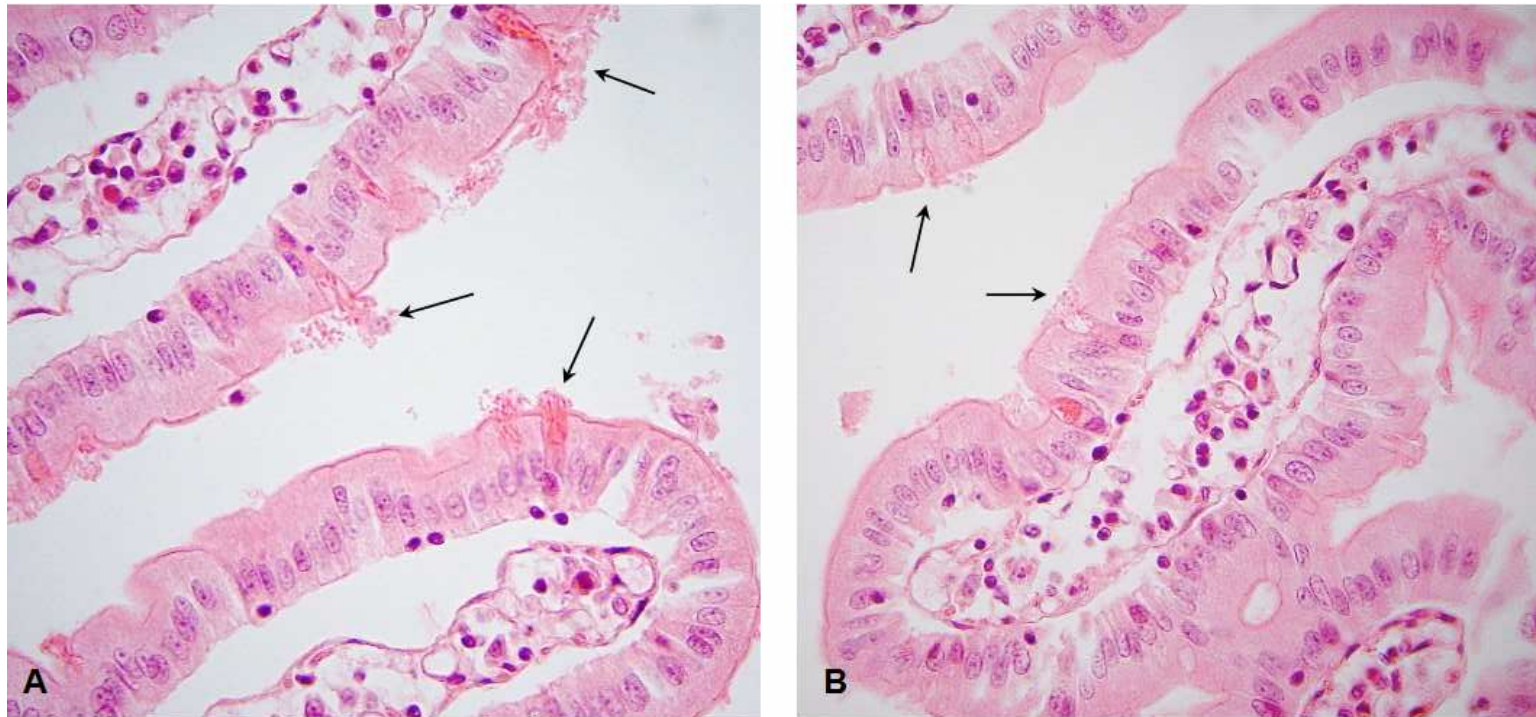


Figura 24. Enteritis linfoplasmocitaria leve difusa con edema intersticial en mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Se observan secciones de intestino (A y B) presentando la mucosa intestinal intacta con ligero infiltrado linfoplasmocitario intersticial embebido en material eosinofílico claro (edema), algunos enterocitos presentan diferente afinidad tintorial con protrusión hacia la luz de estructuras ovales y elongadas (flechas), sugerentes de parásitos Apicomplexa. HE, 400x.

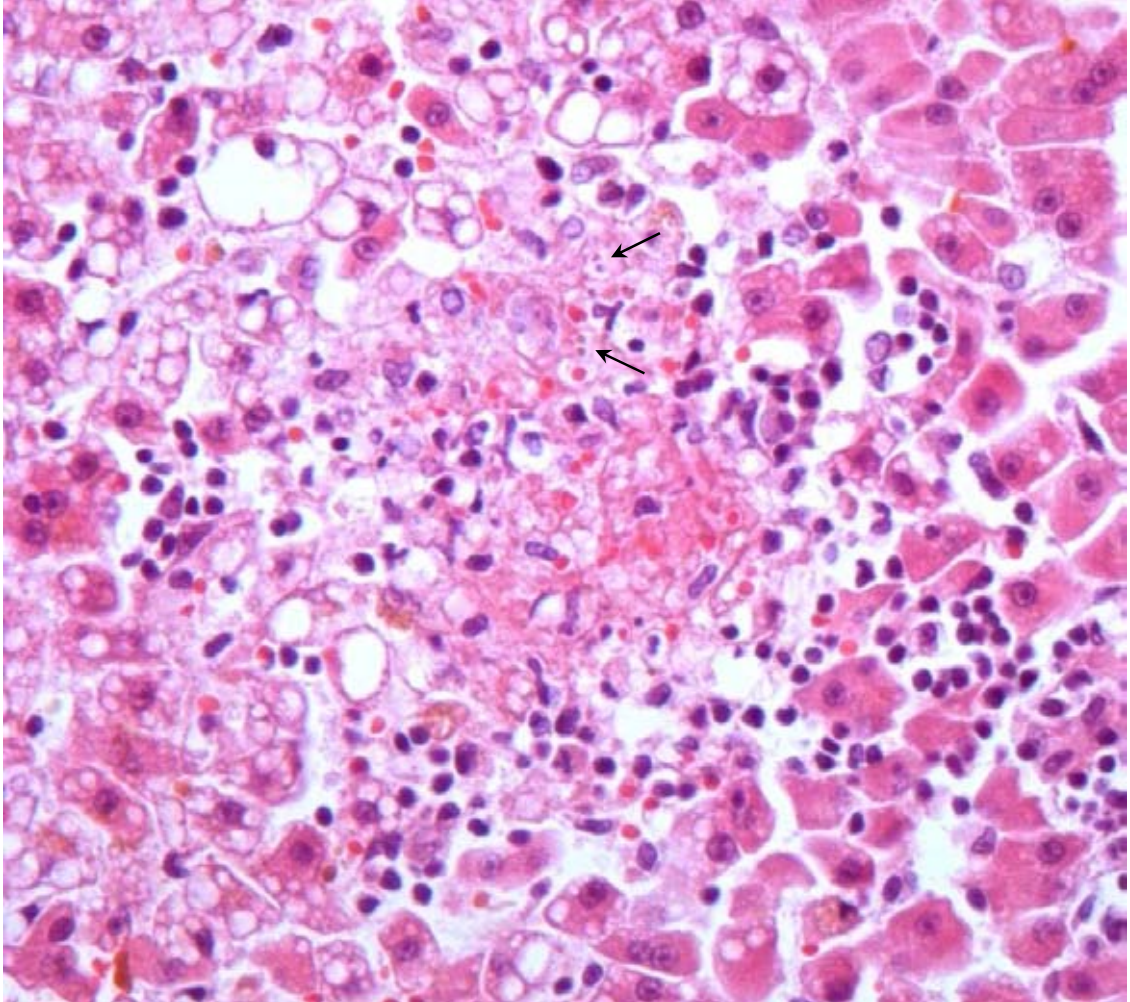


Figura 25. Hepatitis necrótica severa zonal en mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Se observa sección de hígado, presentando una zona extensa de necrosis coagulativa delimitada por infiltrado linfoplasmocitario con presencia de estructuras parasitarias intralesionales (flechas) sugerentes de *Toxoplasma gondii*; del lado izquierdo adyacente a la zona de necrosis, los hepatocitos presentan vacuolización de su citoplasma (degeneración grasa), mientras que los del lado derecho morfológicamente no presentan alteraciones. HE, 400x.

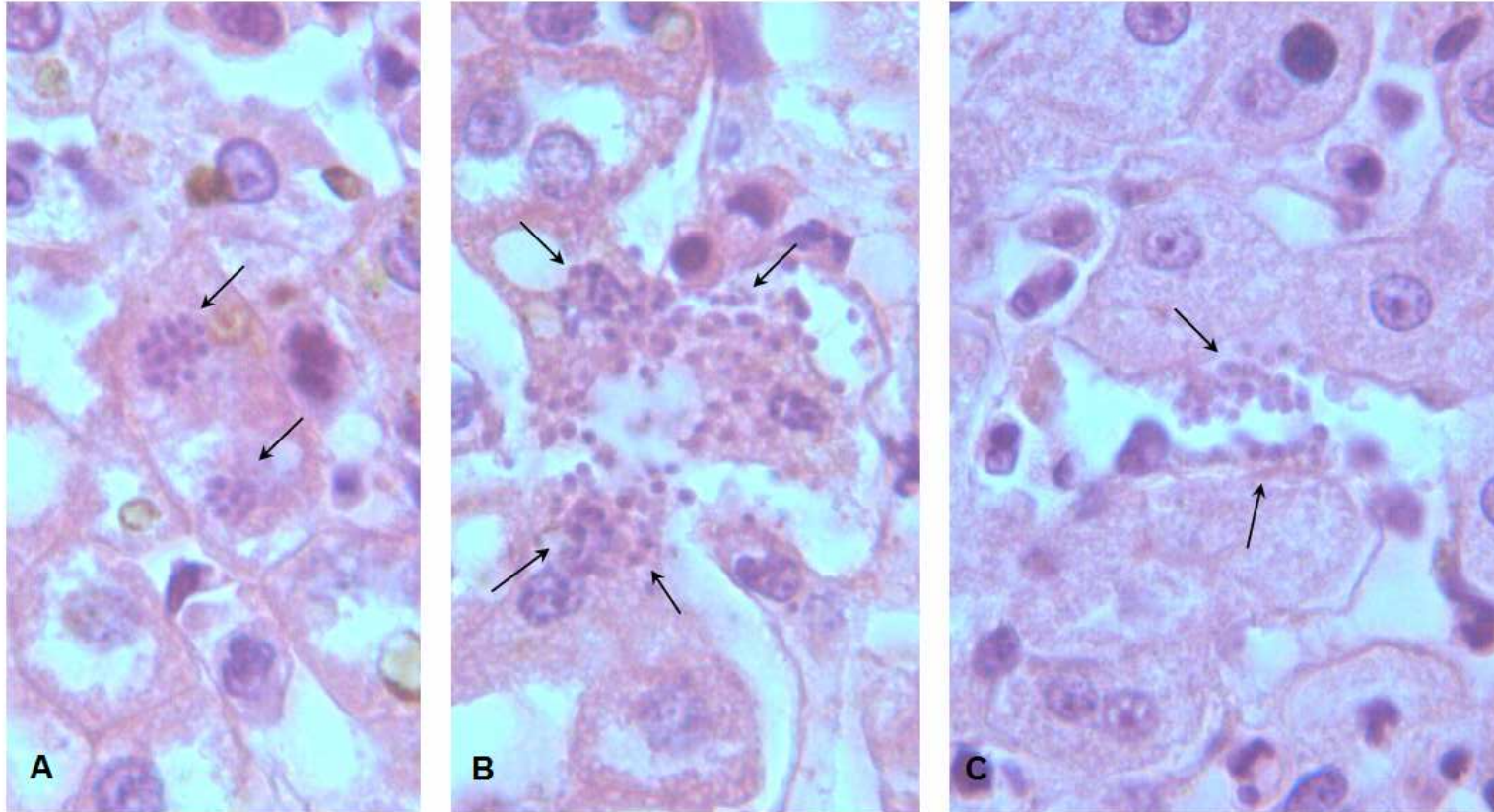


Figura 26. Invasión, proliferación y diseminación de estructuras parasitarias sugerentes de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* en parénquima hepático de mono ardilla (*Saimiri sciureus*). A) Se observa en sección de parénquima hepático, hepatocito sin alteraciones morfológicas con presencia de estructuras parasitarias (flechas) compatibles con taquizoítos de *Toxoplasma gondii*; B) Necrosis unicelular de hepatocito por acumulo y liberación de taquizoítos (flechas); C) Estructuras parasitarias (flechas) diseminándose a través de sinusoides hepáticos. HE, 1000x.

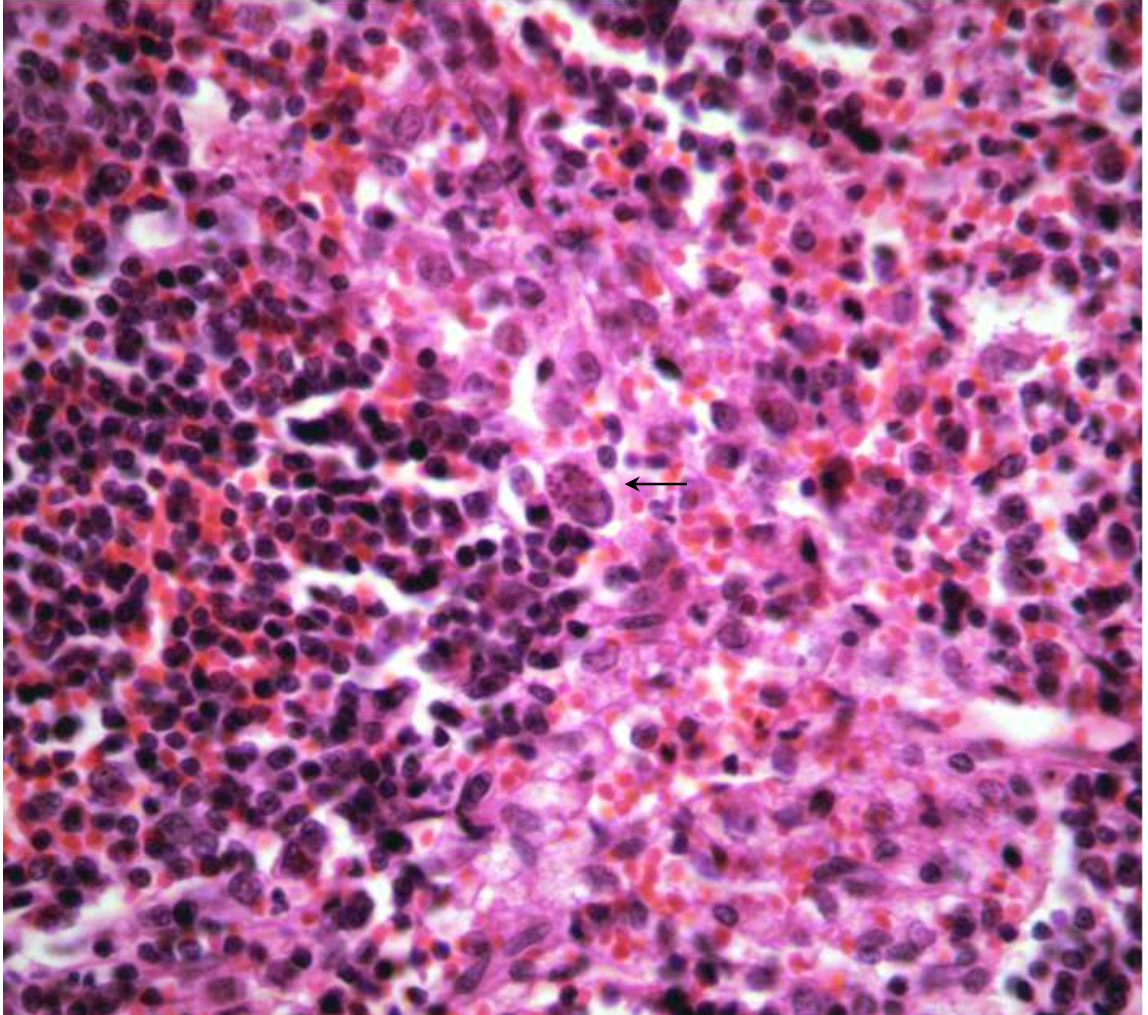


Figura 27. Atrofia linfoide esplénica con presencia de pseudoquiste de *Toxoplasma gondii* en mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Se aprecia sección de bazo con presencia de pseudoquiste (flecha), en los límites de la transición de la disminución de las células linfoides. HE, 400x.

Cuadro 15. Alteraciones microscopicas en sistema nervioso central asociadas a toxoplasmosis.

No de Caso	Especie	Degeneración y necrosis neuronal	Satelitosis y neuronofagia	Gliosis	Infiltrado perivascular	Infiltrado meningeo	Ependimitis	Quistes tisulares
2	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	Wallaby	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(++)
6	Wallaby	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(+)
7	Wallaby	(++)	(++)	(++)	(++) a (+++)	(+)	(-)	(+)
8	Wallaby de Bennet	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(-)	(++)
9	Wallaby de Bennet	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	Wallaby	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	Wallaby	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	Wallaby de Tammar	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	León africano	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	Canguro gris	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	Oso negro	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	Wallaby	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	Canguro gris	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(++)
19	Mono ardilla	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
20	Mono ardilla	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	Mono ardilla	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	Lémur	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	Lémur	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
25	Canguro rojo	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
26	Canguro rojo	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)

Grado de la lesión o cantidad de estructuras parasitarias: (+) leve, (++) moderado, (+++) severo o abundante, (-) negativo.

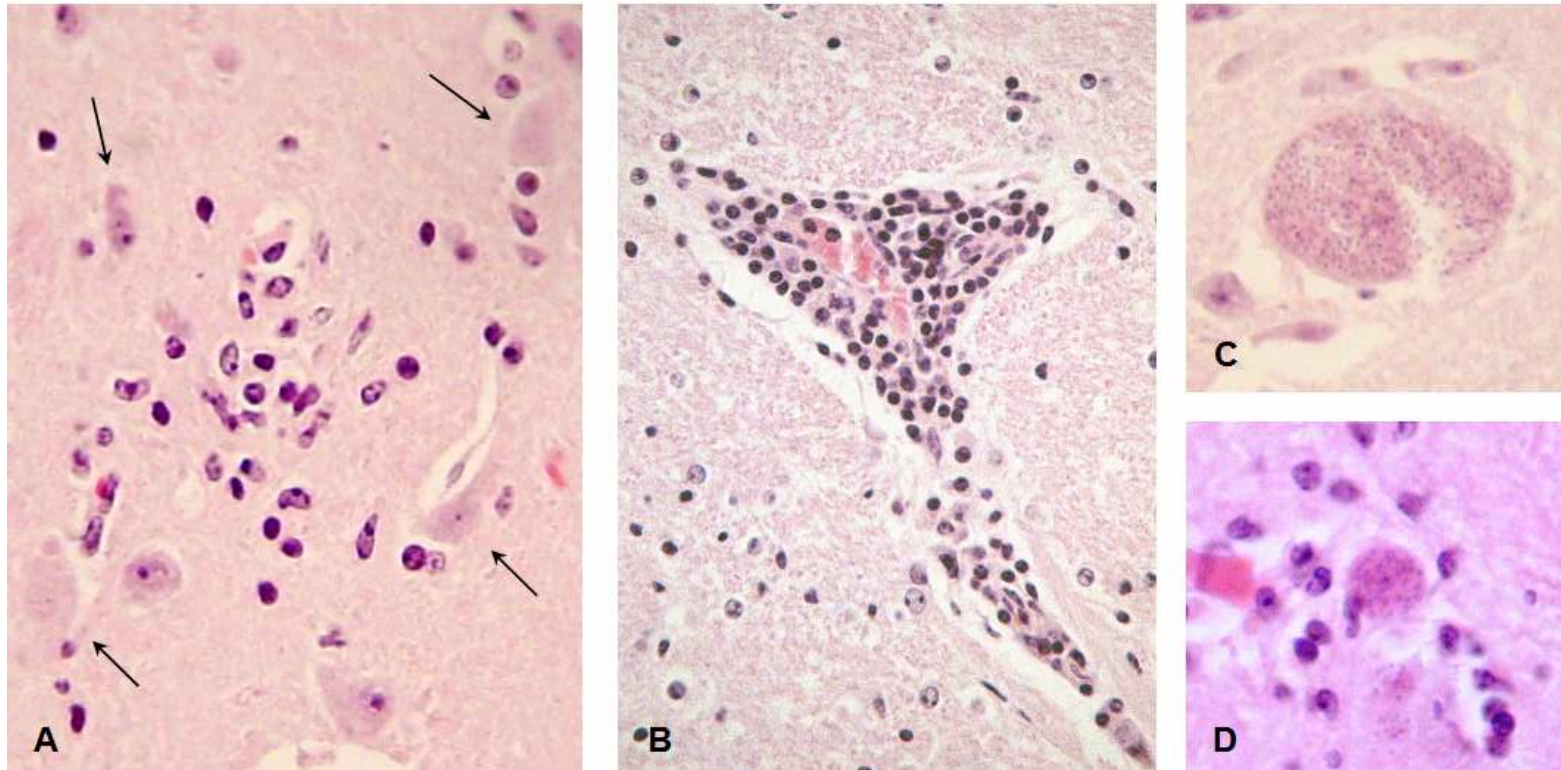


Figura 28. Cambios microscópicos en sistema nervioso central de marsupiales. A) Gliosis ligera focal en sustancia gris, adyacente a neuronas con cambios degenerativos y satellitosis (flecha), HE, 700x; B) Perivascularitis linfoplasmocitaria severa en sustancia blanca, HE, 400x; C) Quiste tisular con abundantes bradizoítos, intercalado entre neuronas con cambios degenerativos, sin observarse respuesta glial o inflamatoria, HE, 1000x; D) Quiste tisular de tamaño pequeño, rodeado por células gliales, HE, 1000x.

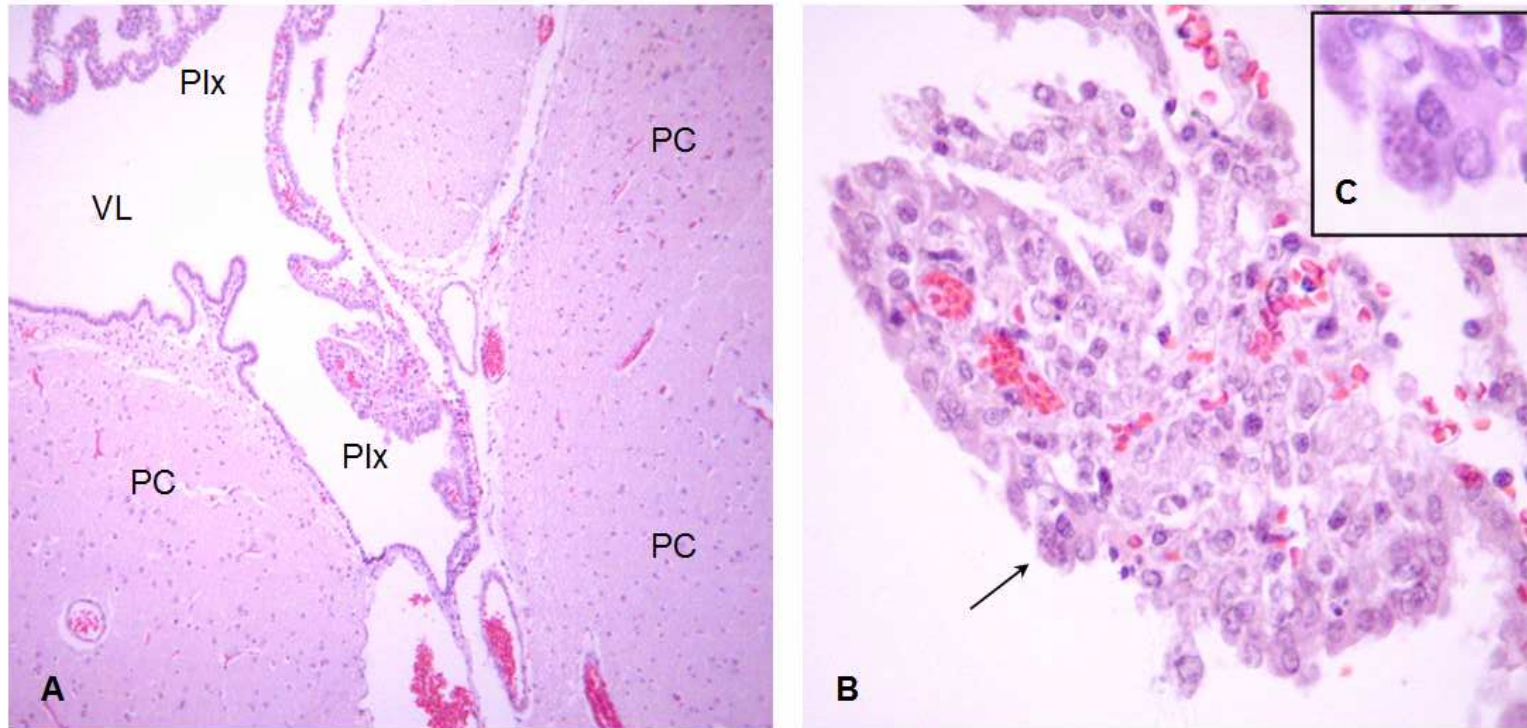


Figura 29. Ependimitis de plexos coroideos de ventrículos laterales con pseudoquistes de *Toxoplasma gondii* en mono ardilla (*Saimiri sciuresus*). A) Sección panorámica de encéfalo medio, apreciándose parénquima cerebral (PC) con vasos sanguíneos, ventrículo lateral (VL) recubierto por células ependimarias y plexos coroideos de forma libre en la luz ventricular (Plx), HE, 100x; B) Detalle de plexos apreciándose infiltrado de células inflamatorias compuesto por linfocitos, macrófagos y escasa células plasmáticas, con presencia de pseudoquistes en células ependimarias (flecha), HE, 400x; C) Detalle del pseudoquiste apreciándose abundantes taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, HE, 1000x.

6.2.3 Inmunohistoquímica

Los 16 casos procesados para IHQ correspondieron a un delfín del Atlántico, cuatro monos ardilla, dos lémures, cinco canguros y cuatro wallabys. De los casos evaluados, en 13 de ellos, los tejidos presentaron inmunopositividad de estructuras parasitarias (quistes tisulares, pseudoquistes o parásitos libres) (Cuadro 16). Los órganos donde se apreciaron estructuras inmunopositivas fueron corazón, pulmón, intestino delgado, hígado, bazo, linfonodo o sistema nervioso central (Figura 30). En algunos casos la inmunopositividad fue fuerte y definida, tanto para la pared del quiste o pseudoquiste como para las estructuras parasitarias como en el caso del delfín nariz de botella (Figura 31), mientras que en otros casos fue parcial, tanto para la pared o zoítos, como en algunos casos de marsupiales. Los 13 casos positivos por IHQ permitieron definir a los casos como compatibles (positivos) con toxoplasmosis por anatomopatología.

6.2.4 Microscopia electrónica

Ultraestructuralmente se evaluaron cuatro casos positivos por IHQ, apreciándose estructuras parasitarias compatibles con protozoarios de la familia Apicomplexa, identificándose organelos y estructuras propias del Phylum: complejo apical, conoide, micronemas, roptrias y gránulos densos. En el caso del delfín del Atlántico se evaluaron secciones de intestino delgado que presentaron abundantes estructuras parasitarias en diferentes estadios de división, de forma arqueada, oval o piriforme (Figura 32), observándose algunos estadios en endodiogenia sincronizada. En los otros tres casos correspondientes a secciones de pulmón de dos monos ardilla y un canguro, se observaron taquizoítos de forma oval a piriforme (Figura 33), tanto de forma libre como intracelularmente en macrófagos, neutrófilos y neumocitos (Figuras 34).

Cuadro 16. Relación de casos procesados para IHQ con diferente grado de positividad.

No. de caso	Especie	Tejidos procesados para IHQ	Resultado IHQ
1	Delfín del Atlántico	X	(+++)
2	Mono ardilla	X	(++)
3	Mono ardilla	X	(++)
4	Canguro	X	(++)
5	Wallaby	X	(+)
8	Wallaby de Bennet	X	(+)
9	Wallaby de Bennet	X	(-)
11	Wallaby	X	(-)
17	Canguro gris	X	(-)
20	Mono ardilla	X	(+++)
21	Mono ardilla	X	(++)
22	Lémur	X	(++)
23	Lémur	X	(++)
24	Canguro rojo	X	(++)
25	Canguro rojo	X	(++)
26	Canguro rojo	X	(++)

Intensidad de marcaje: positividad ligera o parcial (+), positividad moderada (++) , positividad fuerte y definida (+++), sin marcaje (negativo) (-)

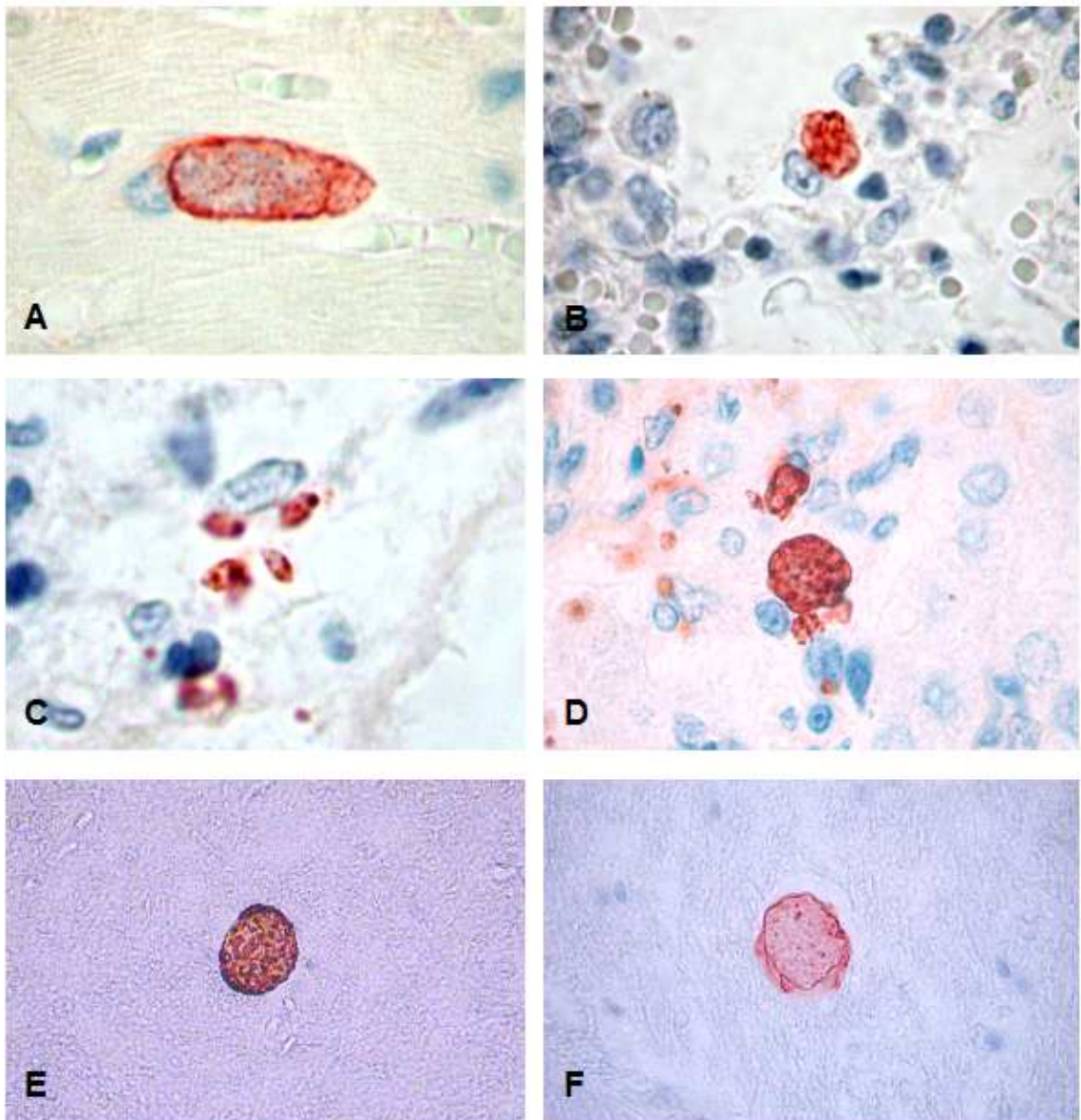


Figura 30. Inmunohistoquímica positiva a *Toxoplasma gondii* en diferentes tejidos de distintas especies. A) Quiste tisular en sección de miocardio de canguro rojo (*Macropus rufus*) con inmunopositividad de bradizoítos y en su pared, 1000x; B) Pseudoquiste en macrófago alveolar en pulmón de mono ardilla (*Saimiri sciureus*) con inmunopositividad completo de los taquizoítos, 400x; C) Taquizoítos libres con inmunopositividad marcada, en submucosa de intestino delgado de mono ardilla (*S. sciureus*), 1000x; D) Pseudoquistes en parénquima hepático de lémur (*Lemur catta*), presentando inmunopositividad difusa, 400x; E y F) quistes tisulares en marsupiales, presentando inmunopositividad marcada e inmunopositividad parcial; 1000x. Todos los tejidos fueron evaluados con el Complejo avidina biotina-peroxidasa (CAB-P).

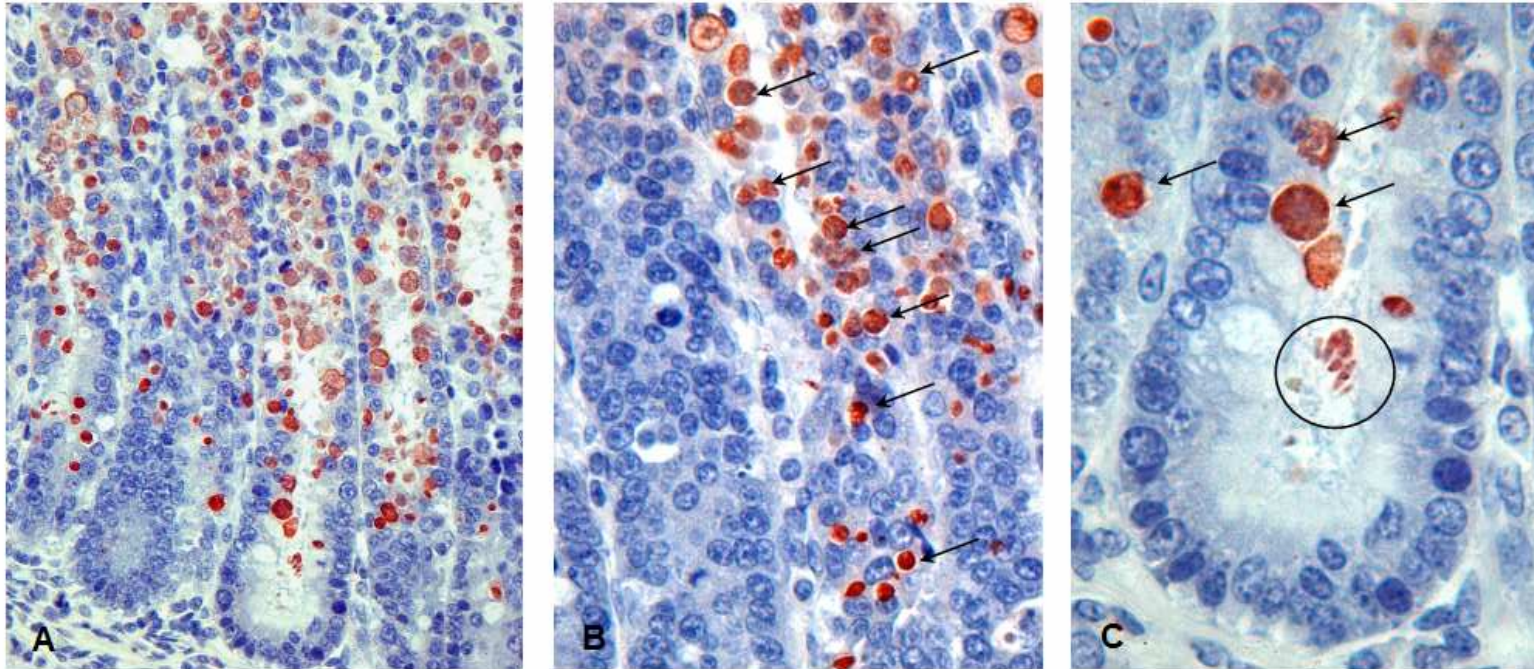


Figura 31. Inmunohistoquímica positiva a *Toxoplasma gondii* en intestino delgado de delfín del atlántico (*Tursiops truncatus*). A) Sección de intestino correspondiente a la figura 21, con diagnóstico morfológico de enteritis necrótica severa difusa, presentando abundantes estructuras parasitarias inmunopositivas distribuyéndose aleatoriamente, CAB-P, 100x; B) Comparación de dos criptas intestinales con y sin inmunopositividad a las estructuras parasitarias (flechas), CAB-P, 300x; C) Cripta intestinal apreciándose estructuras parasitarias inmunopositivas, de forma alargada arqueada (circulo) y de forma oval (flechas) de mayor tamaño, CAB-P, 600x.

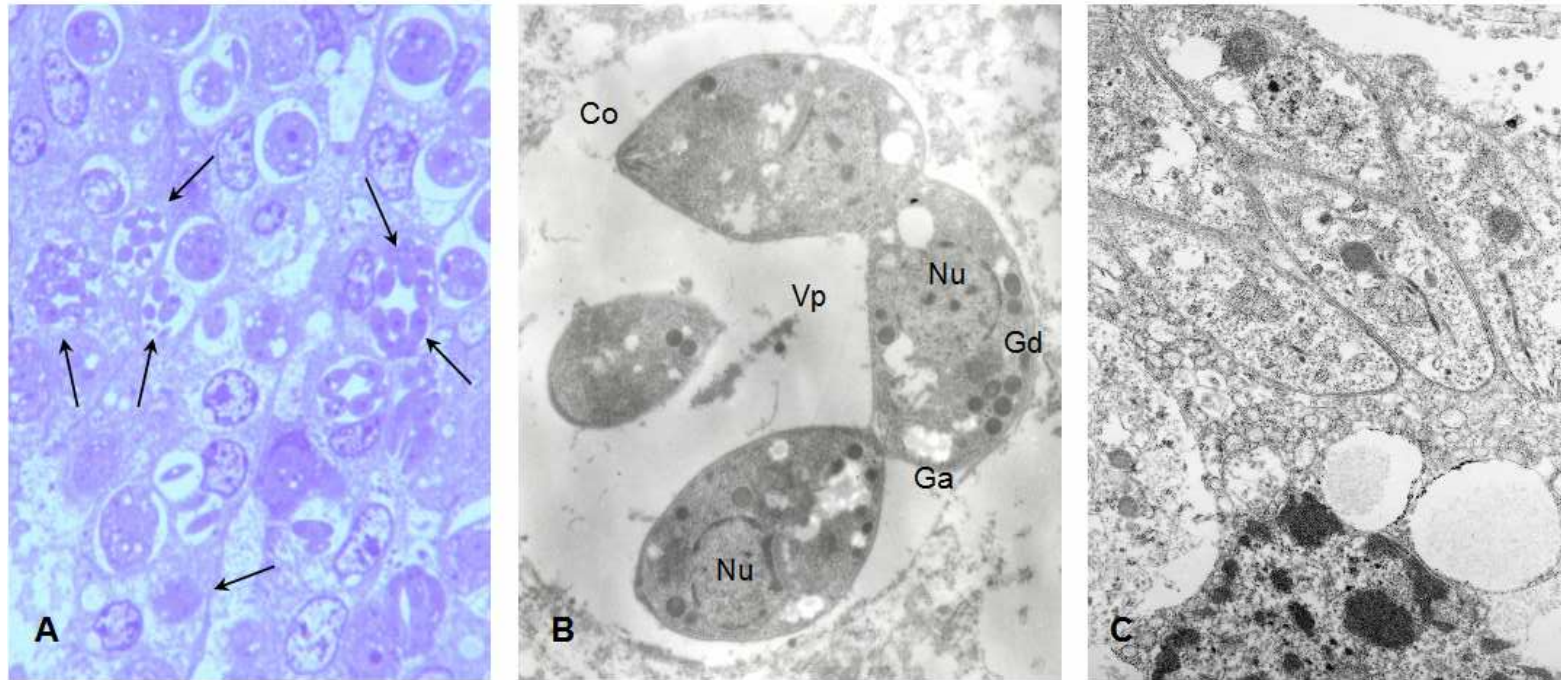


Figura 32. Identificación ultraestructural de *Toxoplasma gondii* en intestino delgado de delfín del atlántico (*Tursiops truncatus*). A) Corte semifino de mucosa intestinal apreciándose múltiples estructuras parasitarias intracelulares en diferentes estadios de división con diversos patrones morfológicos: estructuras alargadas arqueadas, de forma redondeada y piriforme (flechas), ovals unicelulares de diferentes tamaños, AT, 1000x; B) Vacuola parasitofora (Vp) con taquizoítos en su interior apreciándose su conoide (Co), gránulos densos (Gd), gránulos de amilopectina (Ga) y núcleo (Nu), Ur-Pb, 8000x; C) Taquizoítos de forma alargada intracelulares sin apreciarse vacuola parasitofora, con regular estado de preservación, apreciándose algunos organelos como mitocondrias, núcleo y escasa roptrias, Ur-Pb, 5000x.

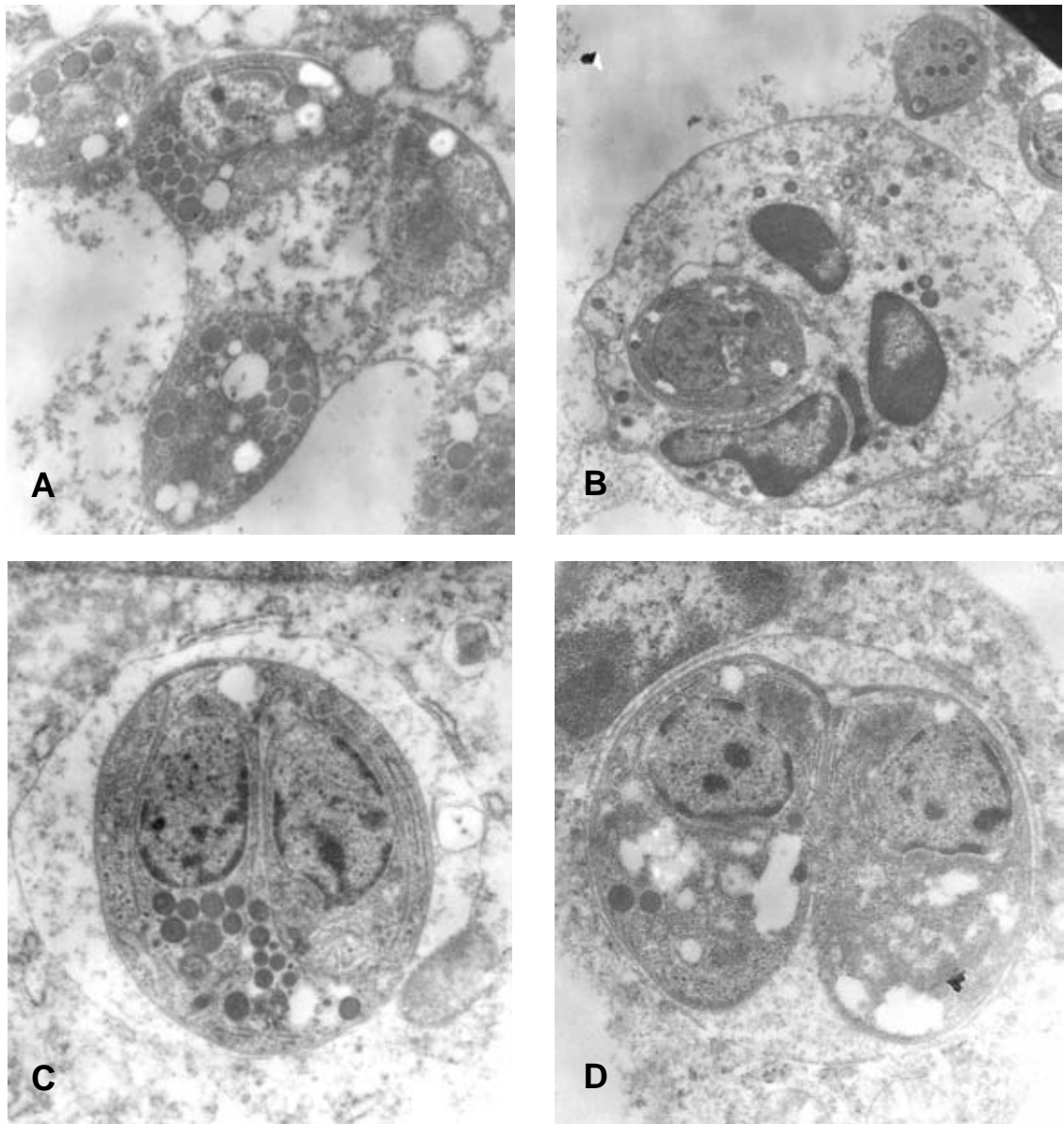


Figura 33. Identificación ultraestructural de tachizoítos de *Toxoplasma gondii* en diferentes animales. A) Tachizoítos de forma oval en el interior de un pseudoquiste, localizados en neumocito de pared alveolar de mono ardilla (*Saimiri sciureus*), Ur-Pb, 12000x; B) Tachizoíto en el interior de un neutrófilo viable, en parenquima pulmonar de canguro rojo (*Macropus rufus*), Ur-Pb, 10000x; C y D) Tachizoítos en diferentes etapas de endodiogenia en células inflamatorias de canguro rojo, apreciándose en la figura C, la división de los zoítos con redistribución de organelos dentro de la célula madre, en la figura D, los zoítos se han desarrollado casi en su totalidad, adquiriendo por completo el complejo membranoso de la célula madre, Ur-Pb, 17000x.

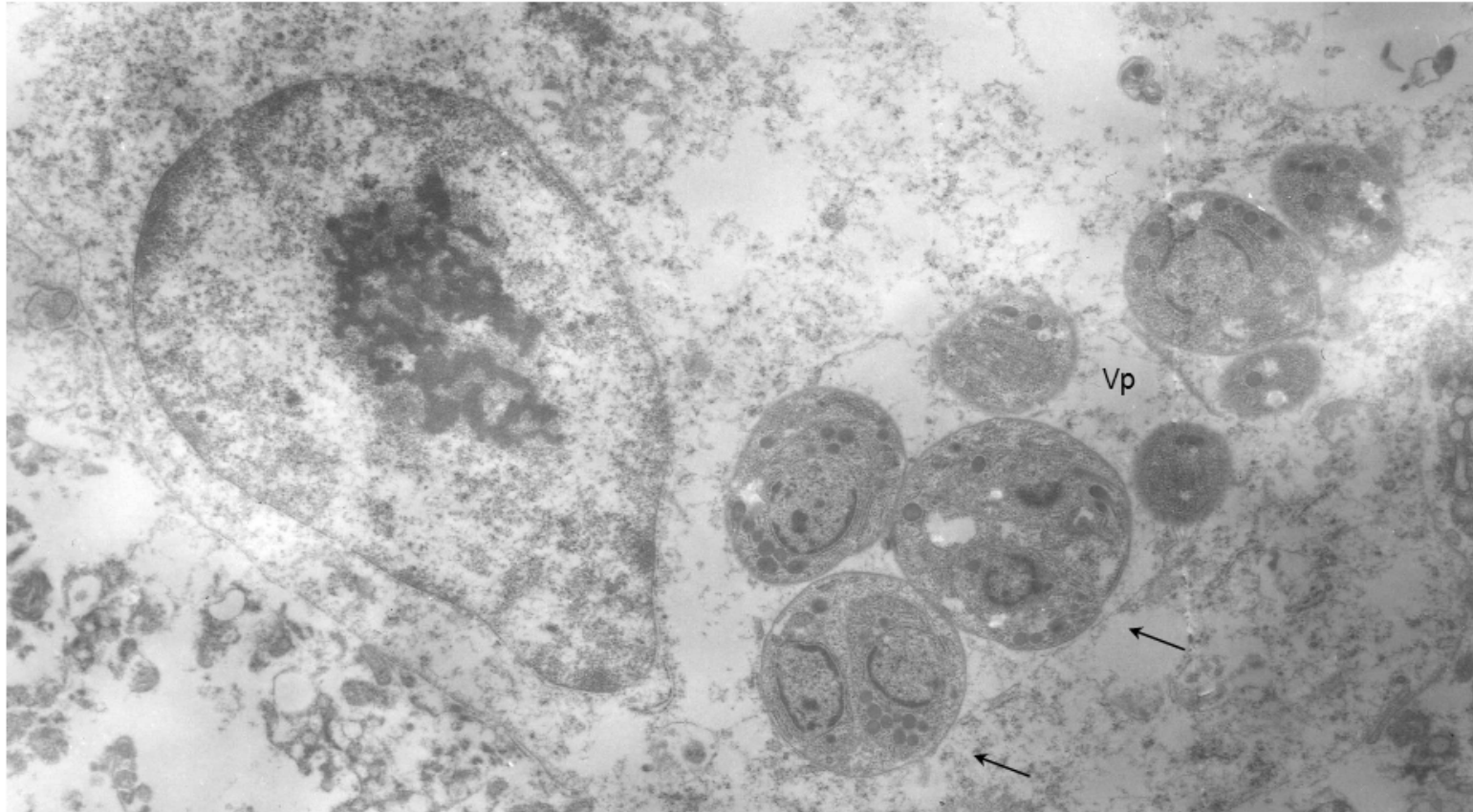


Figura 34. Identificación ultraestructural de tachizoítos de *Toxoplasma gondii* en parénquima pulmonar de canguro rojo (*Macropus rufus*). Se observa macrófago alveolar con cambios degenerativos (cromatina de aspecto reticulado y pérdida de organelos citoplasmáticos), presentado una vacuola parasitofora (Vp) con múltiples tachizoítos viables, encontrándose algunos de ellos en división (flecha), Ur-Pb, 6000x.

6.3 Biología molecular

A partir de los casos clasificados como sospechosos, se procesaron muestras para la extracción y cuantificación de DNA y posteriores pruebas moleculares (PCR y PCR-RFLP) de diferentes tejidos recolectados durante los estudios de necropsia de 5 casos y tejidos fijados en formaldehído correspondientes a 20 casos (Cuadro 17), independiente de su condición de positivos o no a *T. gondii* por las técnicas anatomopatológicas.

6.3.1 PCR

De los 25 casos evaluados por PCR, 12 casos fueron positivos, obteniéndose productos de amplificación para los genes B1, GRA6 o SAG3 (Cuadro 17). Para el gen B1, a partir de tejidos de un wallaby, las secciones de corazón y encéfalo (tálamo, mesencéfalo y puente), amplificaron para un producto de 362 pb visualizándose bandas tenues (Figura 35); del tejido pulmonar del león africano, se amplificó para el mismo gen, visualizándose también una banda tenue (Figura 36). El resto de los tejidos evaluados de los otros casos resultaron negativos para la amplificación de DNA, tanto para el producto de 619 pb como el de 362 pb.

Para el gen SAG3, productos de amplificación de 311 pb, se obtuvieron de secciones de corteza-hipocampo de marsupiales y de pulmón de monos ardilla, oso negro y canguro (Figuras 37 y 38). Para el gen GRA6, productos de amplificación de 342 pb se obtuvieron de secciones de corteza-hipocampo y puente de casos de wallabys y un canguro gris; también se obtuvieron productos de amplificación de secciones de pulmón de monos ardilla y un canguro y del bazo de otro wallaby (Figura 39). Para GRA6 y SAG3, los productos de amplificación se visualizaron con bandas tenues, tanto en la primera corrida de PCR como en las reamplificaciones. Solamente en uno de los casos (corteza-hipocampo de un wallaby), la banda generada posterior a su reamplificación fue gruesa y bien definida para el gen GRA6 (Figura 40).

Cuadro 17. Relación de casos procesados para PCR y positivos para alguno de los genes (*B1*, *GRA6* y *SAG3*) evaluados.

No. de Caso	Especie	Tejidos procesados		Resultado PCR		
		En fresco	En formaldehido	<i>B1</i>	<i>GRA6</i>	<i>SAG3</i>
2	Mono ardilla		X	(-)	(+)	(-)
3	Mono ardilla		X	(-)	(+)	(-)
4	Canguro		X	(-)	(-)	(-)
5	Wallaby		X	(-)	(-)	(+)
8	Wallaby de Bennet		X	(-)	(+++)	(+)
9	Wallaby de Bennet		X	(-)	(+)	(+)
10	Wallaby		X	(-)	(-)	(-)
11	Wallaby		X	(-)	(+)	(+)
12	Wallaby de Tammar	X		(+)	(-)	(-)
13	León africano	X	X	(+)	(-)	(-)
14	Canguro gris	X		(-)	(-)	(-)
15	Oso negro	X		(-)	(-)	(+)
16	Wallaby	X		(-)	(+)	(-)
17	Canguro gris		X	(-)	(+)	(-)
18	Mono saraguato		X	(-)	(-)	(-)
19	Mono ardilla		X	(-)	(-)	(-)
20	Mono ardilla		X	(-)	(-)	(-)
22	Lémur		X	(-)	(-)	(-)
23	Lémur		X	(-)	(-)	(-)
24	Canguro rojo		X	(-)	(-)	(-)
25	Canguro rojo		X	(-)	(-)	(-)
26	Canguro rojo		X	(-)	(-)	(-)
27	Canguro rojo		X	(-)	(-)	(-)
28	Canguro rojo		X	(-)	(-)	(-)
29	Canguro rojo		X	(-)	(-)	(+)

Intensidad de banda visualizada en gel de agarosa: tenue o difuminada (+), definida (+++), sin observarse (negativo) (-).

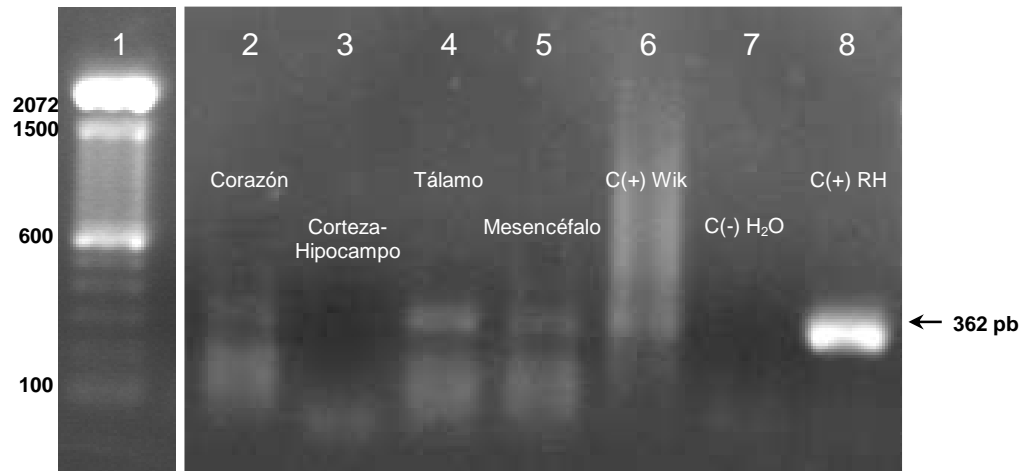


Figura 35. PCR semianidada para la detección del gen B1 de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*). Evaluación de tejidos en fresco: corazón y secciones de encéfalo. Carriles 1 a 8: marcador de peso molecular 100 pb (1), tejidos positivos (2, 4 y 5), tejido negativo (3), controles positivos DNA cepas Wiktor (6) y RH (8), control negativo agua destilada (7). Gel de agarosa al 1%.

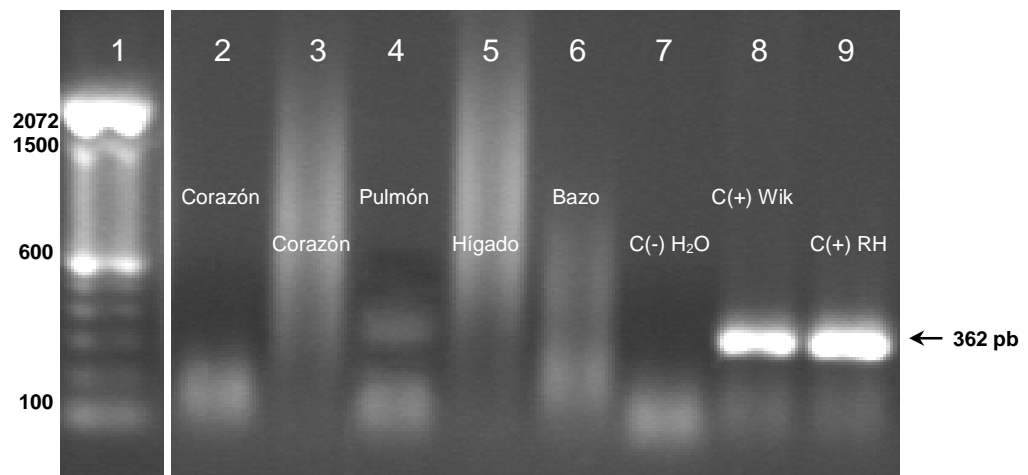


Figura 36. PCR semianidada para la detección del gen B1 de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de león africano (*Panthera leo*). Evaluación de tejidos en fresco: corazón, pulmón, hígado y bazo. Carriles 1 a 9: marcador de peso molecular 100 pb (1), tejido positivo (4), tejidos negativos (2, 3, 5 y 6), control negativo agua destilada (7), controles positivos DNA cepas Wiktor (8) y RH (9), Gel de agarosa al 1%.

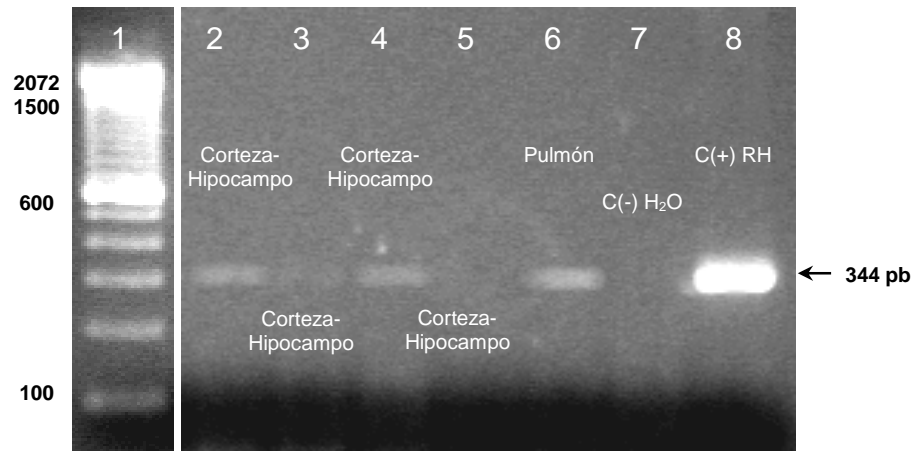


Figura 39. PCR para la amplificación del gen GRA6 de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de wallabys (*Macropus* spp), canguro gris (*Macropus giganteus*) y mono ardilla (*Saimiri sciureus*). Evaluación de tejidos en formaldehído: corteza e hipocampo de marsupiales y pulmón de mono ardilla. Carriles 1 a 7: marcador de peso molecular 100 pb (1), tejido positivo de wallaby (2), tejidos negativos de wallabys (3 y 5), tejido positivo de canguro (4), tejido positivo de mono ardilla (6), control negativo agua destilada (7), control positivo DNA cepa RH (8). Gel de agarosa al 1%.

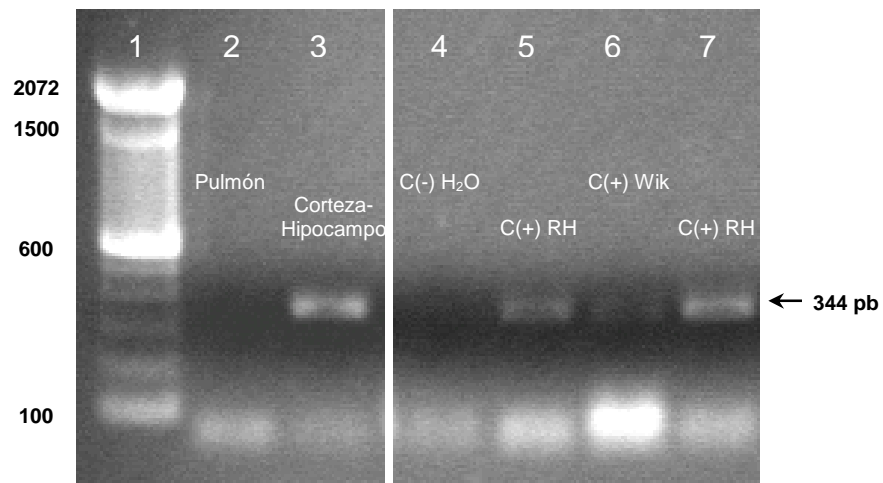


Figura 40. PCR para la reamplificación del gen GRA6 de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de mono ardilla (*Saimiri sciureus*) y wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*). Evaluación de tejidos en formaldehído: pulmón de mono ardilla y encéfalo de wallaby de Bennet. Carriles 1 a 7: marcador de peso molecular 100 pb (1), tejido negativo de mono ardilla (2), tejido positivo de wallaby de Bennet (3), control negativo agua destilada (4), controles positivos DNA cepas RH (5 y 7) y Wiktor (6). Gel de agarosa al 1%.

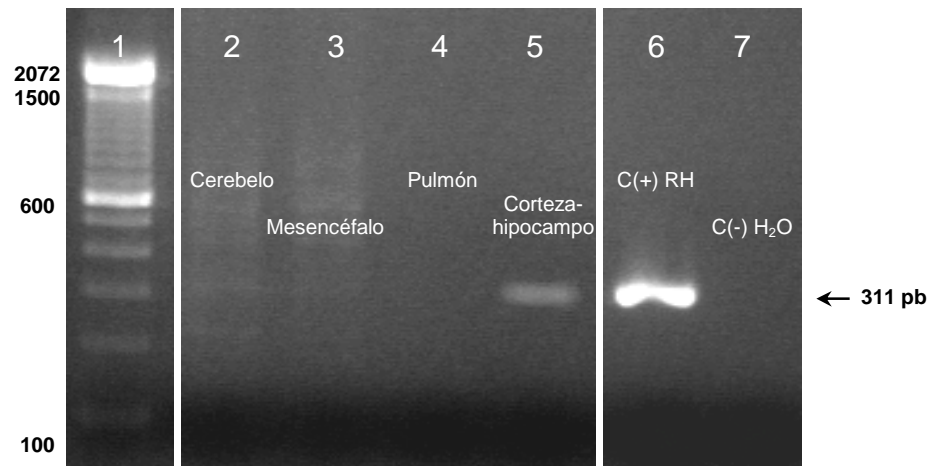


Figura 37. PCR para la amplificación del gen SAG3 de *Toxoplasma gondii*. a partir de muestras de oso negro (*Ursus americanus*), mono ardilla (*Saimiri sciureus*) y wallaby (*Macropus* sp). Evaluación de tejidos en fresco: encéfalo de oso negro. Evaluación de tejidos en formaldehído: pulmón de mono ardilla y encéfalo de wallaby. Carriles 1 a 7: marcador de peso molecular 100 pb (1), tejidos negativos de oso negro (2 y 3), tejido negativo de mono ardilla (4), tejido positivo de wallaby (5), control positivo DNA cepa RH (6), control negativo agua destilada (7). Gel de agarosa al 1%.

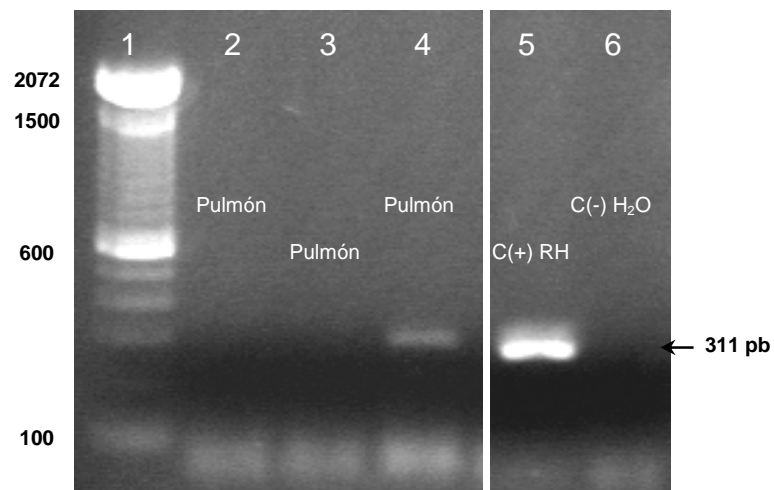


Figura 38. PCR para la amplificación del gen SAG3 de *Toxoplasma gondii*. a partir de muestras de canguros rojos (*Macropus rufus*). Evaluación de tejidos en formaldehído: pulmón. Carriles 1 a 7: marcador de peso molecular 100 pb (1), tejidos negativos de canguros rojos (2 y 3), tejido positivo de canguro rojo (4), control positivo DNA cepa RH (6), control negativo agua destilada (7). Gel de agarosa al 1%.

Los tejidos que presentaron bandas tenues o bien definidas se consideraron como positivos a *T. gondii* por biología molecular.

6.3.2 PCR-RFLP

Debido a la cantidad de DNA amplificado en los casos positivos para los tres genes, obteniéndose bandas tenues en la mayoría de los tejidos evaluados, solamente el DNA amplificado de corteza e hipocampo de un wallaby donde se obtuvo una banda bien definida para el gen GRA6, se empleó para su digestión con la enzima de restricción *Mse* I. La digestión del DNA evidenció dos bandas de 280 y 85 pb aproximadamente, similares a las que presentó el control positivo cepa RH, correspondiendo a alelos para el genotipo I (Figura 41).

6.4 Comparación de casos sospechosos y positivos por anatomopatología con casos positivos por biología molecular.

De los 29 casos considerados sospechosos, 22 presentaron lesiones sugerentes de infección por *T. gondii*, 13 fueron confirmados por IHQ y 4 por MET. Solamente 4 casos fueron evaluados por HP, IHQ y MET.

La metodología propuesta para la obtención de DNA y amplificación por PCR para su posterior confirmación molecular y genotipificación, fue adecuada, obteniéndose 12 casos positivos por PCR a partir de los 29 casos sospechosos, proviniendo la mayoría de los casos a partir de muestras conservadas en formaldehído que datan desde el año 1999.

De los 19 casos con lesiones evaluadas por HP, solamente 7 fueron positivos por PCR y 4 fueron a su vez, positivos por IHQ.

Los casos definidos como sospechosos y positivos por las técnicas anatomopatológicas se comparan con los resultados obtenidos por PCR, en el cuadro 18.

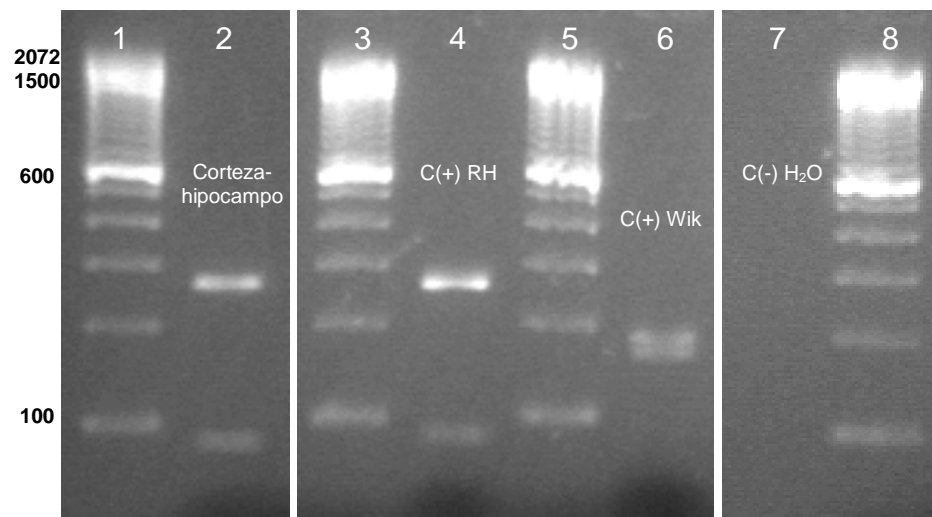


Figura 41. Patrón de bandas obtenido por RFLP, posterior a la digestión del gen GRA6 de *Toxoplasma gondii* con la enzima de restricción *Msel*. El producto de reamplificación con GRA6 fue obtenido a partir de secciones de corteza e hipocampo de wallaby (*Macropus* sp), correspondiente a la figura 36, visualizándose alelos para el genotipo I, similares a los del control positivo cepa RH (genotipo I). Carriles 1 a 8: marcador de peso molecular 100 pb (1, 3, 5 y 8), DNA digerido de wallaby (2), DNA digerido de control positivo cepa RH (4) genotipo I, DNA digerido de control positivo cepa Wiktor (6) genotipo II, control negativo agua destilada (7). Gel de agarosa al 3%.

Cuadro 18. Comparación de casos sospechosos y positivos por anatomopatología a toxoplasmosis y positivos por biología molecular.

No. de Caso	Especie	Lesiones por HP	IHQ	MET	PCR
1	Delfín del Atlántico	(+++)	(+++)	(+++)	ND
2	Mono ardilla	(+++)	(++)	(+++)	(+)
3	Mono ardilla	(+++)	(++)	(+++)	(+)
4	Canguro	(+++)	(++)	(++)	(-)
5	Wallaby	(++)	(+)	ND	(+)
6	Wallaby	(++)	ND	ND	ND
7	Wallaby	(++)	ND	ND	ND
8	Wallaby de Bennet	(+)	(+)	ND	(+++)
9	Wallaby de Bennet	(+)	(-)	ND	(+)
10	Wallaby	(+)	ND	ND	(-)
11	Wallaby	(+)	(-)	ND	(+)
12	Wallaby de Tammar	(+)	ND	ND	(+)
13	León africano	(+)	ND	ND	(+)
14	Canguro gris	(+)	ND	ND	(-)
15	Oso negro	(+)	ND	ND	(+)
16	Wallaby	(+)	ND	ND	(+)
17	Canguro gris	(++)	(-)	ND	(+)
18	Mono saraguato	(++)	ND	ND	(-)
19	Mono ardilla	(+++)	ND	ND	(-)
20	Mono ardilla	(+++)	(+++)	ND	(-)
21	Mono ardilla	(+++)	(++)	ND	ND
22	Lémur	(++)	(++)	ND	(-)
23	Lémur	(+) a (++)	(++)	ND	(-)
24	Canguro rojo	(+++)	(++)	ND	(-)
25	Canguro rojo	(+++)	(++)	ND	(-)
26	Canguro rojo	(+++)	(++)	ND	(-)
27	Canguro rojo	(+++)	ND	ND	(-)
28	Canguro rojo	(+++)	ND	ND	(-)
29	Canguro rojo	(+++)	ND	ND	(+)

Grado de la lesión o intensidad de positividad: (+) leve, (++) moderado, (+++) marcada o abundante, (-) negativo. ND: no determinado

7. DISCUSIÓN

7.1 Animales evaluados durante el estudio

Los 222 casos seleccionados para su revisión, pertenecían a 6 órdenes, 16 familias y 36 especies; mientras que los casos considerados sospechosos a toxoplasmosis, incluyendo los casos positivos por anatomopatología y biología molecular, correspondieron a 4 órdenes (primates, carnívora, marsupiala y cetacea), 6 familias (cebidae, felidae, ursidae, macropodidae y delphinidae) y 10 especies: mono ardilla (*Saimiri sciureus*), mono saraguato (*Alouatta* spp), lemur (*Lemur catta*), león africano (*Panthera leo*), oso negro (*Ursus americanus*), canguro rojo (*Macropus rufus*), canguro gris (*Macropus giganteus*), wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*), wallaby de Tammam (*Macropus eugenii*) y delfín del Atlántico (*Tursiops truncatus*).

La presentación de *T. gondii* en animales de zoológico se considera de interés particular para la medicina veterinaria y ciencias biológicas, debido a que muchas especies de animales en cautiverio mueren por toxoplasmosis, siendo una fuente de potencial de exposición para niños y personas mayores, a partir de la eliminación de ooquistes por felinos silvestres presentes en zoológicos (Dubey y Jones, 2008). Existen diversos informes sobre la seroprevalencia de *T. gondii* en animales de zoológico, siendo variable su presentación, dependiendo el zoológico y las especies evaluadas.

La prevalencia de *T. gondii* en felinos silvestres en cautiverio en Tailandia fue evaluada a partir de muestras de 136 animales pertenecientes a 12 especies, detectándose anticuerpos en el 15.4% (21 de 136 felinos) de los animales, variando su presentación dependiendo el origen, ya que en animales provenientes de regiones de norte del país fue del 0%, mientras que animales del sur presentaron 23% de seroprevalencia (Thiangtum *et al*, 2006)

De Camps y colaboradores (2008) determinaron la seroprevalencia de anticuerpos en felinos, macrópodos y prosimios de 8 zoológicos de los Estados Unidos para determinar la seroprevalencia de *T. gondii*. 269 muestras

pertenecientes a 14 especies de felinos, 6 especies de macrópodos y 4 tipos de prosimios, entre otros animales, fueron evaluadas detectándose anticuerpos en el 36.17% de los felinos, 62.0% de los macropodos y 16.21% de los prosimios.

En el presente trabajo no fue posible establecer la seroprevalencia de *T. gondii* en los animales evaluados, sin embargo la presentación de casos positivos por anatomopatología y biología molecular permite considerar que la presentación de *T. gondii* en dos de las entidades (DGZVS y ZG) pudiera ser similar a la descrita por otros autores.

7.2 Presentación de lesiones

La evaluación de los tejidos por técnicas anatomopatológicas permitió identificar lesiones asociadas a infección o reactivación de estadios de *T. gondii*. En el caso de los monos ardilla, lémures y canguros rojos, las lesiones se presentaron en órganos de la cavidad torácica y abdominal, sugiriendo cuadros de toxoplasmosis aguda o diseminada, siendo la causa de muerte en estos casos. Los cambios observados en tubo digestivo, sugieren como ruta de infección la vía digestiva con posterior diseminación por vía linfática y sanguínea a órganos de la cavidad abdominal y torácica, cuyo patrón de lesiones (neumonía intersticial; hepatitis, linfadenitis y esplenitis necrótica, principalmente) aunado a la presencia de taquizoítos libres, fagocitados y fomando pseudoquistes, sugieren un cuadro de diseminación masiva aguda con división parasitaria activa. En estos casos, la presencia de estructuras parasitarias resultaron inmunopositivas por IHQ, confirmándose los cambios microscopicos encontrados. Las alteraciones descritas en el presente estudio son similares a lo referido por otros autores, con variaciones ligeras en su grado y distribución.

La toxoplasmosis aguda ha sido descrita en lemures de cola anillada, monos ardilla, marmosetas y monos lanudos (Dubey y Jones, 2008). En la mayoría de los casos, los animales mueren súbitamente por toxoplasmosis diseminada, presentando diferente grado de neumonía intersticial, hepatitis necrótica, hiperplasia linfoide esplénica y de linfonodos, principalmente. Así

mismo, pueden presentar enteritis con necrosis de las células de la lámina propia e inflamación de linfonodos mesentéricos, sugiriendo estos cambios infección oral por el consumo de alimento o agua contaminados con ooquistes (Inoue, 1997; Espinosa-Aviles y Morales-Martínez, 2007; Dubey y Jones, 2008).

Epiphanio y colaboradores (2003) llevaron a cabo un estudio recapitulativo sobre la patología de *T. gondii* en primates del nuevo mundo en cautiverio, revisando 33 casos de animales de las familia Callitrichidae y Cebidae de diferentes zoológicos de Brasil. Clínicamente, más de la mitad de los animales murieron sin presentar signos, mientras que el resto (43%) cursaron con cuadros hiperagudos o agudos de enfermedad. Algunos de los signos referidos fueron malestar, disnea, hipotermia, descarga nasal espumosa o serosanguinolento, anorexia y emesis. La condición corporal fue de buena, regular a pobre. Los hallazgos postmortem más comunes fueron congestión y edema pulmonar, esplenomegalia y linfadenitis mesentérica; mientras que los hallazgos histopatológicos más frecuentes fueron hepatitis necrótica multifocal, linfadenitis, neumonía intersticial y esplenitis necrótica. En todos los casos, diferentes tejidos resultaron inmunopositivos a la detección de estadios infecciosos de *T. gondii*.

En uno de los casos de un mono ardilla, además de presentar las lesiones descritas en los otros primates, se observó la presencia de pseudoquistes en células endimarias de plexos coroideos de ventrículos laterales con respuesta inflamatoria zonal, sin presentarse alteraciones en el parénquima nervioso. Dicho hallazgo, permite elucubrar que la distribución de taquizoítos por vía sanguínea puede alcanzar zonas remotas como sistema nervioso en una fase aguda de la infección, con posterior diseminación al parénquima a través de la circulación de líquido cefalorraquídeo. El hallazgo mencionado no ha sido documentado en primates de nuevo mundo u otros animales de fauna silvestre en la literatura científica.

La mayoría de los wallabys y canguros grises presentaron cambios degenerativos e inflamatorios en sistema nervioso central (satelitis, neuronofagia, degeneración y necrosis neuronal, encefalitis o meningoencefalitis

linfoplasmocitaria principalmente), con o sin la presencia de quistes tisulares, confirmados parcialmente por IHQ, debido a que en algunos casos donde se observaron quistes tisulares por histopatología, resultaron negativos por IHQ. Probablemente esto se debió a la distribución anatómica de los quistes tisulares que generalmente se encuentran en menor cantidad que en casos con taquizoítos y pseudoquistes en casos de presentación aguda con una mayor densidad parasitaria, existiendo la posibilidad de que en los cortes evaluados por IHQ no se presentaran quistes tisulares en la región evaluada.

Las alteraciones presentes en los marsupiales sugieren cuadros de toxoplasmosis crónica con reactivación de protozoarios, secundaria a la presentación de diferentes entidades primarias en cada caso, conllevando a la mortalidad de los animales.

En la literatura científica existen múltiples informes sobre toxoplasmosis severa en wallabys y canguros en cautiverio de diferentes partes del mundo (Hill *et al*, 2000; Dubey y Jones, 2008). Se considera que los marsupiales australianos pertenecen a uno de los grupos con alta susceptibilidad a la infección aguda por *T. gondii*. Los animales pueden morir súbitamente, con o sin la presentación de signos clínicos; así mismo pueden presentar pérdida de la visión, diarrea y diestres respiratoria. Las lesiones que generalmente se presentan postmortem son neumonía, miocarditis, hepatitis, linfadenitis, esplenitis y meningoencefalitis, causando mortalidad en la mayoría de los casos (Hill *et al*, 2000; Basso *et al*, 2007; Dubey y Jones, 2008).

Basso y colaboradores (2007) diagnosticaron toxoplasmosis mortal generalizada en dos wallabys de Bennet en Argentina, muriendo los animales súbitamente. A ambos animales se les detectaron anticuerpos contra *T. gondii* mediante aglutinación modificada, presentando títulos de 1:800 o mayores. Microscópicamente, se observaron estructuras parasitarias asociadas a meningoencefalitis, hepatitis, miositis, miocarditis y enteritis, confirmándose por IHQ. *Toxoplasma gondii* fue aislado por bioensayo en ratones y cultivo celular, a partir de muestras de encéfalo. Con base en las lesiones intestinales, los autores

consideraron la vía oral como la ruta de infección. El resto de los macropodos con los que convivían los animales estudiados, no desarrollaron enfermedad clínica como tal, sugiriendo que la infección en estos animales pudiera ser asintomática o no mortal.

En el caso del delfín del Atlántico, el único órgano evaluado fue el intestino delgado; sin embargo, debido al grado y distribución de las lesiones presentes (enteritis necrótica severa difusa con positividad por IHQ) aunado al tipo de animal en el que se presentó (cría de delfín), se consideró como causa de muerte la enteritis descrita asociada a la infección parasitaria. Los cambios observados en este caso no han sido descritos actualmente en delfines u otros cetáceos en la literatura científica.

La toxoplasmosis se ha documentado en varias especies de mamíferos marinos incluyendo nutrias marinas, pinípedos y cetáceos, generando cuadros de meningoencefalitis, encefalitis, linfadenitis, enfermedad diseminada o congénita. Se ha descrito la presencia de *T. gondii* u organismos parecidos en delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), delfín del Atlántico (*Tursiops truncatus*), delfín girador (*Stenella longirostris*), delfín mular (*Tursiops truncatus truncatus*), delfín de Risso y gris (*Grampus griseus*), entre otros (Dubey, Zarnke *et al*, 2003).

La descripción de casos clínicos de toxoplasmosis en mamíferos marinos, tanto en cautiverio como en vida libre, se ha incrementado en los últimos años, así como su presentación en especies no descritas anteriormente. La contaminación del lecho marino por aguas residuales se considera una de las principales fuentes de diseminación de este parásito, que favorecen el desarrollo de toxoplasmosis en estas especies. Se ha descrito en la literatura científica, que los ooquistes esporulados pueden sobrevivir en agua marina por periodos prolongados de tiempo; así mismo, diferentes mariscos y moluscos pueden filtrar y concentrar ooquistes en suficiente cantidad como para poder infectar a un mamífero marino o terrestre (Dubey, Zarnke *et al*, 2003; Dubey JP, Jones JL, 2008).

7.3 Casos positivos por biología molecular

Los tres marcadores empleados para la detección del genoma de *T. gondii* permitieron diagnosticar 12 casos positivos por PCR a partir de muestras clínicas, los cuales correspondieron a 7 especies de animales (monos ardilla, wallaby de Tammar, wallaby de Bennet, canguro gris, canguro rojo, león africano y oso negro), obteniéndose productos de amplificación de diferentes tejidos (corazón, pulmón, bazo y encéfalo).

La metodología propuesta para la búsqueda de casos y su confirmación final por biología molecular fue favorable en la mayoría de los casos, detectando estadios infeccioso de *T. gondii* previamente por las técnicas anatomopatológicas y posteriormente confirmando la presencia del genoma con uno o dos marcadores.

Las especies y tejidos que resultaron positivos por PCR concuerdan con los descritos en la literatura científica; sin embargo, la mayoría de los estudios realizados por otros autores, se basan primeramente en técnicas de aislamiento (*in vitro* e *in vivo*) y posterior evaluación molecular, siendo pocas las referencias donde se documenta la detección a partir de muestras clínicas como en el presente trabajo y de forma retrospectiva, dado que los casos positivos corresponden a muestras de animales a los que se les practicó el estudio de necropsia desde 1999 hasta 2008.

Hyman y colaboradores (1995) identificaron casos positivos a *T. gondii* en animales domésticos (gato, perro, bovino y cobayo) y silvestres (cisne, halcón, ardilla, canguro, wallaby, primates no humanos, león marino y manatí) mediante PCR (empleando el gen *B1*), a partir de tejidos fijados en formaldehído y bloques de parafina de animales. Los tejidos evaluados incluyeron secciones de encéfalo, músculo, bazo, pulmón, ojo, glándula adrenal y secciones de tracto gastrointestinal. En varios casos, las muestras se evaluaron en repetidas ocasiones, dado la condición en la que presentaban los tejidos.

Basso *et al* (2007) confirmaron la presencia del genoma de *T. gondii* por PCR en tejidos de wallabys de Bennet con toxoplasmosis, posterior a su aislamiento en ratones y cultivo celular, mediante la amplificación del gen *B1*.

Hurkova y Modry (2006) evaluaron 240 encéfalos de carnívoros silvestres para la detección de *T. gondii* y otros parásitos Apicomplexa, utilizando el gen *B1* como marcador, confirmando la presencia del gen en 4.9% (3 de 61) de los casos. En Estados Unidos y Canadá, a partir de muestras clínicas de fauna silvestre en vida libre incluyendo mapaches, zorrillos, zorros, coyotes, lince, osos negros y pumas, entre otros, se han logrado diversos aislamientos de *T. gondii*, confirmándose molecularmente con uno (*SAG2*) o más marcadores (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* y *Apico*) (Dubey, Parnell *et al*, 2004; Dubey, Graham *et al* 2004; Dubey, Sundar *et al*, 2007; Dubey, Quirk, 2008).

Durante el desarrollo del estudio, llamó la atención la distribución de tejidos positivos, dado que en ninguno de los casos se obtuvo amplificación para los tres genes (*B1*, *GRA6* y *SAG3*): en dos de los casos solamente hubo amplificación para el gen *B1* sin amplificar para *GRA6* o *SAG3*, mientras que en otros la amplificación se obtuvo para *GRA6* o *SAG3* (7 casos) y solamente tres casos amplificaron para *GRA6* y *SAG3*.

Una explicación a este patrón observado sería asociada a la condición de la muestra y su procesamiento. En casos donde se presenta infección por *T. gondii* con una carga parasitaria baja o discreta, la habilidad para detectar al parásito en las muestras a evaluar, depende en gran parte de la estrategia propuesta para la extracción del DNA y amplificación por PCR. Si el parásito se encuentra muy disperso en los tejidos, se deberá recolectar y procesar mayor cantidad de muestra de un órgano para asegurar su detección por PCR. Otra alternativa, es tomar diferentes muestras del órgano a evaluar y hacer un homogenizado del tejido, para incrementar las posibilidades de detección (Wastling y Mattsson, 2003). Durante el desarrollo del estudio, la recuperación de tejidos fue limitada y particular en algunos casos, obteniendo solamente una sección de tejido para las pruebas anatomopatológicas y moleculares en algunas ocasiones, mientras que en otras, el órgano a evaluar era de gran tamaño (ejemplo, lóbulos pulmonares o hígado de oso negro) sin poder recolectar tejido representativo para su análisis molecular.

La evaluación por PCR de tejidos fijados en formaldehído o en bloque de parafina generalmente presenta limitaciones, independientes a la metodología propuesta para solucionar dichas situaciones. Por ejemplo, el tiempo que dura el tejido en la solución fijadora y la calidad del fijador (longevidad y pureza de reactivos) influyen directamente en la integridad del DNA y la amplificación de productos mayores de 1000 pb. Los tejidos fijados por un lapso de hasta 16 años en formalina amortiguada, pueden ser amplificados para un producto de 250 pb aproximadamente con una efectividad del 90%, mientras que productos de 950 pb aproximadamente bajo las mismas condiciones de fijación, sólo pueden amplificarse hasta los 5 años postfijación, con una efectividad menor del 20% (Greer et al, 2008). Los tejidos evaluados durante el estudio, refieren fecha de realización de los exámenes postmortem desde 1999, sin conocerse las condiciones de fijación realizadas en dichas época y sin poder establecer con certeza si este factor influyó directamente en la amplificación de tejidos, que previamente estaban confirmados por las técnicas anatomopatológicas.

7.4 Genotipos

Los casos positivos por PCR para los genes *GRA6* y *SAG3*, dieron bandas tenues en la mayoría de los tejidos evaluados, a excepción del caso 8 de un wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*) de donde se extrajo el DNA de secciones de corteza e hipocampo, en el que previamente se habían observado abundantes quistes tisulares con respuesta inflamatoria y cambios neuronales moderados, confirmándose con inmunohistoquímica positiva. El DNA extraído amplificó una banda tenue para *GRA6* en un inicio, pero al reamplificar con el mismo gen, el producto de amplificación obtenido generó una banda definida con el peso molecular correspondiente. Posteriormente, se procedió a su digestión con la enzima de restricción *MseI*, evidenciándose alelos para un patrón de polimorfismo tipo I, similar al de la cepa de referencia RH, la cual es una cepa virulenta para ratones, genotipo I.

Dubey y Crutchley (2008) caracterizaron genéticamente tres aislamientos de *T. gondii* provenientes de un wallaby de Tammar (*M. eugenii*) y dos wallabys de Bennet (*M. rufogriseus*). El primer animal presentaba pobre condición corporal asociada a parasitosis intestinal, mientras que los otros 2 animales cursaron con cuadro clínico neurológico y ocular. Durante la necropsia de los animales, se recolectaron muestras de sistema nervioso central para aislamiento en ratones. Microscópicamente, los wallabys de Bennet presentaron en el encéfalo gliosis moderada e infiltrado inflamatorio perivascular mononuclear, sin observarse quistes tisulares o taquizoítos por HE o por IHQ. Se obtuvieron tres aislamientos en ratones, los cuales no manifestaron signología clínica, considerándose los aislamientos como no virulentos para ratones. Los tejidos de los ratones inoculados se procesaron para la extracción de DNA y posterior genotipificación por PCR-RFLP, empleando el marcador SAG2, resultando los tres aislamientos como genotipo III.

Los datos obtenidos por los autores antes mencionados son similares al caso en el que se logró determinar su genotipo en este trabajo, en cuestión a la especie en la que se presentó (wallaby de Bennet) y las lesiones en sistema nervioso; sin embargo los genotipos caracterizados tras el bioensayo en ratones de los tres animales referidos caracterizados como tipo III, son diferentes al genotipo I determinado en este estudio.

De los demás casos que resultaron positivos para PCR, no fue posible reamplificar bandas bien definidas para llevar a cabo el estudio de RFLP. Sin embargo, retomando el patrón de distribución de muestras amplificadas por PCR, existe la posibilidad de que el conjunto de muestras que amplificaran para un gen y no para otro (ejemplo, positivo para *GRA6* y negativo para *SAG3*), presentaran un polimorfismo diferente, que no permitiera la unión de los iniciadores en la región que se pretendía amplificar. Esta posibilidad, sugiere que algunos de los casos positivos pudieran ser genotipos recombinantes o atípicos, los cuales ya han sido descritos en la literatura en estas especies, particularmente en Norteamérica.

8. CONCLUSIONES

A partir de muestras clínicas de sistema nervioso central fijadas en formaldehído de un wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*), se caracterizó genéticamente el aislamiento de DNA de *Toxoplasma gondii* como genotipo I, mediante PCR-RFLP, cumpliéndose el objetivo general del estudio y confirmándose la hipótesis nula, sobre la presentación de este tipo genético en animales de fauna silvestre en cautiverio en México, por lo menos desde el año 2002, fecha en la que se hizo el estudio postmortem del marsupial referido. El estudio de genotipificación llevado a cabo en esta especie, difiere con el único informe descrito en la literatura científica a la fecha, siendo el genotipo I identificado, distinto a los genotipos determinados (genotipo III) en tres wallabys de los Estados Unidos (Dubey y Crutchley, 2008).

Las secciones de encéfalo de donde se obtuvo el DNA y posteriormente se llevó a cabo la caracterización genética, fueron evaluadas microscópicamente, identificándose cambios de tipo inflamatorio y degenerativo con presencia de quistes tisulares, los cuales se corroboraron con inmunopositividad de las estructuras parasitarias por inmunohistoquímica. Estos hallazgos, permiten establecer que el genotipo identificado fue virulento para la especie afectada, desencadenando una respuesta inflamatoria posterior a su reactivación.

9. LITERATURA CONSULTADA

1. Ajzenberg D, Bañuls AL, Tibayrenc M, Darde ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*. 2002; 32(1): 27-38.
2. Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Fillisetti D *et al.* Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002a; 186(5) : 684-689.
3. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carme B *et al.* Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34(10): 1185-1196.
4. Ajzenberg D, Dumetre A, Darde ML. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(4): 1940-1943.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 4ta ed. Ediciones Omega. Barcelona, España. 2004.
6. Aluja AS, Constantino CF. *Técnicas de necropsia en animales domésticos*. 2ª ed. Manual Moderno. México, D.F. México. 2002.
7. Alvarado-Esquivel C, Liesenfeld O, Herrera-Flores RG, Ramírez-Sánchez BE, González-Herrera A, Martínez-García SA *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, México. *Journal of Parasitology*. 2007; 93 (5): 1214-1216.
8. Alvarado-Esquivel C, Cruz-Magallanes HM, Esquivel-Cruz R, Estrada-Martínez S, Rivas-Gonzalez M, Liesenfeld O *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in human adults from three rural communities in Durango state, Mexico. *Journal of Parasitology*. 2008; 94(4): 811-816.

9. Anfray P, Bonetti C, Fabbrini F, Magnino S, Mancianti F, Abramo F. Feline cutaneous toxoplasmosis. *Veterinary Dermatology*. 2005; 16(2): 131-136.
10. Aramini JJ, Stephen C, Dubey JB. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): Serology and oocyst shedding. *Journal of Parasitology*. 1988. 84(2): 438-440.
11. Basso W, Venturini MC, More G, Quiroga A, Bacigalupe D, Unzaga JM *et al.* Toxoplasmosis in captive bennet's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2007; 144(1-2): 157-161.
12. Besné-Mérida A, Figueroa-Castillo JA, Martínez-Maya JJ, Luna-Pastén H, Calderón-Segura E, Correa D. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico city. *Veterinary Parasitology*. 2008; 157(3-4): 310-313.
13. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000; 64(3): 607-623.
14. Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss an spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6(1): 79-88.
15. Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Current Opinion in Microbiology*. 2007; 10(6): 582-587.
16. Brogi E, Cibas ES. Cytologic detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in cerebrospinal fluid. *Microbiology and Infectious Disease. American Journal of Clinical Pathology*. 2000; 114(6): 951-955.
17. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989; 27(8): 1787-1792.
18. Burns R, Williams ES, O'Toole D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* infections in captive black-footed ferrets (*Mustela nigripes*), 1992-1998: clinical signs, serology, pathology and prevention. *Journal of Wildlife Diseases*. 2003; 39(4): 787-797.

19. Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez ML, Luna-Pastén H, Rodríguez-Pérez LR, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP *et al.* Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2008; 27(5): 469-474.
20. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detection and Prevention*. 2003; 27(5): 397-404.
21. Carmen JC, Sinai AP. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Molecular Microbiology*. 2007; 64(4): 904-916.
22. Carruthers VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International*. 1999; 48(1): 1-10.
23. Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*. 2002; 81(2): 111-122.
24. Carruthers VB. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *Internacional Journal for Parasitology*. 2006; 36(5): 595-600.
25. Cedillo-Pelaez C. Toxoplasmosis en monos ardilla (*Saimiri* sp). *Memorias del Curso Patología en Fauna Silvestre*. 2006, agosto. México, D.F., México. División Sistema de Universidad Abierta y Educación Continua, FMVZ, UNAM. 2006.
26. Cole RA, Lindsay DS, Howe DK, Roderick CL, Dubey JP, Thomas NJ *et al.* Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Journal of Parasitology*. 2000; 86(3): 526-530.
27. Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazet J, Dabritz H *et al.* Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into marine environment. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35(11-12): 1155-1168.

28. Cooper JE. Diagnostic pathology of selected diseases in wildlife. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*. 2002; 21(1): 77-89.
29. Cooper JE, Cooper M. Introduction to veterinary and comparative forensic medicine. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 2007.
30. Cooper GM, Hausman RE. La célula. 3ra ed. Marban Libros SL. Madrid, España. 2007.
31. Correa D, Coballase UE, Cañedo SI, Rico TC. Toxoplasmosis. En: Flisser A, Pérez TR, editores. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos. México, D.F., México. 2006: 355-367.
32. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *Journal of Clinical Pathology*. 2005; 58(8): 894-895.
33. Cheville NF. Ultrastructural pathology: an introduction to interpretation. Ames, Iowa State University. USA. 1999.
34. Da Silva AV, Pezerico SB, de Lima VY, d'Arc-Moretti L, Pinheiro JP, Tanaka EM *et al*. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127(1): 23-27.
35. Darde ML. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2004; 40 (1): 57-63.
36. De Camps S, Dubey JP, Saville WJ. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the midwestern United States. *Journal of Parasitology*. 2008; 94(3): 648-653.
37. Demar M, Ajzenberg D, Serrurier B, Dardé ML, Carme B. Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008; 78(2): 195-197.

38. Dietz HH, Henriksen P, Bille-Hansen V, Henriksen SA. Toxoplasmosis in a colony of new world monkeys. *Veterinary Parasitology*. 1997; 68(4): 299-304.
39. Djurkovic-Djakovic O, Klun I, Khan A, Nikolic A, Knezevic-Usaj S, Bobic B *et al*. A human origin type II of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes and Infection*. 2006; 8(8): 2206-2212.
40. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 1998; 28(7): 1019-1024.
41. Dubey JP. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *Journal of Parasitology*. 2002; 88(4): 713-717.
42. Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Veterinary Parasitology*. 2002a; 106(2): 121-153.
43. Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. 2004; 126(1-2): 57-72.
44. Dubey JP, Applewhite L, Sundar N, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OCH *et al*. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology*. 2007; 134(Pt 11): 1559-1565.
45. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. *CRC Press*. Boca Raton, Florida, USA. 1988.
46. Dubey JP, Bhaiyat MI, de Allie C, Macpherson CNL, Sharma RN, Sreekumar C *et al*. Isolation, tissue distribution and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(3): 557-560.
47. Dubey JP, Córtes-Vecino JA, Vargas-Duarte JJ, Sundar N, Velmurugan GV, Bandini LM *et al*. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary Parasitology*. 2007; 145(1-2): 45-50.

48. Dubey JP, Crutchley C. Toxoplasmosis in wallabies (*Macropus rufogriseus* and *Macropus eugenii*): blindness, treatment with atovaquone and isolation of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*. 2008; 94(4): 929-933.
49. Dubey JP, Edelhofer R, Marcet P, Vianna MCB, Kwok OCH, Lehmann T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Veterinary Parasitology*. 2005; 133(4): 299-306.
50. Dubey JP, Fair PA, Sundar N, Velmurugan G, Kwok OCH, McFee WE *et al*. Isolation of *Toxoplasma gondii* from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Parasitology*. 2008; 94(4): 821-823.
51. Dubey JP, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LMA, Vianna MCB, Marcet PL *et al*. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Amazon, Brazil. *Journal of Parasitology*. 2006; 92(1): 36-40.
52. Dubey JP, Gennari SM, Sundar N, Vianna MCB, Bandini LM, Yai LEO *et al*. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology*. 2007; 93(1): 60-64.
53. Dubey JP, Gomez-Marin JE, Bedoya A, Lora F, Vianna MCB, Hill D *et al*. 2005. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Veterinary Parasitology*. 2005;134 (1-2): 67-72.
54. Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA *et al*. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *International Journal for Parasitology*. 2002; 32(1): 99-105.

55. Dubey JP, Graham DH, da Silva DS, Lehmann T, Bahia-Oliveira MG. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype and oocyst shedding by cats. *Journal of Parasitology*. 2003; 89(4): 851-853.
56. Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Hilali M, El-Ghaysh A, Sreekumar C *et al.* Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. *Veterinary Parasitology*. 2003a; 114(2): 89-95.
57. Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Sreekumar T, Davis MF, Morishita TY. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from the United States. *Journal of Parasitology*. 2003b; 89(5): 1060-1062.
58. Dubey JP, Graham CR, de Young RW, Dahl E, Eberhard ML, Nace EK *et al.* Molecular and biologic characteristic of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *Journal of Parasitology*. 2004; 90 (1): 67-71.
59. Dubey JP, Huong LTT, Sundar N, Su C. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. *Veterinary Parasitology*. 2007; 146 (3-4): 347-351.
60. Dubey JP, Huong LTT, Lawson BWL, Subekti DT, Tassi P, Cabaj W *et al.* Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens in Ghana, Indonesia, Italia, Poland, and Vietnam. *Journal of Parasitology*. 2008; 94(1): 68-71.
61. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38(11): 1257-1278.
62. Dubey JP, Karhemere S, Dahl E, Sreekumar C, Diabaté A, Dabiré KR *et al.* First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso and Kenya). *Journal of Parasitology*. 2005; 91(1): 69-72.

63. Dubey JP, Lenhart A, Castillo CE, Alvarez L, Marcet P, Sreekumar C *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in chickens from Venezuela: isolation, tissue distribution and molecular characterization. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(6): 1332-1334.
64. Dubey JP, Levy MZ, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Dahl E *et al.* Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *Journal of Parasitology*. 2004; 90(5): 1015-1018.
65. Dubey JP, Lewis B, Beam K, Abbitt B. Transplacental toxoplasmosis in a reindeer (*Rangifer tarandus*) fetus. *Veterinary Parasitology*. 2002; 110 (1-2): 131-135.
66. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cyst. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11(2): 267-299.
67. Dubey JP, López B, Alvarez M, Mendoza C, Lehmann T. Isolation, tissue distribution and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* free-range chickens from Guatemala. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(4): 955-957.
68. Dubey JP, Marcet PL, Lehmann T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Argentina. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(6): 1335-1339.
69. Dubey JP, Morales ES, Lehmann T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *Journal of Parasitology*. 2004; 90(2): 411-413.
70. Dubey JP, Morales JA, Sundar N, Velmurugan GV, González-Barrientos CR, Hernández-Mora G *et al.* Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. *Journal of Parasitology*. 2007; 93 (3): 710-711.

71. Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudencio LB *et al.* Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2003; 117(3): 229-234.
72. Dubey JP, Ott-Joslin J, Torgerson RW, Topper MJ, Sundberg JP. Toxoplasmosis in Black-faced kangaroos (*Macropus fuliginous melanops*). *Veterinary Parasitology*. 1988; 30(2): 97-105.
73. Dubey JP, Pas A. *Toxoplasma gondii* infection in Blanford's fox (*Vulpes cana*). *Veterinary Parasitology*. 2008; 153(1-2): 147-151.
74. Dubey JP, Parnell PG, Sreekumar C, Vianna MCB, De Young RW, Dahl E *et al.* Biologic and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from striped skunk (*Mephitis mephitis*), Canada goose (*Branta canadensis*), blacked winged lory (*Eos cyanogenia*), and cats (*Felis catus*). *Journal of Parasitology*. 2004; 90(5):1171-1174.
75. Dubey JP, Patitucci AN, Su C, Sundar N, Kwok OCH, Shen SK. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Veterinary Parasitology*. 2006; 140(1-2): 76-82.
76. Dubey JP, Quirk T, Pitt JA, Velmurugan GV, Kwok OCH, Leclair D *et al.* Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*) and cougar (*Puma concolor*) from Canada. *Journal of Parasitology*. 2008; 94 (1): 42-45.
77. Dubey JP, Rajapakse RPVJ, Ekanayake DK, Sreekumar C, Lehmann T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens from Sri Lanka. *Journal of Parasitology*. 2005; 91(6): 1480-1482.
78. Dubey JP, Rajapakse RPVJ, Wijesundera RRMKK, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OCH, Su C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Sri Lanka and genetic characterization of parasites isolates. *Veterinary Parasitology*. 2007; 146(3-4): 341-346.

79. Dubey JP, Salant H, Sreekumar C, Dahl E, Vianna MCB, Shen SK *et al.* High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. *Veterinary Parasitology*. 2004;121(3-4): 317-322.
80. Dubey JP, Su C, Cortés JA, Sundar N, Gomez-Marin JE, Polo LJ *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary Parasitology*. 2006; 141(1-2): 42-47.
81. Dubey JP, Su C, Oliveira J, Morales JA, Bolaños RV, Sundar N *et al.* Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. *Veterinary Parasitology*. 2006a; 139(1-3): 29-36.
82. Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AH, Farias NA, Ruas JL *et al.* Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Veterinary Parasitology*. 2007; 143(2): 182-188.
83. Dubey JP, Sundar N, Nolden CA, Samuel MD, Velmurugan GV, Bandini LA *et al.* Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. *Journal of Parasitology*. 2007a; 93 (6): 1524-1527.
84. Dubey JP, Sundar N, Pineda N, Kyvsgaard NC, Luna LA, Rimbaud E *et al.* Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. *Veterinary Parasitology*. 2006; 142(1-2): 47-53.

85. Dubey JP, Velmurugan GV, Ulrico V, Gill J, Carstensen M, Sundar N *et al.* 2008. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from fetuses of different gestational ages. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38(8-9): 1057-1063.
86. Dubey JP, Venturini MC, Venturini L, Piscopo M, Graham DH, Dahl E *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. *Journal of Parasitology*. 2003; 89(5): 1063-1064.
87. Dubey JP, Vianna CB, Sousa S, Canada N, Meireles S, Correia da Costa JM *et al.* Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Portugal. *Journal of Parasitology*. 2006; 92(1): 184-186.
88. Dubey JP, Webb DM, Sundar N, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OCH *et al.* Endemic avian toxoplasmosis on a farm in Illinois: clinical disease, diagnosis, biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) and goose (*Anser anser*). *Veterinary Parasitology*. 2007; 148(3-4): 207-212.
89. Dubey JP, Zarnke R, Thomas NJ, Wong SK, Van Bonn W, Briggs M *et al.* *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*. 2003; 116(4), 275-296.
90. Dubey JP, Zhu XQ, Sundar N, Zhang H, Kwok OCH, Su C. Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. *Veterinary Parasitology*. 2007(3-4); 145: 352-356.
91. Dubremetz JF. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology*. 2007; 9(4): 841-848.
92. Epiphanyo S, Guimararaes MABV, Fedullo DL, Correa SHR, Catao-Dias JL. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Sanguinus imperator*) in captivity. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2000; 31(2): 231-235.

93. Epiphanio S, Sinhorini IL, Catao-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. *Journal of Comparative Pathology*. 2003; 129(2-3): 196-204.
94. Espinosa-Avilés D, Morales-Martínez MS. Brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio. *Veterinaria México*. 2007; 38(3): 365-369.
95. Fan H, Gulley ML. DNA Extraction from paraffin-embedded tissues. En: Killeen AA. *Methods in Molecular Medicine. Molecular Pathology Protocols*. Vol 49. Humana Press. USA. 2001: 1-4.
96. Ferguson DJ. Use of molecular and ultraestructural markers to evaluate stage conversión of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34(3): 347-360.
97. Fernández-Presas AM. Apoptosis en protozoarios y en la célula huésped inducida por protozoarios. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 2000; 47(2): 84-93.
98. Ferreira IMR, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, de Oliveira ACP *et al.* *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental Parasitology*. 2008; 118(2): 221-227.
99. Figueroa-Castillo JA, Duarte-Rosas V, Juárez-Acevedo M, Luna-Pastén H, Correa D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *Journal of Parasitology*. 2006; 92(2): 394-395.
100. Fowler ME, Miller RE. Editor. *Zoo and wild animal medicine*. 5th ed. Philadelphia, USA. Saunders. 2003.
101. Fowler ME, Miller RE. Editor. *Zoo and wild animal medicine. Current therapy*. Vol. 6. St Louis, Missouri, USA. Saunders. 2008.

102. Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín JE. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica*. 2006; 97(2): 161-167.
103. Galván-Ramírez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. *Toxoplasma gondii* antibodies in Mexican blood donors. *Transfusión*. 2005; 45(2): 281-282.
104. Galván-Ramírez ML, Sánchez-Vargas G, Vielma-Sandoval M, Soto-Mancilla JL. Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*. 1999; 32(5): 483-488.
105. García-Márquez LG, Gutiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, Palma JM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, México. *Journal of Parasitology*. 2007; 93(6): 1527-1528.
106. García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Solorzano-Salgado M. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in three states of México. *Preventive Veterinary Medicine*. 1990; 10: 25-29.
107. García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Diaz-García G, Hernandez-Baumgarten O. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, swine and goats in four Mexican states. *Preventive Veterinary Medicine*. 1993; 17: 127-132.
108. Gardiner CH, Fayer R, Dubey JP. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. 2nd ed. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC. USA. 1998.
109. Gerhold RW, Yabsley MJ. 2007. Toxoplasmosis in a red-bellied woodpecker (*Melanerpes carolinus*). *Avian Diseases*. 51(4): 992-994.
110. Gillis KD. Naturally occurring *Sarcocystis* infection in domestic cats (*Felis cats*). (Master of Science thesis). Florida, USA. University of Florida. 2003.

111. Green C. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2^a ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2000.
112. Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedde tissues. PCR Methods and Aplications. 1994; 3(6): S113-S122.
113. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy biological aplications. 4th ed. Cambridge University Press. USA. 2000.
114. Heffess CS, Mullick FG. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington, D.C., EU. 1995.
115. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmisión, diagnosis and prevention. Clinical Microbiology and Infection. 2002; 8(10): 634-640.
116. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biological and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Animal Health Research Reviews. 2005; 6(1): 41-61.
117. Holshuh HJ, Sherrod AE, Taylor CR, Andrews BF, Howard EB. Toxoplasmosis in a feral northern fur seal. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1985; 187(11): 1229-1230.
118. Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. Journal of Clinical Microbiology. 1997; 35(6): 1411-1414.
119. Hunter E. Practical electron microscopy. Cambridge University Press. Canada. 1984.
120. Hyman JA, Johnson LK, Tsai MM, O'Leary TJO. Specificity of polymerase chain reaction identification of *Toxoplasma gondii* infection in paraffin-embedded animal tissues. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 1995; 7(2): 275-278.
121. Inoue M. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys. The Journal of Veterinary Medical Science. 1997; 59(7): 593-595.

122. Inskip W, Gardiner CH, Harris RK, Dubey JP, Goldston RT. Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tusiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 1990; 26(3): 377-382.
123. Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2000; 41(3): 634-644.
124. Jones YL, Fitzgerald SD, Sikarske JG, Murphy A, Grosjean N, Klupel M. 2006. Toxoplasmosis in a free-ranging mink. *Journal of Wildlife Diseases*. 42 (4): 865-869.
125. Juan-Sallés C, Prats N, López S, Domingo M, Marco AJ, Morán JF. Epizootic disseminated toxoplasmosis in captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricata*). *Veterinary Pathology*. 1997; 34(1): 1-7.
126. Khan A, Taylor S, Su C, Mackey AJ, Boyle J, Cole R *et al*. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33(9): 2980-2992.
127. Kikuchi Y, Chomel BB, Kasten RW, Materson JS, Swift PK, O'Brien SJO. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Veterinary Parasitology*. 2004; 120(1-2): 1-9.
128. Kim K. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Tropica*. 2004; 91(1): 69-81.
129. Kim JY, Ahn MH, Jun HS, Jung JW, Ryu JS, Min DY. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-κB activation. *Yonsei Medical Journal*. 2006; 47(6): 862-869.
130. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes and Infection*. 2008; 10(9): 978-984.
131. King JM, Roth JL, Dodd DC, Newson ME. *The necropsy book*. Charles Louis Davis, DVM Foundation Publisher. Illinois USA. 2005.

132. Laliberte J, Carruthers VB. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. Cellular and Molecular Life Sciences. 2008; 65(12): 1900-1915.
133. Lambourn DM, Jeffries SJ, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in harbor seals (*Phoca vitulina*) in southern Puget Sound, Washington. Journal of Parasitology. 2001; 87(5): 1196-1197.
134. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. PNAS. 2006; 103 (30): 11423-11428.
135. Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. American Journal of Veterinary Research. 1989; 50 (11): 1981-1983.
136. Lindsay D, McKown RD, DiCristina JA, Jordan CN, Mitchell SM, Oates DW *et al.* Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in adult and fetal mule deer (*Odocoileus hemionus*) from Nebraska. Journal of Parasitology. 2005; 91(6): 1490- 1491.
137. Lindström I, Sundar N, Lindh J, Kironde F, Kabasa JD, Kwok OCH *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. Parasitology. 2008; 135(Pt1): 39-45.
138. Macpherson CN. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. International Journal from Parasitology. 2005; 35(11-12): 1319-1331.
139. Maxie MG, editor. Jubb, Kenedy and Palmer's Pathology of domestics animals. 5th ed. Elseviers Saunders. China. 2007.
140. McGavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed. Mosby Elsevier. China. 2007.
141. Migaki G, Allen JF, Casey HW. Toxoplasmosis in a California sea lion (*Zalophus californianus*). American Journal of Veterinary Research. 1977; 38(1): 135-136.

142. Miller MA, Gardner IA, Packham A, Mazet JK, Hanni KD, Jessup DA *et al.* Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for demonstration of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sea otter (*Enhydra lutris*). *Journal of Parasitology*. 2002; 88(3): 594-599.
143. Miller MA, Grigg ME, Kreuder C, James ER, Melli AC, Crosbie PR *et al.* An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34(3): 275-284.
144. Miller M, Conrad P, James ER, Packham A, Toy-Choutka S, Murray MJ *et al.* Transplacental toxoplasmosis in a wild southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). *Veterinary Parasitology*. 2008; 153(1-2): 12-18
145. Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli AC, Leutenegger CM *et al.* Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38(11): 1319-1328.
146. Mondragon R, Howe DK, Dubey JP, Sibley D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *Journal of Parasitology*. 1998; 84(3): 639-641.
147. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002; 185 (Suppl 1): S73-82.
148. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363(9425): 1965-1976.
149. Muñiz HS, González PS, Mondragón CM, Mondragón FR. Caracterización de los cambios estructurales de células MDCK durante la interacción con el parásito *Toxoplasma gondii*. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas*. 2005. México. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.

150. Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*. 2008; 121(Pt 9): 1559-1568.
151. Nopal-Guerrero T, Mondragón Castellan M, González Pozos S, Mondragón Flores R. Identificación y caracterización bioquímica, celular y funcional de proteasas secretadas por *Toxoplasma gondii* durante la interacción con componentes de matriz extracelular. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergetica y Biomembranas*. 2005, noviembre, 13-18; Oaxaca, Oaxaca, México. Sociedad Mexicana de Bioquímica AC. 2005.
152. Ortíz-Alegria LB. Validación de técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2004.
153. Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *Journal of Parasitology*. 1999; 85(2): 382-384.
154. Patrón SA, Mondragón M, González S, Ambrosio JR, Guerrero AL, Mondragón R. Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Internacional Journal for Parasitology*. 2005; 35(8): 883-894.
155. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38(5): 561-569.
156. Prestrud KW, Dubey JP, Asbakk K, Fuglei E, Su C. First isolate of *Toxoplasma gondii* from arctic fox (*Vulpes lagopus*) from Svalbard. *Veterinary Parasitology*. 2008; 151(2-4): 110-114.
157. Quintal-Avilés R, Navarrete ER. Encuesta serológica en una población del agro henequenero yucateco. *Salud Pública México*. 1975; 17: 365-369.
158. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2005; 42: 405-426.

159. Rico-Torres PC. Estandarización y validación a nivel de laboratorio de una prueba de PCR para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2005.
160. Roch E, Varela G. Diversos aspectos de la investigación sobre toxoplasmosis en México. Resultados de 29 883 reacciones de Sabin y Feldman efectuados de 1953 a 1965. Salud Pública México. 1966; 26: 31-49.
161. Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the tree major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. TRENDS in Parasitology. 2005; 21(10): 476-481.
162. Sánchez-Godoy FD. Diagnostico de neosporosis bovina en fetos, por inmunohistoquímica y PCR del Gen pNc5 y el ITS-1. (Tesis de maestría). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.
163. Sedlak K, Bartová E. Seroprevalencia of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. Veterinary Parasitology. 2006; 136(3-4): 223-231.
164. Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y *et al.* DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2002; 50(8): 1005-1011.
165. Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. Histochemistry and Cell Biology. 2004; 122(3): 211-218.
166. Sibley LD, LeBlanc AJ, Pfefferkorn ER, Boothroyd JC. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. Genetics. 1992. 132(4); 1003-1015.

167. Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences. 2002 ; 357(1417): 81-88.
168. Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. Traffic. 2003; 4(9): 581-586.
169. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. International Journal for Parasitology. 1997; 27 (10): 1135-1145.
170. Speer Ca, Dubey JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. International Journal for Parasitology. 2005; 35(2): 193-206.
171. Spencer JA, Joiner KS, Hilton CD, Dubey JP, Toivio-Kinnucan M, Minc JK, Blagburn BL. Disseminated toxoplasmosis in a captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*). Journal of Parasitology. 2004; 90(4): 904-906.
172. Sreekumar C, Graham DH, Dahl E, Lehmann T, Raman M, Bhalerao DP *et al*. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. Veterinary Parasitology. 2003; 118(3-4): 187-194.
173. Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002; 99(16): 10753-10758.
174. Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. International Journal for Parasitology. 2006; 36(7): 841-848.
175. Sukthana Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. TRENDS in Parasitology. 2006; 22(3): 137-142.

176. Sundar N, Cole RA, Thomas NJ, Majumdar D, Dubey JP, Su C. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*. 2008, 151(2-4): 125-132.
177. Suzán-Azpiri G. Rabia, *Toxoplasma* y parvovirus en mamíferos silvestres de dos reservas del Distrito Federal. (Tesis de maestría). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1998.
178. Suzán G, Ceballos G. The role of feral mammals on wildlife infectious diseases prevalence in two nature reserves within México city limits. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2005; 36(3): 479-484.
179. Switaj K, Master A, Skrzypczak M y Zaborowski. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 11(3): 170-176.
180. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30(12-13): 1217-1258.
181. Thiangtum K, Nimsuphun B, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Tunwattana W, Tongthainan D *et al*. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive felids in Thailand. *Veterinary Parasitology*. 2006; 136(3-4): 351-355.
182. Thomas NJ, Dubey JP, Lindsay DS, Cole RA, Meteyer CU. Protozoal meningoencephalitis in sea otters (*Enhydra lutris*): a histopathological and immunohistochemical study of naturally occurring cases. *Journal of Comparative Pathology*. 2007; 137(2-3): 102-121.
183. Vázquez NG, Echeverría O. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. UNAM y Fondo de Cultura Económica. México, D.F. México.
184. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, Gonzáles-Contreras C, Ortiz-Cortés J *et al*. Short report: neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in México. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005; 72(2): 142-144.

185. Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C *et al.* Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. *Salud Pública México*. 1992; 34 (2): 222-229.
186. Vidal-Hernández E. Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero de wallabie de cuello rojo (*Macropus rufogriseus*) mediante la prueba de fijación de complemento indirecta (Tesis de licenciatura). México, D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1996.
187. Wastling JM, Mattsson JG. Detection of *Toxoplasma gondii*. En: Sachse K, Frey J. *Methods in molecular biology. PCR detection of microbial pathogens*. Vol. 216. Humana Press. USA. 2003:
188. Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, Sugimoto C, Xuenan X, Fujisaki K. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2006; 68(10): 1105-1107.