

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

“Frecuencia y caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en animales silvestres procedentes del Parque Nacional Soberanía”

Evelyn del Carmen Henríquez Carrizo

Trabajo de graduación presentado a la Escuela de Biología, como requisito parcial para optar por el Título de Maestría en Microbiología Ambiental

Panamá, República de Panamá

2022

Zuleima Caballero, Investigadora de INDICASAT-AIP y Profesora del Programa de Maestría en Microbiología Ambiental de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: EVELYN DEL CARMEN HENRÍQUEZ CARRIZO

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título: FRECUENCIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *TOXOPLASMA GONDII* EN ANIMALES SILVESTRES PROCEDENTES DEL PARQUE NACIONAL SOBERANÍA

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado, y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el 20 de mayo de 2022.

Dedicatoria

Dirigida a mi abuela Paula Justiniani quién fue parte importante en mi vida desde mi infancia hasta mi adultez, quién me enseñó a siempre dar lo mejor de mí.

A mi madre por ser mi ejemplo a seguir, mi inspiración, por inculcarme a no rendirme y que todo lo que deseamos con esfuerzo se puede lograr.

A toda mi familia, especial a mi papá, hermanos, tíos, sobrino, gracias por estar en todos los momentos especiales.

A Dios por guiarme y guardarme en cada paso que doy, porque sin él nada soy.

Agradecimientos

A Dios todopoderoso, por ser mi pastor y guiarme en cada paso que doy, por enseñarme que sus tiempos siempre son los correctos.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) y a la Universidad de Panamá por escogerme como estudiante de la Maestría en Microbiología Ambiental. Al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá (INDICASAT- AIP) por brindarme la oportunidad de utilizar sus instalaciones para poder realizar mi tesis.

Al grupo de investigación de Toxoplasmosis en Panamá liderado por la Dra. Zuleima Caballero E. le agradezco toda su confianza, apoyo, paciencia y consejos desde el día cero, por guiarme en un mundo nuevo para mí como lo era la biología molecular.

A mis compañeras veterinarias, la Dra. Alessandra Jurado, quien fue la primera estudiante del grupo que me apoyó con la estandarización de las primeras metodologías, a las licenciadas Anabel García y Lorena Fábrega, por ayudarme con las necropsias. También quiero agradecer muy especialmente a la Licda. Delba Villalobos y Ryan Cano, por guiarme y darme todos sus consejos. A todos mis otros compañeros por haber compartido momentos especiales en este caminar.

A mis profesores en la Universidad de Panamá, los Doctores. Alex Martínez y Jordi Querol por toda la orientación recibida y por permitir seguir mis análisis en el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA). También a la Dra. Nidia Sandoval y a la Mgtr. Nivia Ríos por su confianza, guía, correcciones y sus mensajes de motivación.

La Dra. Carolina de la Guardia y al Dr. Armando Castillo por enseñarle la técnica de clonación y por las correcciones a mi tesis. A todos los demás compañeros del INDICASAT- AIP por siempre brindarme toda la colaboración que necesité.

Al Parque Municipal Summit, en especial a los Doctores. Diorene Smith y Bernardo Castillo por apoyarme en la logística de las muestras de animales silvestres y en las necropsias.

A mis familiares que desde el día cero han estado conmigo impulsandome a seguir hacia adelante. Agradezco a todas las personas que forman parte de mi vida, los cuales siempre me han guiado y motivado a ser mejor cada día.

Contenido

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	v
Índice general	viii
Índice de figuras	x
Índice de cuadros	xi
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Hipótesis de Trabajo	8
Justificación	8
CAPÍTULO I	9
1.1.1 Generalidades del parásito	10
1.1.2 Clasificación taxonómica	10
1.1.3 Filo Apicomplexa	11
1.1.4 Clase Sporozoa	12
1.1.5 Orden Eucoccidida	12
1.1.6 Familia Sarcocystidae	13
1.2 Ciclo biológico	13
1.2.1. Formas de <i>T. gondii</i>	14
1.2.2 Ooquistes	15
1.2.3 Taquizoitos	15
1.2.4 Bradizoitos	16
1.3 Vías de transmisión	17
1.3.1 Vía oral	17
1.3.2 Vía vertical	18
1.3.4 Trasplantes de tejidos y órganos	18
1.3.5 Transmisión sexual	18
1.3.6 Contacto con mucosas	19

1.4 Epidemiología	19
1.5 Manifestaciones clínicas	21
1.5.1 Toxoplasmosis adquirida	21
1.5.2 Toxoplasmosis congénita	22
1.5.3 Toxoplasmosis ocular	23
1.6 Diagnóstico	23
1.6.1 Métodos indirectos	23
1.6.2 Métodos directos	24
1.7 Tratamiento	25
1.8 Caracterización genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
1.9 Antecedentes en Panamá	28
1.9.1 Toxoplasmosis en animales silvestres	28
1.9.2 Estudios sobre Toxoplasmosis en animales domésticos	31
CAPÍTULO II	33
Materiales Y Métodos	34
2.0 Materiales y métodos	34
2.1 Descripción	34
2.1.1 Área de estudio	34
2.1.2 Tipo de muestra	35
2.1.3 Extracción de ADN	35
2.1.4 Cuantificación de muestras de ADN en NanoDrop	36
2.1.5 Detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras de animales silvestres por medio de la técnica de PCR y utilizando como marcador molecular el gen B	37
2.1.6. PCR-RFLP – Genotipificación de <i>Toxoplasma gondii</i> en tejidos de animales silvestres	38
2.1.7. Análisis del producto de PCR mediante electroforesis	42
2.1.8. Preparación del gel de agarosa	42
2.1.9. Preparación de muestras y marcador	42
2.1.10. Análisis estadísticos	42
CAPÍTULO III	43
Resultados	44
3.1. Frecuencia de infección de <i>Toxoplasma gondii</i> en animales silvestres	44

3.1.1 Frecuencia de infección de <i>T. gondii</i> en animales silvestres utilizando el gen B1, como marcador molecular	44
3.1.2 Porcentaje de positividad para diferentes órganos obtenidos en aves, mamíferos y reptiles utilizando el gen B1.	45
3.1.3 Genotipificación directa mediante la técnica RFLP-PCR en muestras de tejidos de animales silvestres.	46
Capítulo IV. Discusión	56
Capítulo V. Conclusiones y recomendaciones	61
Recomendaciones	63
Capítulo VI. Referencias bibliográficas	64
Anexos	79

Índice de Figuras

Figura 1. Árbol filogenético de los esporozoos (Apicomplexa/ Alveolata), clasificados por la importancia médica veterinaria y humana. (Fuente: Beck et al., 2009).	11
Figura 2. Morfología de los parásitos apicomplexos. (Fuente: Baum et al., 2006).	12
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> . (Fuente: Robert-Gangneux & Dardé, 2012).	14
Figura 4. Forma del quiste esporulado y no esporulado de <i>T. gondii</i> . (Fuente: (Dubey, 2010).	15
Figura 5. Taquizoito de <i>Toxoplasma gondii</i> . (Fuente: Bobbi Pritt, 2019).	16
Figura 6. Quiste tisular de <i>Toxoplasma gondii</i> de una emulsión cerebral. (Fuente: Paris, 2019).	17
Figura 7. Transmisión de ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> (Fuente: Bahia-Oliveira et al., 2017).	19
Figura 8. Estado global de la seroprevalencia de Toxoplasmosis congénita (Fuente: Pappas et al., 2009).	20
Figura 9. Distribución geográfica de los principales haplotipos de <i>T. gondii</i> (Fuente: Chunlei Su et al., 2012).	21

Figura 10. Resonancia magnética del cerebro del paciente con encefalitis por toxoplasma. (Fuente: Paris, 2019).	22
Figura 11. Toxoplasmosis ocular activa. (Fuente: Paris, 2019)	23
Figura 12. Distribución geográfica de los genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> .	25
Figura 13. Localización de las especies muestreadas, Parque Nacional Soberanía	36
Figura 14. Medición de la concentración de ADN de los animales silvestres en NanoDrop	36
Figura 15. Porcentaje total de animales silvestres positivos para <i>T. gondii</i> con el marcador molecular Gen B1	45
Figura 16. Porcentaje de positividad para la infección por <i>T. gondii</i> en poblaciones de animales silvestres procedentes del Parque Nacional Soberanía	46
Figura 17. Porcentaje de positividad en los diferentes órganos analizados para aves y mamíferos procedentes del Parque Nacional Soberanía.	47
Figura 18. PCR-RFLP alt. SAG2.	48
Figura 19. Digestión enzimática para el fragmento del gen GRA6 utilizando la enzima de restricción MseI.	51
Figura 20. PCR-RFLP SAG1.	52
Figura 21 PCR-RFLP SAG3.	53
Figura 22. PCR-RFLP APICO.	54

Índice de Cuadros

Tabla 1. Genotipificación de <i>Toxoplasma gondii</i> en diferentes regiones a nivel mundial.....	27
Tabla 2. Mezcla de ligación Tabla 2. Marcadores moleculares utilizados en el PCR-RFLP en muestras de ADN de animales silvestres	40

Tabla 3. Caracterización molecular de *T. gondii* en muestra de ADN de animales silvestres

.....49

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado con la capacidad de infectar a una gran diversidad de animales como mamíferos, aves y reptiles. La principal vía de transmisión es por la ingesta de alimentos contaminados con quistes tisulares y ooquistes del parásito, así como también por ambientes contaminados (suelo y agua), que facilitan la transmisión a diferentes hospedadores intermediarios y definitivos. Se han realizado diversos estudios a nivel mundial para conocer la frecuencia y genotipos que circulan en ambientes domésticos y silvestres, clasificando tres linajes principales denominados como I, II y III. También se ha demostrado que circulan otras cepas o aislados que debido a su variabilidad genética son diferentes de los linajes principales; a estos se les conoce como exóticos o atípicos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar genéticamente a *Toxoplasma gondii* en muestras de tejidos de animales silvestres procedentes del Parque Nacional Soberanía y analizar su frecuencia de infección. Fueron analizados 140 animales (77 aves, 46 mamíferos y 17 reptiles), de los cuales se colectaron 684 muestras de tejido a partir del cerebro, corazón, músculo esquelético, ojo, hígado y pulmón. Se observó una frecuencia de infección de *T. gondii* de 60% (84/140). De esta población las aves representaron un 61%, los mamíferos un 60.87% y los reptiles un 52.94% de infección. También se observó una migración homogénea de *T. gondii* entre los 7 tejidos analizados. El linaje Tipo III no fue identificado en las muestras analizadas, A través de los marcadores moleculares SAG1, Alt.SAG2, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, GRA6 y APICO se demostró una mayor frecuencia del linaje tipo II. El linaje tipo I se observó recombinado con el linaje tipo II. También se encontró una muestra que no presentó el patrón de bandas característicos de los tres linajes principales, sin embargo, no se descarta la posibilidad que este genótipo esté circulando en ambientes silvestres. Nuestros hallazgos sugieren que los ambientes en Panamá (suelo y agua) están altamente contaminados con ooquistes; esto es promovido por el clima tropical húmedo y las altas precipitaciones que facilitan la propagación y permanencia del parásito en hospedadores intermediarios y hospedadores definitivos.

Palabras claves: Panamá, animales silvestres, *Toxoplasma gondii*, genotipificación

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite with the ability to infect a wide diversity of animals such as mammals, birds and reptiles. The main route of transmission is through the ingestion of food contaminated with tissue cysts or oocyst of the parasite. Also by contaminated environments (soil and water) that facilitate transmission to different intermediate and definitive hosts. Several studies have been carried out worldwide to know the frequency and genotypes that circulate in domestic and wild environments, classifying three main lineages called I, II and III. It has also been shown that other strains or isolated circulates that due to their genetic variability are different from the main lineages, they are known as exotic or atypical. Therefore, the objective of this study was genetically characterized *Toxoplasma gondii* in samples of wild animals from the Soberanía National Park and analyze its frequency of infection. A total of 140 animals (77 birds, 46 mammals and 17 reptiles) were analyzed, of which 684 tissue samples were collected from the brain, heart, skeletal muscle, eye, liver and lung. A frequency of *T. gondii* infection of 60% (84/140) was observed. From this population the birds represented 61%, the mammals 60.87% and the reptiles 52.94% of infection. A homogeneous migration of *T. gondii* was also observed among the tissues analyzed. Through the molecular markers SAG1, Alt.SAG2, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, GRA6 and APICO, a higher frequency of the type II lineage was found. The type I lineage was observed recombined with the type II lineage. A sample was also found that did not present the pattern of bands characteristic of the three main lineages. Type III lineage was not identified in the analyzed samples, however the possibility that this genotype is circulating in wild environments cannot be ruled out. Our findings suggest that the environments in Panama (soil and water) are highly contaminated with oocysts. This is promoted by the humid tropical climate and the high rainfall that facilitate the propagation and permanence of the parasite in intermediate and definitive hosts.

Keywords: Panama, wild animals, *Toxoplasma gondii*, genotyping

Introducción

La toxoplasmosis es una infección causada por *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular obligado y considerado como uno de los patógenos eucariotas más exitosos en términos de número de hospedadores intermediarios (Dubey, 2009). Las principales vías de transmisión son la ingesta de quistes tisulares del parásito presentes en carnes crudas o poco cocidas y la ingesta de agua, verduras y frutas contaminadas con ooquistes provenientes de las heces de los felinos. En ambientes silvestres el agua y los suelos contaminados sirven como fuentes de infección para una gran diversidad de animales (Dubey, 2009).

En animales, específicamente en los domésticos, se han realizado diversos estudios para conocer la prevalencia y los genotipos que circulan en tejidos de un gran número de especies (Biancifiori, *et al.*, 1986; Brennan *et al.*, 2016; Rêgo *et al.*, 2017; Algaba *et al.*, 2020). Por otro lado, las investigaciones en animales silvestres son limitadas, por lo que se conoce poco sobre el impacto de estos animales en el ciclo biológico del parásito (Yai *et al.*, 2009; Cabral *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2014).

Se ha determinado que el parásito tiene diferentes estructuras de subpoblación según las regiones geográficas. Por ejemplo: en América del Norte y Europa se observa una estructura de población clonal con los 3 linajes predominantes (denominados tipos I, II y III). En el 2011, en esta misma región geográfica se describió un cuarto linaje clonal, denominado de tipo 12. Este linaje, proveniente de muestras de animales silvestres y fue definido por varias metodologías como: electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) y análisis de microsatélite (Khan *et al.*, 2011; Ajzenberg *et al.*, 2002). En cambio, en América del Sur se observa una gran diversidad de genotipos de *T. gondii* designados como los aislados "atípicos" o "exóticos" (Ajzenberg *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2006). En Brasil fueron caracterizados linajes clonales comunes, los cuales fueron designados como tipos BrI, BrII, BrIII y BrIV (Pena *et al.*, 2008).

Panamá gracias a su posición geográfica es reconocida como el punto donde se dio el Gran Intercambio Biótico Americano y gracias a esto en la actualidad cuenta con

una gran biodiversidad de especies, sin embargo, no se han realizados estudios para conocer la frecuencia de infección del parásito y se desconoce cuáles son los genotipos que circulan en ambientes domésticos y silvestres.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar genéticamente el parásito *Toxoplasma gondii* en muestras de tejidos de animales silvestres y analizar su frecuencia de infección.

Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de infección de *T. gondii* en tres clases de animales, específicamente aves, mamíferos y reptiles.
- Evaluar la diversidad genética y la frecuencia de infección de *T. gondii* entre cinco tipos de órganos procedentes de aves, mamíferos y reptiles.

Hipótesis de Trabajo

- Ha: Existe una alta frecuencia y diversidad genética de *T. gondii* en animales silvestres procedentes del Parque Nacional Soberanía.

Justificación

Estudiar la variabilidad genética del parásito en animales silvestres, nos permitirá conocer los principales genotipos que están circulando en ambientes contiguos al área metropolitana, posibles asociaciones con su hospedero y su preferencia hacia cierto tipo de tejidos. A través de este análisis, también podremos entender la dinámica de la enfermedad en ambos ambientes y verificar qué genotipos atípicos pueden estar circulando en ambientes urbanos y si estos genotipos pueden estar causando patologías inusuales a las ya conocidas hasta ahora.

En Panamá se ha reportado niveles altos de seroprevalencia para la toxoplasmosis y no existe un programa de control de esta parasitosis, pues todavía se realizan estudios. Los dos ciclos del parásito, el doméstico y el silvestre, pueden intercambiar variantes adaptadas a uno de ellos y ocasionar brotes en el otro, que incluso pueden ser mortales. Por lo anterior, para mejorar la eficacia en las estrategias de control del patógeno es esencial conocer la dinámica adaptativa de las poblaciones a través de su caracterización.

CAPÍTULO I

1.0 Revisión bibliográfica

1.1.1 Generalidades del parásito

Toxoplasma gondii, fue aislado por primera vez en el bazo e hígado del roedor salvaje *Ctenodactylus gondii*, en el norte de África por Nicolle y Manceaux (1908). Paralelamente, en Brasil, Alfonso Splendore lo describió en tejidos de conejos de laboratorio. Este microorganismo fue considerado como un nuevo parásito intracelular y lo nombraron como *Toxoplasma gondii* (*Toxoplasma* del griego toxon: arcos y *gondii* por el nombre del roedor). Años más tarde, fue identificado en diversas aves y mamíferos y se le designó con el nombre genérico de *Toxoplasma*, seguido del nombre del propio animal de donde fue aislado (*T. cuniculi*, *T. canis*, *T. avium*) (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b). Sin embargo, después de comparar el comportamiento biológico de estas especies, se unificó el nombre a *T. gondii* (Gómez, 2004).

1.1.2 Clasificación taxonómica

El parásito pertenece al Reino Protista, Filo Apicomplexa, Clase Sporozoa, Subclase Coccidia, Orden Eucoccidida, Suborden Eimeriina, Familia Sarcocystidae, Género *Toxoplasma*, Especie *Toxoplasma gondii* (figura 1) (Petersen & Dubey, 2001). Otros miembros pertenecientes a esta familia son los coccidios que afectan a los bovinos, causando abortos como la *Neospora caninum*; *Besnoitia besnoiti* agente causal de la besnoitiosis y también se incluye la *Hammondia hammondi*, que necesita de los felinos como sus hospedadores definitivos y que a la vez es un protozooario muy relacionado con *T. gondii* (Raiden *et al.*, 2013).

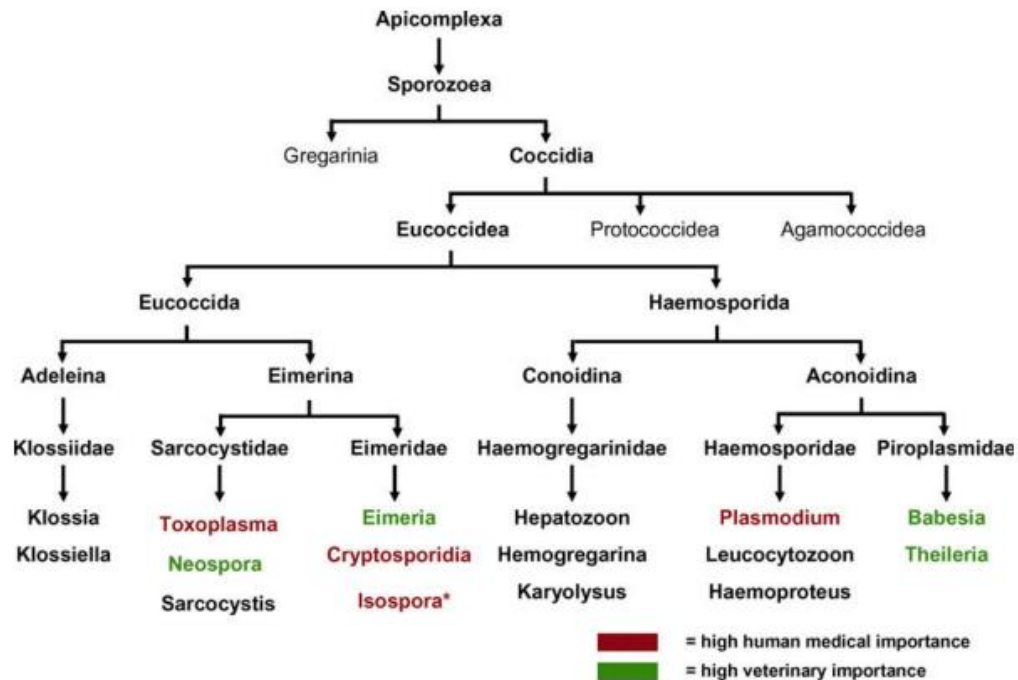


Figura 1. Árbol filogenético de los esporozoos (Apicomplexa/ Alveolata), clasificados por la importancia médica veterinaria y humana. (Fuente: Beck *et al.*, 2009).

1.1.3 Filo Apicomplexa

El filo Apicomplexa comprende un conjunto grande y heterogéneo de parásitos intracelulares obligados de importancia médica y veterinaria, con amplia distribución geográfica. La característica principal es que poseen una estructura denominada complejo apical, del cual deriva su nombre. Este complejo está construido alrededor del conoide y posee micronemas, roptrias, anillos polares, granulos densos y microtúbulos. Esta región está involucrada en la unión, invasión, replicación y patogenicidad en la célula hospedadora (Hu *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2009).

Otros miembros del filo incluyen especies del género *Plasmodium sp.*, donde se encuentra el *Plasmodium falciparum*, agente causal de uno de los tipos de malaria más severos. Dentro de este filo también se incluyen parásitos de importancia veterinaria como *Eimeria spp.*, patógeno de aves y ganado vacuno; *Cryptosporidia*, un patógeno oportunista humano y animal; y *Babesia* y *Theileria*, parásitos del ganado. El éxito de estas especies está asociado con sus ciclos biológicos complejos, cantidad de hospederos, diversidad reproductiva (esporogonia,

gametogonia y esquizogonia) y capacidad de invasión a la célula hospedera (Hu *et al.*, 2006).

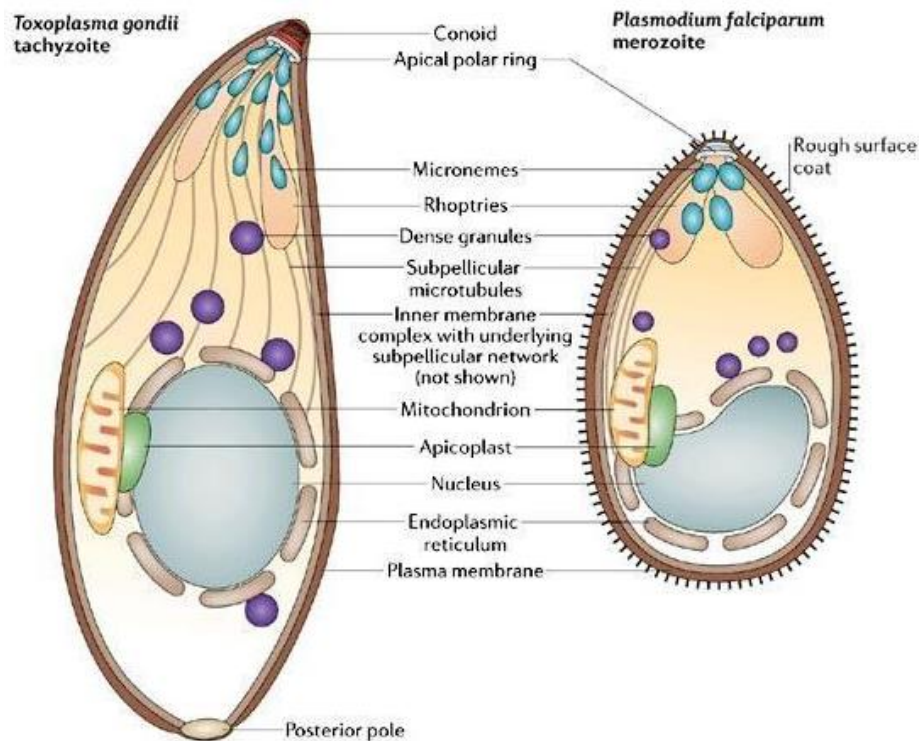


Figura 2. Morfología de los parásitos apicomplexos. (Fuente: Baum *et al.*, 2006).

1.1.4 Clase Sporozoa

Una de las características de la Clase Sporozoa es que todos sus miembros son parásitos intracelulares obligados, pueden presentar formas ovaladas, alargadas y/o esféricas y generan cápsulas protectoras conocidas como esporas, que carecen de filamentos polares. Los trofozoitos maduros son pequeños e intracelulares. Los géneros que pertenecen a esta clase son *Babesia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Plasmodium sp.*, y *Toxoplasma gondii* (Sacks & Sher, 2004).

1.1.5 Orden Eucoccidida

Incluye a protozoos intracelulares que se ubican en las células sanguíneas y epiteliales de vertebrados e invertebrados. El ciclo de vida comprende fases sexuales y asexuadas. El representante de esta orden es el género *Cryptosporidium spp.*, que se transmite al medio ambiente mediante quistes

resistentes (ooquistes); una vez ingeridos causan una infección gastrointestinal en una amplia variedad de mamíferos, incluyendo el hombre (Coco *et al.*, 2009).

1.1.6 Familia Sarcocystidae

Los protozoos que pertenecen a esta familia pueden presentar una fase sexual (hospedador definitivo) y una fase asexual (hospedador intermediario). La principal característica del género es la de formar quistes musculares con tabiques que delimitan cavidades internas con numerosos zoitos (fase vegetativa del parásito que se replica). Los géneros de interés sanitarios que se incluyen en esta familia son dos: *Toxoplasma* y *Sarcocystis* (Dubey & Lindsay, 2006).

1.2 Ciclo biológico

El complejo ciclo de vida de *T. gondii* facilita los modos de transmisión tanto clonales como sexuales. Aunque muchos vertebrados sirven como hospederos intermediarios para la replicación asexual, el desarrollo sexual está restringido al epitelio intestinal de los felinos, que desprenden millones de ooquistes, los cuales alcanzan la maduración en el medio ambiente (Dubey *et al.*, 2014).

En los hospedadores intermediarios, después de la ingestión del ooquiste del parásito, la pared es destruida por las enzimas gástricas. Los bradizoitos se liberan y penetran dentro de los enterocitos, donde experimentan un número autolimitante de multiplicaciones asexuales (endodiogenia), caracterizadas por el desarrollo de merozoitos dentro de los esquizontes. La conversión de taquizoitos a bradizoitos, puede deberse a múltiples factores como una disminución de la replicación (G0 inactivo), por estrés exógeno (reducción de nutrientes), estrés térmico y/o conversión espontánea (Skariah *et al.*, 2010). Los quistes de tejido surgen de 7 a 10 días después de la infección y pueden permanecer durante toda la vida en tejidos como el cerebro, hígado, pulmón, musculatura y ojo. Este proceso ocurre en la mayoría de los hospederos, estableciendo la fase crónica de la enfermedad (Jones & Dubey, 2010).

En los felinos se produce el desarrollo sexual, con la formación de gametos masculinos y femeninos (gametogonía) (Ferguson, 2002). Después de la fertilización, los ooquistes formados dentro de los enterocitos, se liberan por la

disrupción de la célula y se excretan como formas no esporuladas en las heces de los felinos. La maduración ocurre unos días después en el entorno externo y da como resultado, un ooquiste esporulado con dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoitos haploides. El desprendimiento de los ooquistes comienza de 3 a 7 días después de la ingestión de quistes de tejido y puede continuar hasta 20 días. Los felinos infectados pueden arrojar más de 100 millones de ooquistes en sus heces (Jones & Dubey, 2010).

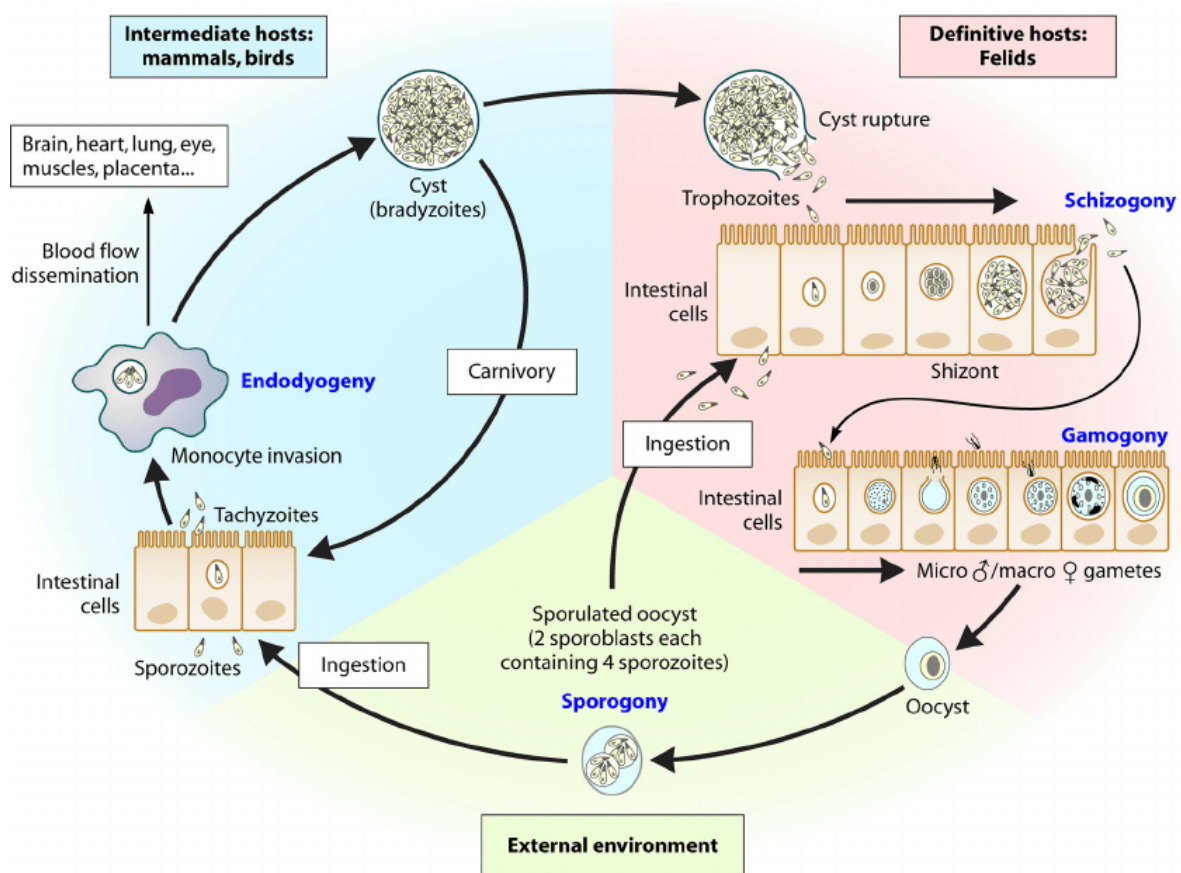


Figura 3. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. (Fuente: Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

1.2.1. Formas de *T. gondii*

Este parásito presenta 3 etapas infecciosas para todos los hospederos: esporozoito (etapa ambiental, protegido dentro de un ooquiste), tachizoitos (multiplicación rápida) y bradizoitos (multiplicación lenta, presentes en quistes de tejidos) (Ferguson, 2002).

1.2.2 Ooquistes

Sólo están presente en el hospedador definitivo (los felinos), en dos tipos de formas, ooquistes no esporulados y ooquiste esporulado. Los ooquistes no esporulados (esféricos y miden entre 10 y 12 μm de diámetro) son eliminados en las heces de felinos infectados y son resistentes a las condiciones climáticas. Por su parte, los ooquistes esporulados (elipsoidales y miden de 11 a 13 μm de diámetro), poseen dos esporoquistes, con cuatro esporozoitos en su interior y son la forma infectiva en el ambiente (Jones & Dubey, 2010).



Figura 4. Forma del quiste esporulado y no esporulado de *T. gondii*. (Fuente: (Dubey, 2010).

1.2.3 Taquizoitos

La forma de taquizoitos es la fase de diseminación del parásito en los diferentes hospederos intermediarios y es la forma que origina la fase aguda de la enfermedad. Presenta una forma de media luna, de aproximadamente 5 μm de largo y 2 μm de ancho, con un extremo apical puntiagudo y un extremo posterior redondeado. Está conformado por organelas secretoras (Roptrias), poseen un núcleo, una mitocondria, un complejo de Golgi, ribosomas y un retículo endoplásmico. Son de rápida multiplicación dentro de la vacuola parasitófora y pueden migrar hacia diversos órganos, logrando colonizarlos muy rápidamente. (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b).

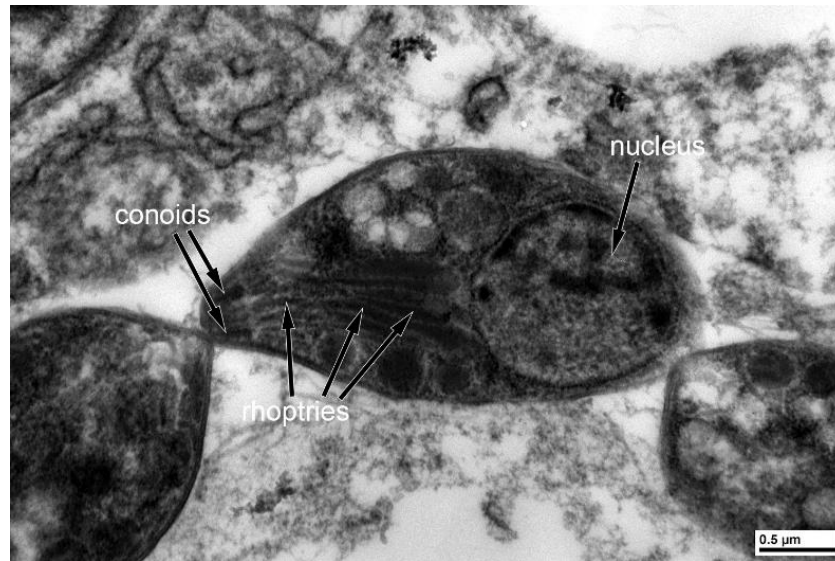


Figura 5. Taquizoito de *Toxoplasma gondii* (Fuente: Pritt, 2019).

1.2.4 Bradizoitos

Los bradizoitos son la etapa crónica (latencia) de la infección. La conversión de los taquizoitos, dentro de los tejidos a bradizoitos, implica la formación de una pared quística en tejidos tales como: cerebro, corazón, hígado, ojo y músculo estriado. Son esferoides y varían de tamaño, dependiendo del estado, los quistes jóvenes tienen un tamaño de 10 μm (con dos bradizoitos) y los quistes maduros miden alrededor de 100 μm (con cientos a miles de bradizoitos empacados). Los bradizoitos no causan respuesta inflamatoria a menos que el sistema inmune del hospedador se vea comprometido, dando lugar a la rotura de la pared del quiste, permitiendo entonces la liberación de los bradizoitos (resistentes a la pepsina ácida). La liberación de los bradizoitos causa sintomatología en los hospederos, tales como hidrocefalia, retinocoroiditis y encefalitis (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b).

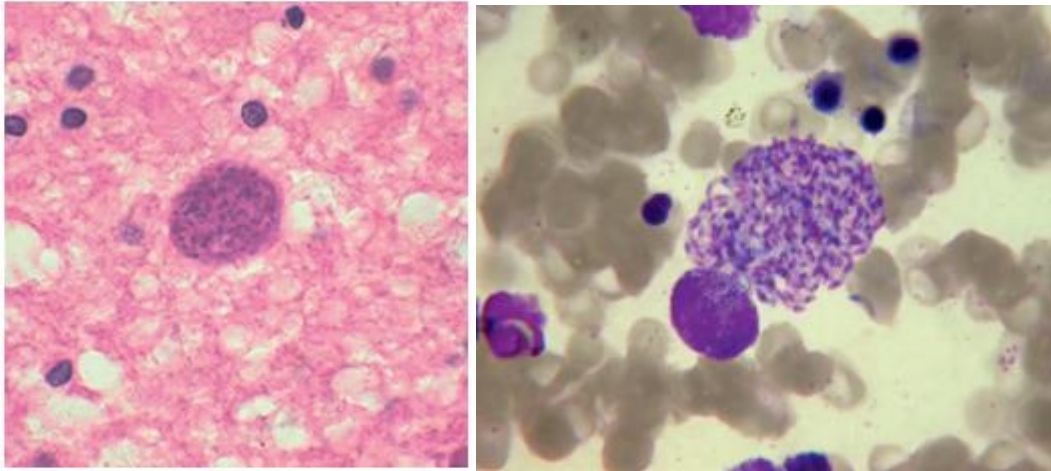


Figura 6. Quiste tisular de *Toxoplasma gondii* de una emulsión cerebral. (Fuente: Paris, 2019).

1.3 Vías de transmisión

1.3.1 Vía oral

Entre las principales vías de transmisión del parásito, podemos mencionar la ingestión de quistes tisulares (de músculos y cerebros de animales infectados), el consumo de agua, frutas y verduras contaminadas con ooquistes del parásito procedentes de las heces felinas (Tenter *et al.*, 2000). Las altas temperaturas, humedad y escorrentías juegan un papel fundamental en la transmisión y mantenimiento del ciclo de vida del parásito en los diversos hospederos intermediarios. También, la falta de medidas sanitarias, tanto animal como humana, puede incrementar la prevalencia de la infección (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b).

En la última década, también se ha investigado la presencia de *Toxoplasma gondii* en animales acuáticos, tales como ~~las~~ almejas filtradoras de las aguas, que retienen en sus lamelas los ooquistes del parásito. Por lo tanto, ahora se considera una nueva ruta de infección por medio de la ingesta de productos del mar contaminados. Es así como *Toxoplasma gondii* ahora es un problema epidemiológico significativo, por ~~las~~ costumbres de consum~~iros_de~~ este alimento a nivel mundial (Shapiro *et al.*, 2019).

1.3.2 Vía vertical

En humanos y animales mamíferos principalmente, la transmisión vertical se da cuando la madre adquiere una primoinfección por medio de la ingesta de quistes en tejidos, agua y alimentos contaminados con ooquistes del parásito. Los taquizoitos pueden colonizar los tejidos placentarios durante su proceso de diseminación y desde allí pueden acceder al feto. La inmunidad materna se desarrolla cuando hay contacto con el parásito previo al embarazo, sin embargo, en casos de madres con sistemas inmunológicos comprometidos y dependiendo del periodo de gestación, puede hasta causar la muerte del feto (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b).

1.3.4 Trasplantes de tejidos y órganos

Una fuente de contaminación importante son los materiales de laboratorio, colecta de médula ósea (al momento de recolección), que pueden tener muestras viables del parásito (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b). Las transfusiones de sangre contaminada con *T. gondii* es otra forma de contaminación reconocida en el hombre desde la década de los 60. Se ha encontrado altas prevalencias de infección en receptores seronegativos de trasplantes cardíacos y hepáticos. Por lo que los nuevos protocolos exigen diversas evaluaciones tanto en órganos como en sangre para evitar la transmisión (Payá *et al.*, 2012).

1.3.5 Transmisión sexual

Esta vía de transmisión ha sido poco documentada. Las primeras pruebas se obtuvieron con la experimentación de animales seronegativos, como ovejas y perros. En ovejas inseminadas artificialmente con semen que contenía 4×10^7 taquizoitos, por PCR se identificó el parásito en las ovejas inoculadas (de Moraes *et al.*, 2010). En seres humanos se ha encontrado el parásito en testículos, túbulos seminíferos, células de Sertoli y macrófagos testiculares post-mortem de un individuo inmunocomprometido (Payá *et al.*, 2012).

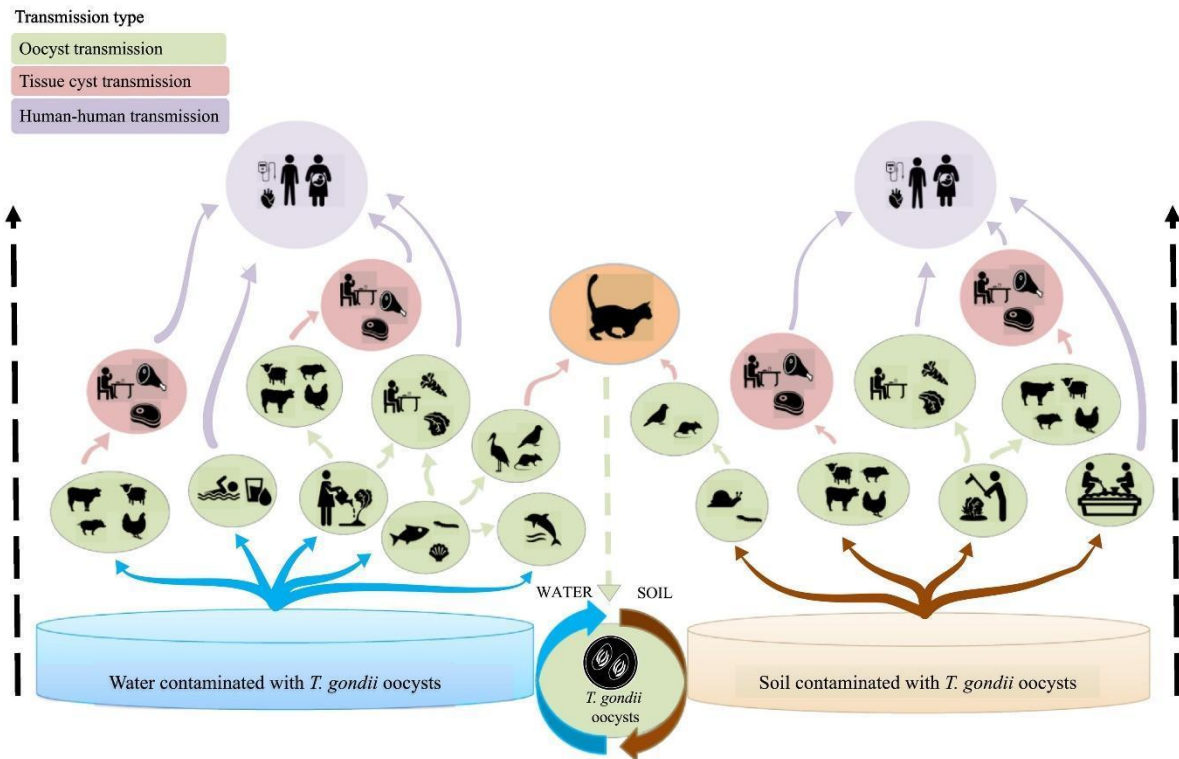


Figura 7. Transmisión de ooquistes de *Toxoplasma gondii* (Fuente: Bahia-Oliveira *et al.*, 2017).

1.3.6 Contacto con mucosas

En menos frecuencia, se ha reportado la inhalación de ooquistes aerolizados provenientes de heces fecales de felinos infectados (Pérez *et al.*, 2011). En Polonia, utilizando la técnica de filtros de gelatina y PCR en tiempo real en muestras de aire provenientes de huertas, áreas recreativas y pozos de arena, determinaron el genotipo I mediante el marcador molecular SAG2 (Lass *et al.*, 2017).

1.4 Epidemiología

En la actualidad se manejan varias teorías de la procedencia del parásito. Por un lado indican un origen sudamericano y por otro, sugieren que gracias al surgimiento del Istmo de Panamá, conjuntamente con la migración de los felinos hacia el sur, dio paso a la gran variabilidad de cepas existente a nivel mundial (A. Khan *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2008).

La toxoplasmosis es una parasitosis ampliamente distribuida a nivel mundial. La seroprevalencia, medida por anticuerpos IgG contra *T. gondii* en humanos, varía en todo el mundo, y se informa que es del 6,7% en Corea, 12,3% en China, 23.9% en Nigeria, 46% en Tanzania y 47% en Francia (área rural) (Furtado et al., 2011). En América del Sur se han reportado porcentajes de 74% en Ecuador, 54.4% en Colombia, 35% en México, y entre 59% y 78% en Brasil (Rosso et al., 2007). La diferencia de prevalencia en las regiones estudiadas se debe a factores climáticos (climas cálidos y húmedos), ubicación geográfica, tipo de cepa, individuos inmunoprometido, tipo de hospedadores, factores socioeconómicos, incluidos los hábitos alimentarios y las prácticas relacionadas con la higiene y salud (Furtado et al., 2011).

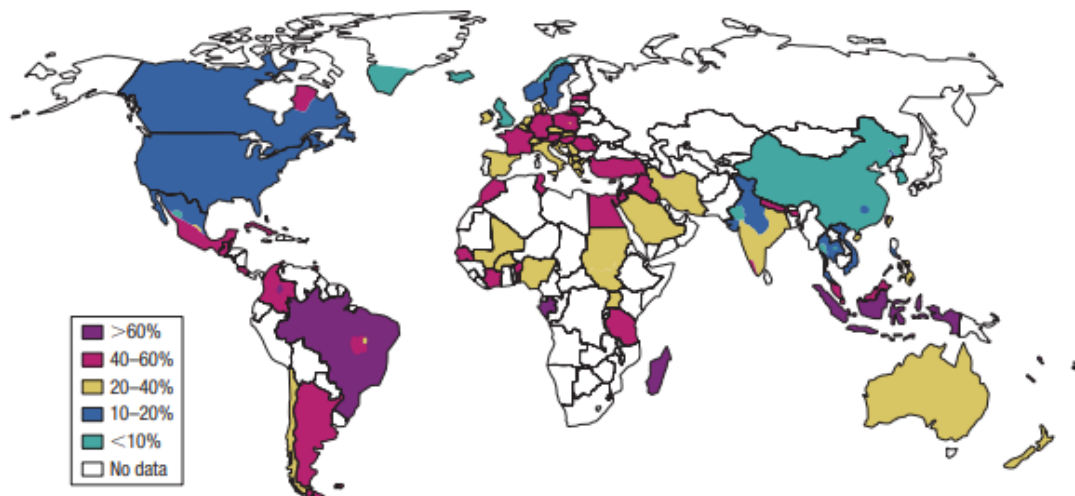


Figura 8. Estado global de la seroprevalencia de Toxoplasmosis congénita (Fuente: Pappas et al., 2009).

En el ambiente, la presencia de *Toxoplasma* está asociado con la contaminación en el suelo y las fuentes de agua, haciendo más fácil el contacto directo con los diferentes hospedadores intermediarios. La presencia de felinos infectados agrava más la diseminación y variabilidad de cepas, debido a que en ellos se da la recombinación sexual (Kaushik et al., 2014). Sin embargo, en la naturaleza intervienen un conglomerado de factores que sirven como facilitadores o barreras contra el parásito, como: susceptibilidad del hospedador, tamaño, edad, peso de los animales, comportamiento y dieta (herbívoros, omnívoros, carnívoros), presencia

de aves migratorias y el aumento de actividades antropogénicas que fragmentan los bosques (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b).

Las investigaciones sobre toxoplasmosis en la vida silvestre, han tomado importancia en las últimas décadas, gracias al aporte de nuevas metodologías que facilitan el estudio. En el 2012 mediante el RFLP-PCR, marcadores de microsatélites y una red filogenética, reconoció un total de 138 genotipos en 15 haplogrupos que definen colectivamente seis clados principales en muestras de diferentes regiones del mundo (Chunlei Su *et al.*, 2012).

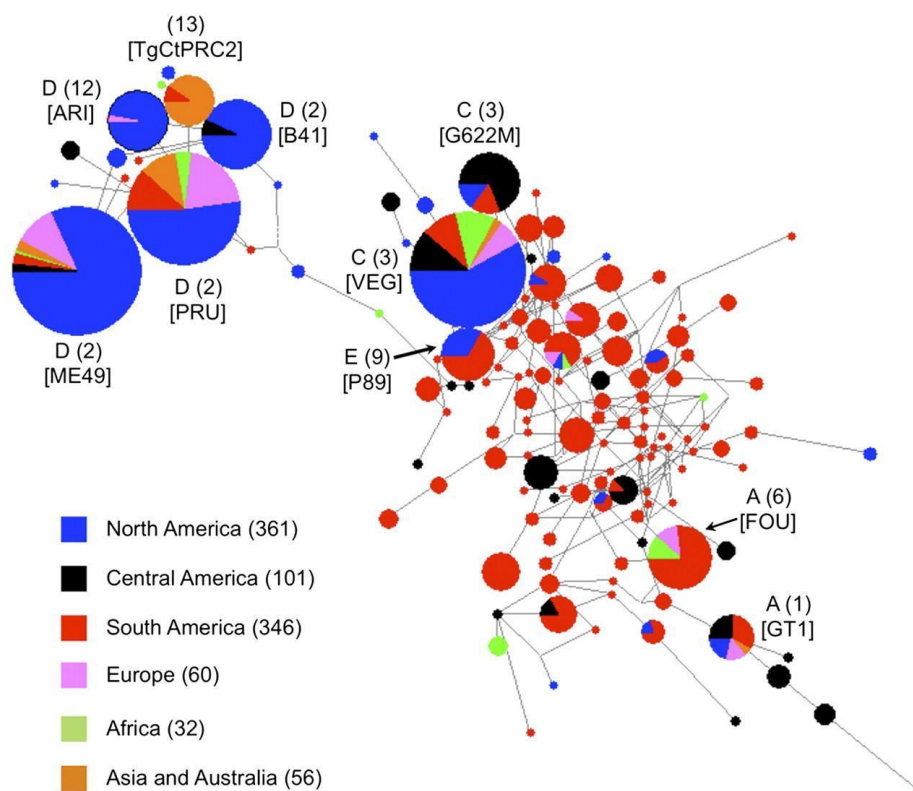


Figura 9. Distribución geográfica de los principales haplotipos de *T. gondii* (Fuente: Su *et al.*, 2012).

1.5 Manifestaciones clínicas

1.5.1 Toxoplasmosis adquirida

En pacientes inmunocompetentes infectados por *T. gondii*, el desarrollo de la enfermedad puede permanecer latente (fase crónica) o presentar síntomas leves durante muchos años. Sin embargo, en individuos inmunosuprimidos, mujeres

embarazadas y pacientes con deficiencia de linfocitos T, la infección puede causar desde trastornos del estado de ánimo (depresión, suicidios), retinocoroiditis, miocarditis, meningoencefalitis, neumonía atípica, hasta la muerte (Hinze-Selch *et al.*, 2010; Flegr *et al.*, 2014).

En pacientes con VIH-SIDA, se puede desarrollar encefalitis toxoplasmática, debido a la reactivación del estado latente (Bradizoitos) (Ho *et al.*, 2008). También, se puede presentar importantes consecuencias oculares y neurológicas en pacientes con trasplantes y cáncer (Flegr *et al.*, 2014).

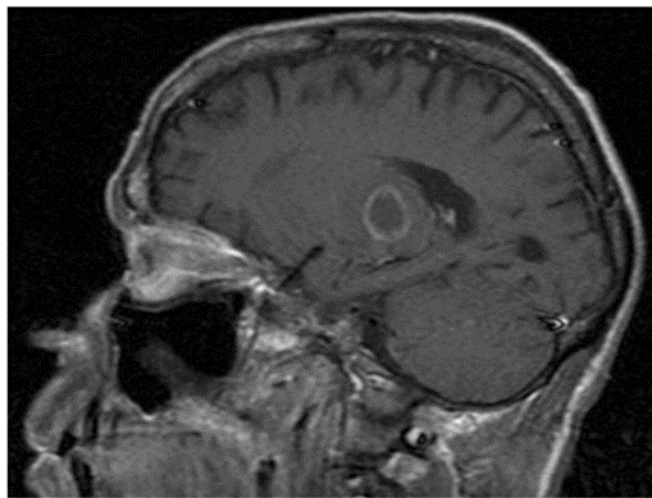


Figura 10. Resonancia magnética del cerebro del paciente con encefalitis por *Toxoplasma*. (Fuente: Paris, 2019).

1.5.2 Toxoplasmosis congénita

La toxoplasmosis congénita ocurre con una primoinfección durante el embarazo. La gravedad del daño fetal dependerá de la cepa, trimestre de embarazo, y del sistema inmune de la madre (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b). La placenta permite la transmisión al feto en 30% a 60% durante el tercer trimestre y más cerca del parto (Montoya & Remington, 2008). Sin embargo, el 80% de los casos infectados en el tercer trimestre no presentan sintomatologías.

En el primer trimestre, la infección es más severa en el feto, el cual presenta daño multisistémicos hasta la muerte. En recién nacidos se ha observado hepatomegalia, esplenomegalia, hiperbilirrubinemia, anemia, trombocitopenia, coriorretinitis y en

diversas edades de la infancia se desarrolla ceguera, trastornos físicos y mentales, que le dificultará el normal desenvolvimiento dentro de la sociedad (Robert-Gangneux & Dardé, 2012b).

1.5.3 Toxoplasmosis ocular

Se presenta una infección ocular primaria o recurrente que, generalmente, persiste durante 2 a 4 meses o se mantiene en estado latente (forma crónica), esta última se desarrolla si el sistema del individuo presenta una inmunosupresión y puede desencadenar afecciones a nivel de retina y nervio óptico (conocidas como faro de niebla), neuritis óptica, iridociclitis y, en raras ocasiones, panuveitis (Holland, 2004).

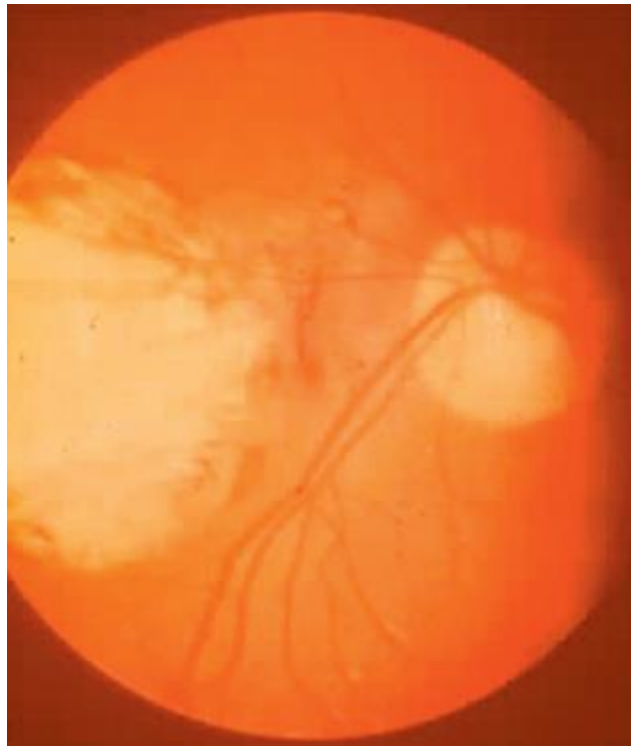


Figura 11. Toxoplasmosis ocular activa. (Fuente: Paris, 2019).

1.6 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la toxoplasmosis en humanos y animales se pueden usar métodos directos e indirectos.

1.6.1 Métodos indirectos

El método indirecto, se basa en el serodiagnóstico, que detectan diferentes anticuerpos o antígenos. Estas pruebas miden diferentes niveles y tipos de

anticuerpos, incluidos IgM, IgG, IgA e IgE, los cuales aumentan y disminuyen durante o después de la infección, manteniéndose en niveles detectables por varios meses o años, lo cual es una característica de la fase crónica de la infección (Rorman *et al.*, 2006). Entre los métodos indirectos más utilizados están: la prueba de tinte Sabin-Feldman (SFDT), pruebas de aglutinación, ensayo fluorescente indirecto (IFA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) o una combinación de estos métodos (Sabin & Feldman, 1948; Robert-Gangneux & Dardé, 2012; Liu *et al.*, 2015; Rorman *et al.*, 2006; Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

1.6.2 Métodos directos

Debido a que los métodos serológicos poseen ciertas limitaciones, en los últimos años se ha utilizado el PCR (La reacción en cadena de la polimerasa- The Polymerase Chain Reaction) para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*, especialmente en matrices como tejidos, fluidos corporales (como el líquido cefalorraquídeo) o el cultivo del parásito (Ybañez *et al.*, 2020). Este método combinado con marcadores como el gen B1 (elemento repetido 35 veces en el genoma de *T. gondii*), el espaciador transcrito interno (ITS-1) o secuencias de ADNr 18S, obtiene una alta sensibilidad y especificidad en la detección de *T. gondii* (Liu *et al.*, 2015).

En la actualidad, en muestras de humanos y animales, se utiliza el PCR-RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción- Restriction Fragment Length Polymorphism). La PCR-RFLP se basa en la capacidad de las endonucleasas de restricción para reconocer sitios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), digerir los productos de PCR y, posteriormente, mostrar distintos patrones de bandas de ADN en la electroforesis en geles de agarosa (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Para estudios epidemiológicos, de diferenciación y distribución de cepa y filogenia, se ha utilizado la técnica PCR-RFLP y se han clonado diferentes genes que codifican las proteínas de *T. gondii*, los cuales incluyen los antígenos de superficie SAG1 (P30), SAG2 (anteriormente P22), SAG3 (anteriormente P43), Rhoptries ROP1 (anteriormente P66), ROP2 (anteriormente

P54) y los densos antígenos granulados GRA6 (anteriormente P32), (Liu *et al.*, 2015). Mediante la técnica de PCR-RFLP se ha podido caracterizar el parásito *T. gondii* a nivel mundial. A través de estos análisis se ha encontrado una mayor variabilidad de genotipos en América del Sur (específicamente en Brasil), que en otras regiones del mundo previamente analizadas (Shwab *et al.*, 2013).

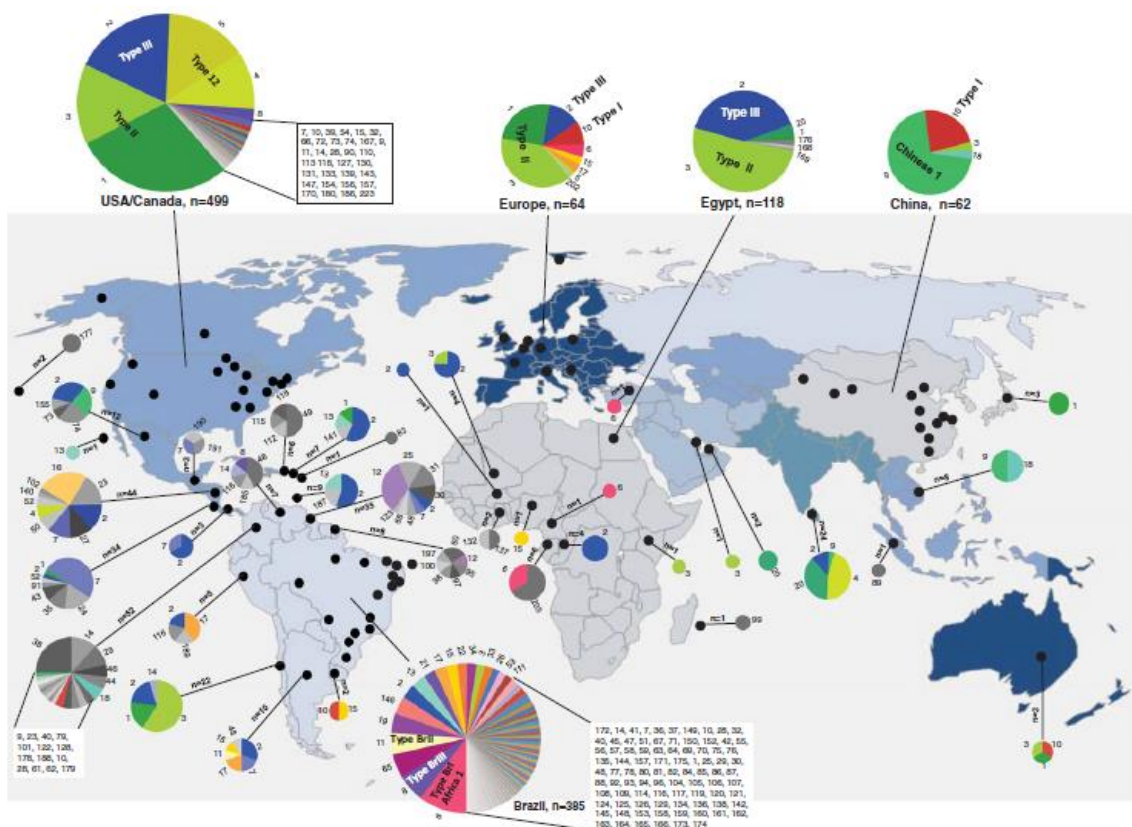


Figura 12. Distribución geográfica de los genotipos de *Toxoplasma gondii*.

1.7 Tratamiento

Debido a la variabilidad de cepas y las diversas manifestaciones clínicas, todavía no se cuenta con un tratamiento eficaz contra este parásito. En pacientes con SIDA y toxoplasmosis ocular el tratamiento consiste en pirimetamina, sulfadiazina y ácido folínico; la clindamicina es utilizada como alternativa en pacientes alérgicos a la sulfadiazina. La profilaxis contra la toxoplasmosis encefálica (TE) consiste en trimetoprima-sulfametoxazol (Montoya & Remington, 2008).

1.8 Caracterización genética de *Toxoplasma gondii*

En los últimos años, se han incrementado las investigaciones en las cuales utilizan diversas técnicas moleculares para el diagnóstico de *T. gondii*, así como en la detección de variantes genéticas que son determinantes para conocer la historia evolutiva de *T. gondii*. Al mismo tiempo, se ha podido comprender mejor la epidemiología y la genética de poblaciones de *T. gondii* debido al uso de nuevas técnicas que presentan una alta sensibilidad y especificidad (Ybañez *et al.*, 2020). Entre estas nuevas técnicas están: el análisis de la homología molecular, el Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), el método de secuenciación de microsatélites, el método de electroforesis de enzimas multilocus MLEE (Multi locus enzyme electrophoresis) y secuenciación de nueva generación (Dubey *et al.*, 2010).

Las metodologías mencionadas y el uso de proteínas que codifican a *Toxoplasma gondii* han servido para poder determinar una gran diversidad de genotipos a nivel mundial. Las proteínas utilizadas incluyen principalmente a los gránulos densos excretados secretados (GRA), Roptrias (ROP1 y ROP2) y los antígenos de superficie (SAG1, SAG2, SAG3) (Ybañez *et al.*, 2020). Estos antígenos fueron unos de los primeros marcadores utilizados para caracterizar al parásito y son abundantes en la superficie de los taquizoitos, con función asociada a la unión, penetración y evasión de la célula hospedera (Burg *et al.*, 1988).

Los SAG2 (antes conocidas como p22) han sido utilizados para serodiagnóstico, inmunoterapias o desarrollo de vacunas y la distinción de los tres linajes principales del parásito (Burg *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2004; Cong *et al.*, 2005; Fazaeli & Ebrahimzadeh, 2007). Sin embargo, ante el aumento de casos a nivel mundial de aislados no reconocidos con la proteína SAG2 y que tenían una mayor virulencia, se agregaron nuevos marcadores genéticos basados en PCR, los cuales se analizaron utilizando enzimas de restricción, con el fin de comprender mejor la distribución mundial, epidemiología molecular y la virulencia de estos genotipos conocidos como "atípicos o exóticos" (Sibley, 2009; Pena *et al.*, 2008). Entre los nuevos marcadores genéticos usados en diversas investigaciones sobre *T. gondii*

tenemos, la Beta-tubulina (BTUB), proteína serina/treonina quinasa (PK1), las proteínas recombinantes c22 –8, c29–2, L358 y el marcador Apico para el genoma del apicoplasto, tal como se presenta en la tabla 1 (Sibley, 2009). Como vemos, el análisis de la homología molecular ha adquirido una gran importancia debido a que logra establecer la diversidad y evolución de las cepas analizadas a nivel mundial (Su *et al.*, 2010).

Tabla 1. Genotipificación de *T. gondii* en diferentes regiones a nivel mundial

País/Región	Marcadores	Animal	Muestra	Resultados	Referencia
América del Norte	SAG1, 5' y 3'-SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22 –8, c29–2, L358, PK1 y Apico	Vida silvestre de América del Norte	Pulmón y cerebro	Linajes Tipo II, Tipo III y un cuarto linaje denominado Tipo 12	(Dubey <i>et al.</i> , 2011)
República Democrática del Congo, Mali, Burkina Faso y Kenia	SAG2	Gallinas de corral	Cerebro y corazón	I, II y III	(Dubey <i>et al.</i> , 2005)
Italia	SAG2	Urracas	Músculo mamario	II, III	(Mancianti <i>et al.</i> , 2020)
Japón	SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, PK1 L358, Apico	Monos ardillas	Cerebro	I, II	(Nishimura <i>et al.</i> , 2019)
México	SAG1, 5'- y 3'-SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 y Apico	Puma	Corazón	#222 (cepa atípica)	(Dubey <i>et al.</i> , 2013)
Costa Rica	SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6	Pollos de corral	Cerebro y corazón	I, III, infección mixta (I/II, I/III)	(Dubey <i>et al.</i> , 2006)

Brasil	SAG1, 5 '+' 3' SAG2, alt. SAG2, SAG3, CS3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 y Apico	Aves silvestres de vida libre	Cerebro y corazón	TgWildBrMG2 y TgWildBrMG4 (cepas atípicas)	(Rêgo <i>et al.</i> , 2018)
Brasil	SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, PK1, L358 y Apico	Gatos salvajes	Cerebro, corazón, pulmón, diafragma hígado	ToxoDB #146 (cepa atípica)	(Melo <i>et al.</i> , 2016)
San Cristóbal	AG1, SAG2 (5'-3 ' SAG2 y alt.SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 y Apico	Pollos de corral	Cerebro	ToxoDB # 141, #13, #264, #265, #141 (cepas atípicas)	(Hamilton <i>et al.</i> , 2017)

Diversas investigaciones realizadas en América Central y del Sur demuestran que no hay un patrón establecido con los linajes principales del parásito, Tipo I, Tipo II y Tipo III. En Costa Rica, se ha demostrado infección mixta en pollos de corral (ver tabla 1); por su parte en Brasil existen cuatro genotipos, los cuales se conocen como cepas brasileñas (BrI, BrII, BrIII y BrIV). También, se han aislado genotipos no clonales o también conocidas como "cepas atípicas", que están relacionadas con el desarrollo de una mayor virulencia en el hospedador (Silva *et al.*, 2014).

1.9 Antecedentes en Panamá

1.9.1 Toxoplasmosis en animales silvestres

Según las últimas estimaciones el Istmo de Panamá surgió hace 3 millones de años y desde ese entonces ha servido como puente natural para la migración de animales entre América del Norte y América del Sur (Woodring, 1966; Buchs *et al.*, 2019). Felinos silvestres como el jaguar, puma, ocelote, tigrillo, yaguarundí y oncilla los podemos encontrar distribuidos a lo largo de todo el país y son responsables de la diseminación de los ooquistes del parásito en el ambiente. Con la presencia de estas 6 especies de felinos silvestres y con un clima húmedo tropical, en Panamá,

se facilita el mantenimiento del parásito en la vida silvestre (Reid, 2009; Dubey *et al.*, 2009). Sin embargo, en Panamá aún no existen estudios de prevalencia de toxoplasmosis en estos tipos de animales silvestres contaminando el ambiente.

En 1949, se iniciaron las investigaciones en animales silvestres para detectar el *T. gondii* por “de Rodaniche & Pinzón”. Ellos describieron la infección por el parásito en cobayos comprados tanto en la ciudad de Panamá como en el interior del país, los cuales fueron criados como mascotas y fuente de alimentos en estas zonas. En la necropsia observaron quistes en el bazo, hígado, pulmón y la pared peritoneal. Debido a que los cobayos son herbívoros, este caso representa una prueba de la ingestión de los ooquistes del *Toxoplasma* a partir del ambiente, además del hecho de generar un problema de salud pública en esa época ya que era utilizado como una alternativa de alimento para las familias (de Rodaniche & Pinzón, 1949).

En agosto de 1953 llegó un caso de un mono cara blanca (*Cebus capucinus*) al Laboratorio del Instituto Conmemorativo Gorgas. El mono estaba moribundo y con sospecha de fiebre amarilla, por lo que fue sacrificado y aprovecharon para tomar suero del animal y con la misma, inocularon ratones para estudiar el desarrollo de la infección. Tres semanas después encontraron quistes de *T. gondii* en el cerebro y pulmón. Esta fue la primera descripción para la comunidad científica de la presencia del parásito en monos de cara blanca. Lamentablemente, en este caso, no hubo reporte de la procedencia del animal, por ende no se pudo identificar si la infección provino de la jungla o si la adquirió en cautiverio, dato importante para entender un poco más sobre la epidemiología del parásito (de Rodaniche, 1954a). Con los parásitos aislados del mono cara blanca, la investigadora Enid de Rodaniche se enfocó en estudiar la susceptibilidad de la enfermedad en otros primates. Rodaniche fue motivada por la existencia de diferentes trabajos publicados a nivel mundial, donde se reportaba un alto grado de resistencia de estos animales, la no existencia de parásitos en los tejidos y ninguna sintomatología asociada (Cowen & Wolf 1945). En su investigación, para la infección experimental, utilizaron 31 monos denominados comúnmente como mono Tití (*Marikina geopfroyi*) y 15 monos nocturnos (*Aotus zonalis*). Ambas especies resultaron ser altamente

sensibles y desarrollaron una infección aguda después de la inoculación por varias vías. Con los resultados obtenidos, se logró una mejor visualización de la infección por *T. gondii* en primates nativos de Panamá (de Rodaniche, 1954b). La investigadora, de Rodaniche comprobó la existencia del parásito en monos, sin embargo, hasta ese momento no se conocía de casos de infección directa por la ingestión de aguas y/o suelos contaminados con el ooquiste del parásito en el Istmo. No fue hasta 1963, que se asoció una infección natural del *T. gondii* en un hormiguero (*Tamandua tetradactyla*) en la cordillera central del Darién. El criterio de identificación se basó tanto por la morfología como por pruebas inmunológicas, dándole validez a los resultados. Esto representó el reconocimiento de un nuevo hospedero para *T. gondii*, así como el primer registro de la infección en un edentado (Walton & Arjona, 1968).

En esta misma provincia, se realizó un estudio de prevalencia de anticuerpo contra toxoplasma en ciertos mamíferos selváticos, favorecido por la construcción de la represa del río Bayano. Se rescataron 180 mamíferos de 22 especies distintas y se les tomó la muestra de sangre antes de liberarlos. Se encontró el anticuerpo en el 11% (21/180) de los mamíferos analizados pertenecientes a grupos de carnívoros, omnívoros y un mirmecófago, sin embargo, un herbívoro y los mamíferos arbóreos resultaron negativos. Se asoció la presencia de *T. gondii* en esta clase de animal debido a la presencia en el área de felinos silvestres como ocelotes y jaguarundis, quienes liberan los ooquistes en el ambiente (Frenkel & Sousa, 1983).

A nivel de diagnóstico, Frenkel y Escajadillo (1987), estudiaron la ruptura de quistes como mecanismo patogénico de la Encefalitis Toxoplásmica mediante la Técnica periódica de ácido schiff, seguida de la hematoxilina (PASH) y la Técnica de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Los quistes aparentemente intactos se identificaron dentro de los nódulos microgliales en desarrollo, en un mono nocturno panameño (*Aotus lemurinus*). Este hecho comprobó por pruebas inmunohistoquímicas, el daño que ocasiona el parásito a nivel cerebral. Esto respalda la hipótesis que la desintegración de los quistes puede dar lugar a

encefalitis clínica en presencia de una inmunidad aparentemente adecuada (Frenkel & Escajadillo, 1987).

Con estos resultados obtenidos de susceptibilidad en el mono nocturno panameño (*Aotus lemurinus*), el siguiente estudio se enfocó en medir la efectividad de la sulfadiazina o la vacuna ts-4 no persistente contra el parásito en 26 animales. La quimiopprofilaxis fue por vía subcutánea con dosis entre 60 a 300 mg de sulfadiazina por día durante 40 días. Cinco monos (19%) sobrevivieron durante más de un año, 10 murieron después de una enfermedad prolongada y 11 murieron tan rápido como los siete controles. La sulfadiazina o la vacuna ts-4 no presentó un efecto protector al hospedero, por lo tanto, no fue exitosa, sin embargo, la sensibilidad observada en estos animales sirvió como referencia en el uso potencial de los mismos para futuros estudios en la búsqueda de una vacuna contra la toxoplasmosis (Escajadillo & Frenkel, 1991).

1.9.2 Estudios sobre Toxoplasmosis en animales domésticos

En 1943 Johnson describe el primer caso de toxoplasmosis en animales domésticos. El mismo se dio en un grupo de palomas mensajeras del Ejército de Estados Unidos en la Zona del Canal de Panamá. Estas se enfermaron repentinamente presentando cuadros de fiebre alta, debilidad, encefalitis y neuritis leves. Las aves, en especial las palomas, son importantes hospederos intermediarios del parásito, debido a que son una de las principales presas de los felinos, además de poseer una amplia distribución geográfica, lo cual facilitan el mantenimiento y propagación del parásito en el ambiente (de Rodaniche & Pinzón 1949).

En esta misma zona, Grocott (1950) informó de un caso de toxoplasmosis en un perro, donde se le encontró el parásito en el músculo cardíaco, siendo así el primer reporte para el país del contacto de *T. gondii* con animales que viven en áreas peridomiciliarias. Podemos observar que la Zona del Canal ya presentaba dos casos en paloma, por lo que se puede proyectar como un ambiente contaminado por los ooquistes del parásito.

Esta conexión, entre perros con el parásito, se confirmó en un estudio realizado en

las regiones de Bayano y San Blas. Los perros se pueden convertir en vectores mecánicos debido a sus hábitos coprofágicos. Además, el posible contacto directo con ambientes contaminados y la cercanía a gatos domésticos, pueden facilitar la permanencia del parásito en el ambiente (Etheredge *et al.*, 2004).

Por otro lado, un estudio realizado en porcinos en 6 provincias de Panamá demostró una alta prevalencia de infección, donde la provincia de Panamá presentó la mayor positividad con un 59.5%. Estos resultados resaltan la importancia de la actualización de normas y protocolos nacionales para la búsqueda de este parásito en carnes para consumo humano, debido al riesgo presente y más cuando estas son poco cocinadas (Correa *et al.*, 2008).

Un reciente estudio realizado en gatos y perros domésticos de diferentes regiones metropolitanas de Panamá determinó, la seroprevalencia del parásito con un 25% en gatos y un 32,23% en perros utilizando un ensayo de inmunoadsorción enzimática indirecta comercial (ELISA). El análisis estadístico indicó que existen variables relevantes relacionadas con la prevalencia del parásito, como la edad de los animales y la cercanía con el ser humano. Animales domésticos como los perros y gatos infectados con el parásito pueden representar un riesgo como factor de transmisión dependiendo de los hábitos higiénicos, culturales y ambientales (Rengifo-Herrera, *et al.*, 2017).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.0 Materiales y métodos

2.1 Descripción

2.1.1 Área de estudio

Las muestras de animales silvestres fueron colectadas en el Parque Nacional Soberanía, el cual está situado a lo largo de la ribera este del Canal de Panamá (Figura 14). Este Parque forma parte de su cuenca hidrográfica y fue declarada zona protegida en 1980 mediante el Decreto Ejecutivo N° 13 del 27 de mayo. Ocupa las provincias de Panamá y Colón y es una de las áreas protegidas del país de más fácil acceso. Este parque es el hábitat de más de 1300 especies de plantas y 525 especies de aves. Además han sido identificadas 105 especies de mamíferos, 79 especies de reptiles y 55 de anfibios entre otros. El Parque Nacional Soberanía forma parte del corredor biológico de áreas protegidas en la zona este del Canal de Panamá que también incluye el Parque Natural Metropolitano, el Parque Nacional Camino de Cruces y el Lago Gatún (Panamá, Ministerio de Desarrollo Agropecuario 1980).

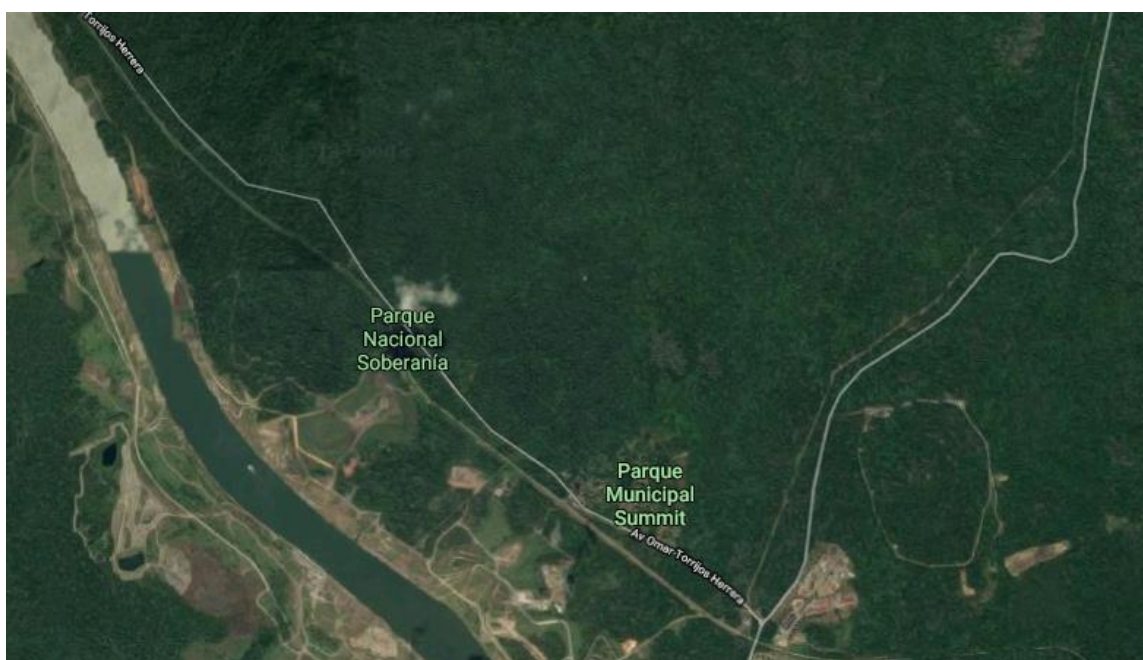


Figura 13. Parque Nacional Soberanía, sitio de muestreo de los animales silvestres.

2.1.2 Tipo de muestra

Fueron colectadas muestras de tejidos (cerebro, músculo esquelético, hígado, corazón y pulmón) de una gran variedad de aves, mamíferos y reptiles, obtenidas a través de necropsias realizadas a animales fallecidos naturalmente en el Parque. Las muestras se guardaron a -20°C en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP). Las necropsias se realizaron con el apoyo de pinzas de disección y bisturí desechables para cada animal, las cuales nos facilitaron la manipulación adecuada de la muestra (evitamos la contaminación de nuestras muestras). El tamaño aproximado del tejido fue de 20 g, los cuales se preservaron en tubos Eppendorf de 2 ml, que contenían etanol al 70%.

2.1.3 Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN a los tejidos colectados de animales silvestres se utilizó el *kit* GENTRA PUREGENE de QIAGEN. Este *kit* de extracción permite la purificación de ADN de alto peso molecular (100–200 kb). También, el procedimiento de purificación elimina suavemente los contaminantes e inhibidores y permite que las muestras se purifiquen para utilizarlas como referencias a largo plazo (QIAGEN Technologies, 2011). A los tejidos se les cortó una masa aproximada de 5 a 10 mg de tejido. Posteriormente fueron macerados y colocados en tubos de 1.5 ml, que contenía 300 µl de solución de lisis. Para obtener un mayor rendimiento de la muestra, se agregó 1.5 µl de Proteinasa K para luego ser incubado a 65°C por 60 minutos.

Luego de la incubación, se añadió 1.5 µl de Rnasa A y se incubó a 37°C por 15 minutos en una placa de calor, posteriormente se incubó por 1 minuto en hielo. Pasado el tiempo, se agregó 100 µl de la Solución de Precipitación, homogenizando los tubos suavemente con un vortex y finalmente se centrifugó a 16000xg por 3 minutos. Después de precipitar las proteínas, se procedió a extraer el sobrenadante, este se colocó en tubos limpios de 1.5 ml, los cuales contenían 300 µl de Isopropanol. Posteriormente se homogenizaron suavemente y se centrifugaron por 1 minuto a 16,000 xg RCF. Luego, se descartó el sobrenadante, quedando solo el

pellet, al cual se le agregaron 300 µl de Etanol (grado molecular) y se centrifugó a 16,000 xg RCF por 1 minuto; nuevamente se descartó el sobrenadante y se vertió el tubo en papel absorbente. Para el almacenamiento del ADN se agregó 100 µl de solución de hidratación de ADN.

2.1.4 Cuantificación de muestras de ADN en NanoDrop

Después de la extracción, se procedió a cuantificar el ADN en un NanoDrop modelo 2000 de la marca Thermo Scientific. Este equipo nos indicó las concentraciones de ácidos nucleicos en nanogramos. Para realizar las mediciones, se siguieron los siguientes pasos según el manual del equipo (figura 14).



Figura 14. Medición de la concentración de ADN de los animales silvestres en NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, 2009).

2.1.5 Detección de *Toxoplasma gondii* en muestras de animales silvestres por medio de la técnica de PCR y utilizando como marcador molecular el gen B1

El Gen B1 fue utilizado como marcador molecular de cribado o tamizado para la detección de *T. gondii* en muestras de tejido de animales silvestres. Este marcador molecular nos permitió trabajar con un gran volumen de muestras e identificar los animales con algún tejido positivo para la infección por *T. gondii*. El gen B1 posee una alta sensibilidad y especificidad en el reconocimiento de *T. gondii*, esto se atribuye al número de copias que este gen presenta en el genoma del parásito (35), además, de ser altamente específico para *T. gondii*. Por lo tanto, este gen es utilizado como marcador molecular para la amplificación del ADN del parásito, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este procedimiento puede ser utilizado en la detección del parásito en muestras de sangre y ~~el~~ tejido (Burg *et al.*, 1989); ~~y~~ ha sido probado con numerosas cepas en una gran cantidad de estudios (Mahalakshmi *et al.*, 2010).

Para esta etapa se utilizaron dos pares de cebadores que reconocen secuencias específicas dentro del gen B1 de *T. gondii*. El proceso de amplificación se realizó en 2 etapas. La primera ronda consistió en la ampliación de un fragmento de 289 pares de bases (pb) con los cebadores: forward JW 62 - 5'-TTCTCGCCTCATTTCTGGGTCTAC-3' y reverse JW 63 - 5'-GCACCTTTTCGGACCTCAACAACCG-3', a una concentración de 2.5 µM (micromolar) en una mezcla de 25 µL. Para el proceso de amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador (Applied Biosystems™ modelo 2720) a 95°C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s y finalmente 72°C por 5 minutos. La segunda ronda consistió en la re-amplificación de un fragmento menor (115pb) de la secuencia que codifica el gen B1. El producto de ADN obtenido en la primera ronda de PCR se utilizó para la amplificación de este fragmento; en este caso, los cebadores se anidaron a una región más interna del primer fragmento amplificado.

2.1.6. PCR-RFLP – Genotipificación de *Toxoplasma gondii* en tejidos de animales silvestres

Todas las muestras de tejido que resultaron positivas con los PCR realizados utilizando el gen B1 de *T. gondii*, fueron seleccionadas para proceder con la genotipificación de las muestras. Para este proceso se utilizaron los marcadores moleculares SAG1, Alt.SAG2, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, GRA6, BTUB, L-358, C29-2 y APICO (de Melo *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2006). Después de la primera ronda de amplificación, todos los productos fueron reamplificados mediante la técnica de nested-PCR (n-PCR), seguida de cortes con enzimas de restricción (RFLP). Todos estos genes codifican para proteínas involucradas en importantes procesos fisiológicos, bioquímicos e inmunológicos (procesos de invasión) del parásito. También, a través de estos genes es posible inferir relaciones filogenéticas entre diferentes genotipos de *T. gondii* asociados con sus reservorios o a diversas patologías observadas en el desarrollo de la enfermedad.

Para cada uno los marcadores se llevó a cabo una reacción de PCR externa utilizando 25 µL de mezcla de reacción que contenía 12,5 µL de Master Mix 1X (Promega), cebador externo (25 µM), 1,5 µL del ADN del animal silvestre y agua libre de nucleasas. La reacción de PCR externa se llevó a cabo en un termociclador T 100 (BIO RAD) utilizando el siguiente ciclo: 95°C durante 4 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos y 15°C durante 5 minutos. La PCR anidada se llevó a cabo en 25 µL de mezcla de reacción que contenía 12,5 µL de Master Mix 1X (Promega), cebador interno (50 µM), 2,5 µL de producto de PCR externo (para el marcador 3'SAG-2), una dilución 1:1000 (para los marcadores alt.SAG2, 5'SAG2 y APICO) y 1,5 µL de producto de PCR externo (SAG1, SAG3, GRA6, BTUB, L-358 y C29-2) y agua libre de nucleasas. Ciclo de PCR anidado, 95°C durante 4 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos y 15°C durante 5 minutos. Las cepas de referencia RH perteneciente al linaje Tipo I y la cepa PDS perteneciente al linaje tipo II, fueron utilizadas como controles positivos.

Las enzimas de restricción usadas para cada una de los marcadores moleculares se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Marcadores moleculares utilizados en el PCR-RFLP en muestras de ADN de animales silvestres

Marcador molecular	Cebadores externos	Cebadores internos	Enzima de restricción	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
SAG1	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	Sau96I + HaeII (doble digestión)	37°C	60 minutos
alt.SAG2	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTGACCGAGCGGGAGCAC	HinfI + TaqI (doble digestión)	37°C y 65°C	30 minutos y 30 minutos
3'SAG2	F: TCTGTTCTCCGAAGTGA CTCC R: TCAAAGCGTG CATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	HhaI	37°C	60 minutos
5'SAG2	Utiliza los cebadores del externo de alt.SAG2	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	MboI	37°C	60 minutos
SAG3	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	NciI	37°C	60 minutos
GRA6	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	MseI	37°C	60 minutos

BTUB	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	BsiEI+TaqI (doble digestión)	37°C	60 minutos
L-358	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	HaeIII+NlaII I (doble digestión)	37°C	60 minutos
C29-2	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	HpyCH4IV+ RsaI (doble digestión)	37°C	60 minutos
PK1	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	AvaI+RsaI (doble digestión)	37°C	60 minutos
APICO	F: TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F: GCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCTTGATA	AflII+DdeI (doble digestión)	37°C	60 minutos

2.1.7. Análisis del producto de PCR mediante electroforesis

Se visualizaron los productos de PCR por medio de la cámara UltraLum (Omega 5058), donde se colocaron los geles de agarosa (bajo peso molecular) al 1.5% con el ADN amplificado. Los productos de ADN se corrieron con una corriente eléctrica de 104 Voltios. Se preparó un gel de agarosa al 2.5% para la digestiones enzimáticas, con la digestión del marcador APICO que se utilizó un gel de agarosa al 3% y se corrió a 88 voltios por una hora y media.

2.1.8. Preparación del gel de agarosa

En un frasco de Erlenmeyer, se vertió 80 ml de buffer TBE 1X, luego se pesó 1.2 gramos de Agarosa (bajo peso molecular) en polvo y se mezcló en el Erlenmeyer junto con el buffer_TBE 1X. Esta mezcla se calentó en el microondas por 1 minuto, revolviendo el frasco cada 30 segundos para disolver completamente la agarosa. Esperamos que la temperatura del líquido estuviera aproximadamente en 48°C y con una micropipeta se añadió 2 µl de Bromuro de Etidio y revolvimos la mezcla previamente enfriada, luego se vertió el líquido en el molde de la cámara de electroforesis y colocamos 1 o 2 peines de acuerdo con la cantidad de muestras que corrimos en el gel.

2.1.9. Preparación de muestras y marcador

El buffer que se utilizó para realizar la corrida de las muestras en la cámara de electroforesis fue el TBE 1X. También empleamos un marcador de peso molecular (PCR Core kit with Taq DNA polymerase IF SL BW 5942) de 100 pb y se colocó un volumen de 1.5 µl en los pocillos del gel. Por otro lado, el gel se cargó con un volumen de 5µl del producto de PCR (ADN amplificado) y las muestras fueron corridas a 104 Voltios por 45 minutos.

2.1.10. Análisis estadísticos

Se utilizó la aplicación GraphPad prism 6 (analiza, grafica y presenta datos científicos). Se emplearon tablas de contingencia donde se analizaron asociaciones

entre varias variables y utilizamos la prueba de chi cuadrado (chi-square) para determinar si existe o no diferencia significativa entre las variables analizadas.

Capítulo III

Resultados

3.1. Frecuencia de infección de *Toxoplasma gondii* en animales silvestres

3.1.1 Frecuencia de infección de *T. gondii* en animales silvestres utilizando el gen B1, como marcador molecular

Este estudio fue realizado en animales silvestres procedentes del Parque Nacional Soberanía. Un total de ciento cuarenta animales fueron analizados utilizando el gen B1 como marcador molecular de tamizaje. A través de este marcador se determinó una frecuencia de infección de *T. gondii* de 60% (84/140) en el total de las muestras analizadas; esta frecuencia se distribuyó entre las clases de animales de la siguiente forma: 20% (28/140) en mamíferos, 33.57% (47/140) en aves y 6.42% (9/140) en reptiles (figura 15).

Porcentaje total de animales silvestres positivos para *T. gondii*

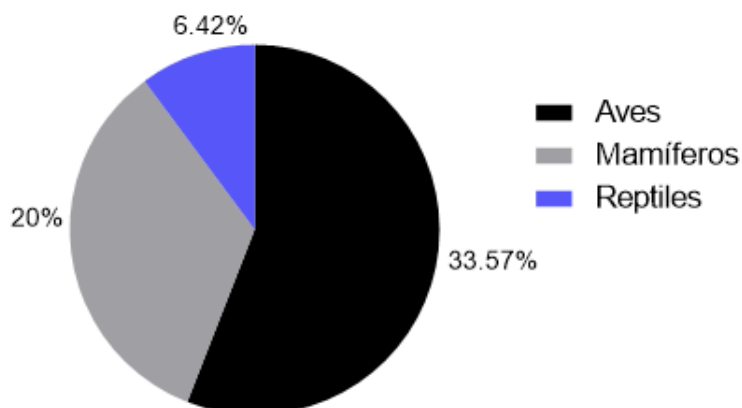


Figura 15. Porcentaje total de animales silvestres positivos para *T. gondii* con el gen B1 como marcador molecular. Se observó una frecuencia de infección del 60% (84/140) en el total de la población analizada.

Las poblaciones de aves y mamíferos fueron analizadas individualmente, mostrando una frecuencia de infección para *T. gondii* de 61% (47/77) y 60.87% (28/46) respectivamente. Los análisis estadísticos realizados para comparar los porcentajes de ambas poblaciones (aves y mamíferos) no mostraron diferencia estadística significativa ($\text{Chi } X^2 = 0.0003473$, GL 2, $P < 0.05$ [$P = 0.9998$]). La población

de reptiles fue pequeña (17 muestras), en comparación con las poblaciones de aves y mamíferos, por lo tanto, no se incluyó en los análisis estadísticos, sin embargo, se observó una frecuencia de infección de 52.94% (9/17) (figura 16).

Frecuencia de infección de *T. gondii* en animales silvestres

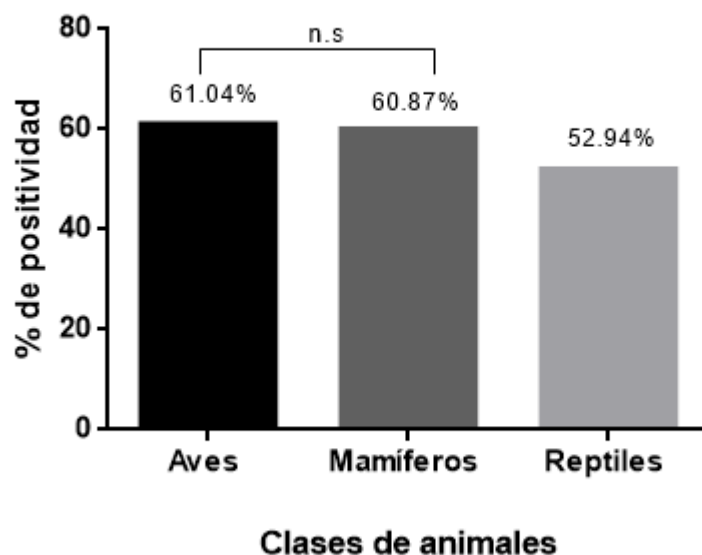


Figura 16. Porcentaje de positividad para la infección por *T. gondii* en poblaciones de animales silvestres procedentes del Parque Nacional Soberanía. Las líneas conectadas representan las poblaciones comparadas estadísticamente y la abreviatura **ns** representa la no significancia estadística entre las poblaciones de aves y mamíferos.

3.1.2 Porcentaje de positividad para diferentes órganos obtenidos en aves, mamíferos y reptiles utilizando el gen B1.

Con el fin de evaluar la frecuencia de migración de *T. gondii* hacia diferentes órganos de sus hospederos, se analizaron un total de 505 muestras de tejidos. Las muestras se extrajeron de diferentes órganos como: cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado y pulmón de 101 animales, distribuidos entre 70 de aves, 24 mamíferos y 7 reptiles.

Se observó una migración homogénea del parásito en todos los órganos analizados para cada una de las clases de animales. Los análisis estadísticos no mostraron

diferencia significativa, cuando se comparó la infección de *T. gondii* entre los órganos de la población de aves (Chi $X^2 = 1.361$, GL 8, $P < 0.05$ [$P = 0.9948$]). De igual forma se observó en la población de mamíferos (Chi $X^2 = 1.554$, GL 8, $P < 0.05$ [$P = 0.9918$]). Debido al tamaño de muestra en la población de reptiles (7) no fue posible realizar los análisis estadísticos (Figura 17).

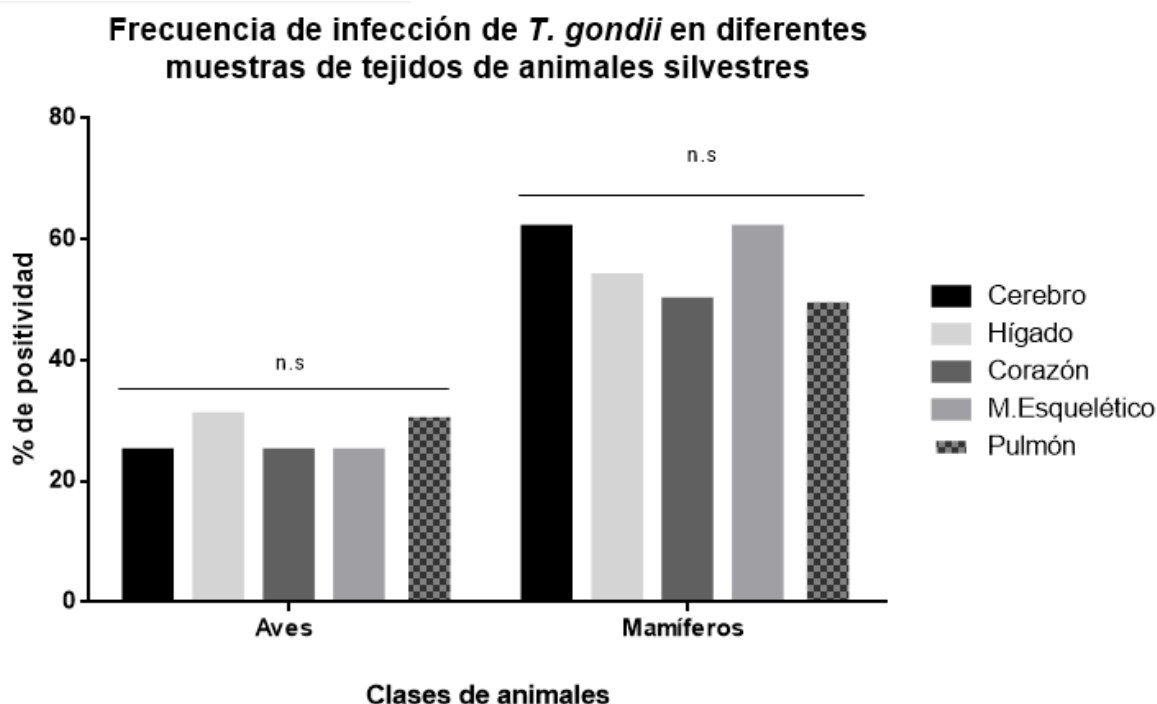


Figura 17. Porcentaje de positividad en los diferentes órganos analizados para aves y mamíferos procedentes del Parque Nacional Soberanía. La línea sobre cada una de los órganos comparados y la **ns** representa la no significancia estadística entre los órganos de las poblaciones de aves y mamíferos.

3.1.3 Genotipificación directa mediante la técnica RFLP-PCR en muestras de tejidos de animales silvestres.

Un total de doscientos cinco muestras de ADN positivas para la infección por *T. gondii* fueron examinados utilizando once marcadores moleculares (SAG1, Alt.SAG2, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, GRA6, BTUB, L-358, C29-2, PK1 y APICO) previamente descritos para realizar la caracterización genética de *T. gondii*. Del total de muestras analizadas apenas cuarenta y ocho se lograron amplificar con los siguientes marcadores: SAG1, Alt.SAG2, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, GRA6 y APICO.

Con el marcador alt.SAG2 se caracterizaron dieciocho muestras de ADN procedentes de las poblaciones de aves, mamíferos y reptiles. A través de este marcador se observaron dieciseis muestras con un patrón de bandas compatible con el linaje Tipo II y una muestra con el linaje Tipo I. Una muestra de ADN no presentó ninguna de los cortes de bandas esperados para los tres linajes principales de *T. gondii* (muestra representada como n. a en la tabla 3).

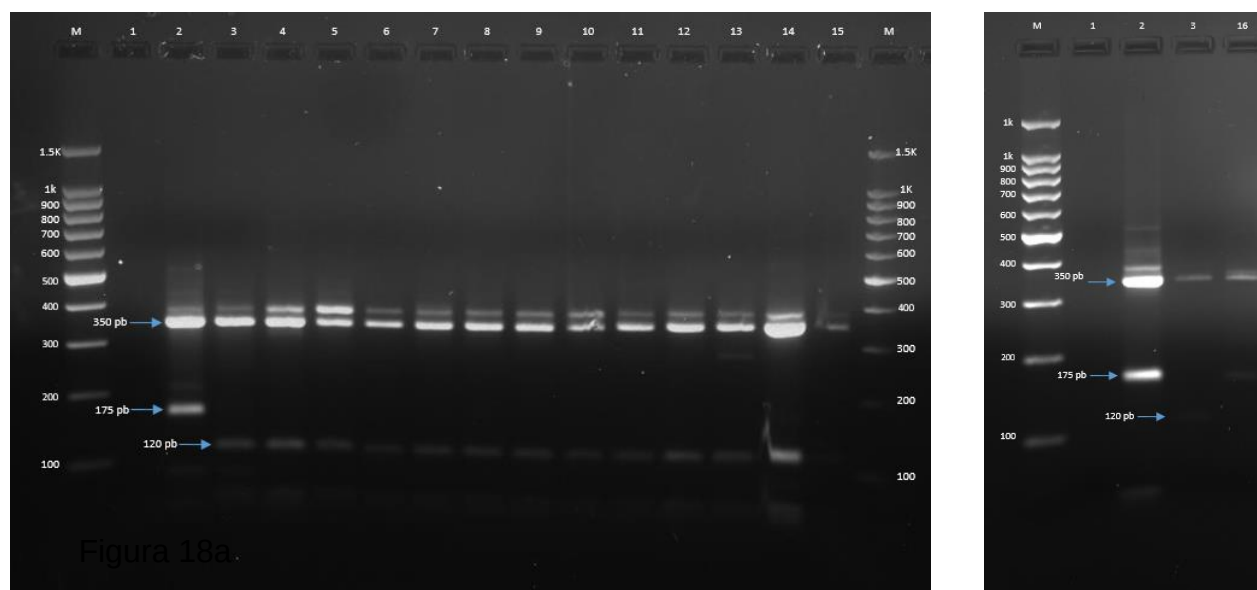


Figura 18. PCR-RFLP alt. SAG2. La digestión se realizó utilizando las enzimas *HinfI* y *TaqI*. El patrón de bandas para definir el linaje Tipo I fue de 350pb y 175pb. Para definir el Tipo II el patrón de bandas fue de 350pb y 120pb. Para las figuras 18a y 18b el M representa el marcador molecular de 100 pb. El pocillo 1 representa el control negativo; el pocillo 2 representa el control positivo para el genotipo I (cepa RH); el pocillo 3 representa el control positivo para el genotipo II (cepa PDS). Figura 18a: los pocillos del 4 al 15 mostraron patrones de bandas compatibles con el genotipo II. Figura 18b: pocillo 16 mostró un patrón de bandas compatible con el genotipo I.

Tabla 3. Caracterización molecular de *T. gondii* en muestras de animales silvestres

Número de animal	Especie	Nombre común	Tipo de animal	Distribución geográfica	Dieta	Comportamiento	Tejido	alt.SAG2	3'SAG2	5'SAG2	GRA6	SAG3	SAG1	Apico
1	<i>Iguana iguana</i>	Iguana	Reptil	México a Argentina	Omnívoro	Arbóreo	Pulmón	II	-	I/II	-	-	-	-
2	<i>Iguana iguana</i>	Iguana	Reptil	México a Argentina	Omnívoro	Arbóreo	Corazón	II	-	I/II	-	-	-	II
3	<i>Nyctidromus albicollis</i>	tapacaminos común	Ave	Estados Unidos a Argentina	Insectívoro	Arbóreo /Terrestre	Ojo	II	I/III	-	-	-	-	-
4	<i>Piaya cayana</i>	Cuco ardilla	Ave	México a Argentina	Omnívoro	Arbóreo	Hígado	II	-	I/II	-	-	-	II
5	<i>Piaya cayana</i>	Cuco ardilla	Ave	México a Argentina	Omnívoro	Arbóreo	Pulmón	II	-	I/II	-	-	-	-
6	<i>Buteo platypterus</i>	Gavilán aludo	Ave	Canadá a Bolivia	Carnívoro	Arbóreo	M. esquelético	II	-	I/II	-	-	-	II
7	<i>Buteo platypterus</i>	Gavilán aludo	Ave	Canadá a Bolivia	Carnívoro	Arbóreo	Hígado	I	-	I/II	-	II	-	-
8	<i>Turdus grayi</i>	Mirlo pardo	Ave	Estados Unidos a Colombia	Omnívoro	Arbóreo	Pulmón	II	-	I/II	II	II	-	II
9	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capibara	Mamífero	Panamá a Argentina	Herbívoro	Terrestre	Hígado	II	I/III	-	-	-	-	-
10	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Capibara	Mamífero	Panamá a Argentina	Herbívoro	Terrestre	Cerebro	II	-	I/II	-	-	-	-
11	<i>Tamandua mexicana</i>	Hormiguero	Mamífero	México a Ecuador	Carnívoro	Arbóreo /Terrestre	M. esquelético	n.a	II	-	I	-	-	I
12	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Armadillo	Mamífero	Estados Unidos a Argentina	Carnívoro	Terrestre	Cerebro	-	I/III	I/II	-	-	-	II
13	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Armadillo	Mamífero	Estados Unidos a Argentina	Carnívoro	Terrestre	Corazón	II	-	I/II	-	-	-	-
14	<i>Potus flavos</i>	Cusumbí	Mamífero	México a Brasil	Omnívoro	Arbóreo	Hígado	II	II	I/II	II	-	II/III	II
15	<i>Potus flavos</i>	Cusumbí	Mamífero	México a Brasil	Omnívoro	Arbóreo	Pulmón	-	I/III	I/II	-	-	-	II
16	<i>Saguinus geoffroyi</i>	Tamarino de Geoffroy	Mamífero	Panamá a Colombia	Omnívoro	Arbóreo	Cerebro	II	I/III	-	-	-	-	-
17	<i>Potus flavos</i>	Cusumbí	Mamífero	México a Brasil	Omnívoro	Arbóreo	Cerebro	II	II	I/II	-	-	-	II
18	<i>Potos flavos</i>	Cusumbí	Mamífero	México a Brasil	Omnívoro	Arbóreo	Hígado	II	-	I/II	-	-	-	-
19	<i>Dasyprocta punctata</i>	Ñeque	Mamífero	México a Ecuador	Frugívoro	Terrestre	M. esquelético	-	I/III	I/II	-	-	-	-

Para el marcador molecular SAG2 se caracterizaron cuarenta y ocho muestras de ADN específicamente para el fragmento 3'SAG2, procedentes de las poblaciones de aves, mamíferos y reptiles. A través de este marcador molecular se observaron diecisiete muestras con un patrón de bandas compatible con el linaje Tipo II. Para el resto de las muestras (treinta y uno) no se observaron cortes al agregar la enzima de restricción correspondiente (HhaI); por lo tanto, no se logró definir el tipo de genotipo de *T. gondii* en estas muestras de ADN (tabla 3). Con el fragmento 5'-SAG2 se caracterizaron cuarenta y seis muestras de ADN procedentes de las poblaciones de aves, mamíferos y reptiles. Mediante la enzima de restricción MboI no se logró definir el patrón de banda correspondiente al linaje Tipo III; por lo tanto las muestras quedaron por determinar si eran linaje tipo I o linaje tipo II (Tabla 3). El granulo denso 6 (GRA6), también se utilizó como marcador para la genotipificación de las muestras de ADN evaluadas. Los resultados obtenidos por este marcador mostraron tres muestras de ADN con patrones de bandas similares al genotipo II y al genotipo I (Figura 19). De estas muestras dos pertenecían a la clase mamífera y una a la clase de aves (Tabla 3).



Figura 19. Digestión enzimática para el fragmento del gen GRA6 utilizando la enzima de restricción MseI. El patrón de bandas para definir el linaje Tipo I fue de 80pb y 280pb y para el Tipo II de 170pb y 180pb. M: representa el marcador molecular de 100 pb. El pocillo 1: representa el control negativo; el pocillo 2 representa el control positivo para el genotipo I (RH); el pocillo 3 representa el control positivo para el genotipo II (PDS), los pocillos 4 y 5 mostraron patrones de bandas compatibles con el genotipo II. Pocillo 6 mostró un patrón de bandas compatibles con el genotipo I.

El antígeno de superficie SAG1 también fue utilizado para caracterizar las muestras de ADN procedentes de las poblaciones de mamíferos y aves. Con este marcador se observó un patrón de bandas similar al genotipo II (figura 20). Sin embargo, la digestión enzimática de este fragmento no define los genotipos II y III porque los tamaños de bandas son iguales. Esta muestra en particular pudo ser definida como genotipo II a través de cuatro marcadores moleculares como alt.SAG2, 3'SAG2, GRA6 y APICO.

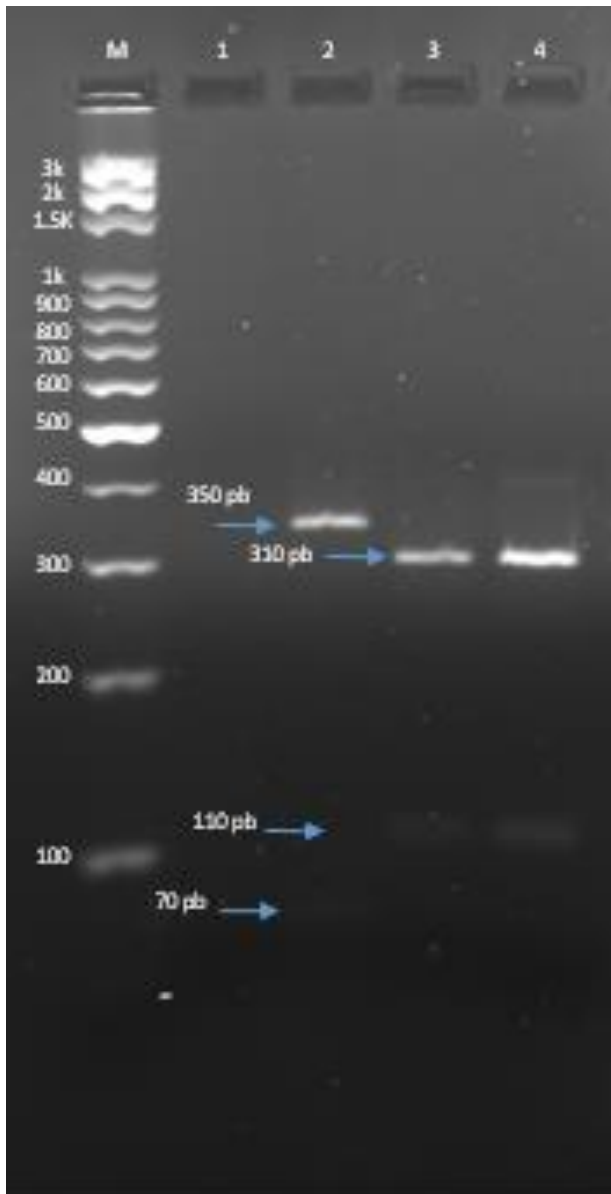


Figura 20. PCR-RFLP SAG1. La digestión se realizó utilizando las enzimas Sau96I y HaeII. El patrón de bandas para definir el linaje Tipo I fue de 50pb y 350pb y para el Tipo II de 110pb y 310pb. M representa el marcador molecular 100 pb. El pocillo 1 representa el control negativo; el pocillo 2 representa el control positivo para el genotipo I (cepa RH); el pocillo 3 representa el control positivo para el genotipo II (cepa PDS). El pocillo 4 mostró un patrón de bandas compatible con el genotipo II.

El antígeno de superficie SAG1 también fue utilizado para caracterizar las muestras de ADN procedentes de las poblaciones de mamíferos y aves. Con este marcador se observó un patrón de bandas similar al genotipo II (figura 20). Sin embargo, la

digestión enzimática de este fragmento no define los genotipos II y III porque los tamaños de bandas son iguales. Esta muestra en particular pudo ser definida como genotipo II a través de cuatro marcadores moleculares como alt.SAG2, 3'SAG2, GRA6 y APICO.

Con el antígeno de superficie SAG3 se logró caracterizar dos muestras de ADN procedente de muestras de aves. Con este marcador se observó un patrón de bandas similar al genotipo II (figura 21).

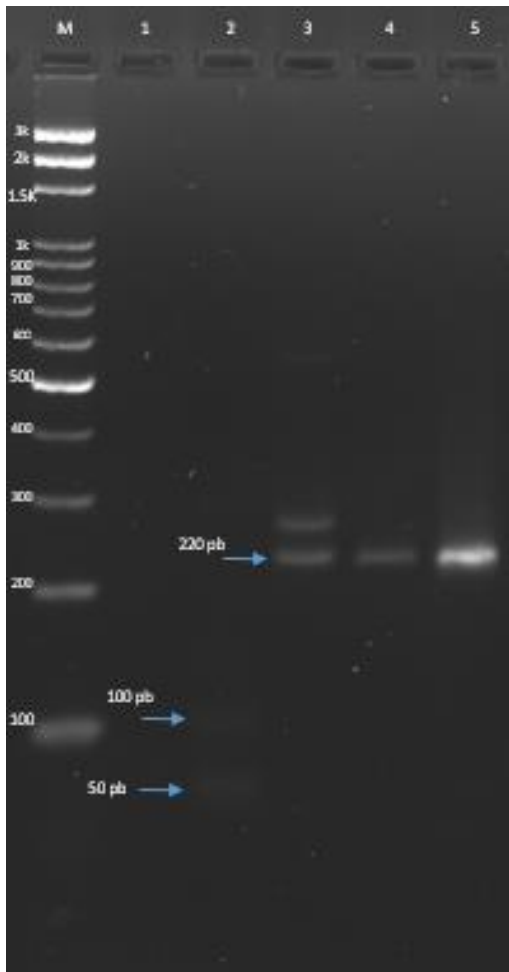


Figura 21 PCR-RFLP SAG3. Digestión enzimática con la enzima de restricción NciI. El patrón de bandas para definir el linaje Tipo I fue de 50pb y 100pb y para el Tipo II de 220pb. Marcador molecular de 100 pb, C- representa el control negativo, C+: representa el control positivo para el genotipo I (cepa RH); C+: representa el control positivo para el genotipo II (cepa PDS. Pocillos 1 y 2 mostraron patrones de bandas compatibles con el genotipo II .

El último marcador molecular con el cual se pudo caracterizar las muestras de ADN de animales silvestres fue el gen APICO. Se genotipificaron nueve muestras procedentes de las poblaciones de aves, mamíferos y reptiles. Se observaron ocho muestras con un patrón de bandas compatible con el linaje Tipo II y una muestra con el patrón de banda compatible con el linaje Tipo I. (figura 22).

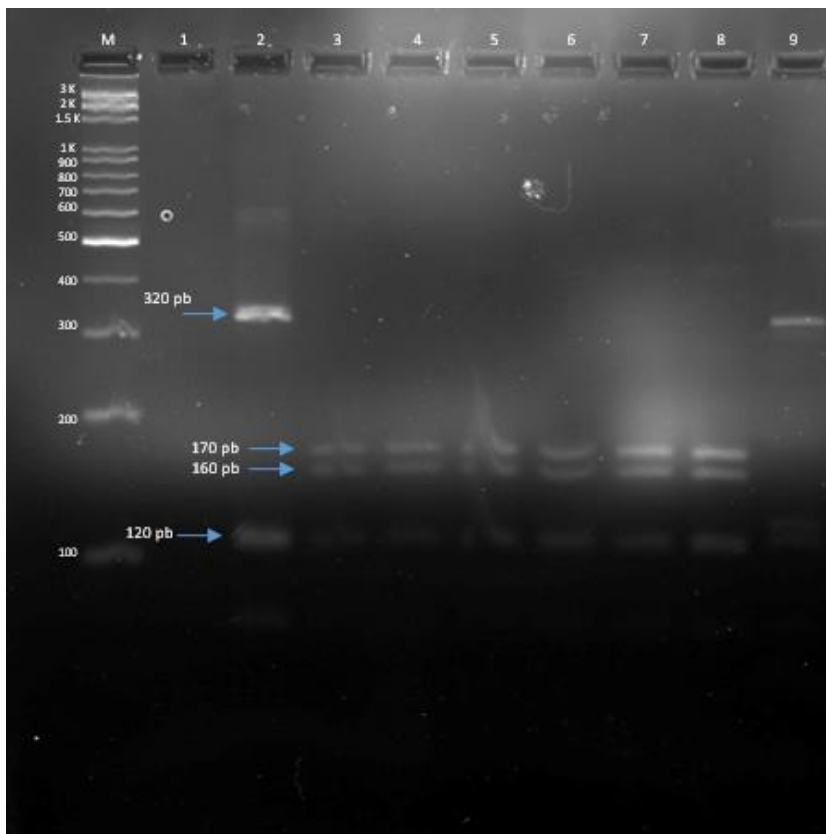


Figura 22. PCR-RFLP APICO. La digestión se realizó utilizando las enzimas AflII y DdeI. M: El patrón de bandas para definir el linaje Tipo I fue de 120pb y 320pb y para el Tipo II de 160pb y 170pb. M representa el marcador molecular de 100 pb. El pocillo 1 representa el control negativo; el pocillo 2 representa el control positivo para el genotipo I (cepa RH); el pocillo 3 representa el control positivo para el genotipo II (cepa PDS). Pocillos del 4 al 8 mostraron patrones de bandas compatibles con el genotipo II. Pocillo 9 mostró un patrón de bandas compatible con el genotipo I.

Los marcadores moleculares C29-2 L-358, BTUB y PK1 no lograron caracterizar ninguna de las muestras de ADN procedentes de animales silvestres. Los marcadores moleculares L-358 y BTUB no amplificaron ninguna muestra, ni en el

PCR externo ni con el Nested PCR. En cambio con los marcadores C29-2 y PK1 se lograron amplificar las bandas esperadas, sin embargo, debido a la gran cantidad de bandas inespecíficas observadas en el Nested PCR, no fue posible realizar los cortes con las enzimas de restricción correspondientes para identificar el genotipo.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Toxoplasma gondii actualmente se ha convertido en un problema a nivel veterinario muy importante debido a que puede infectar tanto a animales domésticos, como animales silvestres y causarles patologías como: abortos, neumonía, miositis, miocarditis y encefalitis (Dubey, 2010; Roqueplo *et al.*, 2011). En Panamá, el primer reporte de *Toxoplasma gondii* en animales silvestres se realizó en un mono de cara blanca (de Rodaniche 1954); sin embargo, hasta el momento no se había realizado un estudio para saber la frecuencia de infección del parásito, ni los genotipos que circulan en la vida silvestre de Panamá. Por lo tanto, la caracterización de las muestras de ADN de las poblaciones de aves, mamíferos y reptiles nos ayudaron a comprender los ciclos de transmisión que ocurren en el ambiente silvestre, hospedadores intermediarios, migración tisular del parásito y frecuencia de los genotipos en la población de animales silvestres.

En nuestros resultados se observó una alta frecuencia de infección (60%) del parásito *T. gondii* en poblaciones de animales silvestres con características distintivas de comportamiento, temperatura corporal, dieta y hábitat. Esta frecuencia de infección es comparable con estudios realizados en Brasil, donde se encontró una frecuencia de infección en animales silvestres del 62.4% (Ferreira *et al.*, 2018) y en Chile de 67.7% (Barros *et al.*, 2018). Esto demuestra que los ambientes silvestres en Panamá (suelo y agua) están altamente contaminados con ooquistes del parásito; lo cual es promovido por el clima tropical húmedo, las altas precipitaciones, la cadena trófica y el contacto de la vida silvestre con ambientes perturbados por actividades antropogénicas, los cuales facilitan la propagación y permanencia del parásito en hospedadores intermediarios y hospedadores finales (Rego *et al.*, 2018). Nuestros datos concuerdan con las investigaciones realizadas por Beneson y colaboradores (1982), quienes reportaron un brote de *T. gondii* en soldados de la armada de los Estados Unidos, por el consumo de agua contaminada con ooquistes del parásito. Cabe destacar que una de las hipótesis que se maneja sobre la historia evolutiva del parásito *T. gondii*, sostiene que debido al surgimiento del Istmo se facilitó la diseminación del parásito hacia América del Sur por medio del ocelote (O'Brien *et al.*, 2008), por lo que también, se puede facilitar nuestra comprensión sobre la presencia del parásito en el país y su variabilidad genética; la

cual probablemente fue enriquecida desde sus inicios por el tránsito de una gran diversidad de animales. Panamá desde su surgimiento se le ha relacionado con el Gran Intercambio Biótico Americano, por facilitar el tránsito e interacción de un gran número de especies de animales. Esta biodiversidad de especies en el istmo, aunada con los diferentes ambientes, clima cálido y húmedo, acceso al océano Pacífico y Atlántico, bosques estratificados; tiene un efecto directo sobre los diferentes factores de transmisión, ciclo de vida y frecuencia de infección, tanto en animales como en el hombre.

En este estudio, se analizaron una gran variedad de animales silvestres (setenta y siete aves, cuarenta y seis mamíferos y diecisiete reptiles), en los cuales no se observó diferencia estadística significativa cuando se analizó la frecuencia de infección del parásito entre las clases de aves y mamíferos. Estas poblaciones de animales son importantes en el mantenimiento del ciclo de vida del parásito; las aves por ejemplo, son grandes dispersoras del parásito, debido a su facilidad para transportarse. Los mamíferos por su parte están dentro de la cadena trófica (presas) de los hospedadores definitivos (felinos) e intermediarios (Wilson et al., 2020). Todos estos factores facilitan el incremento de la variabilidad genética de *T. gondii* en ambientes silvestres.

La población de reptiles no pudo ser comparada debido a la baja cantidad de individuos analizados (diecisiete), sin embargo, la frecuencia de infección fue del 52.94%. La diversidad de esta población estuvo compuesta por especies como la iguana verde, boa constrictor, boa arcoíris, tortuga de orejas amarillas y serpiente x. Estudios realizados a nivel mundial destacan una frecuencia alta en serpientes con un 80,88% (Nasiri et al., 2016), en caimanes con un 30,95% (Ferreira et al., 2020), por lo que los altos porcentajes de infección en animales con grandes variaciones de temperatura corporal confirman la capacidad de adaptación del parásito a hospederos con considerables diferencias fisiológicas y genéticas.

El análisis del porcentaje de positividad de *T. gondii* en los diferentes órganos analizados demostró una alta frecuencia de infección y se comprobó que el parásito tiene la habilidad de migrar homogéneamente a diferentes células nucleadas, sin diferencia estadística significativa entre cada una de las tres poblaciones de

animales silvestres estudiados. Esto es comparable con estudios realizados por Wilson y colaboradores (2020) donde encontraron una migración del parásito en órganos como el corazón, cerebro e hígado en una población de aves silvestres. Calero-Bernal y colaboradores (2015) también observaron una infección del parásito en el cerebro y corazón de jabalíes y ciervos rojos. Dubey y colaboradores (2009) mostraron una infección por *T. gondii* en los músculos del tórax de un tucán pico de quilla, muestra procedente de Costa Rica. *T. gondii* presenta tres formas (esporozoito, taquizoíto y bradizoíto) que fácilmente pueden atravesar las barreras biológicas de una amplia gama de hospedadores por lo que esta invasión celular facilita la propagación del parásito a través de diversos órganos (Kasper y Mineo, 1994; Hernández & Flores 2009).

Los marcadores moleculares SAG1, 3'SAG2, 5'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C29-2, L358, PK1 y APICO en los últimos años han sido utilizados mediante la técnica de PCR-RFLP en diversas investigaciones para la caracterización genética del parásito *T. gondii*. También se han analizado diferentes muestras a nivel mundial, gracias a la combinación de estos marcadores, los cuales logran identificar recombinación genética, muestras mixtas, aislados atípicos o exóticos, además de los linajes ya conocidos como Tipo I, Tipo II y Tipo III (Howe & Sibley 1995; Su *et al.*, 2010).

La caracterización molecular en muestras de ADN de animales silvestres se logró con siete marcadores moleculares: SAG1, Alt.SAG2, 3'SAG2, 5'SAG2, SAG3, GRA6 y APICO. Nuestros resultados mostraron que los mejores marcadores en términos de cantidad de muestras detectadas y menor número de bandas inespecíficas fueron altSAG2, 3'SAG2, GRA6 y APICO. A través de estos marcadores fue posible caracterizar genéticamente 48 muestras de ADN de *T. gondii* procedentes de diferentes especies de animales silvestres. En cambio los marcadores C29-2 L-358, BTUB y PK1 no lograron amplificar el tamaño de banda correspondiente que los diferencia, por lo tanto, no se logró caracterizar ninguna de las muestras de ADN con estos marcadores. La sensibilidad en la detección de *T. gondii* por medio de la técnica de PCR y utilizando estos 10 marcadores se ve

limitada por la fase de infección del parásito en el hospedero (fase aguda o crónica). Las infecciones agudas o reactivadas pueden ser una de las razones por la cual algunos marcadores consiguieron detectar mejor al parásito (Sibley *et al.*, 2009).

El linaje que tuvo una mayor frecuencia de infección en nuestras muestras de ADN procedentes de animales silvestres fue el genotipo II. Estos resultados son comparables con estudios previos donde indicaron que el genotipo II es más predominante en muestras de aves y mamíferos silvestres (Calero-Bernal *et al.*, 2015). Lo mismo fue observado en animales domésticos y selváticos procedentes de Serbia (Uzelac *et al.*, 2021). También se ha reportado con mayor frecuencia en aves rapaces silvestres (Gazzonis *et al.*, 2021), en urracas y cuervos (Mancianti *et al.*, 2020).

En la actualidad no están bien definidas las asociaciones de los genotipos con los diferentes hospederos, el suelo y fuentes de agua contaminados con ooquistes del parásito, pero se puede sugerir que existen tendencias de infección de ciertos genotipos debido a la susceptibilidad de ciertos hospederos o las fuentes naturales de contaminación (agua y suelo) (Sibley *et al.*, 2009). Una de las hipótesis puede explicar la distribución del linaje Tipo II a nivel mundial, sugiere que este linaje tuvo un entrecruzamiento con cepas ancestrales α y β y así surgieron los Tipo I y III respectivamente (Boyle *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2011).

Con el marcador molecular alt.SAG2 se identificó la recombinación genética entre el genotipo II y el genotipo I en una muestra de ave, denominada como gavi (*Buteo platypterus*). Con los marcadores GRA6 y APICO también se identificó la recombinación genética entre el genotipo II y el genotipo I en una muestra de ADN procedente de un hormiguero (*Tamandua mexicana*). Estos resultados son comparables con Uzelac y colaboradores (2021), donde encontraron una baja frecuencia de recombinación genética en ambientes selváticos con un 3%, en cambio en los ambientes domésticos se encontró un 13%. Esta baja recombinación puede deberse a la baja presencia o la dispersión de los hospedadores definitivos (felinos) en ambientes silvestres en comparación con ambientes domésticos,

aunado a las actividades antropogénicas que facilitan la recombinación genética entre los linajes o a aparición de genotipos nuevos (Sibley *et al.*, 2009).

En las muestras de ADN de animales silvestres analizadas no se caracterizó el genotipo III con ninguno de los marcadores moleculares analizados, sin embargo, no se descarta la presencia de este linaje en nuestro país. Estudios previos realizados en diferentes países de Centroamérica en muestras procedentes de pollos de patio, se detectó con mayor frecuencia del linaje tipo III en Guatemala. Ya en Costa Rica se identificaron los linajes III y I (Dubey *et al.*, 2005b) (Dubey *et al.*, 2006b), y en Nicaragua, se detectaron los tres linajes del parásito (Dubey *et al.*, 2006c).

La muestra de ADN procedente de un hormiguero (*Tamandua mexicana*) analizada mediante el marcador molecular alt.ASAG2 presentó patrones distintos a los linajes Tipo I, II y III. A nivel mundial se han reportados cepas únicas, Dubey y colaboradores (2007), En Colombia mediante el locus PK1 encontraron una cepa denominado u-3 en muestras de órganos de perros callejeros. Dubey y colaboradoras (2009) en Costa Rica encontraron un nuevo aislado denominado TgRsCrl en los músculos pectorales de un tucán pico de quilla. En América del Sur, se han aislado al menos 150 genotipos (cepas sudamericanas o atípicas) (Minot *et al.*, 2012; Shwab *et al.*, 2014), esto demuestra que el parásito tiene una alta diversidad genética y puede infectar a una amplia gama de hospederos intermediarios y/o definitivos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. En Panamá se encontró una alta frecuencia de infección por *Toxoplasma gondii* en tres poblaciones de animales silvestres (60%). Esto sugiere que el ambiente está altamente contaminado con los ooquistes del parásito.
2. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de infección del parásito en las poblaciones de aves y mamíferos.
3. En la población de reptiles se encontró una alta frecuencia de infección, por lo que sugiere que el parásito tiene una gran facilidad de adaptación entre poblaciones de animales con diferencias fisiológicas marcadas.
4. El parásito tiene la capacidad de migrar a todos los órganos analizados, sin presentar asociación o preferencia entre alguno de estos.
5. El marcador molecular denominado como gen B1 demostró ser un excelente marcador para realizar los análisis de diagnósticos en muestras procedentes de tejidos de animales silvestres.
6. El linaje tipo II presentó la mayor frecuencia de infección en las muestras de ADN de animales silvestres.
7. No se pudo caracterizar el linaje Tipo III en las muestras de ADN de animales silvestres.
8. La muestra de de ADN de un hormiguero, el músculo esquelético, no presentó los patrones de bandas esperados dentro de los linajes principales con el marcador molecular alt.SAG2.
9. Los mejores marcadores moleculares para la caracterización de *T. gondii* en muestras de ADN de animales silvestres fueron altSAG2, 3'SAG2, GRA6 y APICO.
10. Los marcadores moleculares C29-2 L-358, BTUB y PK1 no lograron caracterizar ninguna de las muestras de ADN procedentes de animales silvestres.

Recomendaciones

1. Se recomienda utilizar el marcador molecular, gen B1, como marcador de tamizaje debido su sensibilidad y especificidad en la detección de *Toxoplasma gondii*.
2. Con el marcador molecular alt.SAG2 se puede comenzar a caracterizar las muestras debido a que tiene la capacidad de reconocer los linajes principales del parásito denominados I, II y III, además de las cepas o aislados atípicos.
3. Para obtener bandas sin inespecificidad, se debe hacer diluciones 1:100 después del PCR externo con el marcador alt.SAG2.
4. Se recomienda usar los marcadores moleculares GRA6 y APICO para la caracterización directa de muestras de ADN procedentes de animales silvestres.
5. Se recomienda realizar investigaciones enfocadas en la ecoepidemiología de *T. gondii* en diversos ambientes en Panamá, debido a que la alta frecuencia encontrada en este estudio, el cual sugiere que tanto que tanto los suelo como las fuentes de agua en el ambiente poseen una contaminación elevada, así como las actividades antropogénicas y el fraccionamiento de los bosques inciden sobre la frecuencia de este
6. Dentro de las charlas y capacitaciones se debe contemplara la educación sobre el efecto del consumo de los posibles hospedadores intermediarios y los efectos sobre los humanos.

CAPÍTULO VI
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- Ajzenberg, D., Bañuls, A. L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., & 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>
- Ajzenberg, Daniel, Cogné, N., Paris, L., Bessi res, M., Thulliez, P., Filisetti, D., ... Dard , M. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(5), 684–689. <https://doi.org/10.1086/342663>
- Alvarado-Socarras J, Meneses Silvera K, Zarate-Vergara A, Guerrero-Gomez C, R.-M. A. (2017). NO TODO ES ZIKA: TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA,  A N PREVALENTE EN COLOMBIA? NOT EVERYTHING IS ZIKA: CONGENITAL TOXOPLASMOSIS, STILL PREVALENT IN COLOMBIA? *Med Exp Salud Publica*, 34(2), 332–338. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2697>
- Barros, M., Cabez n, O., Dubey, J. P., Almer a, S., Ribas, M. P., Escobar, L. E., Ramos, B., & Medina-Vogel, G. (2018). *Toxoplasma gondii* infection in wild mustelids and cats across an urban-rural gradient. *PloS one*, 13(6), e0199085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199085>
- Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P., & Cowman, A. F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 621–628. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1465>
- Beck, H.-P., Blake, D., Dard , M.-L., Felger, I., Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrillo, J., ... Weir, W. (2009). Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology*, 39(2), 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.001>
- Biancifiori, F., Rondini, C., Grelloni, V., & Frescura, T. (1986). Avian toxoplasmosis: Experimental infection of chicken and pigeon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 9(4), 337–346. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(86\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0147-9571(86)90046-9)

Boyle, JP, Rajasekar, B., Saeij, J., Ajioka, JW, Berriman, M., Paulsen, I., Roos, DS, Sibley, LD, White, MW y Boothroyd, JC (2006). Solo un cruce parece capaz de alterar drásticamente la biología de la población de un patógeno eucariota como *Toxoplasma gondii*. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América*, 103 (27), 10514–10519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510319103>

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/10.1016/j.vetpar.2016.06.008>

Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L., & Boothroyd, J. C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 141(10), 3584–3591. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183382>

Calero-Bernal, R., Saugar, J. M., Frontera, E., Pérez-Martín, J. E., Habela, M. A., Serrano, F. J., Reina, D., & Fuentes, I. (2015). Prevalence and genotype identification of *Toxoplasma gondii* in wild animals from southwestern Spain. *Journal of wildlife diseases*, 51(1), 233–238. <https://doi.org/10.7589/2013-09-233>

Cabral, A. D., Gama, A. R., Sodré, M. M., Savani, E. S. M. M., Galvão-Dias, M. A., Jordão, L. R., ... Pena, H. F. J. (2013). First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). *Veterinary Parasitology*, 193(1–3), 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.015>

Coco, Argentina Del Córdoba, V F ; Basualdo, M. A. ; (2009). Revista Argentina de Microbiología. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(3), 185–196. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016782011>

Cong, H., Gu, Q. M., Jiang, Y., He, S. Y., Zhou, H. Y., Yang, T. T., ... Zhao, Q. L. (2005). Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, 27(1–2), 29–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00738.x>

- Correa R, Cedeño I, de Escobar C. et al. (2008). Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. *Veterinary Parasitology*, 153(1–2), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.017>
- de Melo Ferreira, A., Vitor, R. W. A., Gazzinelli, R. T., & Melo, M. N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.12.004>
- de Moraes, E. P., Batista, A. M., Faria, E. B., Freire, R. L., Freitas, A. C., Silva, M. A., Braga, V. A., & Mota, R. A. (2010). Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Veterinary parasitology*, 170(3-4), 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.017>
- De Rodaniche E, Pinzon, T. (1949). Spontaneous toxoplasmosis in the guinea-pig in Panama. *The Journal of Parasitology*, 35(2), 152–155.
- DE RODANICHE, E. (1954a). Spontaneous toxoplasmosis in the whiteface monkey, *Cebus capucinus*, in Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3(6), 1023–1025. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1954.3.1023>
- DE RODANICHE, E. (1954b). Susceptibility of the marmoset, *Marikina geoffroyi*, and the night monkey, *Aotus zonalis*, to experimental infection with *Toxoplasma*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3(6), 1026–1032. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1954.3.1026>
- Dubey, J. P., Karhemere, S., Dahl, E., Sreekumar, C., Diabaté, A., Dabiré, K. R., ... Lehmann, T. (2005). FIRST BIOLOGIC AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *TOXOPLASMA GONDII* ISOLATES FROM CHICKENS FROM AFRICA (DEMOCRATIC REPUBLIC OF CONGO, MALI, BURKINA FASO, AND KENYA). *Journal of Parasitology*, 91(1), 69–72. <https://doi.org/10.1645/ge-410r>
- Dubey, J. P., Lopez, B., Alvarez, M., Mendoza, C., & Lehmann, T. (2005b). Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Guatemala. *The Journal of parasitology*, 91(4), 955–

957. <https://doi.org/10.1645/GE-493R.1>

- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (2006). Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.08.001>
- Dubey, J. P., Su, C., Oliveira, J., Morales, J. A., Bolaños, R. V., Sundar, N., Kwok, O. C., & Shen, S. K. (2006b). 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., Sundar, N., Pineda, N., Kyvsgaard, N. C., Luna, L. A., Rimbaud, E., Oliveira, J. B., Kwok, O. C., Qi, Y., & Su, C. (2006c). Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. *Veterinary parasitology*, 142(1-2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.016>
- Dubey, J. P., Cortés-Vecino, J. A., Vargas-Duarte, J. J., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Bandini, L. M., Polo, L. J., Zambrano, L., Mora, L. E., Kwok, O. C., Smith, T., & Su, C. (2007). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary parasitology*, 145(1-2), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.001>
- Dubey, J. P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>
- Dubey, J. P., Velmurugan, G. V., Morales, J. A., Arguedas, R., & Su, C. (2009). Isolation of *Toxoplasma gondii* from the keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*) from Costa Rica. *The Journal of parasitology*, 95(2), 467–468. <https://doi.org/10.1645/GE-1846.1>
- Dubey, J. P., Van Why, K., Verma, S. K., Choudhary, S., Kwok, O. C. H., Khan, A., ... Su, C. (2014). Genotyping *Toxoplasma gondii* from wildlife in Pennsylvania and identification of natural recombinants virulent to mice. *Veterinary*

- Parasitology*, 200(1–2), 74–84. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2013.11.001>
- Dubey, J. P., Velmurugan, G. V., Rajendran, C., Yabsley, M. J., Thomas, N. J., Beckmen, K. B., ... Su, C. (2011). Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *International Journal for Parasitology*, 41(11), 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.06.005>
- Escajadillo, A., & Frenkel, J. K. (1991). Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in Aotus monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(4), 382–389. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.382>
- Etheredge G, M., & G, Muehlenbein M, at al. (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 Publica/Pan American Journal of Public Health*, 16(3), 176–186.
- Fazaeli, A., & Ebrahimzadeh, A. (2007). A new perspective on and re-assessment of SAG2 locus as the tool for genetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates. *Parasitology Research*, 101(1), 99–104. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0449-8>
- Ferguson, D. J. P. (2002, August 1). *Toxoplasma gondii* and sex: Essential or optional extra? *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02330-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02330-9)
- Ferran Gómez, G., Gracia Royo, M. P., & Universitat de Barcelona. Departament de Biologia Animal. (2004). *Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alt Urgell. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. Universitat de Barcelona.
- Ferreira, I. M. R., Vidal, J. E., de Mattos, C. de C. B., de Mattos, L. C., Qu, D., Su, C., & Pereira-Chiocola, V. L. (2011). *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Experimental Parasitology*, 129(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.06.002>

- Ferreira, F. B., de Macêdo-Júnior, A. G., Lopes, C. S., Silva, M. V., Ramos, E., Júnior, Á. F., Vitaliano, S. N., Santiago, F. M., Santos, A., Mineo, J. R., & Mineo, T. (2020). Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) and *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758). *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 12, 42–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.04.008>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>
- Frenkel, J. K., & Escajadillo, A. (1987). Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(3), 517–522. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.517>
- Frenkel, J. K., & Sousa, O. E. (1983). Antibodies to *Toxoplasma* in panamanian mammals. *The Journal of Parasitology*, 69(1), 244–245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6827442>
- Furtado, J. M., Smith, J. R., Belfort, R., Gattey, D., & Winthrop, K. L. (2011). Toxoplasmosis: A global threat. In *Journal of Global Infectious Diseases* (Vol. 3, pp. 281–284). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.83536>
- Gazzonis, A. L., Villa, L., Lubian, E., Ressegotti, S., Grilli, G., Raimondi, S., ... & Manfredi, M. T. (2021). Molecular Survey on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* Infection in Wild Birds of Prey Admitted to Recovery Centers in Northern Italy. *Microorganisms*, 9(4), 736.
- Gisbert Algaba, I., Verhaegen, B., Murat, J. B., Coucke, W., Mercier, A., Cox, E., ... De Craeye, S. (2020). Molecular Study of *Toxoplasma gondii* Isolates Originating from Humans and Organic Pigs in Belgium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(5), 316–321. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2675>
- Grigg, M. E., & Boothroyd, J. C. (2001). Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment

- length polymorphism analysis at the B1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 398–400. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.398-400.2001>
- Grocott, R. (1950). A case of canine toxoplasmosis from the Canal Zone. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(5), 669–675. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1950.s1-30.669>
- Hernández, S. M., & Flores, R. M. (2009). Toxoplasma gondii, un patógeno asesino re-emergente. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(2), 52-58.
- Hinze-Selch, D., Daubener, W., Erdag, S., & Wilms, S. (2010). The diagnosis of a personality disorder increases the likelihood for seropositivity to Toxoplasma gondii in psychiatric patients. *Folia Parasitologica*, 57(2), 129–135. <https://doi.org/10.14411/fp.2010.016>
- Ho, Y. C., Sun, H. Y., Chen, M. Y., Hsieh, S. M., Sheng, W. H., & Chang, S. C. (2008). Clinical presentation and outcome of toxoplasmic encephalitis in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 41(5), 386–392.
- Hoffmann, S., Batz, M. B., & Morris, J. G. (2012). Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens 3. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1292–1302. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-417>
- Holland, G. N. (2004). Ocular toxoplasmosis: A global reassessment: Part II: Disease manifestations and management. In *American Journal of Ophthalmology* (Vol. 137, pp. 1–17). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2003.10.032>
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages : Correlation of Parasite Genotype with Human Disease Function p30 Surface Antigen p22 Surface Antigen Rhoptry protein Unknown cDNA Unknown Unknown cDNA. *J. Infect. Dis.*, (October), 1561–1566.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., ...

- Murray, J. M. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine - The apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 2(2), 0121–0138. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>
- Huang, X., Xuan, X., Hirata, H., Yokoyama, N., Xu, L., Suzuki, N., & Igarashi, I. (2004). Rapid Immunochromatographic Test Using Recombinant SAG2 for Detection of Antibodies against *Toxoplasma gondii* in Cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 351–353. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.351-353.2004>
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2010, January 1). Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Experimental Parasitology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>
- JP, D. (2010). Dubey, J.P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. *Parasites & Vectors*, 3(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-112>
- Kasper, L. H., & Mineo, J. R. (1994). Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology today (Personal ed.)*, 10(5), 184–188. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90026-4)
- Kaushik, M., Knowles, S. C. L., & Webster, J. P. (2014). What Makes a Feline Fatal in *Toxoplasma gondii*'s Fatal Feline Attraction? Infected Rats Choose Wild Cats. *Integrative and Comparative Biology*, 54(2), 118–128. <https://doi.org/10.1093/icb/icu060>
- 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, Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology*, 41(6), 645–655. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.005>

- Liu, Q., Wang, Z. D., Huang, S. Y., & Zhu, X. Q. (2015, May 28). Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>
- Luc Paris. (2019). Tissue Infection Toxoplasmosis. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 803–813. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00106-X>
- Mahalakshmi. (2010). Evaluation of Nested PCRs targeting the BI and SAG2 Genes For Detection of *Toxoplasma gondii* Genome in Aqueous Humor From HIV Positive *Toxoplasma* Retinochoroiditis Patients in a Tertiary Eye Hospital. *American Medical Journal*, 1(2), 157–163. <https://doi.org/10.3844/amjsp.2010.157.163>
- Mancianti, F., Terracciano, G., Sorichetti, C., Vecchio, G., Scarselli, D., & Perrucci, S. (2020). Epidemiologic Survey on *Toxoplasma gondii* and *Trichinella pseudospiralis* Infection in Corvids from Central Italy. *Pathogens*, 9(5), 336. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050336>
- Melo, R. P. B., Almeida, J. C., Lima, D. C. V., Pedrosa, C. M., Magalhães, F. J. R., Alcântara, A. M., ... Mota, R. A. (2016). Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 224, 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.023>
- Mimica, F., Muñoz-Zanzi, C., Torres, M., & Padilla, O. (2015). Toxoplasmosis, zoonosis parasitaria prevalente en Chile: Recuento y desafíos. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 541–549. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000600008>
- Minot, S., Melo, M. B., Li, F., Lu, D., Niedelman, W., Levine, S. S., & Saeij, J. P. (2012). Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13458-13463
- Montoya, J. G., & Remington, J. S. (2008). Clinical Practice: Management of

Toxoplasma gondii Infection during Pregnancy . *Clinical Infectious Diseases*, 47(4), 554–566. <https://doi.org/10.1086/590149>

Nasiri, V., Teymurzadeh, S., Karimi, G., & Nasiri, M. (2016). Molecular detection of Toxoplasma gondii in snakes. *Experimental parasitology*, 169, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.08.002>

O'Brien, S. J., Johnson, W., Driscoll, C., Pontius, J., Pecon-Slattery, J., & Menotti-Raymond, M. (2008, June 1). State of cat genomics. *Trends in Genetics*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.004>

Panamá, Ministerio de Desarrollo Agropecuario (1980). POR EL CUAL SE CREA EL PARQUE NACIONAL SOBERANIA EN EL AREA DEL CANAL DE PANAMÁ. Gaceta Oficial: 20333.

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>

Payá, E., Noemí, I., Tassara, R., Catalán, P., & Avilés, C. L. (2012). Profilaxis de toxoplasmosis en niños y adultos sometidos a trasplante de órganos sólidos y precursores hematopoyéticos. *Revista Chilena de Infectología*, 29(SUPPL.1), 37–39. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182012000500007>

Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of Toxoplasma gondii in Brazil. *International journal for parasitology*, 38(5), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>

Peréz E, Viilada J, Naranjo O, C. O. (2011). ALTERNATIVE WAYS OF TOXOPLASMA GONDII TRANSMISSION. *Biosalud*, 10(2). Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502011000200012#46

Petersen, E., & Dubey, J. P. (2001). *Biology of toxoplasmosis*. Retrieved from www.cambridge.org

QIAGEN Technologies, A. (2014). QIAGEN Sample and Assay Technologies, (December), 1–72.

Raiden Grandía G. Ángel Entrena G. Jeddú Cruz H. (2013). TOXOPLASMOSIS EN *Felis catus*: ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y ENFERMEDAD. *Revista de Inmunología y Parasitología*, 24(2), 131–149. Retrieved from chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?pdf=http%3A%2F%2Fwww.scielo.org.pe%2Fpdf%2Fv24n2%2Fa01v24n2.pdf

Rêgo, W. M. F., Costa, J. G. L., Baraviera, R. C. A., Pinto, L. V., Bessa, G. L., Lopes, R. E. N., & Vitor, R. W. A. (2017). Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 247(September), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.015>

Rêgo, W. M. F., Costa, J. G. L., Baraviera, R. C. A., Pinto, L. V., Bessa, G. L., Lopes, R. E. N., ... Vitor, R. W. A. (2018). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates obtained from free-living wild birds rescued in Southeastern Brazil. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(3), 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.11.001>

Rengifo-Herrera, C., Pile E, García, A, et al. (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pets from metropolitan regions of Panama. *Parasite*, 24(9), 1–6. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017009>

Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012a). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264–296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012b, April 1). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

Rorman, E., Zamir, C. S., Rilkis, I., & Ben-David, H. (2006, May 1). Congenital

toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reproductive Toxicology*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.10.006>

Rosso F, A. A. I. A. M. G. (2007). Toxoplasmosis congénita: aspectos clínicos y epidemiológicos de la infección durante el embarazo I aspects of the infection during pregnancy. *Colombia Médica*, 38(3). Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342007000300014

Sabin, A. B., & Feldman, H. A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (toxoplasma). *Science*, 108(2815), 660–663. <https://doi.org/10.1126/science.108.2815.660>

Sacks, D., & Sher, A. (2004). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni1102-1041>

Shapiro K, Lillian, Bahia-Oliveira Dixon B, et al. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*, 12, 1–18.

Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2013). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>

Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453-461

Sibley, LD, Khan, A., Ajioka, JW y Rosenthal, BM (2009). Diversidad genética de *Toxoplasma gondii* en animales y humanos. *Transacciones filosóficas de la Royal Society de Londres. Serie B, Ciencias biológicas*, 364 (1530), 2749–2761. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>

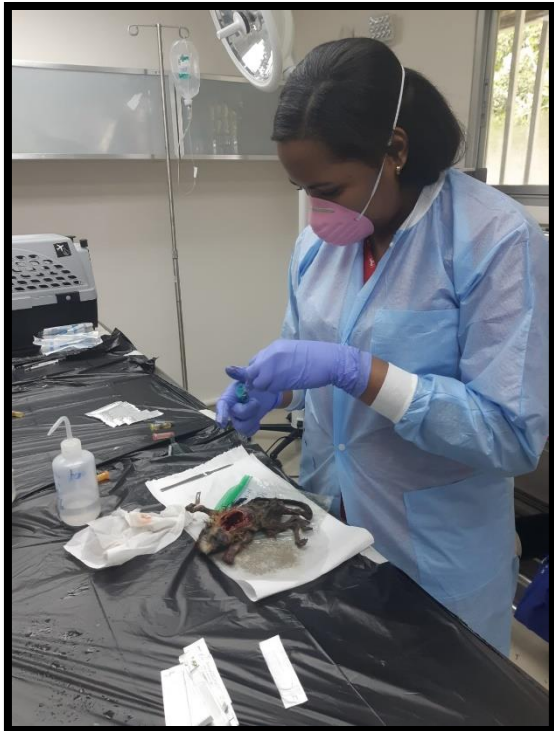
Silva, L. A., Andrade, R. O., Carneiro, A. C. A. V., & Vitor, R. W. A. (2014).

- Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090237>
- Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q., & Dubey, J. P. (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 137(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>
- Su, Chunlei, 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)
- Thermo Fisher Scientific. (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>.
- Uzelac, A., Klun, I., Ćirković, V., Bauman, N., Bobić, B., Štajner, T., Srbijanović, J., Lijeskić, O., & Djurković-Djaković, O. (2021). *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Serbia-Insight into the Population Structure and Diversity of the Species in Southeastern Europe, a Region of Intercontinental Strain Exchange. *Microorganisms*, 9(12), 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122526>
- Walton, B. C., & Arjona, I. (1968). Isolation of *Toxoplasma gondii* from the Lesser Anteater in Panama. *The Journal of Parasitology*, 54(6), 1243.

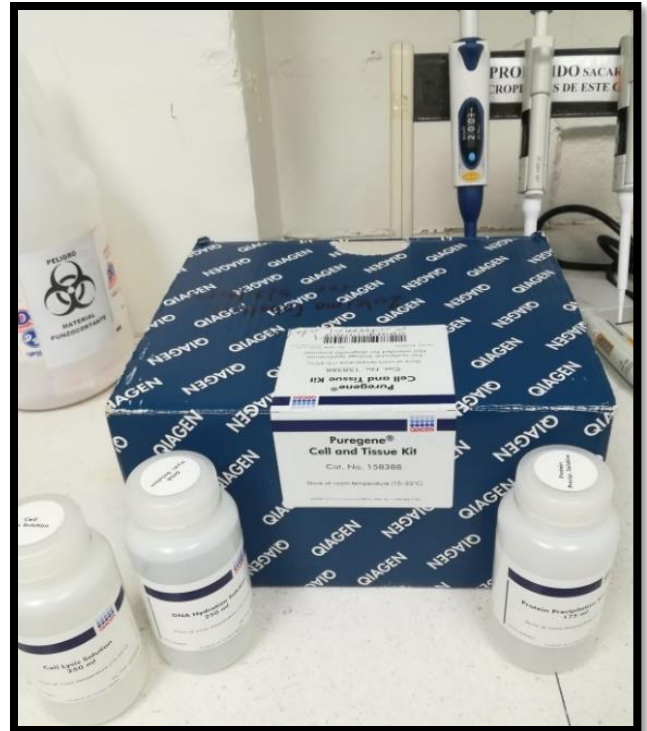
<https://doi.org/10.2307/3277004>

- Wilson, A. G., Lapen, D. R., Mitchell, G. W., Provencher, J. F., & Wilson, S. (2020). Interaction of diet and habitat predicts *Toxoplasma gondii* infection rates in wild birds at a global scale. *Global Ecology and Biogeography*, 29(7), 1189-1198.
- Yai, L. E. O., Ragozo, A. M. A., Soares, R. M., Pena, H. F. J., Su, C., & Gennari, S. M. (2009). Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 162(3–4), 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.007>
- Ybañez, R. H. D., Ybañez, A. P., & Nishikawa, Y. (2020). Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00204>
- Zulpo, D. L., Sammi, A. S., Dos Santos, J. R., Sasse, J. P., Martins, T. A., Minutti, A. F., ... & Garcia, J. L. (2018). *Toxoplasma gondii*: a study of oocyst re-shedding in domestic cats. *Veterinary parasitology*, 249, 17-20.

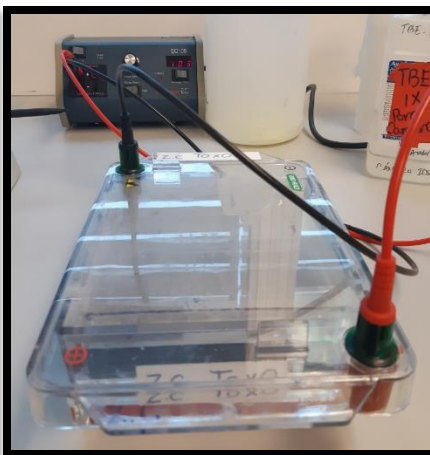
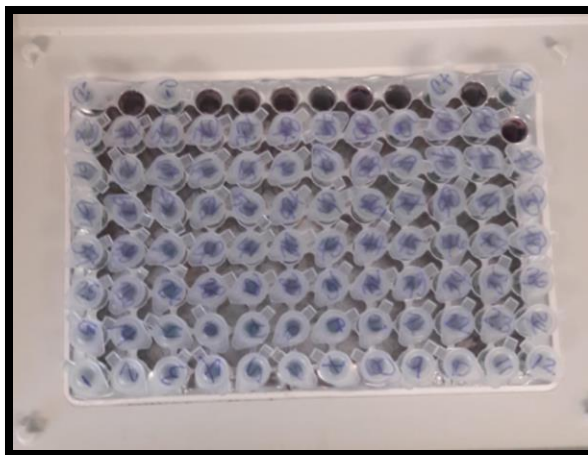
ANEXOS



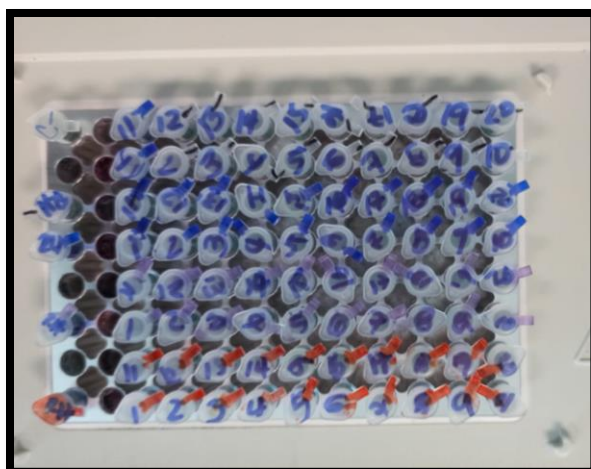
Extracción de órganos



Extracción de ADN



PCR-gen
B1



Genotipificación