



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

“Caracterización Genética de *Toxoplasma gondii* en pacientes con toxoplasmosis congénita”

Aida E. Carles Pirón

2-744-1657

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología, como requisito parcial para optar por el Título de Licenciatura en Biología con Orientación en Genética y Biología Molecular.

Panamá, República de Panamá

2024

DEDICATORIA

Dedicatoria

A Dios, por darme la valentía de enfrentar cada reto en el camino y hacerme entender que su tiempo es perfecto.

A mi abuela, mi ángel en el cielo, porque fue mi pilar desde la niñez, mi inspiración y mi motor para entrar en este mundo científico.

A mi mamá, por ser mi confidente; gracias por tu apoyo incondicional y todo tu amor.

A mi papá y a mi hermana, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida.

A mi pareja, compañero de caminar, gracias por cada sacrificio y momento que pasas a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecerle a Dios la sabiduría, fuerza y entendimiento que me brinda todos los días para seguir adelante cumpliendo mis sueños, dando fe que cada una de las metas cumplidas se dan conforme a su voluntad.

A todo el personal del Instituto de Investigación Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT- AIP), porque desde el primer día me abrieron las puertas a un mundo científico que desconocía, me brindaron el apoyo con cada equipo que utilicé para culminar mi trabajo, especialmente a Laura Pineda quien siempre estuvo presente cada vez que necesité algún equipo. A la Dra. Zuleima Caballero E., por darme la oportunidad de trabajar dentro de su equipo de trabajo y toda la orientación durante la realización de mi tesis. Al Dr. Ricardo Correa por haberme brindado sus consejos en cada experimento realizado. Al Dr. Carlos Restrepo y la Dra. Anayansi Valderrama por los insumos prestados cada vez que los necesitamos.

A mis compañeros de laboratorio Ryan Cano, por haberme enseñado las técnicas moleculares utilizadas en este estudio y el manejo de nuevos equipos, a Delba Villalobos por cada consejo brindado durante todo el proyecto, a los Mgters., Edy Frías y Héctor Cruz por darme ánimos todos los días, por colaborar en cada experimento realizado, enseñarme técnicas nuevas de laboratorio y hacerme entender que no importa de donde vengamos o que dificultades surjan en el camino lo importante es la actitud y brindarle todos los días una sonrisa de positividad al mundo para que con esfuerzo podamos lograr nuestras metas. A los profesores Julio Castillo, Edgardo Castro y Claudia Pérez, que han sido mi inspiración a lo largo de mi carrera en el ámbito profesional; les agradezco tanto su orientación en las correcciones de mi tesis.

A mis familiares, en especial a mis padres José Carles y Rosa Pirón, hermana Liz Carles, mis tíos Leonardo Pirón, Emperatriz Carles y Alex Aparicio que siempre me han apoyado de una u otra manera en el transcurrir de mi carrera y me han motivado a confiar en mis capacidades, gracias por brindarme su apoyo incondicional.

A mi pareja Damil Chiari que ha evidenciado todo mi esfuerzo, día y noche al realizar este trabajo, motivándome todos los días a seguir guerreando por cada uno de mis sueños, muchas gracias por todo el amor que me brindas cada día.

CONTENIDO

Contenido

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	7
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.....	19
OBJETIVOS	24
Objetivos Generales	25
Objetivos Específicos	25
CAPÍTULO I.....	26
Antecedentes.....	27
1.1 Descubrimiento de <i>Toxoplasma gondii</i>	27
1.3 Etapas de la infección por <i>T. gondii</i>	32
1.3.1 Ooquistes	32
1.3.2 Taquizoítos	33
1.3.3 Bradizoítos.....	33
1.4 Vías de transmisión.....	34
1.4.1 Transmisión de quistes tisulares o Vía Oral.....	35
1.4.2 Transmisión congénita o Vía Vertical.....	36
1.4.3 Trasplantes de tejidos y órganos	36
1.4.4 Contacto con mucosas.....	37
1.5 Distribución de genotipos de <i>T.gondii</i> en América.....	38
1.6. Manifestaciones Clínicas.....	41
1.7. Diagnósticos	43
1.7.1. Métodos indirectos	43
1.7.2. Métodos directos	43
1.8. Epidemiología.....	44
1.9. Tratamientos Actuales.....	45
1.10 Toxoplasmosis Congénita en Panamá	46
CAPÍTULO II.....	51
Materiales y Métodos	51

2. Metodología.....	52
2.1 La declaración de ética	52
2.2 Colecta de Muestra y Área de Estudio.....	52
2.3 Extracción de ADN	53
2.4 Cuantificación de muestras de ADN en el NanoDrop	54
2.5 Detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras de tejido placentario, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo, por medio de la técnica de PCR utilizando el marcador B1	55
2.6 Caracterización Genética de <i>Toxoplasma gondii</i> en pacientes con Toxoplasmosis Congénita utilizando los marcadores Alt. SAG2, GRA6 y Apico.	57
2.6.1 Marcador Alt. SAG 2	57
2.6.2 Marcador GRA6:	58
2.6.3 Marcador Apico	59
2.7 Preparación del gel de agarosa y Electroforesis.....	60
2.8 REPLI-g	61
2.9 Protocolo de Células Competentes.....	62
2.10 Clonación.....	63
2.10.1 Purificación de Bandas de Agarosa- Kit Promega	63
2.10.2 Ligación	64
2.10.3 Transformación	64
2.10.4 Minipreps: Purificación del Plásmido (WIZARD WIZARD® PLUS SV MINIPREPS DNA PURIFICATION SYSTEMS).....	65
2.11 Análisis de Datos Moleculares.	65
2.11.1 Análisis de secuencias	66
2.11.2 Análisis de genealogía	66
2.11.3 Análisis estadísticos	66
CAPÍTULO III.....	67
RESULTADOS	67
3.1 Descripción del número de muestras.....	68
3.2 Diversidad de Secuencias de <i>T. gondii</i> en mujeres embarazadas con los marcadores Alt SAG2, Apico y GRA6	69
3.2.1 Análisis de polimorfismo para el gen Alt.SAG2.....	69
3.2.2 Análisis de Polimorfismo para el Gen Apico	71
3.2.3 Análisis de polimorfismo para el gen GRA6.....	73
3.3 Diversidad alélica de <i>T. gondii</i> en mujeres embarazadas utilizando los marcadores Alt SAG2, Apico y GRA6	76
3.3.1 Análisis de Genealogía para el gen Alt. SAG2	76

3.3.2 Análisis de Genealogía para el gen Apico	77
3.3.4 Análisis de Genealogía para el gen GRA6	78
3.4 Identificación y análisis estadísticos de los diferentes Alelos encontrados para los genes Alt. SAG2 y GRA6	80
CAPÍTULO IV	81
DISCUSIÓN.....	81
CAPÍTULO V	91
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	91
CAPÍTULO VI	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	31
Figura 2. Quiste esporulado y no esporulado de <i>T. gondii</i>	33
Figura 3. Etapas infecciosas de <i>T. gondii</i>	34
Figura 4. Vías de transmisión de <i>Toxoplasma gondii</i>	37
Figura 5. Circulación de los genotipos de <i>T. gondii</i> debido a la migración animal y las actividades humanas entre países y continentes.. . . .	41
Figura 6. Tomografía axial del cerebro de un bebé a los tres días de nacido con toxoplasmosis congénita.	42
Figura 7. Estado global de la toxoplasmosis.. . . .	45
Figura 8. Colecta de Muestra y Área de Estudio.. . . .	53
Figura 9. Alineamiento en secuencias de <i>T. gondii</i> utilizando el Marcador molecular Alt.SAG2.	70
Figura 10. Alineamiento de secuencias de <i>T. gondii</i> utilizado el Marcador molecular Apico.. . . .	73
Figura 11. Alineamiento de secuencias de <i>T. gondii</i> utilizando el marcador molecular GRA6.. . . .	74
Figura 12. Análisis de Genealogía de secuencias de <i>T. gondii</i> con el marcador molecular ALT.SAG2.. . . .	77
Figura 13. Análisis de Genealogía de secuencias de <i>T. gondii</i> con el marcador molecular Apico.. . . .	78
Figura 14. Análisis de Genealogía de secuencias de <i>T. gondii</i> con el marcador molecular GRA6.. . . .	79

Índice de Tablas

Tabla 1. Mediciones de concentración realizadas en el "NanoDrop 2000" a muestras de embarazadas con <i>T. gondii</i>	55
Tabla 2. Reacciones utilizadas para la detección de <i>T. gondii</i> en muestras de embarazadas con el marcador molecular B1.	57
Tabla 3. Primers utilizados para la caracterización genética de <i>Toxoplasma gondii</i> con los marcadores Alt. SAG2, GRA6, Apico.....	60
Tabla 4. Caracterización Molecular de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras de mujeres embarazadas.....	69
Tabla 5. Secuencias de Referencias utilizadas en los alineamientos de mujeres embarazadas con toxoplasmosis congénita para los marcadores Alt. SAG2, Apico y GRA6.	75

RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria producida por el protozoo intracelular obligado *Toxoplasma gondii*. Se encuentra ampliamente diseminada por todo el mundo y su frecuencia varía mucho según las áreas geográficas y los hábitos alimentarios de la población. Estudios realizados en Panamá determinaron que la seroprevalencia de *T. gondii* en mujeres embarazadas fue de 44.41%, con una incidencia de 3.8 casos por cada mil niños nacidos vivos. Estos reportes nos indican, que en Panamá actualmente existe una alta exposición al parásito en mujeres embarazadas y una transmisión efectiva hacia el feto la cual probablemente sucede con mayor frecuencia en los dos últimos trimestres de embarazo. Algunos de estos casos mostraron graves sintomatologías que pueden estar relacionada con las variantes genéticas del parásito que circulan en el ciclo doméstico. Estudios realizados en Panamá sobre la variabilidad genética de *T. gondii* en animales silvestres mostraron la presencia de los Alelos I y II, a través de la técnica de PCR-RFLP, posteriormente a través de la técnica de secuenciación se corroboró la presencia de estos alelos, además de identificar el Alelo III. Estos hallazgos nos sugieren que estos Alelos probablemente derivan de Cepas Arquetípicas caracterizadas como genotipos I, II y III. En algunos países de América del sur se han encontrado otras variantes, las cuales se conocen como exóticas o atípicas, estas cepas han sido asociadas con casos graves de Toxoplasmosis en personas inmunodeficientes. En Panamá no contamos con datos sobre los tipos de Alelos de *T. gondii* circulando en el ciclo doméstico. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue realizar la caracterización genética de la población de *T. gondii* en muestras de fluidos corporales y tejidos placentarios de recién nacidos y mujeres embarazadas. Para alcanzar este propósito fueron utilizados tres diferentes marcadores moleculares denominados Alt. SAG2, GRA6 y Apico. Cabe destacar que cada muestra analizada constituye una población diferente de *Toxoplasma gondii*. Las muestras fueron amplificadas a través de la técnica de PCR anidado para cada uno de los marcadores moleculares seleccionados y los productos fueron clonados y secuenciados. Se obtuvieron 54 secuencias que fueron estudiadas mediante análisis de polimorfismos de secuencias SNP y genealogía de haplotipos. Las secuencias analizadas para los marcadores Alt. SAG2 y GRA6 mostraron la

presencia de los Alelos I, II y III de *T. gondii*, los cuales fueron caracterizados mediante la identificación de los sitios polimórficos SNP que han sido previamente definidos para cada uno de estos Alelos. También se observaron algunos sitios polimórficos compartidos entre los Alelos II y III, lo que sugiere una relación ancestral más próxima entre estos dos Alelos. Para cada marcador molecular se obtuvieron secuencias que mostraron nuevos sitios polimórficos, los cuales se repitieron en varias de las secuencias analizadas, estos hallazgos demuestran la fijación de estas mutaciones en la población de *T. gondii*, lo que puede implicar en un futuro la formación de nuevos alelos. Este polimorfismo también demostró la heterogeneidad de individuos con diferencias alélicas, las cuales probablemente provienen de un flujo genético dinámico entre el ciclo doméstico y el silvestre. También se observaron sitios de polimorfismos de base única o SNP, específicos para algunas muestras, es decir que un solo individuo de *T. gondii* presentó esa mutación. Estos resultados revelaron la particularidad de un individuo de *T. gondii* en la población analizada y evidenció la posibilidad de infecciones mixtas en el tejido de una misma paciente. Los análisis genéticos y estadísticos realizados para cada uno de los marcadores moleculares no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la predominancia de los Alelos. Sin embargo, cuando se analizaron en conjunto la cantidad de Alelos identificados con ambos marcadores moleculares se observó una mayor abundancia de los Alelos II (50%) y III (38%) con respecto al Alelo I (11%).

Palabras Claves: Toxoplasmosis Congénita, mujeres embarazadas, genes Alt. SAG2, GRA6 y Apico, caracterización genética, alelos, polimorfismo y genealogía.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. It is widely spread throughout the world and its frequency varies greatly depending on geographical areas and the dietary habits of the population. Studies carried out in Panama determined that the seroprevalence of *T. gondii* in pregnant women was 44.41%, with an incidence of 3.8 cases per thousand live-born children. These reports indicate that in Panama there is currently a high exposure to the parasite in pregnant women and an effective transmission to the fetus which probably occurs more frequently in the last two trimesters of pregnancy. Some of these cases showed serious symptoms that may be related to the genetic variants of the parasite that circulate in the domestic cycle. Studies carried out in Panama on the genetic variability of *T. gondii* in wild animals showed the presence of Alleles I and II, through the PCR-RFLP technique, later through the sequencing technique the presence of these alleles was corroborated. , in addition to identifying Allele III. These findings suggest that these Alleles probably derive from Archetypal Strains characterized as genotypes I, II and III. In some South American countries, other variants have been found, which are known as exotic or atypical; these strains have been associated with severe cases of Toxoplasmosis in immunodeficient people. In Panama we do not have data on the types of *T. gondii* alleles circulating in the domestic cycle. Therefore, the objective of this study was to perform genetic characterization of the *T. gondii* population in samples of body fluids and placental tissues from newborns and pregnant women. To achieve this purpose, three different molecular markers called Alt. SAG2, GRA6 and Apico were used. It should be noted that each sample analyzed constitutes a different population of *Toxoplasma gondii*. The samples were amplified through the nested PCR technique for each of the selected molecular markers and the products were cloned and sequenced. 54 sequences were obtained and studied by analysis of SNP sequence polymorphisms and haplotype genealogy. The sequences analyzed for the markers Alt. SAG2 and GRA6 showed the presence of Alleles I, II and III of *T. gondii*, which were characterized by identifying the polymorphic SNP sites that have been previously defined for each of these Alleles. . Some shared polymorphic sites were also observed between Alleles II and III, suggesting a closer ancestral relationship

between these two Alleles. For each molecular marker, sequences were obtained that showed new polymorphic sites, which were repeated in several of the sequences analyzed. These findings demonstrate the fixation of these mutations in the *T. gondii* population, which may imply in the future the formation of new alleles. This polymorphism also demonstrated the heterogeneity of individuals with allelic differences, which probably come from a dynamic genetic flow between the domestic and wild cycles. Sites of single base polymorphisms or SNPs were also observed, specific for some samples, meaning that a single individual of *T. gondii* presented that mutation. These results revealed the particularity of an individual of *T. gondii* in the analyzed population and evidenced the possibility of mixed infections in the tissue of the same patient. The genetic and statistical analyzes carried out for each of the molecular markers did not show statistically significant differences in terms of the predominance of the Alleles. However, when the number of Alleles identified with both molecular markers were analyzed together, a greater abundance of Alleles II (50%) and III (38%) was observed with respect to Allele I (11%).

Keywords: Congenital Toxoplasmosis, pregnant women, Alt. SAG2, GRA6 and Apico genes, genetic characterization, alleles, polymorphism and genealogy.

INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria producida por un protozoario intracelular obligado denominado *Toxoplasma gondii*. Se encuentra ampliamente diseminada por todo el mundo y su frecuencia varía según las áreas geográficas y los hábitos alimentarios de la población (Botero D, 1992). Se estima que más de un cuarto de la población mundial (30%) ha experimentado en algún momento de su vida una infección con el parásito y su prevalencia puede variar debido a diversos factores socioeconómicos y culturales (Flegr et al., 2014).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la toxoplasmosis congénita representa una carga global significativa para la salud pública. Por lo tanto, esta enfermedad sigue siendo subestimada en cuanto a su impacto, a pesar de las graves secuelas congénitas, principalmente relacionadas con problemas neurológicos y oculares (Torgersona & Mastroiacovo, 2013). La prevalencia por la infección de *T. gondii* es cambiante en las zonas geográficas del mundo. En diversos países industrializados inicialmente se comenzó a comprobar la disminución de la prevalencia al mejorar las condiciones de vida y reducir la infección de *T. gondii* en animales de consumo humano. En las regiones donde existe mayor transmisión, la prevalencia por transmisión congénita también aumenta desde edades más tempranas. Principalmente en Europa existe una gran variación en la seroprevalencia entre mujeres embarazadas: en Francia es alrededor de 54%, mientras en Suecia es tan sólo 12% (Ambroise & France, 2000). En los Estados Unidos la seroprevalencia para *T. gondii* entre mujeres entre 15 y 55 años es de 15% (J. L. Jones et al., 2001). En Latinoamérica, México tiene alrededor de 35% (Ambroise & France, 2000) y en Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro) se han informado diferentes valores entre 59% y 78% (Bahia-Oliveira et al., 2003).

Existen varias teorías geográficas sobre el origen de *T. gondii*, una de ellas se basa en análisis filogenéticos y fenotípicos que sugieren un ancestro común norteamericano, el cual ingresó a América del Sur y se diversificó después del surgimiento del Istmo de Panamá hace aproximadamente 3,5 millones de años, junto con la formación del corredor biológico mesoamericano (Minot et al., 2012). Otra teoría, que emplea enfoques geoestadísticos y filogenéticos, plantea un posible

origen sudamericano de *T. gondii*. Según esta teoría, el parásito se habría expandido por Europa, Asia, África y finalmente América del Norte, a través de diversas rutas migratorias relacionadas con la coevolución de la Familia Felidae y los humanos (Bertranpetit et al., 2017).

A nivel mundial, se han llevado a cabo numerosos estudios para caracterizar genéticamente a *T. gondii*, aunque aún no se ha logrado obtener una imagen completa de la estructura de su población (Brito et al., 2023a). Se sabe de la existencia de tres linajes principales identificados como tipo I, II y III, los cuales son ampliamente distribuidos a nivel global, pero presentan variaciones geográficas significativas, especialmente en las regiones europeas donde el linaje II es más predominante; estos linajes también han sido asociadas con diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad (Fernández-Escobar et al., 2022a). Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que las cepas de *T. gondii* procedentes de América del Sur, Asia y África exhiben una mayor diversidad genética en comparación con las de otros continentes. Estos nuevos genotipos, considerados atípicos o exóticos, presentan una complejidad genética superior debido a la variabilidad y combinación de genes, lo que sugiere una virulencia potencialmente mayor tanto en animales como en humanos (Ajzenberg et al., 2004).

La frecuencia de infección por *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas de la provincia de Panamá y Panamá Oeste mostró un alto porcentaje de positividad (44.23%) y una alta incidencia de toxoplasmosis congénita, con 3.8 casos por cada mil niños nacidos vivos (Flores et al., 2021). En el mundo se han realizado estudios sobre factores de riesgos como el consumo de carne cruda por mujeres embarazadas que representa un riesgo importante para la infección por toxoplasma (Cook et al., 2000; Baril et al., 1999; Paul, 1998). Por lo tanto, estudios muestran alta frecuencia de infección de *T. gondii* en pollos cuando comparado con carnes rojas, este hecho probablemente se deba a las prácticas de manejo y condiciones de producción que pueden estar asociados a la forma de crianza de estos animales. (Lora et al., 2011).

La toxoplasmosis puede manifestarse de forma leve y asintomática, pero también puede tener consecuencias mortales para el feto durante el periodo de gestación en mujeres embarazadas, provocando la toxoplasmosis congénita. La infección transplacentaria durante el embarazo a menudo pasa desapercibida, pero una vez que el parásito se transmite al feto, puede ocasionar secuelas graves que persistirán a lo largo de toda la vida. Es crucial destacar que el riesgo para el feto aumenta a medida que avanza el embarazo debido a que la placenta disminuye su grosor y es más fácil para el parásito atravesarla. La gravedad de la enfermedad al parecer depende de varios factores, como la cantidad de parásitos que atraviesan la placenta, la inmadurez inmunológica del feto y la edad gestacional (Restrepo Giraldo, 2008).

Generalmente la principal vía de transmisión se debe a la ingesta de comida con mala manipulación y carnes crudas o semicocidas portadoras de quistes, o por la ingestión de ooquistes en alimentos y agua contaminada por las heces de gatos. Las vías de transmisión de patógenos a través de la sangre o tejido, respiratorias, cutánea y por mucosa (conjuntival) son diagnosticadas en menor escala. La transmisión por vía transplacentaria ocurre en las mujeres embarazadas cuando son afectadas por una infección primaria, también se han descrito casos muy raros de infección congénita en infecciones maternas anteriores al embarazo (Braunwald E & AS et al., 2001).

En Panamá se cuenta con un protocolo oficial para el control de la toxoplasmosis congénita que ayuda a mujeres embarazadas a través de los controles prenatales y post-parto a dar seguimiento, orientación y evaluar a nivel nacional dicha infección. Sin embargo, en el sistema de salud panameño las reglamentaciones e interpretación de las pruebas en muchas ocasiones no se analizan de la mejor forma. En Colombia se realizó un estudio donde se muestran casos clínicos graves y hacen énfasis en la alta prevalencia de *Toxoplasma gondii* por condiciones socioeconómica que clasifican a la toxoplasmosis como una problemática en la salud pública (Alvarado-Socarras et al., 2021). Por tal motivo el objetivo de este estudio se enfoca en conocer la variabilidad genética de *Toxoplasma gondii* en

muestras de pacientes diagnosticadas con toxoplasmosis congénita. El análisis de tres importantes genes de *T. gondii* nos permitirá comprender cuales son los principales Alelos que circulan en el ciclo doméstico y la posible existencia de Alelos nuevos y menos comunes que pueden estar infectando humanos.

OBJETIVOS

Objetivos Generales: Analizar la variabilidad genética de *Toxoplasma gondii* en muestras de pacientes mujeres embarazadas diagnosticados con toxoplasmosis congénita.

Objetivos Específicos:

- ❖ Estudiar la población de *T. gondii* en muestras de líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y tejidos placentarios colectados en mujeres embarazadas.
- ❖ Determinar la variabilidad alélica de *T. gondii* a través de los marcadores moleculares Alternativo SAG2, GRA6 y Apico.
- ❖ Analizar la variabilidad genética de *Toxoplasma gondii* utilizando análisis de polimorfismo y genealogía.

CAPÍTULO I

Antecedentes

1.1 Descubrimiento de *Toxoplasma gondii*

En 1908, en Túnez, Charles Nicolle y Louis Manceaux descubrieron la existencia del parásito *Toxoplasma gondii* en un roedor llamado *Ctenodactylus gundi*, mientras que, en Brasil, Splendore lo encontró en conejos. Su nombre se refiere a su forma arqueada y su descubrimiento en un ratón (Lehmann et al., 2006).

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado, que carece de flagelos y tiene forma semilunar. Es móvil y Gram negativo, y no tiene un huésped específico (eurixeno). Se caracteriza por sus movimientos de rotación helicoidal, en los que toda la célula participa gracias a las fibrillas en su superficie. Su tamaño varía entre $2 \text{ y } 12 \times 1,5 - 4 \mu\text{m}$ (Artigas et al., 2016).

Inicialmente, se pensó que era una especie de *Leishmania*, pero más tarde se llegó a la conclusión de que se trataba de un nuevo tipo de parásito intracelular. Debido a su forma arqueada. Posteriormente, en 1937, Wolff y Cowen, en colaboración con Sabin, identificaron un agente similar en el cerebro de un niño con problemas en la cabeza, y determinaron que se trataba de *T. gondii* (Thierman, 1973).

Más tarde, en 1960, Jacobs y sus colegas realizaron un estudio en el que observaron que los quistes de *Toxoplasma gondii* presentes en tejidos animales eran resistentes a las enzimas proteolíticas y podían sobrevivir durante largos períodos en el huésped (Jacobs L., 1960). En 1965, Desmonts y su equipo demostraron que la seroprevalencia de la toxoplasmosis aumentaba del 10% al 50% en una población, y alcanzaba el 100% después de consumir carne mal cocida. (Desmonts G., 1965). En 1969, Kean describió un caso de toxoplasmosis en estudiantes que consumían carne cruda, mientras que, en 1972, Wallace y sus colegas encontraron una seroprevalencia del 80% a *T. gondii* en una población parisina, lo cual se asoció con la práctica de consumir carne cruda o mal cocida entre los jóvenes y adultos (Wallace GD., 1972).

En 1965, Hutchinson fue el primero en describir la presencia de ooquistes de *T. gondii* en las heces de los gatos, lo que evidenciaba una transmisión fecal. Fue en 1970 cuando Frenkel describió el ciclo de vida de *T. gondii*, que incluye la fase de

reproducción sexual en el intestino delgado del gato a través de la gametogonia (Dubey, 1970). En 1972, Dubey y Frenkel caracterizaron biológica y morfológicamente cinco formas de diferenciación de *T. gondii* en el epitelio intestinal del gato, y en 1973 Frenkel acuñó el término bradizoíto para definir al organismo que se multiplica en los quistes tisulares. Diversos estudios realizados por Marshall en 1957, Beverley en 1961, Dubey en 1986 y 1990, y Dubey y Beattie en 1988 demostraron que la toxoplasmosis animal es la causa de aborto y muerte neonatal en cerdos y cabras (Dubey J. e., 1988).

A partir de 1960 se desarrollaron pruebas serológicas adecuadas para detectar la infección en mujeres embarazadas, lo que ayudó a prevenir la transmisión de la infección congénita (Voller A. et.al., 1976). También se desarrollaron pruebas diagnósticas para la toxoplasmosis asintomática aguda y la infección crónica, basadas en la detección de anticuerpos IgM (respuesta primaria) y de IgG (respuesta a una toxoplasmosis crónica o pasada) (Voller A. et.al., 1976). En 1976, Ruskin y Remington describieron casos de encefalitis en personas inmunocomprometidas con cáncer y trasplantados (Ruskin J. et.al., 1976).

En 1987, Vollmer informó que las células T cooperadoras ayudan a la eliminación del parásito por parte de los macrófagos, y el interferón gamma desempeña un papel crucial al activar las células citotóxicas. Mediante la administración de anticuerpos monoclonales anti-CD4 en ratones crónicamente infectados, se observó una disminución de las células T, una reducción en los quistes y una proliferación limitada de los taquizoítos. En 1989, Luft demostró un aumento en los casos de encefalitis por *Toxoplasma* en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que ocurría después de una disminución de los niveles de CD4+. Debido a este hecho, *T. gondii* fue considerado como un patógeno oportunista (Luft BJ., 1989).

Entre 1970 y 1992, se llevaron a cabo numerosas investigaciones sobre aspectos bioquímicos de *T. gondii*, destacando la caracterización de la molécula de glicofosfatidilinositol (GPI), que desempeña un papel importante en la fijación de proteínas de membrana del taquizoíto (Mcleod R., et.al., 1991).

En 1994, Mondragón y Frixione investigaron el papel de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en la motilidad de *T. gondii*. También en 1995, demostraron la importancia de la extrusión del conoide en el proceso de invasividad, identificando el calcio intracelular como el desencadenante de este proceso dinámico. Además, describieron las vías de señalización involucradas en la extrusión del conoide (González M. et.al., 2009).

Desde 1997 hasta la actualidad, se ha logrado un gran avance en el diagnóstico de *T. gondii* mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite la detección del ADN del parásito. Sin embargo, aún es necesario consolidar la correlación entre los resultados positivos de esta prueba y las manifestaciones clínicas de los pacientes (Cazenave J. et.al., 1992).

El genoma de *Toxoplasma gondii* tiene un tamaño de 61,6 megabases y 592 cM, y está compuesto por unidades genéticas de 104 kb/cM y 14 cromosomas. El genoma de *T. gondii* es en su mayoría haploides porque casi todos los estadios de *T. gondii* presentan un genoma haploide, excepto una breve fase o estadio diploide que ocurre en el intestino del gato y que es excretada en las heces de los gatos; esta fase se mantiene diploide antes que ocurra la esporulación (Khan AS., et. al., 2005).

Este parásito se encuentra clasificado en el Filo Apicomplexa, Clase Sporozoea, Subclase Coccidia, Orden Eucoccidida, Suborden Eimeriorina, Familia Sarcocystidae y Subfamilia Toxoplasmatinae (Minot et al., 2012). Para completar su ciclo de vida, los miembros de esta subfamilia requieren uno o más hospedadores vertebrados. Otros parásitos relacionados que pertenecen a esta familia incluyen aquellos que afectan al ganado bovino, como la *Neospora caninum* que causa abortos, la *Besnoitia besnoiti* responsable de la besnoitiosis, y la *Hammondia hammondi* que necesita de los felinos como hospedadores definitivos y está estrechamente relacionada con *T. gondii* (Petersen et al., 2001; Raiden et al., 2013).

Las investigaciones científicas realizadas durante los siglos XX y XXI han brindado un mayor entendimiento sobre el *Toxoplasma gondii* y la toxoplasmosis. Sin embargo, a pesar de estos avances, todavía existen muchas preguntas sin respuesta. Afortunadamente, disciplinas como la inmunología, genética, biología molecular y proteómica están desempeñando un papel crucial en el estudio de la

relación entre el hospedero y el parásito. A través de estas áreas de investigación, esperamos obtener un mayor conocimiento sobre esta relación y así poder responder a esas interrogantes pendientes.

1.2 Ciclo Biológico de *T. gondii*

T. gondii tiene dos etapas en la que se divide su ciclo biológico, una etapa asexual que ocurre en hospederos intermediarios ya sean mamíferos, aves y reptiles. También tiene una fase sexual que ocurre exclusivamente en los hospederos definitivos, en especies de felinos (Dubey, 1998; Hutchison, 1965).

En los hospederos definitivos después de la ingesta de quistes presentes en los tejidos de los hospederos intermediarios los taquizoítos haploides se enquistan en el intestino de los felinos e invaden los enterocitos para producir la infección, solo en los enterocitos de los felinos se diferencian intracelularmente en microgameto (masculino) y macrogameto (femenino), los gametos masculinos fertilizan a los maternos y producen un cigoto diploide (Dubey, 1998; West et al., 2003).

Después de la fertilización, los ooquistes formados en los enterocitos se liberan por ruptura de la célula y son excretados como formas no esporuladas en las heces de los felinos. La eliminación de los ooquistes comienza de 3 a 7 días luego de la ingesta del quiste tisular, los gatos infectados pueden eliminar más de 100 millones de ooquistes en sus heces (Elmore et al., 2010). Estos ooquistes sufren una meiosis durante el proceso de esporogonia que ocurre después de algunos días en el ambiente externo (Dubey y Frenkel, 1972; Jones y Dubey, 2010b). Mayoritariamente los estadios en el genoma de *T. gondii* son haploides, excepto una breve fase diploide que ocurre en el intestino del gato antes de la meiosis (Khan AS., et. al., 2005).

En los hospederos intermediarios después de la ingestión de los ooquistes, se liberan los esporozoítos, los cuales penetran en el epitelio intestinal donde se diferencian en taquizoítos, esto ocurre mediante endodiogenia; es decir que los parásitos simplemente replican su genoma haploide y se dividen en dos células hijas

que se forman en el interior de la madre para posteriormente diseminarse a otros tejidos (Kochanowsky y Koshy, 2018a). Los quistes tisulares surgen entre 7 y 10 días luego de la conversión de taquizoítos a bradizoítos debido a la respuesta inmune del hospedero, estos pueden ocurrir durante toda la vida en los hospederos intermediarios predominando en el cerebro o musculatura. Cuando se da la ingestión de estos quistes por los hospederos intermediarios a través de la carne cruda o poco cocida, los quistes se rompen a medida que atraviesan el tracto digestivo y se da la liberación de los bradizoítos, los cuales infectaran el epitelio del nuevo hospedero y se diferencian nuevamente en taquizoítos, los cuales se dividen para diseminarse por todo el cuerpo (Robert-Gangneux y Dardé, 2012).(Fig.1)

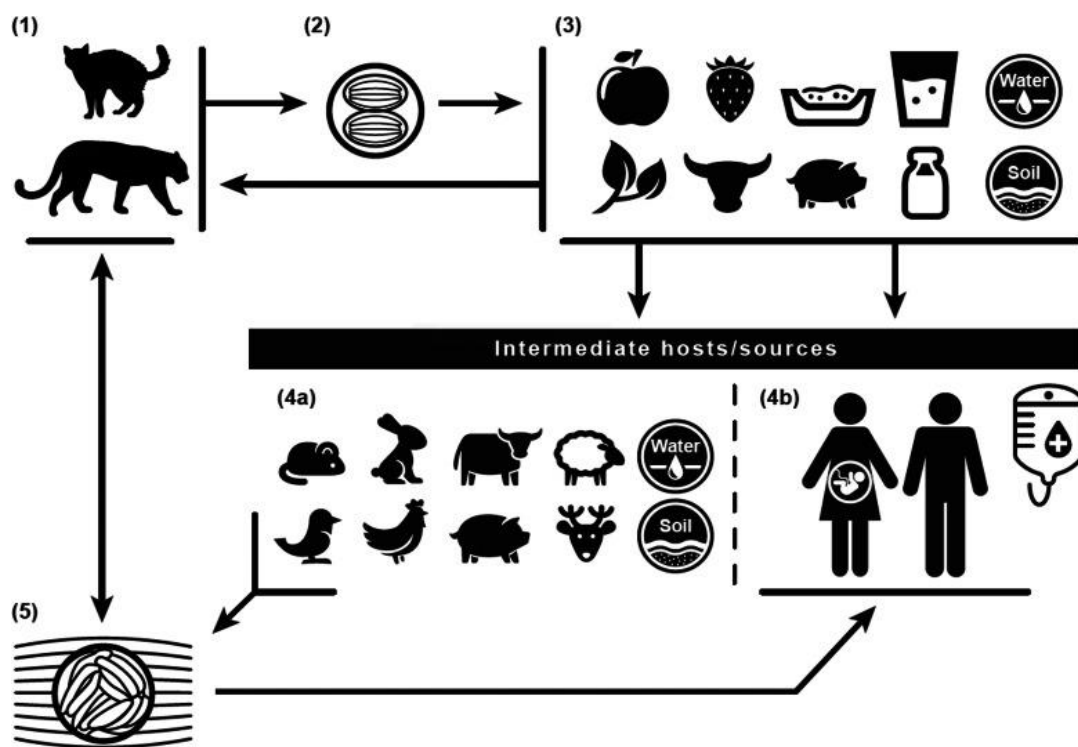


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii*. Los hospederos definitivos (1) ingieren el parásito *T. gondii* por ooquistes tisulares (5) de intermediarios infectados, como roedores y aves, u otras fuentes, incluida el agua (4a). Los hospederos definitivos eliminan ooquistes no esporulados por las heces después de unas tres semanas (2), infectando el agua, suelo y alimentos (3) de los hospederos y fuentes intermedias (4a/4b). Los ooquistes no esporulados esparcidos por las heces de los felinos tardan de 1 a 5 días en volverse infecciosos. Los seres humanos pueden infectarse mediante la ingesta de alimentos o agua contaminados; contacto con tierra contaminada o arena para gatos; transfusiones

de sangre o trasplantes de órganos; o transmisión de madre a feto (vertical/placentaria). Fuente:(Markon et al., 2020).

1.3 Etapas de la infección por *T. gondii*

Toxoplasma gondii posee tres etapas infecciosas: un bradizoito de división lenta en los quistes tisulares, un taquizoíto de división rápida y una etapa en el ambiente, el esporozoíto, el cual se encuentra protegido dentro de un ooquiste (Robert-Gangneux y Dardé, 2012b).

1.3.1 Ooquistes

Esta fase del parásito solo está presente en sus hospederos definitivos (felinos) y pueden ser esporulados y no esporulados. Los ooquistes esporulados tienen forma subesférica a elipsoidales y tienen dos esporoquistes de forma elipsoidales de 6 a 8 μm , además, cada uno contiene cuatro esporozoítos en su interior. Los esporozoítos miden de 6 a 8 μm , presentan un núcleo subterminal y abundantes micronemas, roptrias, gránulos de amilopectina y lípidos. El número de lípidos es superior al presente en los taquizoítos y bradizoítos. Los ooquistes no esporulados tienen forma subesférica a esférica y miden de 10 a 12 μm de diámetro (Jones y Dubey, 2010b). Los ooquistes esporulan cuando salen del felino por medio de las heces después de tres a siete días y contaminan el ambiente, una vez esporulados estos son infecciosos y sufren una división celular que los vuelve haploides. El ooquiste presenta una pared con una estructura multicapa robusta que protege al parasito de cualquier daño mecánico o químico, permitiendo la sobrevivencia del parasito por largos periodos en un ambiente húmedo (Mai et al., 2009). (Fig.2)



Figura 2. Quiste esporulado y no esporulado de *T. gondii*. Fuente: (Dubey, 2010).

1.3.2 Taquizoítos

Son capaces de invadir todos los tipos de células de casi todos los vertebrados, multiplicándose en una vacuola parasitófora y se encuentra característicamente en las infecciones agudas (Robert-Gangneux y Dardé, 2012c). Miden aproximadamente 6 μm y tienen forma de media luna, presentan un extremo anterior conoidal y un extremo posterior redondeado. Presentan diversas organelas en su estructura como mitocondrias, complejo de Golgi, ribosomas, roptrias, retículo endoplasmático rugoso y liso, cuerpos de inclusión, película protectora, microtúbulos subpeliculares, anillos apicales, anillos polares, conoide, micronemas, microporo, gránulos densos, gránulos de amilopectina (a veces ausentes) y apicoplasto (Dubey, 2009).

1.3.3 Bradizoítos

Son el resultado de la conversión de taquizoítos en una etapa de división lenta que forman los quistes tisulares. Tienen forma de esferoides en las células cerebrales o de forma alargadas en las células musculares. El tamaño puede variar desde 10 μm hasta 100 μm , estos bradizoítos tienen un metabolismo latente adaptados a la supervivencia a largo plazo. La resistencia de los bradizoítos a la pepsina ácida la cual es una enzima digestiva que producen las paredes del estómago y es secretada por el jugo gástrico; permite la transmisión mediante la ingestión de los bradizoítos (Ferguson, 2004). Su estructura carece de lípidos y el número de

roptrias y sus gránulos densos son inferiores, mientras que el número de micronemas y gránulos de amilopectina son superiores. Los bradizoítos son ligeramente más delgados que los taquizoítos, presentan un núcleo posterior y resultan ser menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas (Dubey, 2010).(Fig. 3)

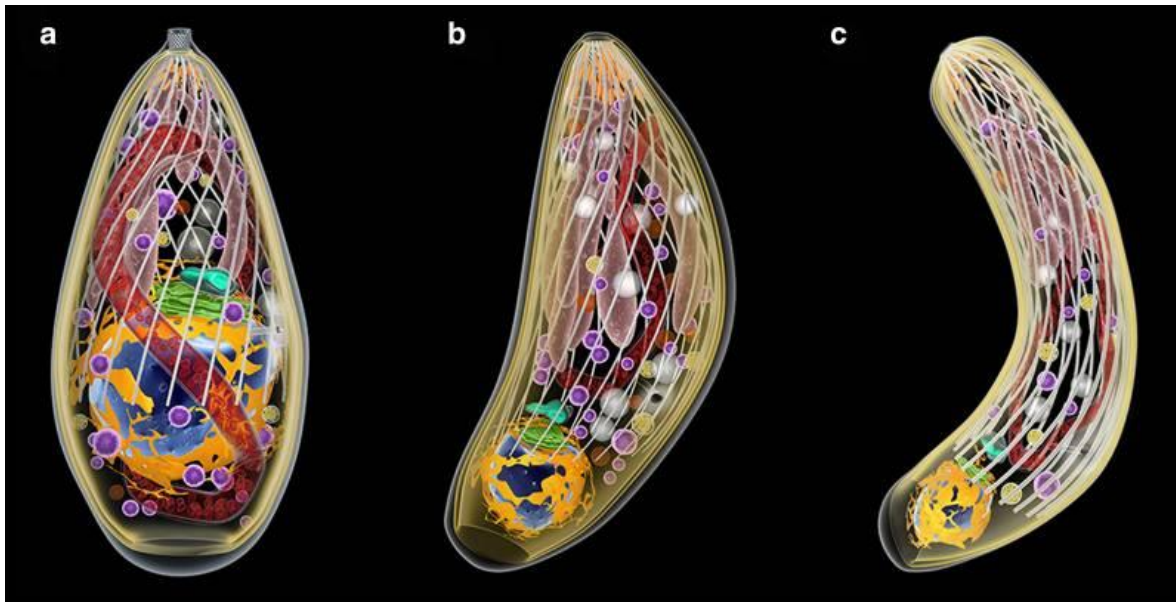


Figura 3. Etapas infecciosas de *T. gondii*. Taquizoito (a), bradizoito (b) y esporozoito (c). Se describen a continuación las diferentes estructuras intracelulares del parásito: El núcleo (azul) rodeado por el retículo endoplasmático rugoso (amarillo). El complejo de Golgi (verde) y el apicoplasto (azul-verde). La mitocondria se propaga a través del citosol (rojo). Los gránulos densos (magenta) y los gránulos amilopectina (blanco) se encuentran dispersos en el citosol. En el complejo apical cilíndrico los micronemas (naranja) y rhoptrias (rosa). Fuente: (Attias et al., 2020).

1.4 Vías de transmisión

La forma más común de transmisión es por la ingesta de quistes tisulares, ooquistes en alimentos, agua contaminada o por medio de la transmisión congénita (D. Hill & Dubey, 2002). Todavía no se ha definido cuál de estas rutas es la más importante desde el aspecto epidemiológico, aunque esto puede cambiar de acuerdo a los hábitos alimenticios y grado de escolaridad. Además, pueden ocurrir infecciones por taquizoítos en trasplantes de tejidos y sangre (Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000).(Fig.4)

1.4.1 Transmisión de quistes tisulares o Vía Oral

Generalmente los quistes tisulares se encuentran en el músculo y el cerebro de los hospederos intermediarios. Las especies de felinos se infectan con toxoplasmosis al comer presas infectadas como roedores y pájaros, iniciando la reproducción sexual y la producción de ooquistes (J P Dubey, Miller, & Frenkel, 1970). Estos hospederos definitivos inician la excreción de ooquistes dos semanas después de la infección, liberando 10 millones de quistes durante un día. Después de la excreción, el ooquiste esporula en 1 a 5 días, se vuelve infeccioso y puede permanecer en estado infectivo por más de 1 año en suelo húmedo y no congelado (J P Dubey, Lindsay, & Speer, 1998). La evidencia sugiere que las infecciones producidas por ooquistes libres en humanos son clínicamente más graves que las infecciones adquiridas por quistes tisulares (J. P. Dubey, 2010).

Los humanos también pueden adquirir la infección mediante el consumo de carne contaminada poco cocida, como carne de cerdo o cordero (J P Dubey et al., 2005; D. E. Hill, Haley, Wagner, Gamble, & Dubey, 2010). Cuando se ingiere un quiste tisular, la pared del quiste se ve alterada por las enzimas proteolíticas presentes en el estómago, donde se liberan los bradizoítos resistentes a la digestión proteolítica, lo que les permite sobrevivir a este proceso digestivo e infectar el intestino delgado (Halonen & Weiss, 2013). Últimamente, se ha estudiado como factores de riesgo el consumo de verduras o frutas sin lavar, y la ingesta de agua contaminada con ooquistes (J. P. Dubey, 2010; Pereira, Franco, & Leal, 2010). Inicialmente, se pensó que las infecciones transmitidas por el agua eran poco comunes. Sin embargo, se ha reportado que la toxoplasmosis puede ser una enfermedad transmitida por fuentes de agua no tratada (J P Dubey, 2004). Es importante destacar que el contacto directo con gatos no es el principal riesgo para la infección humana debido a la corta duración de la eliminación de ooquistes, la expulsión de ooquistes no infecciosos, el comportamiento de acicalamiento y de esconder las heces con la arena o tierra (Elmore et al., 2010). En los gatos el principal mecanismo de transmisión no es la contaminación por tierra y agua, sino el carnivorismo, ya que las presas que cazan, en su mayoría, son portadores de quistes tisulares de *T. gondii*. Una vez los gatos defecan los ooquistes salen al ambiente y se vuelen

infecciosos a partir de siete días, por este motivo, la principal medida de control contra la diseminación de ooquistes del parásito es evitar que los gatos domésticos deambulen libres en la calle y se alimenten de fauna peridoméstica. En ausencia de métodos eficaces para detectar la presencia de ooquistes del parásito en la tierra y en el agua, las medidas de salud pública deben enfocarse en educar a los propietarios de los gatos y a la población en general. Medidas de higiene tan básicas como usar guantes desechables cuando se lleven a cabo tareas de jardinería o agricultura y el lavarse las manos después de tener contacto con tierra, podría prevenir un gran número de infecciones por *T. gondii* en el humano (Fern & Garc, 2017).

1.4.2 Transmisión congénita o Vía Vertical

La transmisión congénita ocurre durante una toxoplasmosis aguda, esto acontece cuando la madre seronegativa se infecta con el parásito y los taquizoítos son liberados a la sangre, en este punto los taquizoítos pueden atravesar la placenta e infectar al feto (J. L. Jones et al., 2003; Jose G Montoya & Remington, 2008). La etapa del embarazo en la que se adquiere la toxoplasmosis materna es un factor importante en la transmisión y la gravedad de la infección congénita. Durante el primer trimestre, la transmisión es relativamente baja menor del 20%, pero aumenta hasta cerca del 80% al final del embarazo (J. Jones, Lopez, & Wilson, 2003; Ortiz-Alegría et al., 2010). Los casos en las primeras etapas de la gestación son graves, lo que podría provocar aborto espontáneo, hidrocefalia y retraso mental. Durante el último trimestre, las tasas de transmisión son más altas, pero la mayoría de estos casos son subclínicos y provocan infecciones asintomáticas o coriorretinitis recurrente durante la edad adulta temprana, lo que puede provocar problemas de visión o ceguera (J G Montoya & Liesenfeld, 2004).

1.4.3 Trasplantes de tejidos y órganos

Para evitar la transmisión de *T. gondii* cuando se realizan los trasplantes de órganos y transfusiones de sangre se debe realizar a los pacientes donadores exámenes rigurosos antes de realizar los procedimientos (Dubey, 2010).

1.4.4 Contacto con mucosas

Otra fuente de contaminación significativa, pueden ser las salpicaduras con material infeccioso de *T. gondii*, sobre superficies del cuerpo como la mucosa ocular y bucal, esto puede ocurrir ya sea por muestras para ser manipuladas en los laboratorios o por las heces de gatos, (Dubey, 2010).

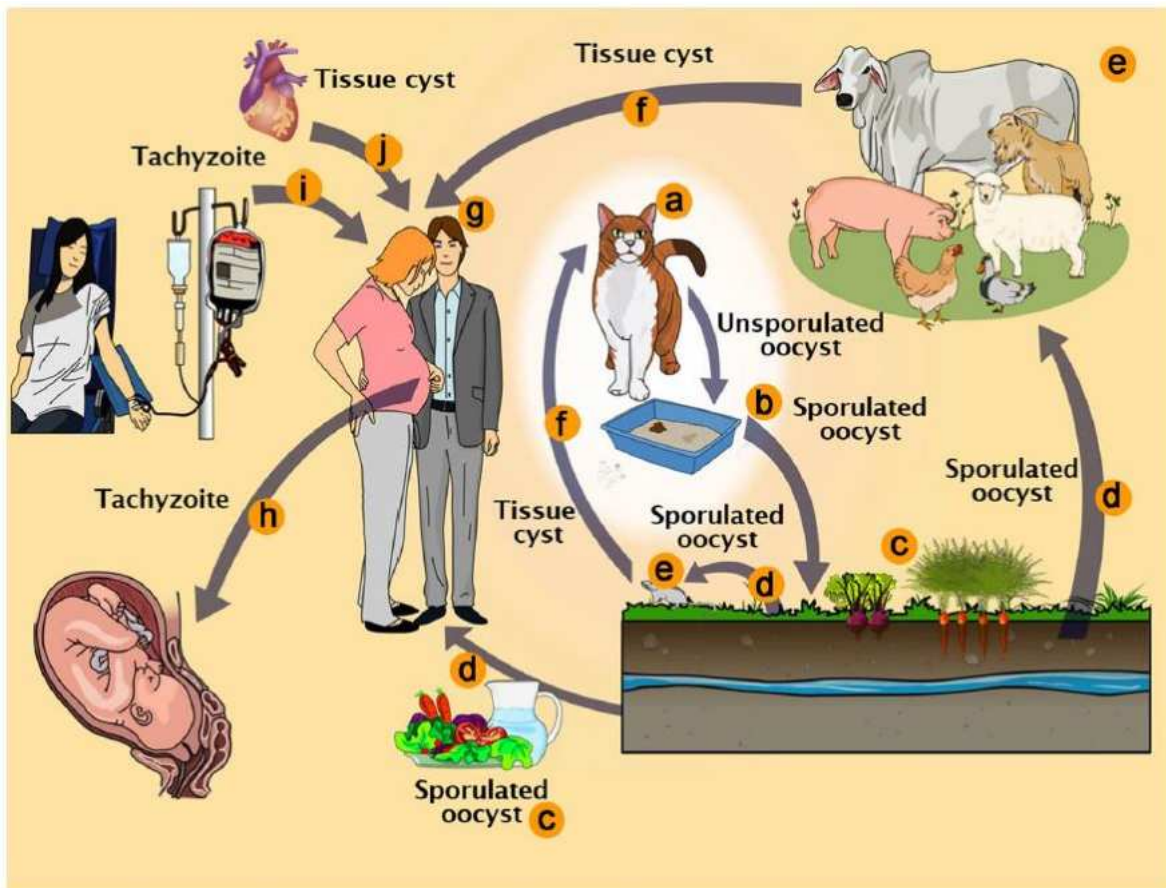


Figura 4. Vías de transmisión de *Toxoplasma gondii*. A huésped definitivo felino (gato). B Oocistos no esporulados en heces de gato. C Alimentos contaminados con oocistos esporulados. D Los huéspedes intermedios pueden ingerir los oocistos a través del agua o de vegetales crudos. E Huéspedes intermedios (por ejemplo, bovinos, ovinos, aves de corral y cerdos). F Ingestión de quistes tisulares en carne cruda. G Huéspedes intermedios (humanos). H Taquizoitos transmitidos a través de la placenta al feto. I Transmisión por transfusión de sangre y trasplante de órganos (j) Fuente: (Attias et al., 2020).

1.5 Distribución de genotipos de *T.gondii* en América

Los estudios de genotipificación de *T. gondii* iniciaron en la década de 1990 y se basaron en el análisis de isoenzimas (Darde et al., 1988), donde se seleccionaron y analizaron algunos marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés RFLP) (Howe y Sibley, 1995).

En América del Norte la estructura de la población parecía similar a la observada en Europa, con predominio de las cepas tipo II (Howe y Sibley, 1995), sin embargo, otros estudios sugieren una mayor prevalencia de cepas atípicas tanto en animales salvajes como domésticos (Dubey, Quirk, et al., 2008; Dubey, Sundar, et al., 2008), además de un haplogrupo clonal (haplogrupo 12) cercano al tipo II (Khan et al., 2011a).

Por otro lado, América del Sur presenta un alto nivel de diversidad de *T. gondii*. Los linajes clonales adicionales conocidos como haplogrupos Br I a IV, pueden ser comunes y endémicos en Brasil, está claro que los intercambios genéticos frecuentes han generado una amplia variedad de genotipos diferentes (Ajzenberg et al., 2004; Pena et al., 2008). Esta diversidad genética en este continente es máxima en el área silvestre amazónica, con muchos sitios polimorfismos únicos y una alta divergencia de secuencias de ADN que contienen genotipos únicos. Todas estas características encontradas en estas cepas han sido denominadas de “exóticas” o “atípicas” (Ajzenberg et al., 2004). En Guyana Francesa, la interpretación de ambientes de selva tropical antropizada y salvaje conduce a la hibridación entre cepas que pueden representar un riesgo potencial para la salud humana (Mercier et al., 2011).(Fig.5)

De acuerdo con lo antes mencionado estos estudios indican que se observa un patrón diferente entre las diversas regiones, por ejemplo, en América del Sur se han reportado diferentes linajes (BrI, BrII, BrIII, BrIV) que muestran una marcada diversidad y divergencia entre los grupos (Khan et al., 2011a; Pena et al., 2011), esta divergencia es menor en regiones de Europa y América del Norte. Estas diferencias sugieren que *T. gondii* se propaga en gran medida de manera clonal en

Europa y América del Norte, pero exhibe una mayor recombinación sexual en América del Sur (Sibley y Ajioka, 2008).

La diversidad de cepas no arquetípicas de *T. gondii* en América del Sur es bien reconocida, las cuales difieren significativamente de las observadas en el hemisferio norte (Saeij, Boyle, & Boothroyd, 2005; Shwab et al., 2014). Un análisis de la distribución geográfica de *T. gondii* realizado hace casi una década, reveló una estructura poblacional muy diversa para las cepas en América del Sur, con 156 genotipos distintos determinados para las 646 cepas analizadas. De estos genotipos, 106 se encontraron exclusivamente en Brasil (Shwab et al., 2014). Las cepas no arquetípicas de América del Sur se diferencian significativamente de las de América del Norte y Europa, y los haplogrupos muestran una separación geográfica distinta y un número variable de polimorfismos específicos (A Khan et al., 2007). Varios estudios sobre caracterización genética de *T. gondii* en América del Sur encontraron genotipos distintos y una diversidad genética superior a la esperada (Asis Khan et al., 2006; Lehmann, Marcet, Graham, Dahl, & Dubey, 2006).

Los estudios de caracterización genética de *T. gondii* mediante PCR-RFLP en América Central (Guatemala, Nicaragua, Costa Rica), el Caribe (Granada, y San Cristóbal y Nieves) y América del Sur (Venezuela, Colombia, Perú y Chile) mostraron una diversidad moderada, con la presencia del linaje tipo II, la alta frecuencia del tipo III (genotipo ToxoDB#2), y genotipos relacionados pertenecientes al haplogrupo 3 (Chikweto et al., 2017; Jitender P Dubey et al., 2016; Hamilton et al., 2015; Rajendran, Su, & Dubey, 2012; Su et al., 2012). Estos genotipos relacionados con el haplogrupo 3 se designaron como genotipos caribeños en el sistema de nomenclatura de microsatélite (Mercier et al., 2011).

En México, un estudio de caracterización genética de *T. gondii* realizado por tipificación de secuencias multilocus (MLST, por sus siglas en inglés) reveló la existencia de una alta diversidad genética de este protozoo. De los 33 genotipos secuenciados exitosamente con tres o más loci, 31 fueron únicos. Solo un genotipo tenía alelos tipo I en los tres loci secuenciados (SAG1, SAG2 y SAG3), y se observó

que los genotipos restantes eran tipos mixtos con combinaciones alélicas I/II/III/u-(n) (Cubas-Atienzar, Hide, Jiménez-Coello, Ortega-Pacheco, & Smith, 2018).

En Brasil, se aislaron parásitos viables en el 80% (12/15) de los bioensayos realizados para el aislamiento de *T. gondii*. Los doce aislados de *T. gondii* obtenidos en el estudio y trece aislados adicionales descritos previamente fueron genotipados mediante polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) utilizando 11 marcadores genéticos. Además, el análisis de microsatélites (MS) se realizó utilizando 15 marcadores. Diecinueve de los veinticinco aislados fueron genotipados completamente mediante PCR-RFLP, los cuales mostraron 12 perfiles diferentes, seis de los cuales fueron identificados recientemente. Un aislado tenía una infección mixta con más de una cepa. Los mismos diecinueve aislados tenían 16 genotipos diferentes según el análisis Genotipo #13 (Caribe 1), que se encuentra comúnmente en el noreste de Brasil y probablemente sea un linaje clonal que circula en esta región (Feitosa et al., 2017).

En otro estudio en el noreste de Brasil se utilizaron técnicas de secuenciación y PCR-RFLP multilocus. En total, se identificaron 11 aislamientos de *T. gondii* denominados TgPgBr06-16. La aplicación de PCR-RFLP multilocus con siete marcadores moleculares (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, C22-8, PK1 y Apico) identificó seis genotipos diferentes. Los aislados TgPgBr 06, 08, 11, 12, 14 y 15 fueron indistinguibles mediante esta técnica, formando un solo genotipo. Los aislamientos restantes se caracterizaron como genotipos distintos. Sin embargo, cuando se emplearon cinco marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB y c22-8) en la secuenciación por PCR multilocus, se demostró que los once aislados eran cepas de *T. gondii* diferentes. Todos los aislados difirieron de los genotipos clonales Tipo I, II y III utilizando ambas técnicas de genotipado (Bezerra et al., 2012).

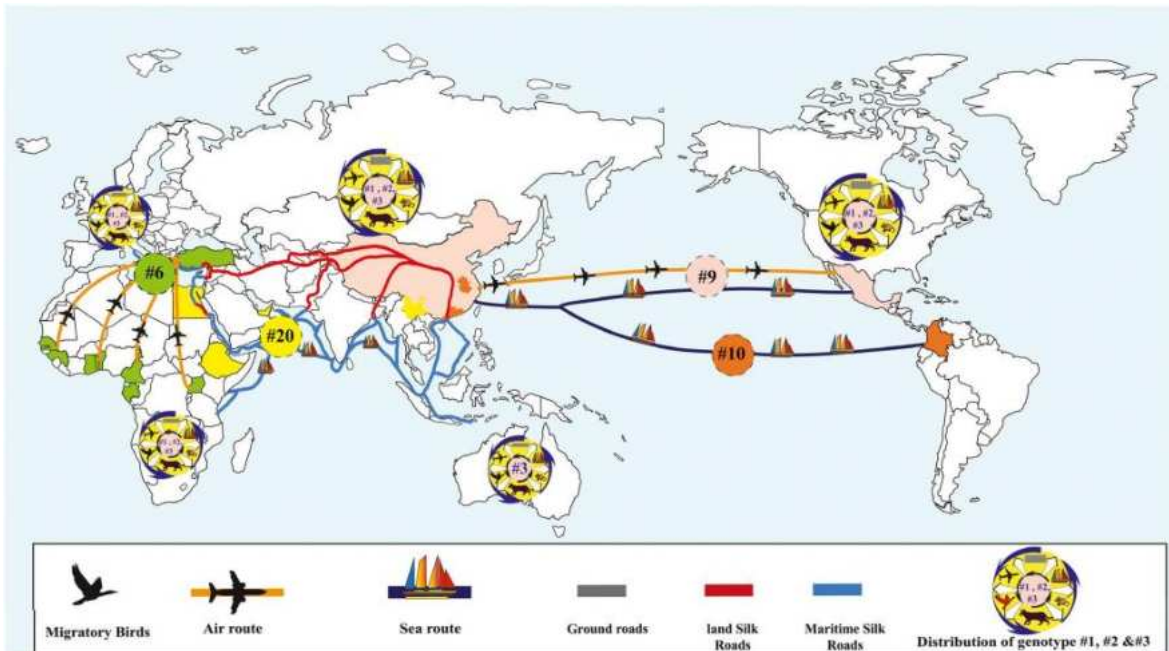


Figura 5. Circulación de los genotipos de *T. gondii* debido a la migración animal y las actividades humanas entre países y continentes. Fuente (Amouei et al., 2020).

1.6. Manifestaciones Clínicas

La infección congénita producida por toxoplasmosis puede tener consecuencias graves, incluyendo abortos espontáneos y enfermedades neonatales severas. Durante el primer mes de vida, puede manifestarse de diferentes formas, desde complicaciones leves hasta secuelas graves de una infección no diagnosticada ni tratada con anterioridad. En la etapa neonatal, las manifestaciones pueden incluir desde anasarca fetal y muerte perinatal hasta recién nacidos con bajo peso para su edad gestacional, prematuridad, cicatrices retinianas, ictericia persistente, trombocitopenia leve, pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo y un conjunto de enfermedades características como la coriorretinitis, hidrocefalia y calcificaciones cerebrales, conocida como tríada de Sabin. Aunque al inicio los recién nacidos parecen sanos, es probable que desarrollen padecimientos oculares si no reciben tratamiento adecuado. Además, pueden presentar síntomas sistémicos como: adenopatías, hepatoesplenomegalia, miocarditis, neumonitis, síndrome nefrótico, vómitos, diarrea y dificultades de alimentación (Durlach et al., 2008). (Fig.6)

En cuanto a las secuelas cutáneas, la piel puede presentar las erupciones que varían desde finas puntiformes hasta petequias, equimosis o hemorragias secundarias a trombocitopenia. También pueden observarse ictericia, cianosis y edemas debido a diversas complicaciones. Las enfermedades endocrinas, neurológicas y oftalmológicas son comunes en los casos de toxoplasmosis congénita no tratada. Estas pueden incluir desde problemas hipofisarios y endocrinos hasta complicaciones neurológicas graves como encefalopatía, hidrocefalia, parálisis de extremidades, convulsiones y microcefalia (Durlach et al.,2008).

Es importante destacar que casi todos los lactantes no tratados desarrollarán lesiones coriorretinianas antes de la edad adulta, y posiblemente la mitad de ellos sufrirán padecimientos visuales graves que pueden llevar al desprendimiento de retina. Por lo tanto, la toxoplasmosis ocular se considera una enfermedad recurrente y progresiva que requiere múltiples ciclos de tratamiento y puede provocar complicaciones como estrabismo, nistagmo, microftalmia, glaucoma y ceguera (Kliegman et al.,2009).

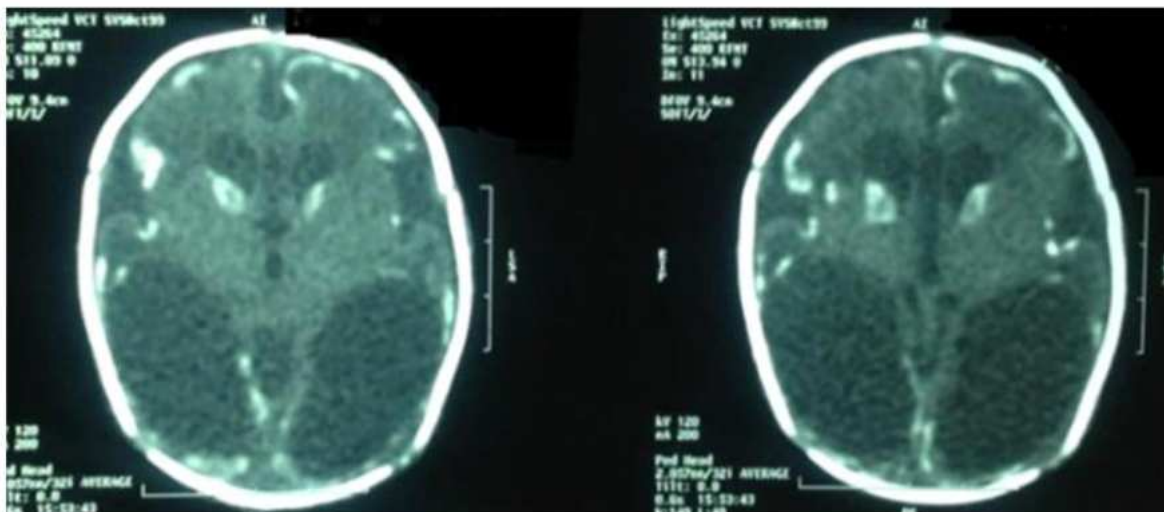


Figura 6. Tomografía axial del cerebro de un bebé a los tres días de nacido con toxoplasmosis congénita en la cual se aprecia dilatación ventricular en todo el sistema, así como calcificaciones corticales y en las regiones periventriculares. Fuente: (Mauricio & Rodríguez-Restrepo, 2014).

1.7. Diagnósticos

1.7.1. Métodos indirectos

Para diagnosticar la toxoplasmosis congénita se pueden realizar pruebas de forma directa o indirecta. Los métodos indirectos se refieren a las pruebas serológicas, para demostrar la presencia de anticuerpos IgM, IgG e IgA, utilizando generalmente la técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), que posee una alta sensibilidad y especificidad contra el parásito. Cuando una gestante es serológicamente positiva a IgM, se le realiza la prueba de avidez para anticuerpos IgG, mediante pruebas de ELISA o por quimioluminiscencia. Se ha observado que la afinidad de los anticuerpos específicos tipo IgG es más baja al inicio de la infección lo que permite diferenciar las infecciones adquiridas en forma reciente y las más avanzadas (Montoya, 2002; Remington et al., 2004) a través de las pruebas de avidez. De otra manera cuando solamente existe IgG se interpreta como infección establecida desde hace bastante tiempo (Isaza, 2007).

Este diagnóstico también puede requerir algunas pruebas complementarias de acuerdo con los órganos afectados, por ejemplo, para la encefalitis toxoplásmica se utiliza la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética nuclear. Para la toxoplasmosis ocular se utiliza la evaluación exhaustiva del fondo de ojo realizada por un especialista (Giraldo, 2008)

1.7.2. Métodos directos

Los métodos directos consisten en la demostración de formas parasitarias completas o su material genético en fluidos o tejidos corporales. Otra técnica de diagnóstico es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), donde se amplifica el ADN. La PCR ha revolucionado el diagnóstico de la toxoplasmosis, principalmente la infección intrauterina (Cassaing et al., 2006; Jalal et al., 2004; Bastien, 2002; Botterel et al., 2002; Hohlfeld et al., 1994; Parmley et al., 1992). También ha sido de utilidad para el diagnóstico de la infección congénita a partir de líquido amniótico, placenta, líquido cefalorraquídeo, sangre u orina del neonato (Boyer, 2001).

Para la detección directa del parásito en la PCR, se emplea un marcador diagnóstico conocido como el gen B1, puesto que tiene una alta especificidad en *T. gondii* y se repite 35 veces en su genoma (Burg et al., 1989). *Toxoplasma gondii* es posible amplificarlo a través de muestras clínicas como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, placenta, líquidos oculares y biopsia de tejido de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos (Dupon et al., 1995; Aouizerate et al., 1993; Garweg et al., 2000).

1.8. Epidemiología

La toxoplasmosis es una de las infecciones más comunes con amplia distribución a nivel mundial. La prevalencia de la infección por *T. gondii* en humanos es variante y alcanza hasta el 90 % en algunas zonas del mundo (Flegr, Prandota, Sovičková, & Israili, 2014). Se ha estudiado en prácticamente todas las especies de mamíferos y en muchas especies de aves (J P Dubey et al., 2005). En humanos, se ha reportado que un treinta por ciento de la población mundial está infectada con toxoplasmosis latente. Sin embargo, la incidencia de la toxoplasmosis es diferente en los países subdesarrollados donde presenta una incidencia mayor. Por ejemplo, existen áreas de alta prevalencia como América Latina, partes de Europa central y oriental, Oriente Medio y partes del sudeste asiático y África (Pappas, Roussos, & Falagas, 2009). Esta variación en la prevalencia puede explicarse por varios factores, incluido el número y la presencia de gatos, el clima y las prácticas culturales. Adicionalmente, la prevalencia es mayor en los países con temperaturas cálidas y húmedas, ya que los ooquistes pierden su virulencia cuando se secan o congelan. En las Américas representan casi el 74 % de los brotes notificados en las últimas décadas (Pinto-Ferreira et al., 2019).

La seroprevalencia de *T. gondii* en gatos de Estados Unidos es del 30 a 40% y la prevalencia regional varía según el clima; y es baja en las regiones más secas del suroeste (16,1 % en Nuevo México, Utah y Arizona) y alta en las zonas húmedas (59,2 % en Hawái) (Elmore et al., 2010). Además, se ha reportado que no es necesario el contacto directo con gatos para que ocurra la infección, ya que esta se

presenta debido al tiempo de los ooquistes en el medio ambiente (Dabritz & Conrad, 2010). (Fig.7)

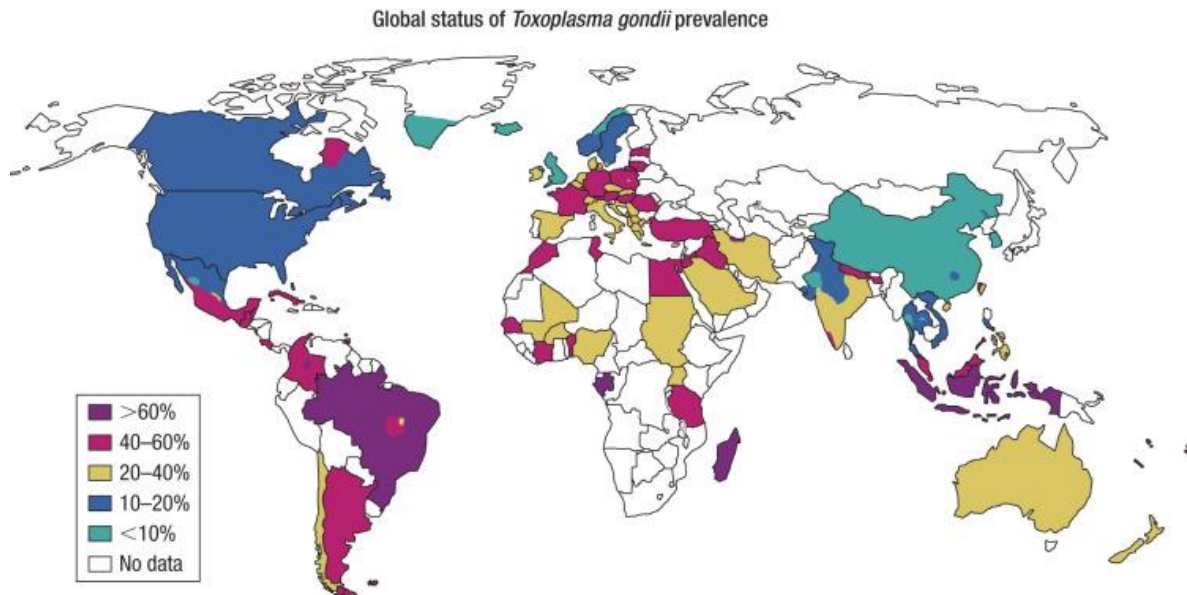


Figura 7. Estado global de la toxoplasmosis. La presencia de *Toxoplasma* está asociada con la contaminación en el suelo y las fuentes de agua, haciendo más fácil el contacto directo con diferentes hospedadores intermediarios. Fuente: (Pappas et al., 2009).

1.9. Tratamientos Actuales

A la toxoplasmosis se le conoce como la mayor causa de morbilidad neurológica y mortalidad en pacientes con SIDA, además puede provocar trastornos neurológicos y psicomotores en niños infectados congénitamente, haciéndose necesario un diagnóstico riguroso de la infección en el laboratorio, antes de prescribir cualquier tratamiento (Botero et al., 1992).

El tratamiento para la toxoplasmosis congénita inicia cuando se confirma el diagnóstico de infección congénita y tiene como objetivo reducir o prevenir las manifestaciones clínicas al nacer y evitar las consecuencias, principalmente oculares. El Chicago Collaborative Treatment Trial (CCTT) mostró un estudio con resultados alentadores con el esquema pirimetamina y sulfadiazina durante un año, con reducciones significativas en las consecuencias a largo plazo (microcefalia,

hidrocefalia, enfermedades de la retina y calcificaciones cerebrales). También, los niños con patologías graves al nacer; el 80% tuvo una función motora normal, el 64% no desarrolló nuevas lesiones oculares y ninguno desarrolló pérdida auditiva neurosensorial (McLeod et al.,2006). El tratamiento temprano es importante en recién nacidos asintomáticos y clínicos, porque reduce la aparición de manifestaciones clínicas. En el año 2017, el Comité de Enfermedades Infecciosas de la American Academy of Pediatrics, publicó recomendaciones para el tratamiento de la toxoplasmosis congénita, en base a un esquema de inducción y continuación con pirimetamina. A pesar de que no existe consenso sobre la duración óptima del tratamiento, se recomienda un esquema intensivo (diario) de por al menos dos meses en asintomáticos y seis meses en sintomáticos, para posteriormente continuar con un esquema de tres semanas hasta completar un total de doce meses, asociando sulfadiazina y ácido folínico durante todo el tratamiento. Además, se sugiere asociar prednisona si existe evidencia de encefalitis o coriorretinitis grave (Maldonado et al.,2017).

La inmunidad adquirida permite controlar la infección y la quimioterapia suministrada actúa suprimiendo la proliferación de *T. gondii*, atacando a los taquizoitos. Sin embargo, no cura la infección porque no erradica los bradizoítos. Generalmente los pacientes que presentan títulos de anticuerpos no son tratados a menos que presenten sintomatología. El tratamiento clásico se hace con pirimetamina y sulfadiazina (Isaza, 2007). La espiamicina es menos tóxica, aunque menos activa que la pirimetamina, esta puede emplearse junto con la sulfadiazina, siendo por tanto el fármaco de elección para el tratamiento de la toxoplasmosis en el embarazo durante el primer trimestre (Valdés et al., 1996; Kapperud et al., 1996). Otros medicamentos sugeridos puede ser clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, atovaquone, azitromicina y claritromicina (Montoya et al., 2005).

1.10 Toxoplasmosis Congénita en Panamá

El inicio de la Toxoplasmosis congénita en Panamá fue marcado en 1945 en el momento que un bebé prematuro ingresó al Hospital Gorgas. El reporte mostró que el neonato al parecer murió a las nueve horas después de su ingreso al hospital.

Después de haberle realizado la autopsia, se encontró el parásito en el cerebro, médula espinal, ojos, nervio craneal, nervio femoral, riñón, nervios de la vejiga urinaria, músculo esquelético de la lengua, mejillas, pecho, piernas y la espalda. Se buscaron las posibles formas de infección en la madre, pero esta fue en vano, sin embargo, se comenzó a darle especial importancia a los animales en el ciclo de transmisión del parásito, debido al entorno en donde vivían (Kean, 1948).

En 1967 se reportó el caso de una niña ingresada al Hospital Santo Tomás con un diagnóstico interpretado como "alcalosis por vómitos", acompañado de convulsiones. El desarrollo de este cuadro fue evaluado durante 19 años porque la paciente, debido a la manifestación de diversos problemas neurológicos que incluían retardo mental, convulsiones, calcificaciones cerebrales y lesiones oculares de coriorretinitis. Al final del estudio, los especialistas concluyeron que se trataba de un caso de toxoplasmosis congénita (Sociedad Panameña de Pediatría de 1967).

En 1978 Bennett y colaboradores, crearon un método de detección temprana del parásito en mujeres embarazadas y neonatos, mediante el estudio serológico-clínico, dentro del Complejo Hospitalario Metropolitano, Caja de Seguro Social de Panamá. Este estudio trató de escoger al azar 176 madres y 46 neonatos, a las cuales se le tomaron muestras sanguíneas a partir del cordón umbilical. Las pacientes grávidas se les aplicó la prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* (IHATOXO). En los resultados se observó una alta prevalencia de toxoplasmosis con un 39.20% de madres positivas y 34.78% de positividad en neonatos. Esto demostró que una gran población de mujeres en etapa reproductiva ha estado expuesta al parásito.

Un estudio realizado en 878 mujeres embarazadas determinó la seroprevalencia de toxoplasmosis en el primer trimestre de embarazo y su incidencia reveló que 55.5% de mujeres fueron positivas, y un 44.5% negativas a este parásito. Estas últimas carecían de anticuerpos anti-*T. gondii* y por consiguiente eran susceptibles a contraer la infección. Posteriormente, se realizaron recomendaciones a las autoridades de salud de realizar campañas de prevención para promover el lavado

frecuente de manos y evitar el consumo de carnes mal cocidas (Sáenz et al., 1984). También, se destacó la importancia de la prevención, mediante la implementación de medidas sanitarias tanto para las mujeres embarazadas seropositivas como embarazadas seronegativas (Sáenz, 1985).

Una investigación realizada por el Dr. Sousa y colaboradores en 1988 comparó la prevalencia de infección de toxoplasmosis durante 10 años tanto en poblaciones urbanas (Ciudad de Panamá) como rurales (Altos del Jobo, Chorrera). Como resultados las dos poblaciones presentaron tasas similares de incidencia, siendo un 8.6% por año, aumentando un 25% en niños de 5 años, 50 % a los 10 años y hasta un 90% a la edad de 60 años.

En Panamá se llevó a cabo otro estudio de cohorte prospectivo en la región metropolitana de la Ciudad de Panamá, en niños, gatos, roedores, pájaros y muestras de suelo. En los niños se observó un 12.6% de positividad, 45% en gatos, 1.1% en suelos y 13.4% en aves muestreadas. Estas variables arrojaron una correlación positiva significativa entre la seroconversión de niños y el contacto con caninos (90%). Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que los perros al comer y convivir en áreas infestadas con heces de gatos actuaran como vectores por proxy en la transmisión de *Toxoplasma gondii*: por otro lado, el mismo estudio no estableció que la ingestión de carne de res o huevos crudos fuese un factor de riesgo significativo para esta población (Frenkel et al., 1995).

En el año 2003, la C.S.S. realizó un estudio de tipo descriptivo, comparativo y retrospectivo en recién nacidos prematuros con el objetivo de conocer la incidencia y factores de riesgo posiblemente asociados a la infección por toxoplasmosis. A estos pacientes se les aplicó una ficha de recolección, seguido de la toma de muestras de sueros que fueron analizadas en el laboratorio. Los resultados mostraron que la incidencia de *T. gondii* fue menor en recién nacidos y mayores en niños. Finalmente, el análisis estadístico de los resultados demostró que la prematuridad es un factor de protección para no adquirir esta infección, por ello se

recomendó que todos los niños antes de 6 años, se les debe incluir la prueba de Toxo test para un diagnóstico temprano y así prevenir secuelas (Rojas, 2003).

A través de un estudio enfocado en determinar la prevalencia del parásito en niños de dos poblaciones amerindias del Este de Panamá (Bayano y San Blas), fue posible reafirmar el rol de los perros y gatos en la transmisión de la toxoplasmosis propuesto anteriormente por Frenkel y colaboradores (1995). El objetivo principal de este estudio fue determinar la relación entre la presencia de anticuerpos y diversos factores de riesgo para la infección por *Toxoplasma gondii*. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre la presencia de anticuerpos y el sexo de las personas analizadas. Sin embargo, los perros pueden ser clasificados como vectores mecánicos por sus hábitos de revolcarse en sustancias fétidas, abriendo paso a posibles nuevas estrategias para la disminución de la toxoplasmosis en estas poblaciones panameñas (Etheredge et al., 2004).

En cuanto a la prevalencia del parásito en otros hospederos domésticos, en Panamá se realizó un estudio en porcinos de 6 provincias el cual demostró una prevalencia de infección de 59.5% para la provincia de Panamá, la de mayor positividad, seguida de la provincia de Chiriquí con un 33.5%, Los Santos con 33.3%, Coclé con 20% y Herrera y Veraguas con un 18.2%. (Correa et al., 2008). Esta investigación destacó el riesgo de transmisión que existe por el consumo de carne, prestando especial atención en la repercusión que pueden tener estos productos porcinos procesados de diferentes granjas de distintas provincias y que a la vez son distribuidos en el país (Correa et al., 2008).

En el 2016 Li y colaboradores, realizaron un estudio el cual se enfocó en la utilización de folletos educativos para dar información vital a las gestantes. El mismo consistió en crear panfletos y un cuestionario para evaluar el conocimiento de la toxoplasmosis en mujeres gestantes del Hospital Santo Tomás. Los resultados arrojaron que el 76% de las participantes no tenían el conocimiento, después de la exposición de la información, se observó un aumento en la comprensión sobre la toxoplasmosis por ello se concluyó que al proporcionar buena información a

pacientes gestantes se pueden crear pruebas rápidas para detectar infecciones activas en mujeres embarazadas en Panamá.

Por otro lado, un estudio en gatos y perros domésticos de diferentes regiones metropolitanas de Panamá mostró la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii*, con un 25% en gatos y 32.23% en perros mediante la prueba de ELISA. El análisis estadístico determinó que existen variables importantes, como la edad de los animales, con una relación positiva directa con la seroprevalencia; por lo que analizó que los animales de compañía pueden ser un factor de riesgo para la transmisión de *T. gondii* en los seres humanos, aunque los factores socioeconómicos y ambientales tienen también un rol importante como factor de riesgo en la transmisión de la toxoplasmosis (Rengifo-Herrera et al., 2017).

Recientemente se realizó un estudio en el Hospital Santo Tomás el cual tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la transmisión de *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas provenientes del área metropolitana de la ciudad de Panamá y Panamá Oeste. En este estudio se demostró altos porcentajes de seroprevalencia en las regiones estudiadas, principalmente en San Miguelito (52%) y Este (50%). También, los factores de riesgo asociados a la infección no presentaron diferencias significativas, pero son fundamentales durante el embarazo, debido a que tanto los hábitos de higiene, alimentación y la interacción con animales domésticos, presentaron porcentajes altos de positividad (Flores et al., 2021).

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

2. Metodología

2.1 La declaración de ética

Los protocolos y metodologías utilizados en este estudio para la recolección de muestras, fueron revisadas y aprobadas por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Santo Tomás (Ciudad de Panamá, Panamá), con número de aprobación de protocolo 2016-347V3.

2.2 Colecta de Muestra y Área de Estudio

Las muestras utilizadas en este estudio fueron colectadas en el año 2018 a partir de líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico o tejido placentario en un estudio previo realizado en la sala de maternidad del Hospital Santo Tomás. Estas muestras fueron colectadas con el consentimiento de las embarazadas, las cuales estuvieron de acuerdo en participar del estudio. Las embarazadas provenían de cinco regiones del Área Metropolitana de Panamá, las cuales fueron: Panamá Centro, Área Norte, Panamá Este, San Miguelito y Panamá Oeste. En total se recolectaron muestras de 2,326 mujeres, de las cuales nueve fueron confirmadas mediante pruebas serológicas y moleculares con infección por toxoplasmosis congénita. Estas nueve muestras de tejido placentario, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo fueron analizadas en este estudio a través de técnicas de clonación y secuenciación. (Fig.8)

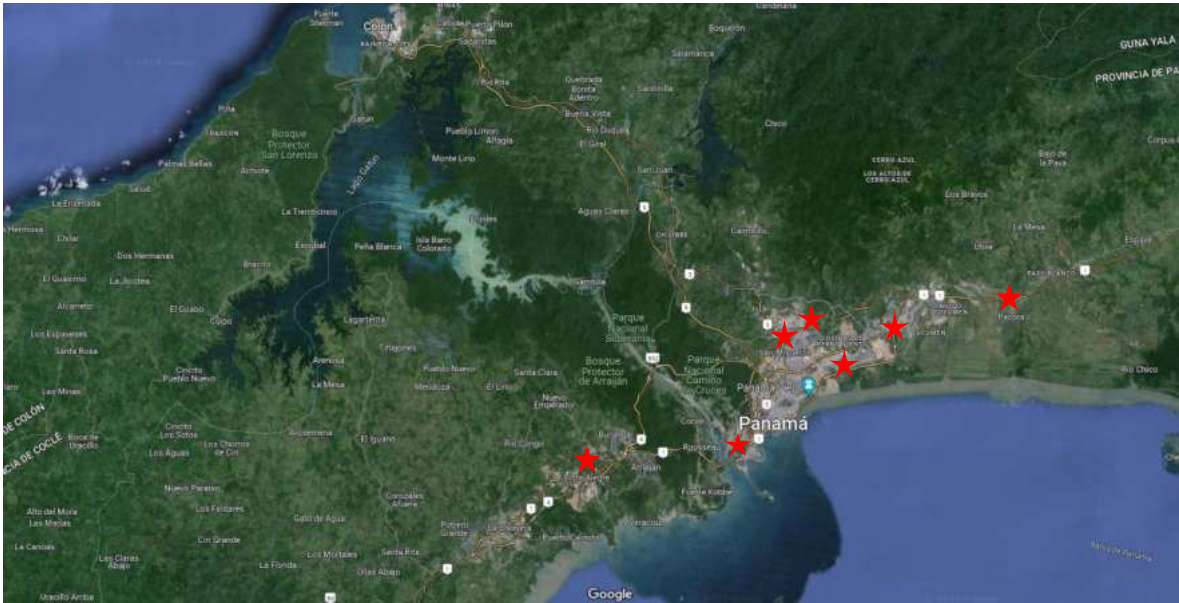


Figura 8. Colecta de Muestra y Área de Estudio. Las muestras procedían de diferentes regiones del Área Metropolitana de Panamá: Panamá Centro, Panamá Norte, Panamá Este, San Miguelito y Panamá Oeste. Las siete estrellas rojas representan los distintos lugares de procedencia de las nueve muestras estudiadas Fuente: Google Maps, INEG Terrametrics, NASA.

2.3 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN en las muestras de líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico o tejido placentario se utilizó un Kit comercial de QIAGEN denominado DNeasy Blood & Tissue Kit. Este kit consta de una columna en formato de spin con una membrana de sílice la cual evita los contaminantes de la sangre y fluidos corporales, también permite que una vez extraída la muestra esta sea de alta calidad.

Para la extracción del ADN de los tejidos placentarios se les cortó una masa aproximada de 5 a 10 mg, se agregó 20 μ l de Proteinasa K (50 ng/ μ L) para luego ser incubado a 56°C por 1 hora. Luego de la incubación, se agregó 200 μ l del Buffer AL (solución de lisis) y se incubó por 10 minutos a 56 °C. Pasado el tiempo, se agregó 200 μ l de etanol (96-100%), se homogenizó la mezcla contenida en los tubos con un agitador vortex y se transfirió el sobrenadante a las columnas. Posteriormente se centrifugó a 6000 rcf, por 1 minuto, se extrajo el sobrenadante y este se colocó en nuevas columnas, donde se le agregó 500 μ l del Buffer AW1

(solución de lavado) y se centrifugó por 1 minuto a 6000 rcf. Luego, se descartó el sobrenadante, y se le realizó un segundo lavado con el Buffer AW2 y se centrifugó a 6000 rcf durante 3 minutos. Después se transfirió la columna con la membrana en tubos de 1.5 mL y se le agregó 75 μ l de la solución de elución, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 6000 rcf durante 1 minuto. La columna se descartó y se almacenó el tubo de 1.5 mL a -20°C , con el ADN extraído para su posterior procesamiento.

Para el líquido amniótico se utilizó aproximadamente 1.5 mL y para el líquido cefalorraquídeo entre 500 μ l o 1ml. Estas muestras, fueron colocadas en tubos de 2.0 mL, luego se les agregó 200 μ l del Buffer AL (solución de lisis) y se incubó por 10 minutos a 56°C , una vez concluido el tiempo, se agregó 200 μ l de etanol (96-100%), las mezclas se homogenizaron llevando los tubos al agitador vortex por un minuto y se transfirió el sobrenadante a las columnas, posteriormente las columnas fueron centrifugadas a 6000 rcf, por 1 minuto. El sobrenadante fue retirado y se colocó en una nueva columna, donde se le agregó 500 μ l del Buffer AW1 (solución de lavado), nuevamente se centrifugó por 1 minuto a 6000 rcf y se descartó el sobrenadante. Un segundo lavado fue realizado con el Buffer AW2; el cual se centrifugó a 6000 rcf durante 3 minutos. Después se transfirió la columna con la membrana en tubos de 1.5 mL y se le agregó 75 μ l de la solución de elución, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 6000 rcf durante 1 minuto. La columna se descartó y se almacenó el ADN extraído en un tubo de 1.5 mL a -20°C para su posterior procesamiento.

2.4 Cuantificación de muestras de ADN en el NanoDrop.

Luego de realizar la extracción, las muestras de ADN fueron cuantificadas en un Nanodrop 2000 de la marca Thermo Scientific. Este equipo mide las concentraciones de ácidos nucleicos en nanogramos por microlitros ($\text{ng}/\mu\text{L}$), a su vez que determina si hay contaminación en la muestra. Las mediciones se realizaron, siguiendo una serie de pasos según el manual del equipo y con la

aplicación del "NanoDrop 2000". En la misma se seleccionó el botón de ensayo de ácidos nucleicos, seguido se levantó el brazo del equipo y se colocó como blanco un microlitro de la solución de hidratación que viene con el kit comercial y utilizado para hidratar las muestras de ADN una vez extraídas. Luego de haber realizado la medición del blanco, se procedió a colocar un microlitro de cada muestra de ADN, con la ayuda de una micropipeta de 10µL. La muestra de ADN fue colocada sobre la placa del pedestal inferior del equipo, y se procedió con la medida espectral de las muestras.

Tabla 1. Mediciones de concentración realizadas en el "NanoDrop 2000" a muestras de embarazadas con *T. gondii*.

Nombre de Muestra	Tipo de Muestra	Procedencia	Concentración (Ng/ µl)
1		24 de diciembre	3.9
2		Belisario Porras	2.7
3	LCR	Vista Alegre	5.2
4		Pacora	20.7
5		24 de diciembre	4.7
6		Ancón	15.3
7	Placenta	Belisario Frias	161.8
8		José Domingo Espinar	318
9	L. Amniótico	Juan Díaz	309

2.5 Detección de *Toxoplasma gondii* en muestras de tejido placentario, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo, por medio de la técnica de PCR utilizando el marcador B1

Una vez realizada las extracciones de ADN en diferentes muestras de tejidos y fluidos corporales, se procedió a la amplificación mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Para la amplificación de las muestras se utilizó primeramente como marcador molecular el Gen B1, ya que tiene una alta

sensibilidad y especificidad como prueba de diagnóstico. Cabe destacar que este gen se repite 35 veces en el genoma de *T. gondii*, por lo que es utilizado para detectar el parásito en materiales clínicos como sangre y tejidos.

El proceso de amplificación fue realizado en 2 etapas. La primera ronda fue la amplificación (PCR externo) de un producto de 289 pares de bases (pb) con los cebadores: forward JW62 (5'- TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC-3') y reverse JW63 (5'- GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG-3'), a una concentración de 10 μ M (micromolar). Se agregó 1.0 μ L de cada cebador en una mezcla de 12.5 μ L de MasterMix (1X Promega), con 5 μ L de ADN extraído. El volumen final de reacción para 25 μ L se ajustó con 6.5 μ L de agua libre de nucleasas. Para el proceso de amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) con 95°C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente 72°C por 5 minutos. Posteriormente se realizó la segunda ronda, la cual fue la reamplificación (PCR anidado) de un producto menor de 115pb, esta reamplificación se realizó utilizando los cebadores: forward B22 (5'AACGGGCGAGTAGCACCTGAGGAGA-3') y reverse B23 (5'TGGGTCTACGTCGATGGCATGACAACT-3), a una concentración de 10 μ M (micromolar). Se colocó 0.5 μ L de cada cebador en una mezcla de 12.5 μ L de MasterMix (1X Promega), luego se agregó 0.5 μ L del producto de ADN obtenido en la primera ronda de PCR, el volumen final de 25 μ L fue ajustado con 11 μ L de agua libre de nucleasas. Para el proceso de reamplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 2 minutos, seguidos por 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente 72°C por 5 minutos. En las dos rondas de reacciones se utilizaron controles positivos con cepas de referencia (RH y PDS), al igual que controles negativos sin ningún tipo de ADN, solo agua, este último control fue utilizado con la finalidad de detectar contaminaciones en las amplificaciones de ADN.

Tabla 2. Reacciones utilizadas para la detección de *T. gondii* en muestras de embarazadas con el marcador molecular B1.

Reacción de 25 μ L		Condiciones del termociclador	
		Prep.	95°C X 2 min
Master Mix	12.5 μ L	Desnaturalización	95°C X 30 s
Primer JW62	0.5 μ L	Desnaturalización	95°C X 30 s
Primer JW63	0.5 μ L	Anidación	62°C X 30 s
H2O	11 μ L	Extensión	72°C X 30 s
Producto de PCR externo	0.5 μ L	Extensión Final	70°C X 5 min
			25 ciclos

PCR ANIDADADO			
Reacción de 25 μ L		Condiciones del termociclador	
Master Mix	12.5 μ L	Prep. Desnaturalización	95°C X 2 min
Primer JW62	0.5 μ L	Desnaturalización	95°C X 30 s
Primer JW63	0.5 μ L	Anidación	62°C X 30 s
H2O	11 μ L	Extensión	72°C X 30 s
Producto de PCR externo	0.5 μ L	Extensión Final	70°C X 5 min
			25 ciclos

2.6 Caracterización Genética de *Toxoplasma gondii* en pacientes con Toxoplasmosis Congénita utilizando los marcadores Alt. SAG2, GRA6 y Apico.

Las muestras de placenta, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico con diagnóstico positivo para toxoplasmosis congénita fueron verificadas nuevamente a través del marcador B1. Una vez comprobado la detección del parásito en las muestras, se procedió con la caracterización genética utilizando los marcadores moleculares Alt.SAG2, GRA6, y Apico.

2.6.1 Marcador Alt. SAG 2: El proceso de amplificación fue realizado en 2 etapas. La primera ronda fue la amplificación (PCR externo) de un producto de 700 pares de bases (pb) con los cebadores: forward Alt SAG2 EXT F (5' GGAACGCGAACAATGAGTTT 3'), y reverse Alt SAG2 EXT R(5' GCACTGTTGTCCAGGGTTTT 3'), a una concentración de 25 μ M (micromolar). Se agregó 0.5 μ L de cada cebador en una mezcla de 12.5 μ L de MasterMix (1X

Promega), con 1.5 μL de ADN extraído. El volumen final de reacción para 25 μL se ajustó con 10 μL de agua libre de nucleasas. Para el proceso de amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 4 minutos, seguidos por 29 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y finalmente 72°C por 1 minuto. Posteriormente se realizó la segunda ronda, la cual fue la reamplificación (PCR anidado) de un producto menor de 546pb. Esta reamplificación se realizó utilizando los cebadores: forward Alt SAG2 INT F (5' ACCCATCTGCGAAGAAAACG 3') y reverse Alt SAG2 INT R(5' ATTTGACCGAGCGGGAGCAC 3'), a una concentración de 50 μM (micromolar) en una mezcla de 12.5 μL de MasterMix (Promega 1X) luego se agregó 0.5 μL del producto de ADN obtenido en la primera ronda de PCR, el volumen final de 25 μL fue ajustado con 11 μL de agua libre de nucleasas. Para el proceso de reamplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 4 minutos, seguidos por 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 40 segundos y finalmente 72°C por 1 minuto., 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente 72°C por 5 minutos. En las dos rondas de reacciones se utilizaron controles positivos con cepas de referencia (RH y PDS), al igual que controles negativos sin ningún tipo de ADN, solo agua, este último control fue utilizado con la finalidad de detectar contaminaciones en las amplificaciones de ADN.

2.6.2 Marcador GRA6:

El proceso de amplificación fue realizado en 2 etapas. La primera ronda fue la amplificación (PCR externo) de un producto de 520 pares de bases (pb) con los cebadores: forward GRA6 EXT F (5' ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT 3'), y reverse GRA6 EXT R (5' GCACCTTCGCTTGTGGTT 3'), a una concentración de 25 μM (micromolar). Se agregó 0.5 μL de cada cebador en una mezcla de 12.5 μL de MasterMix (1X Promega), con 1.5 μL de ADN extraído. El volumen final de reacción para 25 μL se ajustó con 10 μL de agua libre de nucleasas. Para el proceso de amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 4 minutos, seguidos por 29 ciclos de 94°C

por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y finalmente 72°C por 1 minuto. Posteriormente se realizó la segunda ronda, la cual fue la reamplificación (PCR anidado) de un producto menor de 344 pb. Esta reamplificación se realizó utilizando los cebadores: forward GRA6 INT F (5´ TTTCCGAGCAGGTGACCT 3´) y reverse GRA6 INT R(5´ TCGCCGAAGAGTTGACATAG 3´), a una concentración de 50 µM (micromolar) en una mezcla de 12.5 µL de MasterMix (Promega 1X) luego se agregó 0.5 µL del producto de ADN obtenido en la primera ronda de PCR, el volumen final de 25 µL fue ajustado con 11 µL de agua libre de nucleasas. Para el proceso de reamplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 4 minutos, seguidos por 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 40 segundos y finalmente 72°C por 1 minuto., 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente 72°C por 5 minutos. En las dos rondas de reacciones se utilizaron controles positivos con cepas de referencia (RH y PDS), al igual que controles negativos sin ningún tipo de ADN, solo agua, este último control fue utilizado con la finalidad de detectar contaminaciones en las amplificaciones de ADN.

2.6.3 Marcador Apico: La amplificación con este marcador fue realizado en 2 etapas. La primera ronda fue la amplificación (PCR externo) de un producto de 700 pb con los cebadores: forward Apico EXT F (5´ TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG 3´) y reverse Apico EXT R(5´ AACCGGAATTAATGAGATTTGAA 3´), a una concentración de 25 µM (micromolar), se agregó 0.5 µL de cada cebador en una mezcla de 12.5 µL de MasterMix (1X Promega), luego se colocaron 1.5 µL del ADN extraído y 10 µL de agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de reacción de 25 µL. Para llevar a cabo la amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 4 minutos, seguidos por 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y finalmente 72°C por 1 minuto. La segunda ronda fue la reamplificación (PCR anidado) de un producto menor de 640 pb con los cebadores: forward Apico INT F (5´ GCAAATTCTTGAATTCTCAGTT 3´) y reverse Apico INT R (5´ GGGATTCGAACCCTTGATA 3´), a una concentración de 50 µM (micromolar).

Se agregó 0.5 µL de cada cebador en una mezcla de 12.5 µL de MasterMix (1X Promega), con 0.5 µL del producto de ADN diluido 1:1000, obtenido en la primera ronda de PCR externo. También se agregaron 11.5 µL de agua libre de nucleasas con un volumen de reacción final de 25 µL. Para la amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 4 minutos, seguidos por 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y finalmente 72°C por 1 minuto.

Tabla 3. Primers utilizados para la caracterización genética de *Toxoplasma gondii* con los marcadores Alt. SAG2, GRA6, Apico

Marcador molecular	Cebadores externos	Cebadores internos
Alt.SAG2	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG
	R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	R: ATTTGACCGAGCGGGAGCAC
GRA6	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT
	R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG
Apico	F: TGGTTTTAACCTAGATTGTGG	F: GCAAATTCTTGAATTCTCAGTT
	R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	R: GGGATTCTGAACCCTTGATA

2.7 Preparación del gel de agarosa y Electroforesis.

En un erlenmeyer, se agregó 80 mL de buffer TBE 1X, luego se pesó 1.20 gramos de agarosa en polvo, para obtener un gel a una concentración de 1.5%. Luego de agregar la agarosa junto con el buffer se realizó pequeños movimientos circulares, para homogenizar la mezcla. Posteriormente se llevó la mezcla al microondas por 30 segundos, se homogenizó y se colocó una vez más en el microondas por 15

segundos hasta que la mezcla se observara transparente, lo que indicó que la agarosa estaba completamente disuelta en el buffer. Cuando la temperatura de la solución previamente preparada bajó, se añadió 2 μL del Bromuro de Etidio con una micropipeta y se mezcló. Luego este líquido se vertió en el molde de la cámara de electroforesis, se colocaron los peines, se balanceó el molde con la bandeja y se esperó un mínimo de 30 minutos hasta que solidificara.

Una vez el gel estuvo listo, se vertió el buffer TBE 1X en la cámara de electroforesis. El gel se cargó con un volumen de 5 μL del producto de la segunda reacción de PCR (ADN amplificado), posteriormente se añadió 0.3 μL de Loading Dye (Promega). También se colocaron los controles positivo y negativo y se empleó 1.5 μL de un marcador de peso molecular de 100 pares de bases en los pocillos del gel. Las muestras fueron corridas a 105 Voltios por 40 minutos.

2.8 REPLI-g

El kit comercial REPLI-g fue utilizado para aumentar las concentraciones de ADN total obtenidas en las extracciones de ADN de muestras de Líquido Cefalorraquídeo (LC) y Líquido Amniótico (LA), esto debido a su alta capacidad de proporcionar altos rendimientos de ADN. Este kit está conformado por la polimerasa Phi 29, la cual permite obtener mayores concentraciones de ADN en muestras de bajas concentraciones.

Los contenidos de los buffers N1 Y D1 fueron preparados utilizando 7 μL del buffer reconstituyente, 25 μL de agua y 9 μL de una solución de parada o Stop, para obtener un volumen final de 41 μL para cada uno de los buffers. En tubos de PCR se agregó 2.5 μL de cada una de las muestras de ADN de LC y LA, las cuales se llevaron a la microcentrífuga por 2 minutos, posteriormente se les añadió a los tubos los 41 μL de cada uno de los buffers previamente preparados (N1y D1), luego se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos, y se llevaron al vortex por 10 segundos. Posteriormente se añadieron 10 μL más del ADN desnaturalizado y todos los tubos fueron colocados sobre una plancha caliente por 7 horas a 65 °C. Finalmente los tubos fueron removidos de la plancha lo cual produjo la inactivación

de la polimerasa. Para las pruebas de PCR se realizaron diluciones 1:1000 y se procedió a realizar los PCR con 2 μ L del producto diluido.

2.9 Protocolo de Células Competentes

Dentro de la cámara de flujo laminar se sembraron las células DH5 α *Echerichia coli* en un plato con medio LB con ampicilina (7,5 g/L Bacto agar, 5,0 g/L de Triptona, 2,5 g/L de extracto de lavadura, 5,0 g/L de NaCl y 50 mg/L de ampicilina) y se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente se tomó una colonia de células aisladas y se inocularon en un tubo de 15 mL preparado con 1 ml de LB líquido (2,5 g/L triptona, 1,5 g/L extracto de levadura y 2,5 g/l de NaCl). Este cultivo se llevó al agitador orbital con 250 rpm a 37°C entre 16-20 horas.

Se inocularon 5 mL del cultivo celular en 300 mL de medio SOB (6,0 g de Triptona, 1,5 g de extracto de lavadura, 0,15 g NaCl, 1,5 ml 2M MgCl₂ y 0,75 ml de KCl), y se colocaron en el agitador orbital a 200 rpm a 26°C, luego de esto se realizaron mediciones cada 30 minutos haciendo lecturas con el espectrofotómetro UV-Visible, hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 0,6. Una vez obtenido el crecimiento óptimo de las células, se realizó un baño frío durante 10 minutos para detener el crecimiento. A partir de este paso todo se realizó en hielo, los 300 mL fueron divididos en 6 tubos de 50 mL, los cuales se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet de las células de los 6 tubos fueron resuspendidos en 80 mL del buffer de transformación INOUE (Buffer de transformación), luego los 80 mL se repartieron en 4 tubos de 15 mL y 2 tubos de 10 mL, que fueron nuevamente centrifugados a 2500 rpm (durante 10 minutos a 4°C) y se descartó el sobrenadante de cada tubo. Los pellets fueron nuevamente resuspendidos en 2 tubos con 40 mL de medio INOUE cada uno, luego se centrifugó a 2500 rpm (durante 10 minutos a 4°C) y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 20 mL de buffer de transformación INOUE y se repartieron en dos tubos con 10 mL de medio INOUE, luego se agregó 0,75 mL de DMSO estéril frío a cada tubo, el cual funcionó como crio preservante. Los tubos se incubaron en hielo durante 10 minutos y se hicieron alícuotas de 300 μ L en tubos ependorf de 1.5

mL, posteriormente se les agregó rápidamente el nitrógeno líquido, y los tubos fueron almacenados en cajas a -80°C.

2.10 Clonación

2.10.1 Purificación de Bandas de Agarosa- Kit Promega

Una vez amplificado y separado por electroforesis en agarosa, el fragmento de ADN para cada uno de los marcadores utilizados (Alt.SAG2, GRA6 y APICO), fueron llevados a protocolos de purificación con la finalidad de extraer los restos de agarosa y demás contaminantes producto de la separación de los fragmentos por medio de la técnica de electroforesis. Los fragmentos fueron cortados en el tamaño esperado para cada marcador, luego se pesaron tubos de 1,5 mL en la balanza analítica antes y después de colocarle la muestra, la diferencia de estos pesajes es el volumen del gel de agarosa, por lo tanto, se agregó al tubo un volumen de 10 µl de la solución de unión a la membrana por cada 10 mg de agarosa cortada y se llevó al agitador vórtex hasta homogenizar. Se incubó entre 50°- 65°C por 10 minutos hasta que el gel se disolviera completamente. Durante este tiempo se armó el sistema de columnas del kit de purificación donde se transfirió la mezcla con la agarosa disuelta y se incubó por un minuto a temperatura ambiente. Luego se llevó a la centrifuga a 16000 rpm por un minuto y se descartó el líquido del tubo.

Pasado este proceso se realizaron dos lavados, en el primer lavado se agregó 700 µl de solución de lavado (previamente disuelta con etanol al 95%) y se centrifugó a 16000 rpm por 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se le agregó 500 µl de la solución de lavado y se centrifugó a 16000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante del tubo. La columna se transfirió a un tubo limpio de 2 mL y se centrifugó con la tapa abierta por 2 minutos a 16000 rpm para eliminar cualquier residuo de etanol producto de las soluciones de lavado, después la columna se transfirió a un tubo de 1,5 mL donde se le agregó 50 µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 rpm, luego se descartó la columna y se colectó el

eluído con cuidado de no contaminar el ADN. Posteriormente la muestra fue almacenada a -20°C y pasada las 24 horas se realizó la lectura en el Nanodrop 2000.

2.10.2 Ligación

En un tubo se agregó 2,5 μl del buffer de ligación previamente vorteadado, 0.5 μl del vector pGEM, 0.5 μl de T4 y se le agregó 3 μl de H₂O. Posteriormente, se agregó 3,5 μl de la mezcla en los tubos y 2 μl del producto de PCR, obteniendo un volumen de reacción optimizada de 5.5 μl ; una vez realizado este proceso se incubó toda la noche a 4°C .

2.10.3 Transformación

Se tomó un volumen de 50 μl de células competentes, luego se les agregó 2 μl de la reacción de ligación, se incubó en hielo por 20 minutos y después se le realizó un choque térmico a 42°C durante 45 segundos, después de estos segundos inmediatamente el tubo fue colocado nuevamente en hielo. Posteriormente se le colocó 950 μl de medio SOC, luego los tubos se llevaron al agitador orbital horizontalmente durante 1 hora a 200rpm. Luego las células transformadas se pasaron a platos Petri con agar y ampicilina y se agregó 250 μl del producto de transformación, después se incubó a 37° entre 16-20 horas. Posterior a la incubación se observaron las colonias en la cámara de flujo laminar con buena luz y se escogieron las colonias que presentaban un buen crecimiento y que no contenían colonias satélites alrededor. Con la ayuda de un palillo estéril se tomó una colonia del plato Petri y se colocó en un tubo de 15 mL que contenía 1mL de medio LB líquido con una concentración de ampicilina de 100 ng/mL. Los tubos se incubaron toda la noche a 37°C y se colocaron de forma horizontal en el agitador orbital a 250 rpm.

2.10.4 Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)

Purificación del Plásmido utilizando el kit WIZARD WIZARD® PLUS SV MINIPREPS DNA PURIFICATION SYSTEMS

En un tubo de 1,5 mL se colocó 1 mL de las bacterias transformadas y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 16000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 250 µl de la solución de resuspensión, luego se le agregó 250 µl de la solución de lisis y se invirtió 4 veces lentamente, se esperó hasta que estuviera claro, posteriormente se agregó 10 µl de la solución tampón de proteasa alcalina y se invirtió 4 veces lentamente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 350 µl de la solución de neutralización y se invirtió 4 veces lentamente, después se centrifugó a 16000 rpm por 10 minutos, luego el sobrenadante fue agregado a la columna, la cual se centrifugó por 1 minuto y se descartó el lisado. Posteriormente se efectuaron dos lavados, el primer lavado fue realizado con 750 µl de solución de lavado y se centrifugó por 1 minuto, luego se descartó la solución y se le realizó un segundo lavado con 250 µl de solución. El líquido fue descartado y la columna se transfirió a otro tubo de 1,5 mL donde se le agregó 100 µl de agua libre de nucleasas, luego la columna fue centrifugada por 1 minuto y el material con el plásmido purificado fue colectado, posteriormente se almacenó a una temperatura de -20° C. Posteriormente, los plásmidos fueron preparados y enviados para secuenciar ambas hebras tanto forward como reverse mediante secuenciación Sanger.

2.11 Análisis de Datos Moleculares.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas para los marcadores Alt. SAG2, Apico y GRA6 fueron depuradas y analizadas utilizando los siguientes programas.

2.11.1 Análisis de secuencias

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas en el programa Geneious para observar la calidad de la secuenciación mediante el análisis de los cromatogramas. Los cromatogramas fueron revisados para confirmar las secuencias. Se ensamblaron las secuencias FW y RV y se editaron para su limpieza cuando fue necesario, en especial los extremos. Luego, se generó una secuencia consenso y las secuencias se exportaron en formato FASTA. Posteriormente, se verificó la identidad molecular de las secuencias mediante análisis en NCBI-BLAST. Además, se obtuvieron secuencias de referencias del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para análisis comparativos. Todas las secuencias de nucleótidos determinadas en este estudio como las obtenidas en el GeneBank fueron alineadas a través del programa Clustal X version 1.8 (Thompson et al., 1997) y editadas utilizando los programas de GeneDOC v. 2.7.000 y MEGA v 11 (Nicholas et al., 1997) para posteriores análisis genealógicos de haplotipos.

2.11.2 Análisis de genealogía

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas utilizando el programa Splitstree v4.11.3 a través del método de NeighborNet, el cual utiliza el modelo matemático de Kimura (Huson et al., 2001).

2.11.3 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados a través de la prueba de Chi Cuadrado con un nivel de significancia de 0.05. Este análisis fue utilizado para verificar las diferencias estadísticas entre las cantidades de alelos encontrados para cada uno de los marcadores moleculares SAG2 y GRA6. Las tablas de contingencias utilizadas en los análisis estadísticos fueron analizadas en el programa GraphPad prism versión 6.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Descripción del número de muestras:

En este estudio fueron analizadas nueve muestras humanas de tejidos y fluidos que presentaron un diagnóstico positivo para el parásito *Toxoplasma gondii*. Estas muestras fueron recolectadas en un estudio sobre seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* realizado en el Hospital Santo Tomás entre los años 2017 y 2019. En ese entonces se evaluaron 2,326 mujeres embarazadas, de las cuales nueve resultaron positivas para la detección de la infección por *T. gondii*. Estas muestras fueron evaluadas a través de pruebas serológicas y confirmadas por pruebas moleculares (PCR) utilizando el gen B1; el resultado de ambas pruebas demostró la infección congénita por *T. gondii* (Flores et al., 2021). De las nueve muestras analizadas en este estudio, seis fueron de líquido cefalorraquídeo, dos de líquido Amniótico y una de placenta.

Estas muestras fueron analizadas a través de tres marcadores moleculares denominados de Alt. SAG2, GRA6 y Apico, los cuales han sido ampliamente utilizados en la caracterización genética de cepas de *T. gondii*. Para cada marcador fueron secuenciados dos clones por muestras, cabe destacar que cada clon representa un individuo diferente, el cual fue seleccionado al azar desde la población de parásitos que se encontraba en cada uno de los tejidos analizados. En total se obtuvieron cincuenta y cuatro secuencias, dieciocho secuencias para cada uno de los marcadores (Alt. SAG2, GRA6 y APICO). Estos marcadores fueron seleccionados porque cuentan con una gran cantidad de secuencias depositadas en los bancos de datos (GenBank) y porque son capaces de distinguir hasta cuatro diferentes alelos de *T. gondii*. Estas características fueron cruciales a la hora de realizar los análisis de polimorfismo y de genealogías, así como también las comparaciones con otras secuencias previamente descritas en otras regiones del mundo.

Tabla 4. Caracterización Molecular de *Toxoplasma gondii* en muestras de mujeres embarazadas.

Especie	Tipo de Muestra	Procedencia	Clones y Alelos para ALT.SAG2			Clones y Alelos para GRA6		Clones y Alelos para APICO	
<i>Homo sapiens</i>	LCR	24 de diciembre	A1A, A1B	III/III	G1A, G1B	VI	P1A, P1B	VI	
		Belisario Porras	A2A, A2B	III/III	G2A, G2B	III/II	P2A, P2B	VI	
		Vista Alegre	A3A, A3B	III/III	G3A, G3B	III/II	P3A, P3B	VI	
		Pacora	A4A, A4B	III/III	G4A, G4B	VI	P4A, P4B	VI	
		24 de diciembre	A5A, A5B	III/III	G5A, G5B	III/II	P5A, P5B	III/II	
		Ancón	A6A, A6B	III/II	G6A, G6B	VI	P6A, P6B	VI	
	Placenta	Belisario Frías	A7A, A7B	III/II	G7A, G7B	III/II	P7A, P7B	VI	
		José Domingo Espinar	A9A, A9B	III/III	G9A, G9B	VI	P9A, P9B	VI	
	L. Amniótico	Juan Díaz	A8A, A8B	III/III	G8A, G8B	III/III	P8A, P8B	VI	

3.2 Diversidad de Secuencias de *T. gondii* en mujeres embarazadas con los marcadores Alt SAG2, Apico y GRA6

Un total de nueve muestras fueron secuenciadas y analizadas utilizando los marcadores Alt. SAG2, APICO y GRA6. Fueron obtenidas 18 secuencias para cada marcador molecular.

3.2.1 Análisis de polimorfismo para el gen Alt.SAG2

Las secuencias obtenidas para el marcador Alt. SAG2 fueron alineadas junto con las secuencias de referencia para los tres principales alelos de *T. gondii* definidos como Alelo I (RH), II (PTG, PDS, ME49) y III (CTG, VEG). También se incluyeron secuencias de otros estudios, las cuales fueron seleccionados debido a su alto porcentaje de identidad con las secuencias panameñas. La secuencia de la cepa RH (Tipo I) fue seleccionada como secuencia consenso para el alineamiento, esta secuencia fue seleccionada debido a su mayor ancestralidad con respecto a los linajes II y III. Un total de dieciocho secuencias panameñas fueron evaluadas, de las cuales seis mostraron secuencias diferentes cuando fueron analizadas. El alineamiento mostró que las secuencias panameñas presentaban sitios polimórficos únicos en las posiciones 6 y 381, las cuales se repitieron en varias secuencias. Por ejemplo: el sitio polimórfico en la posición 6 fue repetitivo en las secuencias 9A,6A,6B,5A y 8A, sin embargo, las secuencias 2A y 7A presentaron un polimorfismo diferente en esa posición (Figura 9). Por otro lado, el sitio polimórfico en la posición 381 se repitió en las secuencias 7A,9A,6A,6B,1A. Los demás sitios

polimórficos mostraron sitios nuevos de polimorfismo único o SNP's por sus siglas en inglés "Single Nucleotide Polymorphism" en las posiciones 61,97,104,118,179,229,259,282 y 395. Además, se identificaron los sitios polimórficos que definen los alelos II y III (Según las cepas de referencia) en las posiciones 260-398 y 409-418 respectivamente (Cubas-Atienzar et al., 2018). Los sitios polimórficos en las posiciones 55,184,199 y 219 fueron comunes para los alelos II y III (Figura 9).

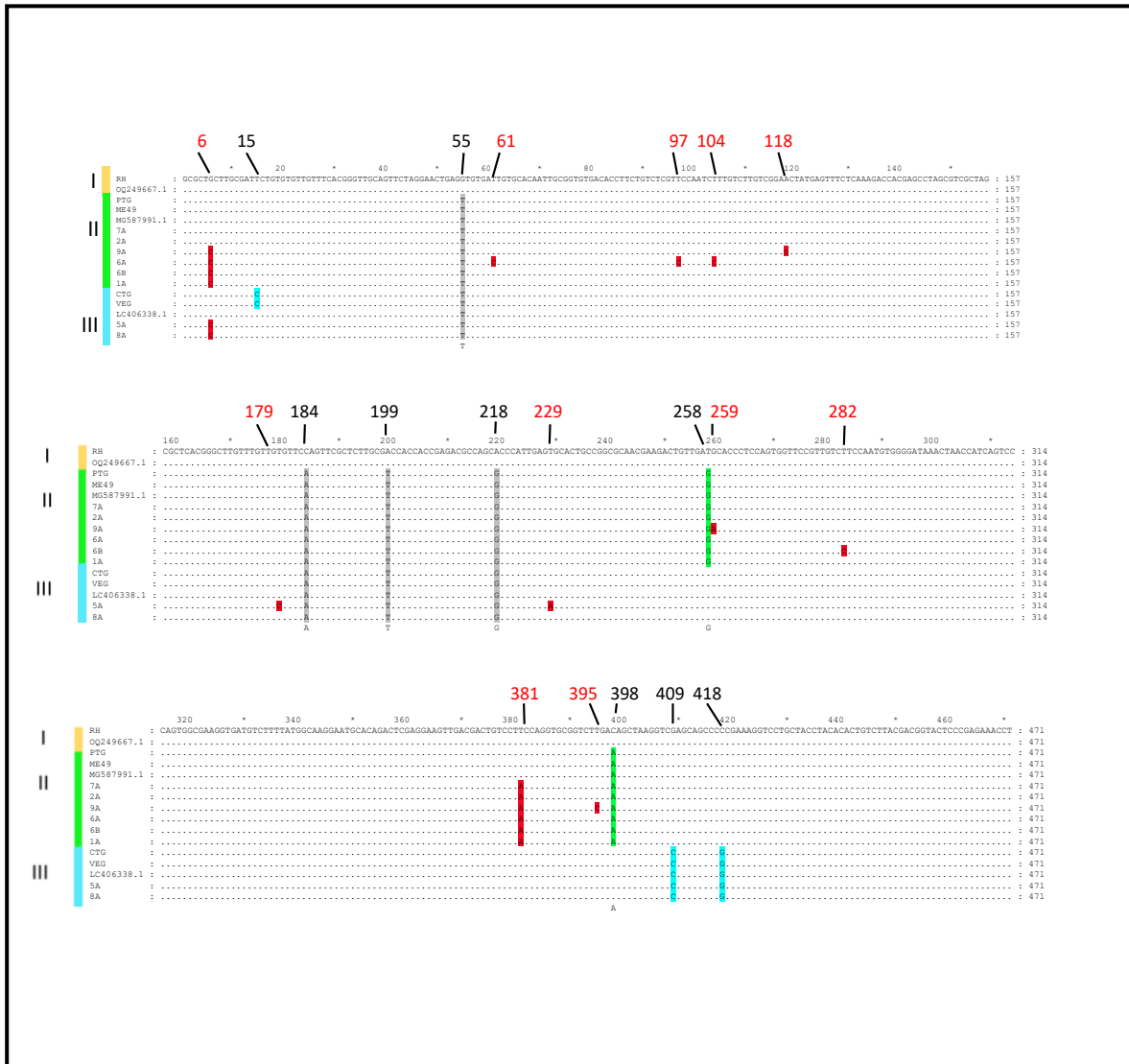


Figura 9. Alineamiento en secuencias de *T. gondii* utilizando el Marcador molecular Alt.SAG2. El color amarillo representa las secuencias para el alelo I, en verde las del alelo II y en celeste las del alelo III. En gris se observan los sitios conservados en común que comparten los alelos II y III.

Los sitios sombreados en rojo simbolizan los sitios polimórficos nuevos para las secuencias panameñas.

3.2.2 Análisis de Polimorfismo para el Gen Apico

Para el marcador Apico fueron analizadas dieciocho secuencias, de las cuales seis mostraron sitios polimórficos nuevos cuando se compararon con la secuencia consenso para el Alelo I (RH). En este alineamiento también se incluyeron las secuencias de referencia para los Alelos II (PTG, PDS y ME49) y III (CTG) y secuencias previamente publicadas en otros estudios (LC406358.1, LC700086.1, KX456221.1). Las secuencias panameñas presentaron 3 sitios de polimorfismo de nucleótido único o SNPs en las posiciones 144, 429, 478. Estas secuencias también presentaron los sitios polimórficos característicos y previamente descritos para los Alelos II y III en las posiciones 156 y 534, respectivamente (Fig 10).

La mayoría de las secuencias panameñas mostraron 99% de identidad con las secuencias para las cepas de referencias y con secuencias de aislados descritos en otros estudios. Además, se encontraron seis secuencias panameñas (1A, 4A, 6A, 6B, 8A, 5A) idénticas a la secuencia de referencia para el Alelo I (RH) y a secuencias de referencias de otros estudios (LC406358.1, KX456221.1) (Tabla 5).

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100
RH      : CAAATCTGAGIATCAITTTTATATAAAGGATGTGGTGAAATTTGGTAAACACAGCGGACTTTATATAATTTAAATTTAGAGATAAATAGTTTTTAICT : 100
LA      : ..... : 100
LC700088.1 : ..... : 100
KT881277.1 : ..... : 100
4A      : ..... : 100
6A      : ..... : 100
6B      : ..... : 100
8A      : ..... : 100
FTG     : ..... : 100
LC700088.1 : ..... : 100
5A      : ..... : 100
CTG     : ..... : 100
HX456221.1 : ..... : 100

```

```

      107          *          120          *          140          *          160          *          180          *          200
RH      : TTATTATTATCGATAAARCTATRAAAAAATTATATAGGATTTTGTATATATATTTAGATTTTATAICAAAAGACTCIAAAAAATAAATTACTTAATA : 200
LA      : .....G.....G..... : 200
LC700088.1 : .....G.....G..... : 200
KT881277.1 : ..... : 200
4A      : ..... : 200
6A      : ..... : 200
6B      : ..... : 200
8A      : ..... : 200
FTG     : ..... : 200
LC700088.1 : ..... : 200
5A      : ..... : 200
CTG     : ..... : 200
HX456221.1 : ..... : 200

```

```

      *          220          *          240          *          260          *          280          *          300
RH      : TTAATATAGACITTAIAAAAAAGTTEACTAATTATTTATATAATATATGAAATCCGTAAACTTTAAAAAGTTTTGAGGGTTCGAGTCCCTTCTCCTT : 300
LA      : ..... : 300
LC700088.1 : ..... : 300
KT881277.1 : ..... : 300
4A      : ..... : 300
6A      : ..... : 300
6B      : ..... : 300
8A      : ..... : 300
FTG     : ..... : 300
LC700088.1 : ..... : 300
5A      : ..... : 300
CTG     : ..... : 300
HX456221.1 : ..... : 300

```

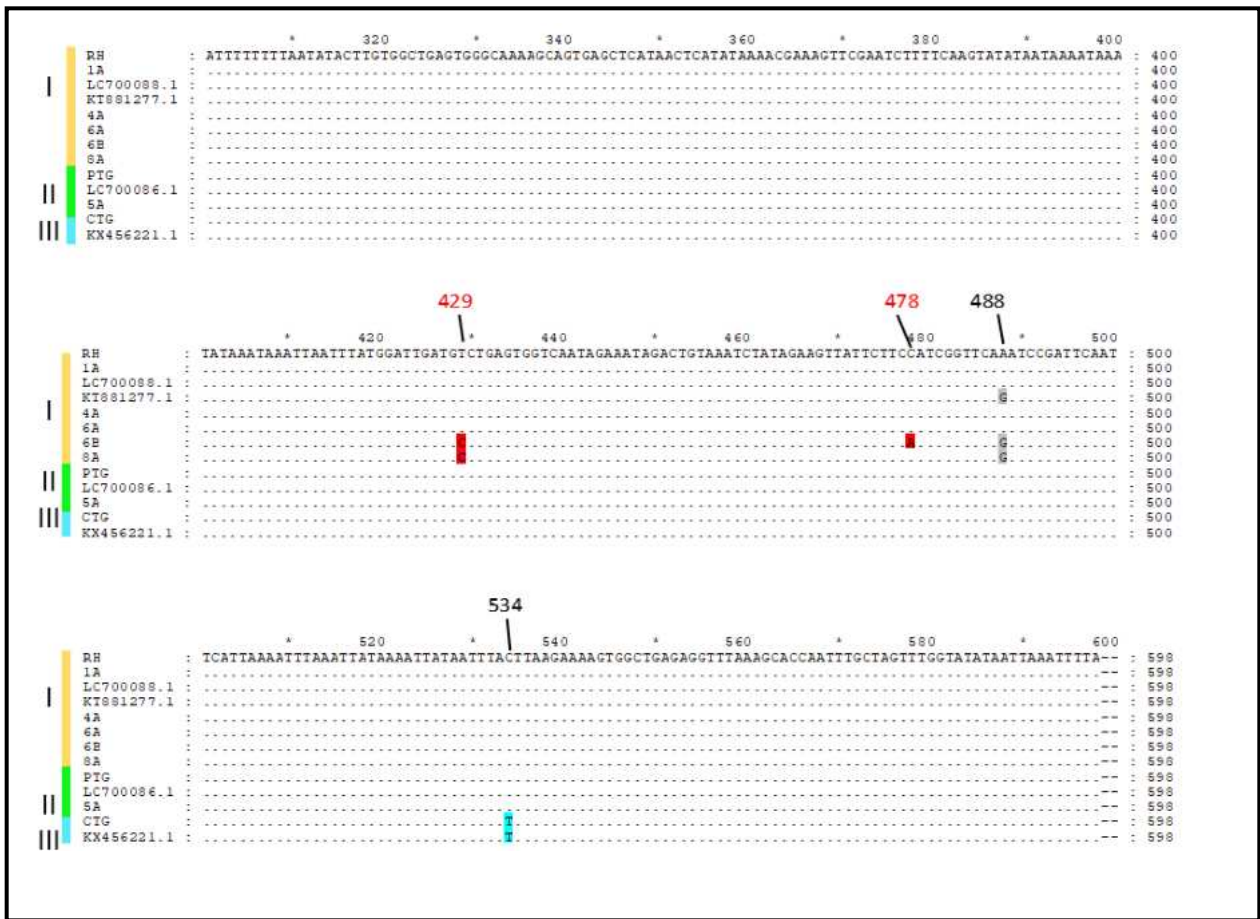


Figura 10. Alineamiento de secuencias para las muestras de mujeres embarazadas con *T. gondii* positivo utilizado el Marcador molecular Apico. El color amarillo representa las secuencias para el alelo I, en verde las del alelo II y en celeste las del alelo III. Los sitios polimórficos sombreados en rojo simbolizan los nuevos sitios polimórficos identificados en las secuencias panameñas.

3.2.3 Análisis de polimorfismo para el gen GRA6

Con el marcador GRA6 se analizaron un total de nueve (9) muestras de las cuales se obtuvieron diecicho (18) secuencias. Con este marcador molecular se observaron en nuestras muestras tres nuevos SNPs en las posiciones 93,177 y 283. En las posiciones 113, 114, 115 y 243 se observaron los sitios polimórficos que definen el alelo II (PTG) y en las posiciones 178 y 234 los sitios que definen el alelo III (CTG). Adicionalmente, en nuestro análisis fue observado un sitio nuevo polimórfico común entre los alelos II (PTG) y III (CTG) en la posición 143.

Cabe destacar que las secuencias 2A, 2B y 3A presentaron un sitio polimórfico en la posición 113, el cual ya había sido observado para la secuencia de referencia II

(PTG) y en una secuencia reportada en otros estudios disponibles en el GenBank HG809550.1 (Cubas-Atienzar et al., 2018) (**Fig. 11**).

La comparación entre secuencias panameñas y secuencias disponibles en otros estudios para este marcador reveló porcentajes de identidad entre el 99.32 y 99.66%, con diferencias entre 0.68 y 0.34 respectivamente

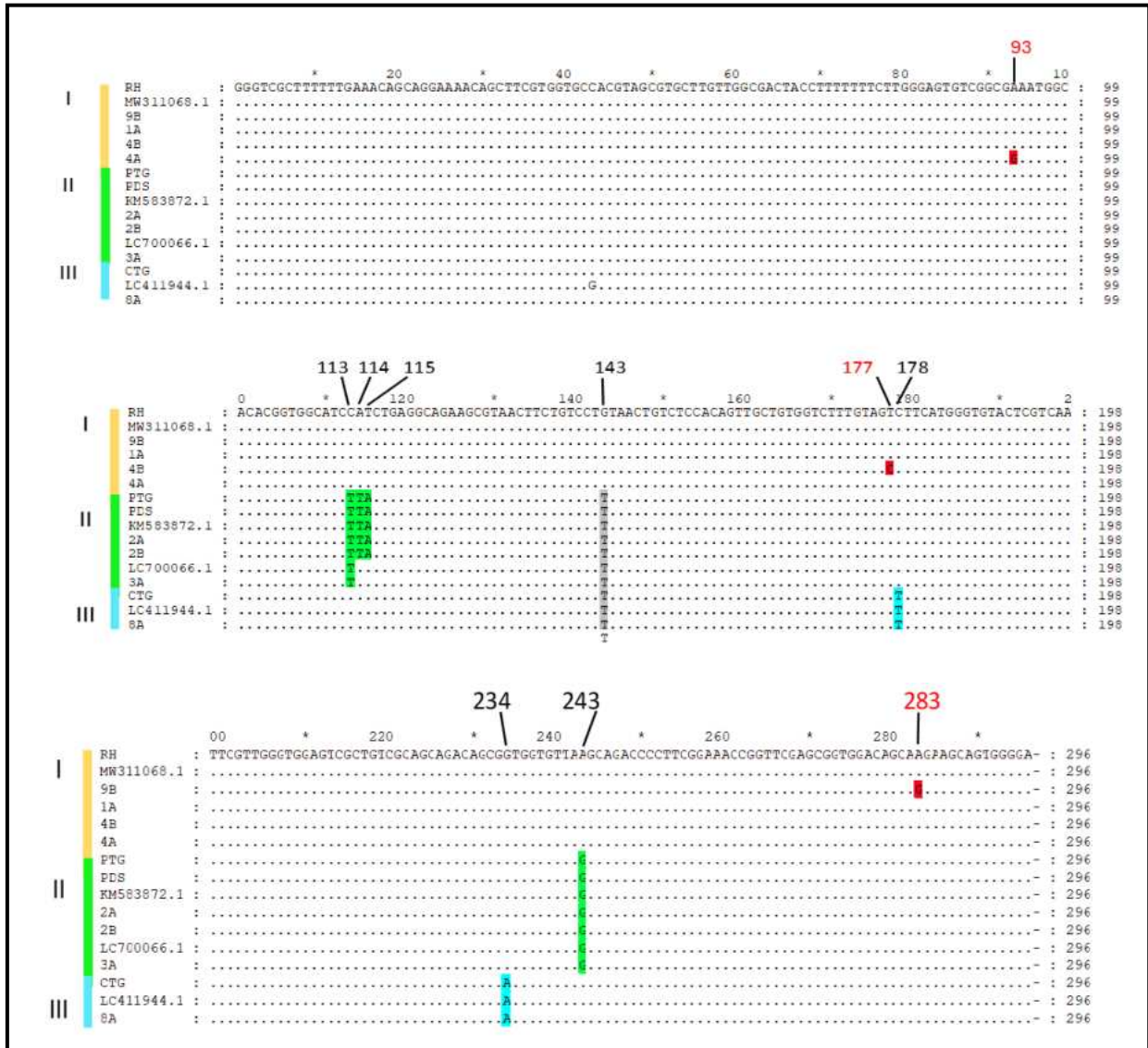


Figura 11. Alineamiento de secuencias de *T. gondii* con el marcador molecular GRA6. El color amarillo representa las secuencias para el alelo I, en verde las del alelo II y en celeste las del alelo III. En gris los sitios polimórficos comunes entre los alelos dos y tres. Los sitios polimórficos en rojo simbolizan los nuevos sitios polimórficos encontrados en las secuencias panameñas

Tabla 5. Secuencias de Referencias utilizadas en los alineamientos de mujeres embarazadas con toxoplasmosis congénita para los marcadores Alt. SAG2, Apico Y GRA6.

Marcador Molecular	Códigos utilizados en los análisis de Network	Hospedero	País de Prodeendencia	Porcentaje de identidad de secuencias de otros estudios con respecto a las muestras panameñas (%)		Aislado	Alelo Reportado	Referencia	Código de Acceso en el GenBank
				Secuencias de Pmá 100% idénticas a las recuperadas del GeneBank	Secuencias de Pmá con % de identidad entre 98-99 con respecto a las descritas en el GenBank				
Alt. SAG2	GBH3	<i>Enhydra lutris nereis</i>	Estados Unidos		*		I	Miller et al.2023	OQ249667.1
	GBH1	<i>Felis catus</i>	Australia	*	A7A, A7B, A2A, A2B		II	Brennan A. et al.,2016	KT881343.1
	GBH2	<i>Felis catus</i>	Australia			Heces	II	Brennan A. et al.,2016	KT881317.1
	GBH4	<i>Arvicola amphibius</i>	Suiza	A7A, A7B	*	Músculo esquelético	II	Pardo,M. et al.,2022	OQ130442.1
	GBH5	<i>Castor fiber</i>	Suiza	A1A,A1B	AGA	Tejido cerebral	II	Scherrer,P. et al.,2024	OQ402913.1
	GBH6	<i>Felis catus</i>	Irán		A7A, A7B, A2A, A2B	Heces	II	Arshadi M. et al.,2019	LC406342.1
	GBH10	<i>Sus scrofa</i>	Italia			Músculo esquelético	II	Battisti E. et al.,2018	MG587956.1
	GBH7	<i>Homo sapiens</i>	Irán	*	A3B, A3A, A8A, A8B, A9A, A9B, A4A, A4B, A5A, A5B		III	Arshadi M. et al.,2019	LC406328.1
	GBH8	<i>Homo sapiens</i>	Irán			Sangre	III	Arshadi M. et al.,2019	LC406327.1
GBH9	<i>Homo sapiens</i>	Irán				III	Arshadi M. et al.,2019	LC406334.3	
APICO	GBH22	<i>Homo sapiens</i>	Irán	P1A, P1B		Sangre	I	Arshadi M. et al.,2019	LC406358.1
	GBH23	<i>Homo sapiens</i>	Irán	*	P9A, P9B, P8A,P8B, P6B	Tejido fetoplacentario	I	Abdoli,A. et al.,2016	KX456221.1
	GBH24	<i>Gallus gallus</i>	Nigeria	P2B, P3A, P3B, P4A, P4B, P7A, P7B	P6A	Tejido muscular	I	Blahe,P.D. et al., 2021	HG992951.1
	GBH26	<i>Homo sapiens</i>	Irán			Sangre	I	Karimi P. et al.,2022	LC700088.1
	GBH19	<i>Felis catus</i>	Irán		*	Heces	II	Karimi P. et al.,2022	LC700086.1
	GBH20	<i>Felis catus</i>	Irán	P5A, P5B,	*		II	Arshadi M. et al.,2019	LC406363.1
GBH25	<i>Homo sapiens</i>	Irán	*	*	Tejido fetoplacentario	III	Abdoli,A. et al.,2016	KX456221.1	
GRA6	GBH17	<i>Homo sapiens</i>	Irán	G1A, G1B	G4A, G4B, G6A, G6B, G9A, G9B	Sangre	I	Rezanezhad,H. et al.,2020	MW311068.1
	GBH18	<i>Ursus americanus</i>	Estados Unidos			Suero	I	Scimeca,R.C. et al.,2020	MH744795.1
	GBH11	<i>Homo sapiens</i>	Irán	G3A, G3B, G7B	G5B, G2A, G5A, G7A	Sangre	II	Karimi P. et al.,2022	LC700066.1
	GBH13	<i>Bos taurus</i>	Italia			Musculo Esquelético	II	Battisti E. et al.,2018	MG587956.1
	GBH14	<i>Ovis aries</i>	España	G2B	G3A, G3B, G7B		II	Fernandez-Escobar,M. et al.,2020	MT370491.1
	GBH15	<i>Vombatus ursinus</i>	Australia				II	Donahoe,S.L. et al.,2014	KM583872.1
	GBH16	<i>Agapornis roseicollis</i>	Australia			Tejido Cerebral	II	Cooper,M.K. et al., 2015	KT777435.1
	GBH12	<i>Rattus rattus</i>	Irán	G3A, G3B, G7B	G5B, G2A, G5A, G7A		II	Shariat,B.E., 2018	LC411944.1
	GBH25	<i>Pica pica</i>	Irán		*		III	Khademvatan S et al.,2013	KP792601.1
	GBH28	<i>Pica pica</i>	Irán	G8A	*		III	Khademvatan S et al.,2013	KP792607.1
GBH29	<i>Homo sapiens</i>	Irán			Sangre	III	Mousavi M et al., 2016	MN604253.1	

Nota: Los códigos del GBH1 al GBH29 fueron utilizados para el análisis Network y cada uno corresponden a los códigos de acceso de las secuencias de referencias tomadas de la base de datos del GenBank.

3.3 Diversidad alélica de *T. gondii* en mujeres embarazadas utilizando los marcadores Alt SAG2, Apico y GRA6

En los análisis de Genealogía realizados con el programa SplitsTree observamos en Panamá los tres alelos de *T. gondii* con los marcadores moleculares Alt. SAG2, APICO y GRA6. Con el marcador molecular Alt.SAG2 se observaron los alelos II y III, con el gen APICO los alelos I y II y con GRA6 los tres alelos (I, II y III).

3.3.1 Análisis de Genealogía para el gen Alt. SAG2

En el análisis de genealogía o haplotipos (network) realizado para el marcador Alt. SAG2 no se observaron secuencias panameñas relacionadas con el alelo I, en este grupo sólo se agruparon la secuencia de referencia RH, y una secuencia recuperada del GenBank procedente de otro estudio (GB3). Para el alelo II ocho secuencias panameñas (A7A, A7B, A2A, A2B, A1A, A1B, A6A y A6B) se agruparon junto con las secuencias para las cepas de referencia PTG, PDS y ME49, así como también, seis secuencias recuperadas del GenBank procedentes de otros estudios (GBH1, GBH2, GBH6, GBH10, GB4 y GB5). El análisis de network mostró cuatro subgrupos dentro del alelo II, un subgrupo formado por cuatro secuencias procedentes del GenBank (KT881343.1, KT881317.1, LC406342.1 y MG587956.1) y las secuencias para las cepas de referencia (PTG, PDS y ME49), el segundo subgrupo estuvo formado por dos secuencias panameñas (A2A, A2B) estos dos grupos se ubicaron en la parte más interna del árbol, el tercer subgrupo estuvo formado por cuatro secuencias panameñas (A1A, A1B, A6A, A6B) y una secuencia recuperada del GenBank (GBH5) y el cuarto subgrupo formado por dos secuencias panameñas y una secuencia recuperada del Genbank (GB4).

El análisis de network también mostró que las secuencias panameñas (A3B, A8B, A8A, A9A, A9B, A4A, A4B) se agruparon junto con las secuencias de referencia para el alelo III (CTG, VEG) y secuencias recuperadas del GenBank procedentes de otros estudios (GB7, GB8, GB9) (Arshadi et al., 2019). Dentro de este grupo se observaron dos subgrupos: un grupo representado por las cepas de

referencia (CTG, VEG) y por secuencias de otros estudios (GB7, GB8 y GB9)(Arshadi et al., 2019), ubicado en una posición más interna con respecto al segundo subgrupo formado sólo por secuencias panameñas (A3B, A8B, A8A, A9B, A9A, A4A, A4B) y ubicadas en las posiciones más terminales (A3A, A5A, A5B) (Figura 12).

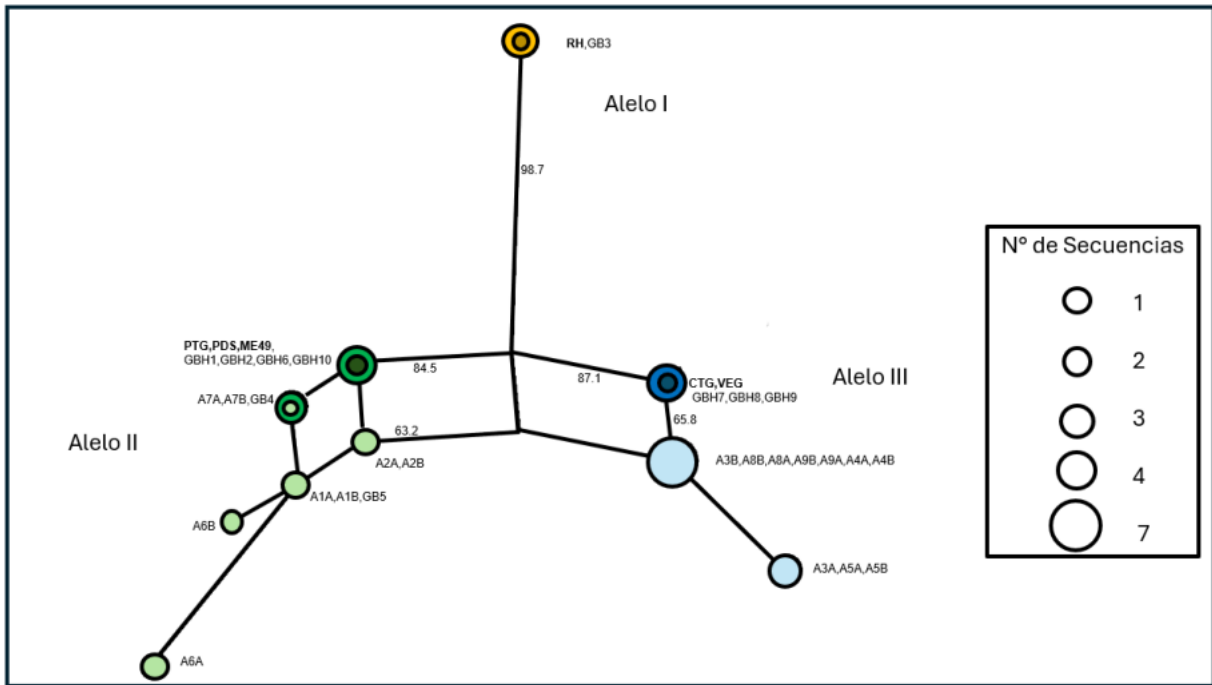


Figura 12. Análisis de Genealogía de secuencias de *T. gondii* con el marcador molecular ALT.SAG2. Los círculos de tonalidades medias representan secuencias del GeneBank, los colores más claros representan las secuencias nuevas panameñas y los colores más oscuros representan las cepas de referencia para los alelos I (RH), II (PTG, ME49, PDS), y III (VEG, y CTG).

3.3.2 Análisis de Genealogía para el gen Apico

Con el marcador Apico todas las secuencias panameñas se agruparon en un solo grupo que correspondía al Alelo I (RH) de *T. gondii*. El análisis de genealogía mostró que todas las secuencias se ramificaron a partir de un mismo nodo. Aunque se encontraron dos secuencias panameñas (P5A, P5B) idénticas con la secuencia de referencia (PTG) para Alelo II, no se observó ninguna una separación de estas secuencias con el Alelo I. Es importante destacar que todas las secuencias analizadas con este gen tuvieron su origen en el mismo nodo, por lo tanto, no se observaron subgrupos con ninguna de las secuencias analizadas. Dentro del Alelo I se observó que siete de las secuencias de Panamá (P2B, P3A, P3B, P4A, P4B,

P7A, P7B) fueron idénticas a la cepa de referencia para el Alelo I (RH) además de tres secuencias de otros estudios (GBH21, GBH24, GBH26) recuperadas del GenBank (Arshadi et al., 2019; Hosseini et al., 2023). Para el Alelo III, se agrupó la cepa de referencia CTG y otra secuencia descrita en otro estudio (GBH25)(Hosseini et al., 2023), en este Alelo no se observaron subgrupos. El análisis de Network mostró valores de Bootstrap confiables para todo el árbol. (Figura13)

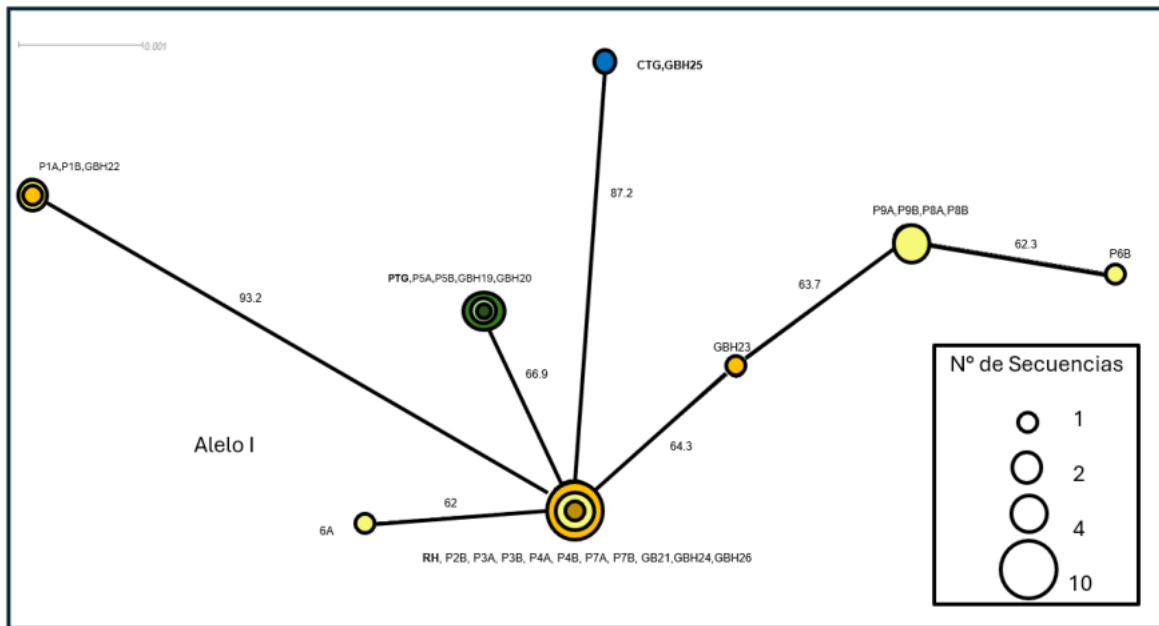


Figura 13. Análisis de Genealogía con secuencias de *T. gondii* en mujeres embarazadas con el marcador molecular Apico. Los círculos amarillos, verdes y azul de tonalidades más oscuras representan las secuencias de referencia para el Alelo I (RH) II (PTG) y III (CTC) respectivamente. Los círculos amarillos en tonalidades medias representan las secuencias de otros estudios recuperadas del GenBank y los círculos en tonalidades más claras representan las secuencias panameñas.

3.3.4 Análisis de Genealogía para el gen GRA6

Los análisis con el marcador GRA6 mostraron que las secuencias panameñas se agruparon dentro de los tres Alelos ya descritos (I, II, III). De las dieciocho secuencias panameñas obtenidas, ocho se agruparon con el Alelo I (RH), siete con el Alelo II (PTG) y una secuencia con el Alelo III. Dentro del Alelo I se observaron dos secuencias idénticas a la cepa de referencia RH, el resto de las secuencias (6), aunque mostraron diferencias, se ubicaron en las posiciones más terminales del árbol y continuaron muy relacionadas con la cepa de referencia para el Alelo I (RH). No se observaron subgrupos dentro del Alelo I. Para el Alelo II se observó la

formación de un solo grupo, tres de las secuencias de Panamá se ramificaron a partir del nodo más interno de este grupo y fueron idénticas a secuencias ya descritas en otros estudios (GBH11, GBH12, GBH13) (Battisti et al., 2018; Cooper et al., 2015; Fernández-Escobar et al., 2020; Karimi et al., 2022; Rezanezhadet al., 2020; Scimeca et al., 2020); estas secuencias se ubicaron en una posición más interna que la secuencia de referencia para el Alelo II (PTG). Junto con la secuencia de referencia para el Alelo II (PTG) se agruparon tres secuencias de otros estudios recuperadas del GenBank (GBH14, GBH15, GBH16) y una secuencia panameña (G2B). El resto de las secuencias panameñas (G5A, G2A, G5B, y G7A) se ramificaron a partir del nodo más interno del grupo hacia una posición más terminal dentro del árbol.

Para el Alelo III, la secuencia panameña se agrupó junto con la cepa de referencia CTG y otras secuencias descritas en otros estudios (GBH25, GBH28, GBH29) (Kalantari et al., 2015; Mousavi et al., 2016), en este Alelo no se observaron subgrupos. El análisis de Network mostró valores de Bootstrap confiables para todo el árbol (Figura 14).

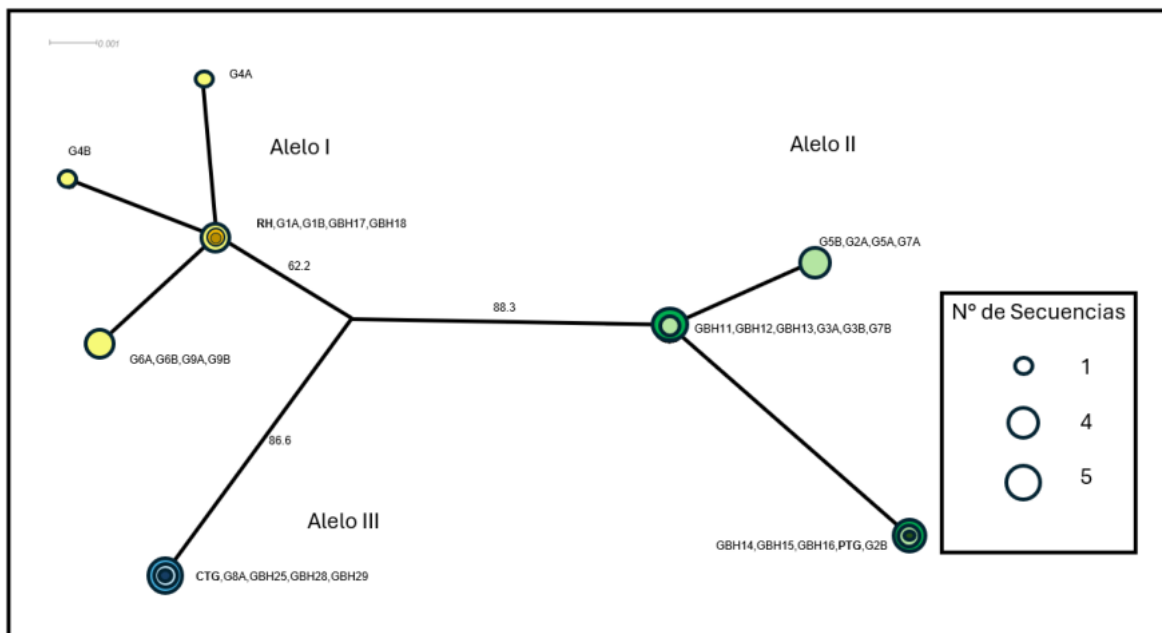


Figura 14. Análisis de Genealogía con secuencias de *T. gondii* con el marcador molecular. Los círculos de tonalidades medias representan secuencias del GenBank, los colores más claros las

secuencias nuevas panameñas y los más oscuros las cepas para tipo uno, dos y tres respectivamente (RH, PTG, PDS, y CTG).

3.4 Identificación y análisis estadísticos de los diferentes Alelos encontrados para los genes Alt. SAG2 y GRA6

La cantidad de Alelos identificados en las poblaciones de *T. gondii* estudiadas fue analizada estadísticamente utilizando la prueba de Chi-cuadrado con un nivel de significancia de 0.05. Los resultados encontrados en las poblaciones analizadas con el gen AltSAG2 mostró un mayor porcentaje de Alelos III (55.5%) que de Alelos II (44.4%), sin diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon ambos porcentajes ($X^2 = 0.44$, gl 2, $p = 0.8007$). El Alelo I no fue observado en las poblaciones de *T. gondii* analizada con el gen Alt.SAG2.

Las poblaciones analizadas con el gen GRA6 no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los porcentajes obtenidos entre los Alelos I (22.2%) y II (55.5%) ($X^2 = 4.280$, gl – 2, $p = 0.1220$); I (22.2%) y III (22.2%) ($X^2 = 0.000$, gl – 2, $P = >0.9999$); y II (55.5%) y III (22.2%) ($X^2 = 4.208$, gl – 2, $p = 0.1220$).

El total de Alelos obtenidos utilizando ambos genes (Alt. SAG2 y GRA6) también fue analizado estadísticamente, se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los porcentajes obtenidos para los Alelos I (11.11%) y II (50%) ($X^2 = 12.83$, gl – 2, $P = 0.0016$); y los Alelos I (11.11%) y III (38.8%) ($X^2 = 7.407$, gl – 2, $p = 0.0246$). Los porcentajes analizados entre los Alelos II (50%) y III (38,8%) ($X^2 = 0.9000$, gl – 2, $p = 0.6376$) no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Discusión

La toxoplasmosis es una enfermedad que afecta a una gran cantidad de personas a nivel mundial, es causada por un parásito intracelular obligado denominado de *Toxoplasma gondii*. Al menos un tercio de la población mundial está infectada con el parásito, lo que la convierte en una de las infecciones parasitarias de mayor efectividad. La infección materna puede causar consecuencias potencialmente mortales para el feto o incluso provocar la muerte en el útero (Saadatnia et al., 2012). Esta enfermedad presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas y su frecuencia varía según las áreas geográficas (Botero D, 1992).

En Brasil, la mayoría de los estados han reportado porcentajes superiores al 50%, con el porcentaje más alto de 91,7% reportado en 2010 para la ciudad de Fortaleza (Dubey et al.,2012; Sroka et al.,2010). En Colombia y Perú, la prevalencia oscila entre 28,0 y 45,8% y entre 35,8 y 97,6%, respectivamente (Silva et al.,2020; Angel-Muller et al.,2014). En Centroamérica se han publicado pocos estudios; sin embargo, los datos reportados han mostrado frecuencias relativamente altas en Guatemala (55,8%) y Costa Rica (60%) (Ruiz et al.,1966; Sinibaldi et al.,1922). En contraste, algunas ciudades de México han mostrado porcentajes relativamente bajos de seropositividad, con valores máximos alrededor del 6% (Alvarado-Esquivel et al. 2016, 2006).

La toxoplasmosis congénita puede provocar abortos espontáneos o manifestarse como una enfermedad neonatal grave o leve, la cual puede iniciar durante el primer mes de vida, o con secuelas o recaídas de una infección previa, no diagnosticada ni tratada, que aparece en la infancia o posteriormente (Durlach et al., 2008). En la etapa gestacional puede presentarse una amplia variedad de manifestaciones graves como muerte perinatal, prematuridad y pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Más de la mitad de los recién nacidos de madres infectadas son considerados antes de nacer, pero prácticamente todos desarrollarán alteraciones oculares si no se les brinda el tratamiento adecuado. Otras manifestaciones que se pueden observar en el recién nacido son adenopatías, hepatoesplenomegalia, miocarditis, neumonitis, síndrome nefrótico, vómitos, diarrea , problemas de alimentación y la triada característica de coriorretinitis,

hidrocefalia y calcificaciones cerebrales; denominada triada de Sabin. A nivel cutáneo los pacientes con toxoplasmosis congénita presentan erupciones de tipo fina puntiforme, maculopapular difusa, lenticular, macular muy definida o papular azulada difusa; hasta petequias, equimosis o hemorragias secundarias a trombocitopenia. Además, se puede observar casos de ictericia con afección hepática y/o hemólisis, cianosis debido a neumonitis intersticial y edema secundario a miocarditis o síndrome nefrótico (Gómez et al.,2002).

En Europa, África y regiones de Norteamérica la estructura de la población de *T. gondii* tiende a ser más clonal, porque se han reportado con mayor frecuencia los genotipos más comunes denominados de I, II y III, aunque en Norteamérica recientemente se describió un nuevo genotipo denominado genotipo 12 (Shwab et al., 2014; Khan et al., 2011). En regiones de Suramérica se han realizado una gran cantidad de estudios sobre la caracterización genética del parásito, en estos estudios se reportaron genotipos muy variados (Dubey et al.,2021), también se han descrito cepas atípicas o exóticas circulando en humanos, estas infecciones presentaron severas manifestaciones clínicas en personas con un sistema inmunológico competente y fueron relacionadas con el consumo de animales silvestres (Amouei et al., 2022). Posteriormente algunos autores asociaron las características genéticas de estas cepas atípicas al intercambio genético del parásito, debido a su reproducción sexual y a la variabilidad genética encontrada en el ciclo doméstico y en el silvestre (Amouei et al., 2022; Silva et al., 2018; Schwab et al., 2014).

Inicialmente en América del Norte se consideró que *T. gondii* tenía una población clonal con baja diversidad genética que engloba tres linajes principales (tipos I, II y III) (Howe et al., 1995). Sin embargo, años más tarde se realizaron estudios importantes en Europa y Estados Unidos donde se aislaron cepas provenientes de Brasil y Guyana Francesa lo que aumentó la información sobre variabilidad genética de *T. gondii* que se tenía en estas regiones hasta el momento (Lehmann et al., 2006).

La estructura poblacional de *T. gondii* que infectaban a humanos en América del Norte era muy similar a la de Europa, con mayor frecuencia de los genotipos tipo II y III, siendo los genotipos atípicos poco comunes y probablemente importados del extranjero (Ajzenberg et al., 2009; Pomares et al., 2011). No obstante, varios estudios han mostrado que la carne para consumo humano en Europa tenía una mayor diversidad genética de *T. gondii*, lo que significa que en los tejidos de esos animales de consumo es probable que se encuentren los genotipos I, II y III. Este hecho sugiere que en América del Norte y Centroamérica el consumo de carne probablemente fue un importante mecanismo para aumentar la variabilidad genética del parásito en estas regiones (J P Dubey et al., 2011, 2008).

Los estudios realizados en América Central para la caracterización genética de cepas de *T. gondii* se han basado principalmente en técnicas de Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP), las cuales han mostrado con mayor frecuencia los Alelos II y III y en menor el Alelo I (J. P. Dubey et al., 2006). Hasta donde sabemos, en América Central hay muy pocos datos sobre los genotipos de *T. gondii* en humanos, la mayoría de los datos provienen de estudios serológicos, los cuales permiten encontrar anticuerpos en la sangre del paciente contra *T.gondii* (Mcleod et al., 2012; Su et al., 2012).

La población clonal de *T. gondii* se refiere a un grupo de individuos genéticamente idénticos, que han crecido en un determinado lugar, todos originados de un solo antepasado por reproducción asexual (Sibley et al., 2009), este hecho se corroboró cuando se analizó la identidad entre los tres Alelos más importantes de este parásito (I, II, III), los cuales solo se diferencian en un 0.30 - 1.2% a nivel de nucleótidos (Sibley et al., 1995). Los eventos de recombinación al ser poco frecuentes han ayudado a mantener la población de *T. gondii* altamente clonal y los porcentajes de identidad entre los tres linajes clonales son tan altos que resulta difícil identificar mutaciones auténticas entre los genotipos (Sibley et al., 2008).

En este estudio se analizó una población de nueve muestras, seis de líquido cefalorraquídeo, dos de tejido placentario y una de líquido amniótico. Es importante señalar que cada una de las muestras representa una población diferente de *T.*

gondii y estas fueron analizadas por los genes Alt. SAG2, GRA6 y Apico. En total se obtuvieron dos clones por muestra y cada clon representó un individuo diferente de *T. gondii*, lo cual nos permitió estudiar la diversidad alélica en cada una de las muestras analizadas. Como resultado de la secuenciación se obtuvieron cincuenta y cuatro secuencias, es decir, dieciocho secuencias para cada gen. Los análisis demostraron que la población de *T. gondii* estudiada en las muestras de mujeres embarazadas estaba representada por los Alelos I, II y III ya que presentaron sitios de polimorfismos característicos para cada uno de estos tres Alelos (Cubas-Atienzar et al., 2018a), esto nos sugiere que en Panamá las cepas de *T. gondii* que circulan en el ciclo doméstico probablemente se derivaron de los tres genotipos más comunes I, II y III.

Con el marcador Alt. SAG2 se encontraron los Alelos II y III y con el marcador GRA6 se observaron los tres Alelos I, II, III, por lo tanto, no se encontró evidencia de otros alelos en las muestras analizadas. Estos hallazgos sugieren que las muestras de placenta, líquido amniótico y líquido cefalorraquídeo, están siendo infectadas con parásitos que tienen características alélicas probablemente derivadas de varios cruces entre las cepas Arquetípicas I, II y III. Los tres Alelos observados con el gen GRA6 demuestran un flujo genético dinámico hacia el ciclo doméstico. Aunque se observaron muestras donde los dos clones analizados para cada uno de los genes presentaron las mismas características alélicas, no es posible afirmar que se trate de cepas puras o Arquetípicas, para esto hubiese sido necesario incluir en el análisis secuencias de al menos diez genes (Apico, SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, C22-8, C29-2, L358, PK1, 5'SAG2 3'). Por otro lado, el análisis de los clones también reveló que algunas muestras fueron infectadas por cepas No Arquetípicas debido a que se encontraron diferentes Alelos para los genes Alt.SAG2 y GRA6 (Tabla 4).

Es importante resaltar que cada secuencia representa un individuo o taquizoito distinto, por lo tanto, las secuencias analizadas que resultaron Alelo II o Alelo III con el gen GRA6 no representan los mismos individuos encontrados con el Alelo II o III para el gen Alt. SAG2. La población de taquizoitos puede provenir de dos fuentes: 1- Por la ingestión de esporozoitos haploides, los cuales a su vez provienen de un

ooquiste diploide excretado por las heces de los felinos, o 2- Por la ingestión de quistes tisulares que son el resultado de la invasión de un taquizoitos haploide. Tomando en cuenta estas dos fuentes, la población de *T. gondii* puede estar formada por taquizoitos que provienen de cruces genéticos (esporozoitos haploides) o por taquizoitos que simplemente sufrieron una división clonal por endodiogenia. La diversidad de Alelos encontrada con ambos marcadores (Alt. SAG2 y GRA6) demostraron que la población de *T. gondii* en cada uno de los tejidos analizados es heterogénea y que está representada por diversos parásitos que han sido producto de varios cruces genéticos. Aunque los cruces genéticos hayan aportado una considerable variabilidad genética a la población de *T. gondii*, es importante mencionar que la población de *T. gondii* es continua siendo predominantemente clonal. Esto fue evidenciado en nuestros datos al encontrar una gran cantidad de secuencias redundantes en cada uno de los clones analizados. Al sumar los Alelos II y III con los marcadores moleculares Alt.SAG2 y GRA6 se obtuvieron dieciocho Alelos tipo II que representa el 50% de los Alelos encontrados en el estudio y catorce del genotipo III que determinan el 38% de los Alelos analizados. Se obtuvieron cuatro Alelos tipo I con GRA6 que representan el 22% y cero con Alt. SAG2.

Los análisis estadísticos realizados a los Alelos identificados con los marcadores Alt. SAG2 y GRA6 mostraron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la cantidad de Alelos encontrados, se observó que los Alelos II y I son estadísticamente diferentes, el mismo resultado se observó cuando se compararon los Alelos III y I. Cuando se compararon los Alelos II y III, no se observó diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados indicaron que la cantidad de Alelos II identificados fue mayor que los Alelos I y III. Nuestros resultados coinciden con un estudio realizado en Argentina que indicó que el Alelo II y III está asociado a la toxoplasmosis congénita y casos de pacientes inmunocomprometidos (Bernstein et al., 2017).

Los análisis de genotipado de *T. gondii* en animales silvestres y humanos realizados en Centroamérica han mostrado una diversidad genética donde predominan los genotipos II y III, estos datos pueden ser comparados con los hallazgos encontrados

en este estudio, aunque, sólo se observaron los Alelos II y III, nuestros datos indican que ambos Alelos probablemente proceden de cepas Arquetípicas de *T. gondii* I, II y III (el Caribe y gran parte de Suramérica) (Chikweto et al., 2017; Hamilton et al., 2017; Dubey et al., 2013; Su et al., 2012).

En nuestro estudio obtuvimos una mayor cantidad de Alelos II y III que de Alelos I, lo que resulta importante ya que los Alelos II y III son los genotipos mayormente descritos en Centroamérica, sin embargo, el Alelo I ya ha sido reportado en Costa Rica en granjas de pollos (Dubey et al., 2006). Además, el genotipo I está asociado en Humanos a manifestaciones clínicas graves como: como anasarca fetal y muerte perinatal a recién nacidos de bajo peso para su edad gestacional, prematuridad, cicatrices retinianas periféricas, ictericia persistente, trombocitopenia leve, pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la triada característica de coriorretinitis, hidrocefalia y calcificaciones cerebrales. También, este genotipo se ha estudiado en modelos murinos donde se observa la letalidad de esta cepa mediante el comportamiento del ratón (Montoya et al., 2017).

En los análisis de polimorfismos realizados a las secuencias panameñas también se observaron nuevos sitios polimórficos que se repetían en más de un individuo y sitios de nucleótidos únicos (SNPs, por sus siglas en inglés, Single Nucleotide Polymorphism), los cuales sólo se observaron en un individuo; cabe destacar que estos sitios no han sido reportados en otras secuencias depositadas por otros estudios. Los marcadores moleculares utilizados en este estudio han sido reportados como los más utilizados para realizar análisis de polimorfismos porque pueden identificar los principales Alelos de *T. gondii* y las cepas atípicas o exóticas denominadas como Cepas No Arquetípicas (Fazaeli et al., 2000; Zakimi et al., 2006).

Estudios realizados en Iran y Yucatán (México) en muestras humanas y de animales silvestres se observaron nuevos sitios polimórficos de *T. gondii* nunca antes reportados en otras secuencias con los marcadores moleculares Alt. SAG2, GRA6 y Apico (Cubas-Atienzar et al., 2018) (Rezanezhad et al., 2020), también se encontraron SNPs que son de gran importancia ya que como señala Wendte et al.,

2011, al encontrar estos sitios pueden describirse diferentes Alelos a los ya conocidos. Los estudios de estos Alelos son de gran importancia debido a que la diversidad y recombinación genética de este parásito están produciendo nuevos mecanismos patogénicos (Demar et al., 2012b).

Las secuencias panameñas analizadas mostraron altos porcentajes de identidad (98-100%) con las secuencias de referencias para los Alelos I, II y III y con estudios realizados en varias regiones del mundo como Estados Unidos, Australia, Suiza, Irán e Italia. En estos estudios se analizaron aislados de humanos, carnes para el consumo y animales silvestres con los genes Alt. SAG2 y GRA6 (Brennan et al., 2016; Battisti et al., 2018; Scimeca et al., 2020; Hosseini et al., 2023; Miller et al., 2023; Pardo et al., 2023; Scherrer et al., 2024). La diferencia observada fue apenas del 2% entre el total de secuencias comparadas. Estos datos nos sugieren que la población de *T. gondii* en Panamá también tiene una estructura mayoritariamente clonal como ha sido observada en otras regiones (Sibley et al., 2009; Webster, 2010).

Con el marcador Alt. SAG2 no se encontraron secuencias panameñas en el Alelo I. Sin embargo, en el Alelo II las secuencias de las muestras A7A y A7B fueron 100% idénticas a un roedor (*Arvicola amphibius*), y el resto de las secuencias panameñas fueron diferentes y mostraron porcentajes de identidad entre el 98 y 99% con estudios realizados en Suiza, Italia e Irán (Arshadi et al., 2019; Battisti et al., 2018; Karimi et al., 2022). Las secuencias panameñas identificadas como Alelo III mostraron porcentajes de identidad del 98% con respecto a las cepas de referencias CTG y VEG, sin embargo, mantuvieron los sitios polimórficos que definen el Alelo III. Estas secuencias también mostraron una identidad del 98% con secuencias reportadas en estudios realizados en humanos en Irán (Arshadi et al., 2019).

Con el marcador Apico las secuencias P2B, P3A, P3B, P4A, P4B, P7A, P7B, fueron idénticas a la secuencia del Alelo I (cepa RH), ya que no se encontraron sitios de polimorfismo que fueran diferentes a esta secuencia, esta homología también ha sido encontrada en otros estudios en Irán y Nigeria realizados en muestras humanas y animales de consumo (Mousavi et al., 2016; Nzelu et al., 2021). Además; también

es importante recalcar que estas secuencias panameñas para el gen Apico fueron idénticas a secuencias de sangre humana en Irán (Karimi et al., 2022), esto podría indicar que Alelos que circulan en animales silvestres también se encuentran circulando en mujeres embarazadas. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios para determinar las posibles relaciones sobre la diversidad genética de *T. gondii* que circulan en las poblaciones de animales silvestres y la relación que pueda existir con los humanos (Wendte et al., 2011c). Por otra parte, las secuencias panameñas P5A y P5B presentaron características idénticas a secuencias reportadas de Irán en *Felis catus* y a las cepas de referencia PTG y PDS (Arshadi et al., 2019). Con el marcador Apico dieciocho secuencias fueron Alelo I y dos clones presentaron características idénticas a la secuencia de referencia para el Alelo II. Sin embargo, en los análisis de genealogía estas secuencias todas salen del mismo nodo sin ninguna separación, debido a que este gen no posee buena señal filogenética para marcar los caminos evolutivos estables en los grupos de *T. gondii*. El Alelo I se observa con predominancia en el gen Apicoplasto porque al ser comparado con los dos otros genes este es heredado a través de línea materna. (Ferguson et al., 2005). Este resultado concordó con lo reportado por Su et al., 2006 que describió por primera vez el marcador Apico y se pudo comprobar que los Alelos II y III con el gen Apicoplasto eran Alelo I. Otros estudios realizados en Vietnam e Italia con el gen Apicoplasto también reportaron los mismos hallazgos cuando se analizaron secuencias desde aislados de *T. gondii* procedentes de muestras humanas (Dubey et al., 2008).

Con el marcador GRA6 se encontraron dos secuencias panameñas en el Alelo I 100% idénticas a la cepa de referencia RH. En el Alelo II las secuencias de las muestras G3A, G3B, G7B fueron 100% idénticas a secuencias reportadas en otros estudios de humanos, *Rattus rattus* y *Bos taurus* en Irán e Italia (Battisti et al., 2018; Karimi et al., 2022), y el resto de las secuencias panameñas fueron diferentes y mostraron porcentajes de identidad entre el 98 y 99% con estudios realizados en Suramérica (Chikweto et al., 2017). Las secuencias panameñas identificadas como Alelo III mostraron 100% de identidad con respecto a la cepa de referencia CTG y mantuvieron los sitios polimórficos que definen el Alelo III. Estas secuencias también

mostraron una identidad del 98% con secuencias reportadas en estudios realizados en Sangre de humanos en Irán y tejidos de ovinos (Fernández-Escobar et al., 2020; Rezanezhad et al., 2020, Arshadi et al., 2019).

En Panamá se debe realizar un estudio más profundo para determinar los genotipos circulantes con los doce marcadores moleculares que genotifican a *T. gondii*, implementando el uso de aislados lo que ayudaría a comprender los efectos patológicos que puede causar esta infección de manera precisa, ya que en Panamá existen otros estudios realizados con anticuerpos IgG e IgM, donde solo utilizan pruebas de diagnóstico serológicas, donde se obtienen solo datos de seroprevalencia (Montenegro VAN et al., 2014). En relación con los resultados de este estudio es necesario la divulgación científica para llevar a cabo nuevas políticas que protejan a pacientes embarazadas e inmunosuprimidos en todas las regiones del país ya que año tras año se detectan los casos de toxoplasmosis congénita y no se definen estrategias para observar el comportamiento de este parásito a nivel nacional especialmente en las áreas más alejadas donde la educación e información que llega es muy poca. También es importante enfatizar en las instituciones de salud, mejoras en las pruebas de diagnóstico, aplicación de tratamiento a los pacientes que requieran y la prevención mediante hábitos alimenticios que ayudan a disminuir el riesgo por la infección.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- ❖ Los marcadores moleculares Alt. SAG2 y GRA6 permitieron caracterizar las secuencias panameñas dentro de los tres principales alelos de *T. gondii*, además se descartó la presencia de alelos atípicos en las muestras de mujeres embarazadas.
- ❖ Se observaron secuencias panameñas idénticas a secuencias reportadas en regiones de Europa, Asia y África para los Alelos I, II y III, esto nos indica una amplia diseminación y flujo genético del parásito.
- ❖ Los sitios polimórficos nuevos encontrados en las secuencias de Panamá dentro del ciclo doméstico de *T. gondii* son mutaciones que se encuentran fijadas en la población ya que se repitieron en varias secuencias procedentes de distintas muestras, como lo indicó el marcador molecular Alternativo SAG2.
- ❖ En Panamá se encontró los tres principales alelos de *T.gondii* I,II y III circulando en mujeres embarazadas con Toxoplasmosis congénita.
- ❖ En el ciclo doméstico se encontró predominancia de los Alelos II y III con respecto al Alelo I cuando se analizaron en conjunto los marcadores Alt. SAG2 y GRA6. No obstante, el análisis de los marcadores por separado no mostró predominancia entre ellos.
- ❖ Los genes Alternativo SAG2 y GRA6 mostraron ser unos excelentes marcadores moleculares para realizar caracterización genética de muestras de líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y placenta.

Recomendaciones

- ❖ Se recomienda continuar la caracterización Alélica con un número mayor de muestras lo cual permitiría afirmar o descartar la presencia de otros Alelos.
- ❖ Se sugiere a las personas, pertenecientes a los grupos susceptibles como embarazadas y pacientes inmunocomprometidos con riesgo de contraer la infección, evitar el consumo de carnes crudas o mal cocidas y la compra de comida en establecimientos donde se observe pocas prácticas de higiene.
- ❖ Es necesario la divulgación de estudios científicos con la finalidad de construir y realizar campañas de prevención en diversas áreas del país para llevar estrategias de información, educación y comunicación entorno a las medidas de prevención frente a la infección por *T. gondii*.
- ❖ Se deben realizar más estudios genéticos asociados a la epidemiología genética sobre este tema, debido a que esta enfermedad no solo compromete a mujeres embarazadas, sino a la población en general, debido que es una enfermedad oportunista que se activa cada vez que el sistema inmunológico es debilitado por otros factores.

CAPÍTULO VI
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J., ... Villena, I. (2009). Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(8), 1155–1167. <https://doi.org/10.1086/597477>
- Ajzenberg, D., Bañuls, A. L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., y Dardé, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 34(10), 1185–1196. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2004.06.007>
- Ambroise, P., & France, S. (2000). 4 . 1 . *Epidemiology of infection in pregnant women*.
- Arshadi, M., Akhlaghi, L., Meamar, A. R., Alizadeh Ghavidel, L., Nasiri, K., Mahami-Oskouei, M., ... Razmjou, E. (2019). Sero-molecular detection, multi-locus genotyping, and clinical manifestations of ocular toxoplasmosis in patients in northwest Iran. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(4), 195–202. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try137>
- Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & Vectors*, 13(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>
- Bahia-Oliveira, L. M. G., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C. F., Oréfice, F., & Addiss, D. G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 55–62. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>
- Baril, L., Ancelle, T., Goulet, y., Thulliez, P., Tirard-Fleury, V., & Carme, B. (1999). Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 31(3), 305-309.
- Battisti, E., Zanet, S., Trisciuglio, A., Bruno, S., & Ferroglio, E. (2018). Circulating genotypes of *Toxoplasma gondii* in Northwestern Italy. *Veterinary Parasitology*, 253, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.023>
- Bernstein, M., Pardini, L., Carral, L., Gos, M., Moré, G., Kaufer, F., ... Venturini, M. C. (2017). *GENOTIPOS DE TOXOPLASMA GONDII EN CASOS DE TOXOPLASMOSIS AGUDA EN MUJERES GESTANTES EN ARGENTINA. (Toxoplasma gondii genotypes found in acute toxoplasmosis cases in pregnant women in Argentina.)*.

- Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., Mercier, A., Devillard, S., & Ajzenberg, D. (2017). Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 48, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.020>
- Bezerra, R. A., Carvalho, F. S., Guimarães, L. A., Rocha, D. S., Maciel, B. M., Wenceslau, A. A., ... Albuquerque, G. R. (2012). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 189(2–4), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.036>
- Botero D, R. M. (1992). Toxoplasmosis. *Parasitosis Humana. 2a Ed. Medellín: Corporación Para Investigaciones Biológicas*, 241–38.
- Brennan, A., Donahoe, S. L., Beatty, J. A., Belov, K., Lindsay, S., Briscoe, K. A., ... Barrs, V. R. (2016). Comparison of genotypes of *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Australia with latent infection or clinical toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 228, 13–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.008>
- Brito, R. M. de M., de Lima Bessa, G., Bastilho, A. L., Dantas-Torres, F., de Andrade-Neto, V. F., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., & Magalhães, L. M. D. (2023). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in South America: occurrence, immunity, and fate of infection. *Parasites & Vectors*, 16(1), 461. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06080-w>
- Castrejón, M. (2002). Toxoplasmosis congénita. *Boletín de la Sociedad Panameña de Pediatría: Volumen 31, N°1*, 36-39.
- Chikweto, A., Sharma, R. N., Tiwari, K. P., Verma, S. K., Calero-Bernal, R., Jiang, T., ... Dubey, J. P. (2017). Isolation and RFLP Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens (*Gallus domesticus*) in Grenada, West Indies, Revealed Widespread and Dominance of Clonal Type III Parasites. *Journal of Parasitology*, 103(1), 52–55. <https://doi.org/10.1645/15-945>
- Cooper, M. K., Šlapeta, J., Donahoe, S. L., & Phalen, D. N. (2015). Toxoplasmosis in a Pet Peach-Faced Lovebird (*Agapornis roseicollis*). *The Korean Journal of Parasitology*, 53(6), 749–753. <https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.6.749>
- Cook, A. J., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., Semprini, A. E., & Dunn, D. T. (2000). Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 321(7254), 142–147. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>
- Correa, R., Cedeño, 1., de Escobar, C., Fuentes, 1. (2008). Increased urban

- seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. *Veterinary parasitology*, 153(1-2), 9-11.
- Cubas-Atienzar, A. I., Hide, G., Jiménez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A., & Smith, J. E. (2018). Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.009>
- Dabritz, H. A., & Conrad, P. A. (2010). Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 34–52. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01273.x>
- David Sibley, L., Khan, A., Ajioka, J. W., & Rosenthal, B. M. (2009, September 27). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 364, pp. 2749–2761. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 60–73. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x>
- Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., & Villena, I. (2021). Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of congenital infections. *Parasitology*, 148(12), 1406. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001013>
- Dubey, J. P., Su, C., Oliveira, J., Morales, J. A., Bolaños, R. V., Sundar, N., ... Shen, S. K. (2006). Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. *Veterinary Parasitology*, 139(1–3), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.031>
- Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126(1–2), 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>
- Dubey, J. P., Hill, D. E., Jones, J. L., Hightower, A. W., Kirkland, E., Roberts, J. M., ... Gamble, H. R. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *The Journal of Parasitology*, 91(5), 1082–1093. <https://doi.org/10.1645/GE-683.1>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). *Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts* † (Vol. 11).
- Dubey, J. P., Miller, N. L., & Frenkel, J. K. (1970). *Toxoplasma gondii* life cycle in cats.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 157(11), 1767–1770.

Dubey, J P, Rajendran, C., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., ... Jones, J. L. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 41(8), 827–833. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.006>

Dubey, J P, Sundar, N., Hill, D., Velmurugan, G. V, Bandini, L. A., Kwok, O. C. H., ... Su, C. (2008). High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.012>

Dubey, Jitender P, Verma, S. K., Villena, I., Aubert, D., Geers, R., Su, C., ... Krecek, R. C. (2016). Toxoplasmosis in the Caribbean islands: literature review, seroprevalence in pregnant women in ten countries, isolation of viable *Toxoplasma gondii* from dogs from St. Kitts, West Indies with report of new *T. gondii* genetic types. *Parasitology Research*, 115(4), 1627–1634. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4900-6>

Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, 26(4), 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

Etheredge, G. D., Michael, O., Muehlenbein, M. P., Frenkel, J. K. (2004). The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. *Revista Panamericana de Salud pública/Pan American Journal of Public Health*, 16(3), 176-186. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892004000900004>.

Feitosa, T. F., Ribeiro Vilela, V. L., de Almeida-Neto, J. L., dos Santos, A., de Moraes, D. F., Alves, B. F., ... Pena, H. F. J. (2017). High genetic diversity in *Toxoplasma gondii* isolates from pigs at slaughterhouses in Paraíba state, northeastern Brazil: Circulation of new genotypes and Brazilian clonal lineages. *Veterinary Parasitology*, 244(July), 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.017>

Fern, N. R., & Garc, P. (2017). *en la toxoplasmosis*. 60, 7–18.

Fernández-Escobar, M., Calero-Bernal, R., Benavides, J., Regidor-Cerrillo, J., Guerrero-Molina, M. C., Gutiérrez-Expósito, D., ... Ortega-Mora, L. M. (2020). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Spanish sheep flocks. *Parasites & Vectors*, 13(1), 396. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04275-z>

- Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., & Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PloS One*, 9(3), e90203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>
- Frenkel, J. K., Hassanein, K. M., Hassanein, R. 5., Brown, E., Thulliez, P., & QuinteroNunez, R. (1995). Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a fiveyear prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 53(5), 458-468. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.458>.
- Halonen, S. K., & Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. *Handbook of Clinical Neurology*, 114, 125–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>
- Hamilton, C. M., Kelly, P. J., Bartley, P. M., Burrells, A., Porco, A., Metzler, D., ... Katzer, F. (2015). *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasites & Vectors*, 8(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0776-7>
- Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(10), 634–640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- Hill, D. E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H. R., & Dubey, J. P. (2010). Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 53–59. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01275.x>
- Hosseini, S. A., Sharif, M., Sarvi, S., Mirzaei, N., Abediankenari, S., Arefkhah, N., ... Daryani, A. (2023). Identification and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from congenital infection in north of Iran. *Parasitology Research*, 122(1), 177–184. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07714-1>
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561–1566. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2001). *Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M., McQuillan, G., Navin, T., & McAuley, J. B. (2001). *Toxoplasma gondii* Infection in the United States: Seroprevalence

- and Risk Factors. *American Journal of Epidemiology*, 154(4), 357–365. <https://doi.org/10.1093/aje/154.4.357>
- Jones, J. L., Ogunmodede, F., Scheftel, J., Kirkland, E., Lopez, A., Schulkin, J., & Lynfield, R. (2003). Toxoplasmosis-related knowledge and practices among pregnant women in the United States. *Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology*, 11(3), 139–145. <https://doi.org/10.1080/10647440300025512>
- Jones, J., Lopez, A., & Wilson, M. (2003). Congenital toxoplasmosis. *American Family Physician*, 67(10), 2131–2138.
- Kalantari, R., Sadraei, J., Pirestani, M. and Esmaeili Fallah, M. (2015). Genotyping of *Toxoplasma gondii* in crows and pigeons by GRA6 gene. *Parasitology & Medical Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran 14115-331, Iran*.
- Karimi, P., Shafaghi-Sisi, S., Meamar, A. R., Nasiri, G., & Razmjou, E. (2022). Prevalence and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara cati* Among Stray and Household Cats and Cat Owners in Tehran, Iran. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.927185>
- Khan, A, Fux, B., Su, C., Dubey, J. P., Darde, M. L., Ajioka, J. W., ... Sibley, L. D. (2007). Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14872–14877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702356104>
- Khan, Asis, Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A. L., Rizzo, L. V, Belfort, R. J., ... Sibley, L. D. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), 942–949. <https://doi.org/10.3201/eid1206.060025>
- Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R., & Dubey, J. P. (2006). *Globalization and the population structure of Toxoplasma gondii*. 103(30), 11423–11428.
- Lora, F., Aricapa, H. J., Pérez, J. E., Arias, L. E., Idarraga, S. E., Mier, D., & Gómez, J. E. (2011). Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. *Infectio*, 11(3)
- Markon, A. O., Ryan, K. A., Wadhawan, A., Pavlovich, M., Groer, M. W., Punzalan, C., ... Postolache, T. T. (2020). Risk factors for *Toxoplasma gondii* seropositivity in the Old Order Amish. *Epidemiology and Infection*, 149, e89. <https://doi.org/10.1017/S0950268820002897>

- McLeod, R., Boyer, K. M., Lee, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., ... Grigg, M. E. (2012). Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(11), 1595–1605. <https://doi.org/10.1093/cid/cis258>
- Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M. P., de Thoisy, B., Bonnabau, H., ... Dardé, M.-L. (2011). Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11(6), 1378–1387. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.003>
- Minot, S., Melo, M. B., Li, F., Lu, D., Niedelman, W., Levine, S. S., & Saeij, J. P. J. (2012). Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13458–13463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117047109>
- Miller, M. A., Newberry, C. A., Sinnott, D. M., Batac, F. I., Greenwald, K., Reed, A., ... Shapiro, K. (2023). Newly detected, virulent *Toxoplasma gondii* COUG strain causing fatal steatitis and toxoplasmosis in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1116899>
- Montenegro VAN, & Otros Autores: Escala, Mélida, Sáenz-Llorens, X. (2014). *Seroprevalencia de infección de Toxoplasma gondii en mujeres embarazadas por medio de detección de anticuerpos IgG e IgM anti T. gondii y su impacto en el recién nacido, que asisten a la Maternidad del Hospital Santo Tomás en el periodo de 1 de junio – 30.*
- Montoya, J G, & Liesenfeld, O. (2004). *Toxoplasmosis*. 363, 1965–1976.
- Montoya, Jose G, & Remington, J. S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(4), 554–566. <https://doi.org/10.1086/590149>
- Mousavi, M., Saravani, R., Modrek, M. J., Shahrakipour, M., & Sekandarpour, S. (2016). Detection of *Toxoplasma gondii* in diabetic patients using the nested PCR assay via RE and B1 genes. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(2). <https://doi.org/10.5812/jjm.29493>
- Nicholas, C. W., Green, P. A., Hawkins, R. D., & Williams, C. (1997). Carbohydrate intake and recovery of intermittent running capacity. *International Journal of Sport Nutrition*, 7(4), 251–260. <https://doi.org/10.1123/ijnsn.7.4.251>

- Nzelu, I. N., Kwaga, J. K. P., Kabir, J., Lawal, I. A., Beazley, C., Evans, L., & Blake, D. P. (2021). Detection and genetic characterisation of toxoplasma gondii circulating in free-range chickens, pigs and seropositive pregnant women in benue state, Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009458>
- Ortiz-Alegría, L. B., Caballero-Ortega, H., Cañedo-Solares, I., Rico-Torres, C. P., Sahagún-Ruiz, A., Medina-Escutia, M. E., & Correa, D. (2010). Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes and Immunity*, *11*(5), 363–373. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.21>
- Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, *39*(12), 1385–1394. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>
- Pardo Gil, M., Hegglin, D., Briner, T., Ruetten, M., Müller, N., Moré, G., ... Basso, W. (2023). High prevalence rates of *Toxoplasma gondii* in cat-hunted small mammals - Evidence for parasite induced behavioural manipulation in the natural environment? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *20*, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.01.007>
- Paul, M. (1998). Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis. *Przeglad epidemiologiczny*, *52*(4), 447-454
- Pereira, K. S., Franco, R. M. B., & Leal, D. A. G. (2010). Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, *60*, 1–19. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60001-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60001-0)
- Pinto-Ferreira, F., Caldart, E. T., Pasquali, A. K. S., Mitsuka-Breganó, R., Freire, R. L., & Navarro, I. T. (2019). Patterns of Transmission and Sources of Infection in Outbreaks of Human Toxoplasmosis. *Emerging Infectious Diseases*, *25*(12), 2177–2182. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181565>
- Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Hasseine, L., Darde, M.-L., & Marty, P. (2011, July). Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 17, pp. 1327–1328. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101642>
- Rajendran, C., Su, C., & Dubey, J. P. (2012). Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(2), 359–368.
- Rengifo-Herrera, C., Pile, E., García, A., Pérez, A., Pérez, D., Nguyen, F. K., Caballero, Z. (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pets

from metropolitan regions of Panama. *Parasite*, 24, 9.

Restrepo Giraldo, M. L. (2008). Toxoplasmosis. *Medicina y Laboratorio*, 14(7), 359-375.

Rezanezhad, H., Solhjoo, K., Sharifzadeh, M., Jahromi, Z., Shadmand, E., & Shahabi, S. (2020). Toxoplasma gondii Infection among Drug Addict in Southern Iran. *Parasitology Dept, Jahrom University of Medical Sciences, Shahid Motahari, Jahrom, Fars 0098, Iran*.

Rojas, G. (2003). Incidencia de Toxoplasma en niños prematuros de 0-4 meses de edad, departamento de neonatología, programa de alto riesgo, Complejo Hospitalario Metropolitano Caja del Seguro Social. Mayo 2001 mayo 2002 (Tesis de maestría). Universidad de Panamá, Panamá.

Saadatnia, G., & Golkar, M. (2012). A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44(11), 805–814. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>

Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., & Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*, 21(10), 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.001>

Sáenz, R., Narváez, E., Quiróz, E. (1984). Seroprevalencia de la Toxoplasmosis Durante el Primer Trimestre del Embarazo Informe Preliminar de Estudio Prospectivo de 25 Toxoplasmosis Adquirida Durante el Embarazo. *Revista Médica de Panamá*, Vol. 9, No. 1, 1-7.

Sáenz, R. (1985). Diagnóstico y Tratamiento de la Toxoplasmosis Durante el Embarazo. *Revista Médica de Panamá*, Vol. 10, No. 3, 145-151.

Scimeca, R. C., Perez, E., Fairbanks, W. S., Ammar, S., Su, C., Gerhold, R. W., & Reichard, M. V. (2020). Seroprevalence, DNA isolation, and genetic characterization of Toxoplasma gondii from black bear (Ursus americanus) sera collected in Eastern Oklahoma. *Parasitology Research*, 119(3), 1109–1115. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06535-z>

Shwab, E. K., Zhu, X., Majumdar, D., Hilda, F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). *Geographical patterns of Toxoplasma gondii genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping*. 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>

Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., ... Sibley, L. D. (2012). Globally diverse Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(15), 5844–5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J., ... Villena, I. (2009). Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(8), 1155–1167. <https://doi.org/10.1086/597477>

Ambroise, P., & France, S. (2000). 4 . 1 . *Epidemiology of infection in pregnant women*.

Arshadi, M., Akhlaghi, L., Meamar, A. R., Alizadeh Ghavidel, L., Nasiri, K., Mahami-Oskouei, M., ... Razmjou, E. (2019). Sero-molecular detection, multi-locus genotyping, and clinical manifestations of ocular toxoplasmosis in patients in northwest Iran. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(4), 195–202. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try137>

Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & Vectors*, 13(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>

Bahia-Oliveira, L. M. G., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C. F., Oréface, F., & Addiss, D. G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 55–62. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>

Battisti, E., Zanet, S., Trisciuglio, A., Bruno, S., & Ferroglio, E. (2018). Circulating genotypes of *Toxoplasma gondii* in Northwestern Italy. *Veterinary Parasitology*, 253, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.023>

Bernstein, M., Pardini, L., Carral, L., Gos, M., Moré, G., Kaufer, F., ... Venturini, M. C. (2017). *GENOTIPOS DE TOXOPLASMA GONDII EN CASOS DE TOXOPLASMOSIS AGUDA EN MUJERES GESTANTES EN ARGENTINA. (Toxoplasma gondii genotypes found in acute toxoplasmosis cases in pregnant women in Argentina.)*.

- Bezerra, R. A., Carvalho, F. S., Guimarães, L. A., Rocha, D. S., Maciel, B. M., Wenceslau, A. A., ... Albuquerque, G. R. (2012). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 189(2–4), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.036>
- Botero D, R. M. (1992). Toxoplasmosis. *Parasitosis Humana. 2a Ed. Medellín: Corporación Para Investigaciones Biológicas*, 241–38.
- Brennan, A., Donahoe, S. L., Beatty, J. A., Belov, K., Lindsay, S., Briscoe, K. A., ... Barrs, V. R. (2016). Comparison of genotypes of *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Australia with latent infection or clinical toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 228, 13–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.008>
- Chikweto, A., Sharma, R. N., Tiwari, K. P., Verma, S. K., Calero-Bernal, R., Jiang, T., ... Dubey, J. P. (2017). Isolation and RFLP Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens (*Gallus domesticus*) in Grenada, West Indies, Revealed Widespread and Dominance of Clonal Type III Parasites. *Journal of Parasitology*, 103(1), 52–55. <https://doi.org/10.1645/15-945>
- Cooper, M. K., Šlapeta, J., Donahoe, S. L., & Phalen, D. N. (2015). Toxoplasmosis in a Pet Peach-Faced Lovebird (*Agapornis roseicollis*). *The Korean Journal of Parasitology*, 53(6), 749–753. <https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.6.749>
- Cubas-Atienzar, A. I., Hide, G., Jiménez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A., & Smith, J. E. (2018). Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.009>
- Dabritz, H. A., & Conrad, P. A. (2010). Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 34–52. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01273.x>
- David Sibley, L., Khan, A., Ajioka, J. W., & Rosenthal, B. M. (2009, September 27). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 364, pp. 2749–2761. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance. *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 60–73. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01274.x>
- Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., & Villena, I. (2021). Congenital toxoplasmosis in humans: an update of worldwide rate of

congenital infections. *Parasitology*, 148(12), 1406.
<https://doi.org/10.1017/S0031182021001013>

Dubey, J. P., Su, C., Oliveira, J., Morales, J. A., Bolaños, R. V., Sundar, N., ... Shen, S. K. (2006). Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. *Veterinary Parasitology*, 139(1–3), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.031>

Dubey, J. P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126(1–2), 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>

Dubey, J. P., Hill, D. E., Jones, J. L., Hightower, A. W., Kirkland, E., Roberts, J. M., ... Gamble, H. R. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *The Journal of Parasitology*, 91(5), 1082–1093. <https://doi.org/10.1645/GE-683.1>

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). *Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts* † (Vol. 11).

Dubey, J. P., Miller, N. L., & Frenkel, J. K. (1970). *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 157(11), 1767–1770.

Dubey, J. P., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., ... Jones, J. L. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 41(8), 827–833. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.006>

Dubey, J. P., Sundar, N., Hill, D., Velmurugan, G. V., Bandini, L. A., Kwok, O. C. H., ... Su, C. (2008). High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.012>

Dubey, Jitender P., Verma, S. K., Villena, I., Aubert, D., Geers, R., Su, C., ... Krecek, R. C. (2016). Toxoplasmosis in the Caribbean islands: literature review, seroprevalence in pregnant women in ten countries, isolation of viable *Toxoplasma gondii* from dogs from St. Kitts, West Indies with report of new *T. gondii* genetic types. *Parasitology Research*, 115(4), 1627–1634. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4900-6>

Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, 26(4), 190–196.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

Feitosa, T. F., Ribeiro Vilela, V. L., de Almeida-Neto, J. L., dos Santos, A., de Moraes, D. F., Alves, B. F., ... Pena, H. F. J. (2017). High genetic diversity in *Toxoplasma gondii* isolates from pigs at slaughterhouses in Paraíba state, northeastern Brazil: Circulation of new genotypes and Brazilian clonal lineages. *Veterinary Parasitology*, 244(July), 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.017>

Fern, N. R., & Garc, P. (2017). *en la toxoplasmosis*. 60, 7–18.

Fernández-Escobar, M., Calero-Bernal, R., Benavides, J., Regidor-Cerrillo, J., Guerrero-Molina, M. C., Gutiérrez-Expósito, D., ... Ortega-Mora, L. M. (2020). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Spanish sheep flocks. *Parasites & Vectors*, 13(1), 396. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04275-z>

Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., & Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PloS One*, 9(3), e90203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>

Flores, C., Villalobos-Cerrud, D., Borace, J., Fábrega, L., Norero, X., Sáez-Llorens, X., Moreno, M. T., Restrepo, C. M., Llanes, A., Quijada R, M., Ladrón De Guevara, M., Guzmán, G., de la Guardia, V., García, A., Lucero, M. F., Wong, D., Mcleod, R., Soberon, M., & Caballero E, Z. (2021). Epidemiological Aspects of Maternal and Congenital Toxoplasmosis in Panama. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(6), 764. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060764>

Halonen, S. K., & Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. *Handbook of Clinical Neurology*, 114, 125–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>

Hamilton, C. M., Kelly, P. J., Bartley, P. M., Burrells, A., Porco, A., Metzler, D., ... Katzer, F. (2015). *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasites & Vectors*, 8(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0776-7>

Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(10), 634–640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>

Hill, D. E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H. R., & Dubey, J. P. (2010). Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey

- (Swine 2006). *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 53–59. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01275.x>
- Hosseini, S. A., Sharif, M., Sarvi, S., Mirzaei, N., Abediankenari, S., Arefkhah, N., ... Daryani, A. (2023). Identification and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from congenital infection in north of Iran. *Parasitology Research*, 122(1), 177–184. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07714-1>
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561–1566. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2001). *Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M., McQuillan, G., Navin, T., & McAuley, J. B. (2001). *Toxoplasma gondii* Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors. *American Journal of Epidemiology*, 154(4), 357–365. <https://doi.org/10.1093/aje/154.4.357>
- Jones, J. L., Ogunmodede, F., Scheffel, J., Kirkland, E., Lopez, A., Schulkin, J., & Lynfield, R. (2003). Toxoplasmosis-related knowledge and practices among pregnant women in the United States. *Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology*, 11(3), 139–145. <https://doi.org/10.1080/10647440300025512>
- Jones, J., Lopez, A., & Wilson, M. (2003). Congenital toxoplasmosis. *American Family Physician*, 67(10), 2131–2138.
- Kalantari, R., Sadraei, J., Pirestani, M. and Esmaeili Fallah, M. (2015). Genotyping of *Toxoplasma gondii* in crows and pigeons by GRA6 gene. *Parasitology & Medical Entomology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran 14115-331, Iran*.
- Karimi, P., Shafaghi-Sisi, S., Meamar, A. R., Nasiri, G., & Razmjou, E. (2022). Prevalence and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara cati* Among Stray and Household Cats and Cat Owners in Tehran, Iran. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.927185>
- Khan, A, Fux, B., Su, C., Dubey, J. P., Darde, M. L., Ajioka, J. W., ... Sibley, L. D. (2007). Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14872–14877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702356104>
- Khan, Asis, Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A. L., Rizzo, L. V, Belfort, R. J., ...

- Sibley, L. D. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), 942–949. <https://doi.org/10.3201/eid1206.060025>
- Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R., & Dubey, J. P. (2006). *Globalization and the population structure of Toxoplasma gondii*. 103(30), 11423–11428.
- Markon, A. O., Ryan, K. A., Wadhawan, A., Pavlovich, M., Groer, M. W., Punzalan, C., ... Postolache, T. T. (2020). Risk factors for *Toxoplasma gondii* seropositivity in the Old Order Amish. *Epidemiology and Infection*, 149, e89. <https://doi.org/10.1017/S0950268820002897>
- McLeod, R., Boyer, K. M., Lee, D., Mui, E., Wroblewski, K., Karrison, T., ... Grigg, M. E. (2012). Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009). *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(11), 1595–1605. <https://doi.org/10.1093/cid/cis258>
- Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M. P., de Thoisy, B., Bonnabau, H., ... Dardé, M.-L. (2011). Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11(6), 1378–1387. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.003>
- Miller, M. A., Newberry, C. A., Sinnott, D. M., Batac, F. I., Greenwald, K., Reed, A., ... Shapiro, K. (2023). Newly detected, virulent *Toxoplasma gondii* COUG strain causing fatal steatitis and toxoplasmosis in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1116899>
- Montenegro VAN, & Otros Autores: Escala, Mélida, Sáenz-Llorens, X. (2014). *Seroprevalencia de infección de Toxoplasma gondii en mujeres embarazadas por medio de detección de anticuerpos IgG e IgM anti T. gondii y su impacto en el recién nacido, que asisten a la Maternidad del Hospital Santo Tomás en el periodo de 1 de junio – 30.*
- Montoya, J G, & Liesenfeld, O. (2004). *Toxoplasmosis*. 363, 1965–1976.
- Montoya, Jose G, & Remington, J. S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(4), 554–566. <https://doi.org/10.1086/590149>
- Mousavi, M., Saravani, R., Modrek, M. J., Shahrakipour, M., & Sekandarpour, S.

- (2016). Detection of *Toxoplasma gondii* in diabetic patients using the nested PCR assay via RE and B1 genes. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(2). <https://doi.org/10.5812/jjm.29493>
- Nicholas, C. W., Green, P. A., Hawkins, R. D., & Williams, C. (1997). Carbohydrate intake and recovery of intermittent running capacity. *International Journal of Sport Nutrition*, 7(4), 251–260. <https://doi.org/10.1123/ijnsn.7.4.251>
- Nzelu, I. N., Kwaga, J. K. P., Kabir, J., Lawal, I. A., Beazley, C., Evans, L., & Blake, D. P. (2021). Detection and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* circulating in free-range chickens, pigs and seropositive pregnant women in benue state, Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009458>
- Ortiz-Alegría, L. B., Caballero-Ortega, H., Cañedo-Solares, I., Rico-Torres, C. P., Sahagún-Ruiz, A., Medina-Escutia, M. E., & Correa, D. (2010). Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes and Immunity*, 11(5), 363–373. <https://doi.org/10.1038/gene.2010.21>
- Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385–1394. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>
- Pardo Gil, M., Hegglin, D., Briner, T., Ruetten, M., Müller, N., Moré, G., ... Basso, W. (2023). High prevalence rates of *Toxoplasma gondii* in cat-hunted small mammals - Evidence for parasite induced behavioural manipulation in the natural environment? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 20, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.01.007>
- Pereira, K. S., Franco, R. M. B., & Leal, D. A. G. (2010). Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 60, 1–19. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60001-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60001-0)
- Pinto-Ferreira, F., Caldart, E. T., Pasquali, A. K. S., Mitsuka-Breganó, R., Freire, R. L., & Navarro, I. T. (2019). Patterns of Transmission and Sources of Infection in Outbreaks of Human Toxoplasmosis. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), 2177–2182. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181565>
- Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Hasseine, L., Darde, M.-L., & Marty, P. (2011, July). Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 17, pp. 1327–1328. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101642>
- Rajendran, C., Su, C., & Dubey, J. P. (2012). Molecular genotyping of *Toxoplasma*

gondii from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 359–368.

Rezanezhad, H., Solhjoo, K., Sharifzadeh, M., Jahromi, Z., Shadmand, E., & Shahabi, S. (2020). Toxoplasma gondii Infection among Drug Addict in Southern Iran. *Parasitology Dept, Jahrom University of Medical Sciences, Shahid Motahari, Jahrom, Fars 0098, Iran*.

Saadatnia, G., & Golkar, M. (2012). A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44(11), 805–814. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>

Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., & Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*, 21(10), 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.001>

Scimeca, R. C., Perez, E., Fairbanks, W. S., Ammar, S., Su, C., Gerhold, R. W., & Reichard, M. V. (2020). Seroprevalence, DNA isolation, and genetic characterization of Toxoplasma gondii from black bear (Ursus americanus) sera collected in Eastern Oklahoma. *Parasitology Research*, 119(3), 1109–1115. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06535-z>

Shwab, E. K., Zhu, X., Majumdar, D., Hilda, F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of Toxoplasma gondii genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>

Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., ... Sibley, L. D. (2012). Globally diverse Toxoplasma gondii isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5844–5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

Su, C., Zhang, X., & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of Toxoplasma gondii by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, 36(7), 841–848.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). Toxoplasma gondii: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

Thierman, E. (1973). Toxoplasmosis. Monografía No.23. Colección de Monografías Biológicas, Universidad de Chile.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>