

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE
Toxoplasma gondii EN GATOS DOMESTICOS (*Felis catus*) EN EL MUNICIPIO
DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA.**

**TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA
DANIEL ONAN MARTÍNEZ CABRERA**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

ABRIL 2022

PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE *Toxoplasma gondii* EN GATOS DOMESTICOS (*Felis catus*) EN EL MUNICIPIO DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA. TESIS PRESENTADA POR DANIEL ONAN MARTÍNEZ CABRERA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS QUE HA SIDO APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ:

**Dr. Gilberto López Valencia
Director de Tesis**

**Dr. Cesar Flores Dueñas
Co- director**

**Dr. Francisco Javier Monge Navarro
Sinodal**

**Dra. Paulina Haro Alvarez
Sinodal**

**Dr. Enrique Trasviña
Sinodal**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

ABRIL 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a nuestro Dios por brindarme la sabiduría necesaria para poder afrontar todos los retos y dificultades con perseverancia hasta el final de este camino.

A mis padres por su apoyo incondicional en todos los aspectos, todo lo que he logrado en la vida se los debo a ellos.

A mis hermanas que siempre han sido mis amigas e inspiración para salir adelante.

A mis abuelos, en particular a mi abuelo Daniel Cabrera hasta el cielo a quien no pude darle el último adiós por la distancia física que nos separó en mi búsqueda de este sueño, sueño que Él siempre me motivó a buscar.

A mi tutor; Dr. Gilberto López, por su acompañamiento y dirección para poder desarrollar mis habilidades y conocimientos en el área de la investigación. Más que solo un tutor ha sido un gran amigo con quien cuento y contare siempre.

Al CONACYT por el apoyo económico si el cual no hubiera sido posible desarrollar mi proyecto de investigación.

A todos los doctores, docentes, administrativos y empleados del IICV que de una u otra manera aportaron en mi formación.

A Hema Diagnostico Veterinario por su valiosa colaboración al proveernos con muestras para el desarrollo de nuestro proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia; padres, Onan Martínez y Leydi Cabrera, hermanas Paulina Y Belén Martínez, mis abuelos Aquilino Martínez (QEPD) y Paulina Girón, Daniel Cabrera (QEPD) y Antonia Andino (mi segunda madre) y tíos en particular mi Tío Denis Cabrera (mi segundo padre).

RESUMEN

Se realizó un estudio observacional transversal con el fin de determinar la seroprevalencia y factores de riesgo asociados a *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos del municipio de Mexicali, Baja California. Además, se estandarizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto utilizando el antígeno de membrana rSAG1 del parásito. Fueron colectadas un total de 262 muestras de sangre de pacientes felinos atendidos en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Autónoma de Baja California y del Laboratorio Privado Hema Diagnóstico Veterinario.

Para la estandarización del sistema ELISA-rSAG1, la proteína rSAG1 fue probada como antígeno de fase sólida en el sistema ELISA indirecto donde las densidades ópticas (DO) obtenidas indican que la mayor amplitud entre controles positivos y negativos se logró al usar 10ng de rSAG1 con una dilución del suero de 1:200 y conjugado enzimático diluido a 1:10,000 para una razón positivo/negativo de 7.21, utilizando estos parámetros el grado de reactividad de las muestras resultó en DO's constantes y uniformes.

Se observó una seroprevalencia general a toxoplasmosis de 45% (119/262). Además, se analizaron los siguientes factores de riesgo; sexo (hembra/macho), tipo de agua que consume (purificada/no purificada), actividad cazadora (si/no), desparasitación periódica (si/no) y disponibilidad de caja de arena (si/no). Ninguno de los FR analizados estuvo asociado estadísticamente con la presencia de la enfermedad.

Palabras clave: Seroprevalencia, Sistema ELISA-rSAG1, Factores de Riesgo.

ABSTRACT

We carried out a cross sectional study to determine the seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic cats in the city of Mexicali, Baja California. Furthermore, we standardized an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the membrane antigen rSAG1 of the parasite. A total of 262 blood samples were collected from feline patients that visited the Small Animals Veterinary Hospital of The Autonomous University of Baja California (HVPE) and the private laboratory Hema Diagnostico Veterinario.

For the standardization of the ELISA-rSAG1 system, the protein rSAG1 was tested as solid phase antigen in the indirect ELISA system where the Optical Density (DO) from the samples suggest that the biggest interval within the negative and positive controls is given by using 10ng of rSAG1 with a serum dilution of 1:200 and enzymatic conjugate diluted at 1:10,000 for a rate of positive/negative of 7.21, using these parameters the reactivity degree of the samples showed constant and uniform DO's.

The general seroprevalence obtained was 45%(119/262). In addition, we analyze the following risk factors, sex(male/female), water source(purified/non purified), hunting behavior(yes/no), periodic deworming(yes/no) availability of sand litter box (yes/no). None of the mentioned risk factors were statistically associated with seropositivity.

Key Words: seroprevalence, ELISA-rSAG1 System, Risk Factors

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	10
LISTA DE FIGURAS	11
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
REVISIÓN DE LITERATURA	16
Taxonomía	16
Especies de <i>T. gondii</i>	17
Formas parasitarias	17
Ciclo biológico	18
Periodo de incubación	21
Formas de Transmisión	21
Transmisión por consumo de quistes en tejidos	21
Transmisión vertical	21
Transmisión sexual	22
Aspectos epidemiológicos	23
Estudios de prevalencia para monitorear <i>T. gondii</i> realizados en otros países	25
Estudios en México	29
Estudios de prevalencia en animales en México	31
Signos asociados a la presencia de <i>T. gondii</i> en diferentes especies	32
Tratamiento	33
Diagnóstico	34
Diagnóstico serológico	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Tipo de estudio y localización del área de estudio	36
Criterios de inclusión	36
Toma de muestra de sangre	37
Toma de muestras de heces	37
Estandarización del sistema ELISA-rSAG1	38
Proteína recombinante SAG1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	38

Controles positivos y negativos	38
Estandarización de la prueba ELISA-rSAG1	41
Análisis de datos para la pruebas ELISA-rSAG1	42
Base de datos	42
Análisis estadísticos	44
RESULTADOS Y DICUSIÓN	45
Estandarización del sistema ELISA-rSAG1	45
Controles positivos y negativos	45
Estandarización del sistema ELISA-rSAG1	45
Detección de <i>T. goondii</i> por medio de análisis coprológicos	47
Seroprevalencia de <i>T. goondii</i> utilizando el sistema ELISA-rSAG1 en muestras de plasma de gatos	48
Análisis de factores de riesgo	50
BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág
1. Imágenes de los diferentes estadios evolutivos de <i>T. gondii</i>	13
2. Factores de riesgo asociados con toxoplasmosis ovina en Brasil ..	22
3. Origen de las muestras de carne analizadas y su prevalencia	24
4. Asociación de la prevalencia de ovejas, cabras y vacas y su edad	26
5. Concentraciones de antígeno rSAG1, diluciones de sueros controles, dilución del conjugado enzimático y razón positivo/negativo de los experimentos de estandarización del sistema ELISA-rSAG1	44
6. Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en gatos domésticos (<i>Felis catus</i>) de acuerdo al origen de las muestras	46
7. Magnitud de asociación de factores de riesgo	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1.	Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	11
2.	Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en humanos a nivel mundial	20
3.	Escrutinio de muestras de plasma (n=92) para identificación de controles positivos y negativos	37
4.	Estandarización del sistema ELISA-rSAG1 para <i>T. gondii</i> empleando un formato de tablero	40

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades zoonóticas son un grupo de enfermedades infecciosas que se transmiten de los animales a los seres humanos. El mayor riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas se produce por la exposición directa o indirecta a los animales, los productos derivados de estos o su entorno (OMS, 2020).

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica causada por el protozoo *Toxoplasma gondii* (Orden: Eimeriorina, Familia: Toxoplasmatidae Género: *Toxoplasma*), parásito de aves y mamíferos. Los felinos son los únicos hospederos definitivos y, por tanto, son la única fuente de oocitos infestivos. Sin embargo, otros mamíferos y aves pueden desarrollar quistes tisulares. Los humanos normalmente se infectan por agua y suelo contaminado con oocitos provenientes de heces de gatos, pero también por consumo de carne mal cocida que contenga taquizoitos y/o bradizoitos o congénitamente (Elmore et al., 2010).

Éste protozoo fue descrito por primera vez en 1908, aislado de un roedor africano. En un inicio se pensaba que se trataba de una especie de *Leishmania* pero un año después, se concluyó que se trataba de una nueva especie que denominaron *T. gondii* (Grandía et al., 2013).

El primer reporte de *T. gondii* en humanos fue descrito por Wolf et al (1939), cuando un recién nacido de 3 días presentó signos neurológicos y alteraciones

oftálmicas. El paciente murió al mes de edad, en todas las muestras analizadas (medula espinal, cerebro y ojo) se identificó a *T. gondii*.

Considerando las consecuencias que éste patógeno puede producir y la amplia gama de hospederos que posee, es importante conocer la prevalencia de esta enfermedad.

A nivel mundial se han realizado múltiples estudios con resultados determinantes y variados por ejemplo; en Estados Unidos, Dubey et al (2002), reportó en el estado de Ohio un 48% (n=133) de seroprevalencia en gatos domésticos, por otra parte, DeFeo et al (2002), reportó una seroprevalencia de 42% (n=200) en el estado de Rhode Island al norte de E.U.A, otros países como Sri Lanka (Kulasena et al, 2011) y Japón (Salman et al, 2018) mostraron prevalencias más bajas de 30.2% (n=86) y 16.1% (n=353) respectivamente.

Para el caso de la región noroeste de México carecemos de estudios en gatos que demuestren la prevalencia de *T. gondii*, sin embargo, En el municipio de Ensenada, Baja California se realizó un estudio en humanos donde se obtuvo una seroprevalencia de 8.6% (12/139) utilizando ELISA como prueba de diagnóstico (Cotázares J. et al, 2019). Siendo que se cuenta con estos registros de prevalencia en humanos, se debe determinar si los animales también están o han sido afectados en especial los gatos, quienes son los hospederos definitivos y principales diseminadores de la enfermedad y sobre quienes se aplicarían las principales medidas de prevención y control al ser una mascota en contacto constante y directo con los humanos.

Por lo anterior expuesto, el objetivo principal de nuestro trabajo es Determinar la prevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) en el municipio de Mexicali, Baja California durante el período 2020-2021

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la prevalencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Toxoplasma gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) en el municipio de Mexicali, Baja California durante el período 2020-2021.

Objetivos Específicos

- Desarrollar y estandarizar un sistema ELISA a partir de una Proteína recombinante SAG1 para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii*.
- Determinar la seroprevalencia de *T. gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) en Mexicali durante el período septiembre 2020 a mayo 2021.
- Identificar factores de riesgo asociados a la presencia del parásito.

REVISIÓN DE LITERATURA

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica causada por el protozoo *Toxoplasma gondii*. Los felinos, incluyendo gatos domésticos, son los hospederos definitivos que pueden liberar ooquistes en sus heces. Como resultado, la infección puede ocurrir accidentalmente vía oral por consumo de alimentos o agua contaminada con oocitos. Se estima que entre 20% y 70% de la población muestran evidencia serológica de exposición al parásito (Dubey, 2010) y gran parte de los humanos afectados podrían haberse contagiado por consumo de carne con estadios infectivos de este parásito (Stelzer et al., 2019).

Taxonomía

Clasificación taxonómica de *T. gondii*.

Filo: Apicomplexa

Clase: Sporozoasida

Subclase: Coccidiasina

Orden: Eimeriorina

Familia: Toxoplasmatidae

Género: *Toxoplasma*

Nombre científico: *Toxoplasma gondii*

Stelzer et al., 2019

Especies de *T. gondii*

Actualmente se conocen tres linajes genéticos designados como Tipo I, II y III. Los mismos difieren en virulencia y patrones epidemiológicos de ocurrencia. La mayoría de las cepas aisladas de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son tipo II. Los linajes tipo I y tipo II han sido reportados en pacientes con enfermedad congénita mientras que el linaje tipo III, en su mayoría, ha sido aislados de animales (Montoya y Liesenfeld, 2004).

Formas parasitarias

Fernández y Dávila (2017), describen tres fases parasitarias durante el ciclo biológico de *T. gondii* y todas son infectantes (Cuadro 1).

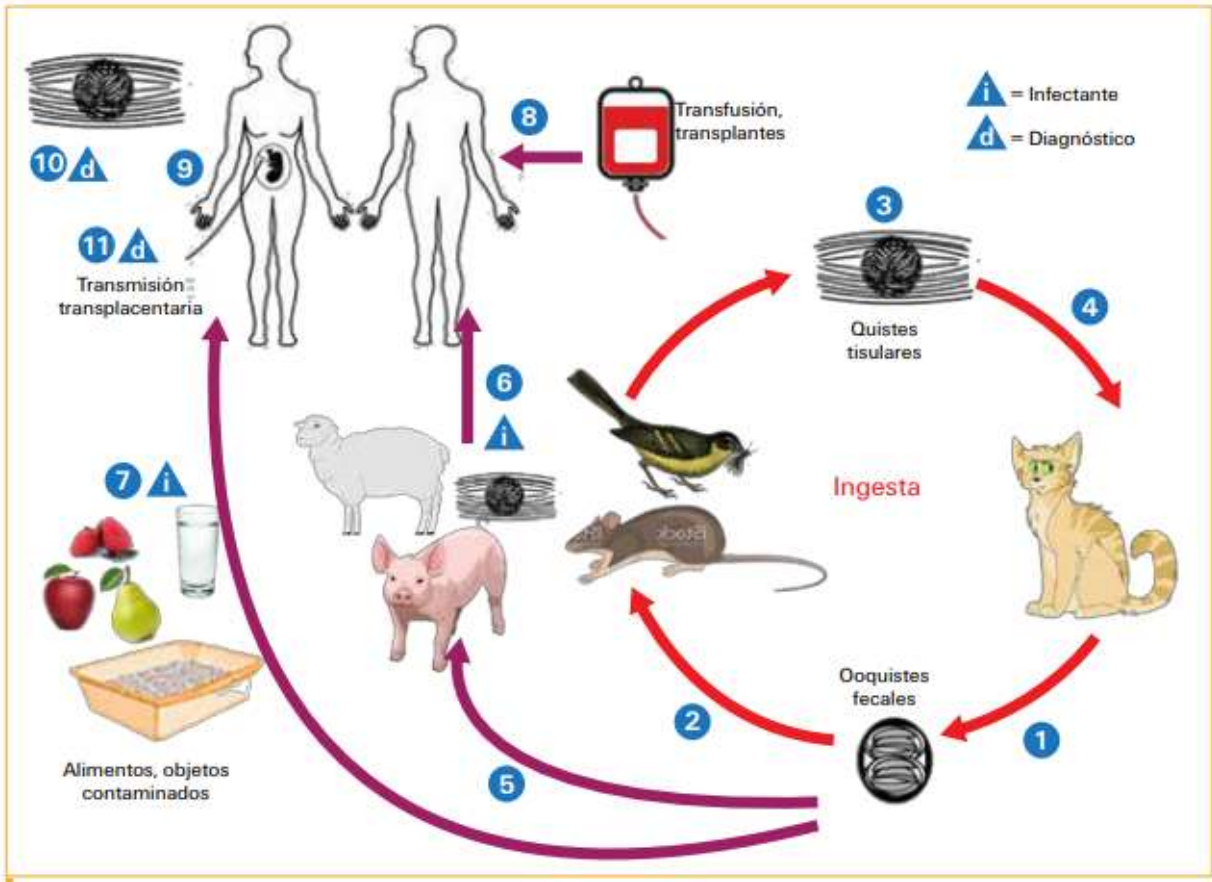
Ooquiste: Son los estadios que son eliminados únicamente por los félidos. Son de forma oval y miden aproximadamente 10x12 μm . Se convierte en infectante cuando se forma esporozoito al interior después de 5 días en el ambiente.

Taquizoito: Es la fase infectante asexual, se caracteriza por su forma de arco o media luna. Mide 3x7 μm . En su extremo apical posee estructuras de motilidad y replicación. Forma una vacuola donde se replica exponencialmente.

Bradizoito: Forma celular de baja motilidad, virulencia y proliferación. Transforman a la célula en un quiste tisular. Morfológicamente similares a los taquizoitos. El quiste tisular mide entre 50 y 70 μm y puede contener entre 1000 y 2000 bradizoitos.

Ciclo biológico

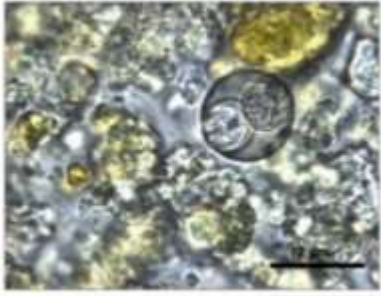

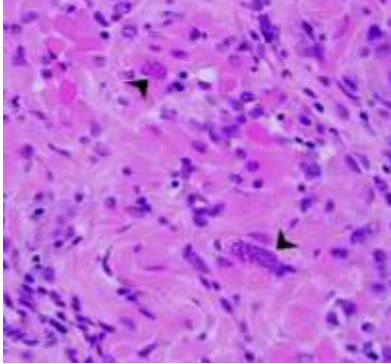
Los felinos domésticos y silvestres son los hospederos definitivos de *T. gondii* y se infectan por consumo de animales que contienen quistes tisulares infectivos (Figura 1) (Esch y Petersen, 2013). Los oocitos son excretados en las heces de los felinos en grandes cantidades por aproximadamente dos semanas al adquirir la infección aguda. Una vez en el ambiente, los oocitos se convierten en infectivos (esporulados) en 1 a 5 días. Dubey, (2010), estudió el ciclo en ratones donde observó que después de la ingestión de oocitos esporulados por los hospederos intermediarios, los esporozoitos penetran el epitelio intestinal alcanzando la lámina propia a través de un mecanismo desconocido, luego llegan a la circulación peri-intestinal tan pronto como 4 horas post infección donde se han transformado en taquizoitos. Posteriormente llegan a los tejidos pasando a su siguiente fase, bradizoitos, formando el quiste tisular. Los quistes tisulares persistieron en muchos órganos de los ratones como infección crónica.



(Correa, 2017)

Figura 1. Ciclo biológico de *T. gondii*

Cuadro 1. Imágenes de los diferentes estadios evolutivos de *T. gondii*.

Forma parasitaria	Imagen
Ooquiste esporulado en coproparasitoscópico de heces felinas (Elmore, et al, 2010)	 A light micrograph showing several yellowish, spherical oocysts with a distinct outer shell, scattered among other fecal particles. A scale bar is visible in the bottom right corner.
Fotomicrografía mostrando célula afectada por taquizoito. (Fernández y Dávila, 2017)	 A high-magnification photomicrograph showing a cell with a characteristic wheel-like appearance, where a central nucleus is surrounded by multiple, radiating, crescent-shaped organelles, representing a tachyzoite.
Bradizoitos en músculo esquelético de un canino. (Esch y Petersen, 2013)	 A histological section of skeletal muscle stained with hematoxylin and eosin (H&E). The muscle fibers are pink, and the nuclei are purple. Several small, dark, crescent-shaped structures are visible, indicated by black arrowheads, representing bradyzoites.

Periodo de incubación

La reproducción sexual de *T. gondii* ocurre exclusivamente en el intestino del gato. Este proceso inicia de 3 a 15 días después de la ingestión del material infectante, siendo este su periodo de incubación específico en felinos. En los humanos, el periodo de incubación varía dependiendo de la forma de contagio, siendo así, un periodo de 10 a 23 días por consumo de carne cruda o mal cocida y entre 5 a 20 días tras la ingestión de ooquistes provenientes de heces felinas (López y Hernández, 2018).

Formas de Transmisión

Una de las características que hace que *T. gondii* sea tan exitoso en su diseminación son sus diferentes vías de transmisión para afectar a sus hospederos (Dubey, 2010). A continuación se hace referencia a las mismas.

Transmisión por consumo de quistes en tejidos

Se demostró experimentalmente que los gatos alimentados usando tejidos con bradizoitos de *T. gondii* fueron seropositivos después de tres semanas de la exposición oral siendo el mismo mecanismo por el cual el parásito afecta otras especies (Dubey, 2010).

Transmisión vertical

Uno de las principales consecuencias de entrar en contacto éste agente en cualquiera de sus formas (oocitos, taquizoitos o bradizoitos) durante o previo a la gestación son los abortos debido a su capacidad de atravesar la barrera placentaria,

tal como se demostró en un estudio realizado en Yucatán, México donde se colectaron muestras de sangre de 100 mujeres con abortos espontáneos atendidas en dos hospitales. Los resultados mostraron que 58% de ellas fueron seropositivas.

Transmisión sexual

T. gondii ha sido encontrado en líquido seminal de hombres y la presencia del parásito ha sido relacionada con la disminución en la calidad del semen. Un modelo experimental en ovejas demostró infección después de infusión vaginal de formas vegetativas de quistes, mientras que el tracto genital masculino puede ser invadido como resultado de la diseminación de *T. gondii* (Crespillo-Andujar, et al., 2018).

Un estudio realizado por Santana et al. (2010) demostraron la presencia de *T. gondii* en semen y órganos reproductivos en cabros de la siguiente manera: se utilizaron animales en edad reproductiva dividiéndolos en un grupo control (n:2) sin inocular, un segundo grupo inoculado artificialmente vía oral con taquizoitos (n:2) y un tercer grupo inoculado vía con oocitos infectivos (n:2). Posteriormente se tomó muestra de sangre para estudios serológicos y muestras de semen utilizando un electro-eyaculador. Los resultados muestran que los animales de los dos grupos inoculados fueron seropositivos a la prueba de inmunofluorescencia indirecta. ADN de *T. gondii* fue identificado a través de PCR en semen los días 5, 7, 28, 49 y 70 post inoculación en el primer grupo y al día 56 en el segundo grupo. De igual manera se identificó ADN del parásito en próstata, testículos, vesícula seminal y epidídimo

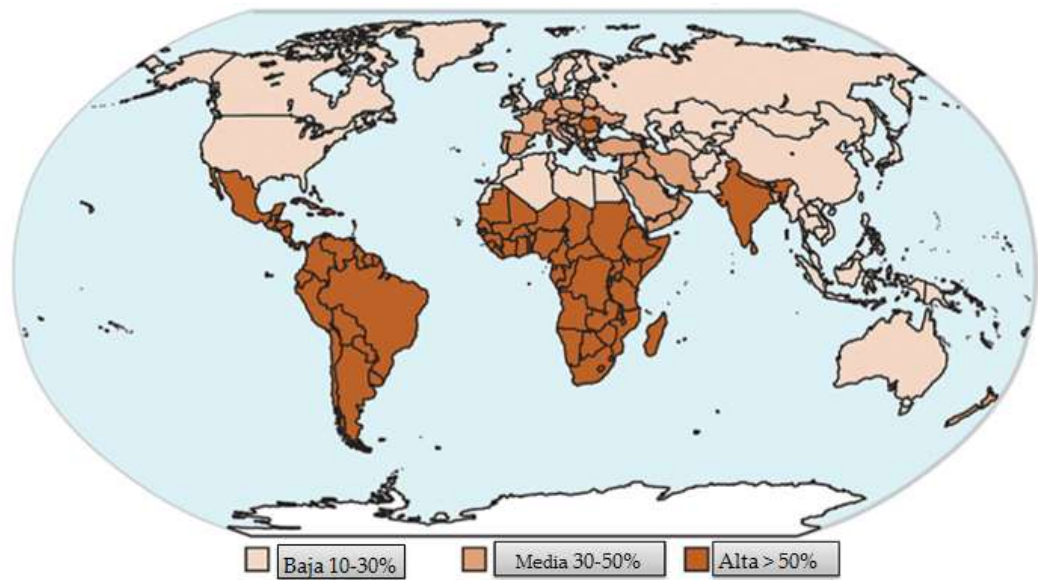
de los animales inoculados dejando demostrado la posible transmisión del parásito a vía reproductiva en caprinos.

Por otra parte, un estudio realizado en ovejas en edad reproductiva donde se inocularon dos ovejas machos; el primero (A) vía oral con ooquistes infectivos de *T. gondii* y el segundo (B) con taquizoitos vía subcutánea, simultáneamente se prepararon dos grupos de 5 ovejas hembras negativas a preñez y enfermedades reproductivas incluyendo toxoplasmosis, sincronizándolas para ser expuestas a monta natural por los machos inoculados (5 al macho A y 5 al macho B). Después de la cópula, 2 ovejas expuestas al macho A y tres ovejas expuestas al macho B, resultaron seropositivas. Una de las tres ovejas expuestas al macho B tuvo un feto macerado al día 70 post cópula. A través de bioensayo y PCR se logró aislar el parásito en órganos reproductivos de las 5 hembras seropositivas y sus respectivas crías incluyendo el feto abortado. Además, se aisló el parásito en semen de los dos machos inoculados. Como conclusión de éste estudio se demuestra la transmisión de *T. gondii* en ovejas incluyendo transmisión vertical de las madres infectadas a sus crías (Lopes et al., 2013).

Aspectos epidemiológicos

Toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria ampliamente distribuida alrededor del mundo (Figura 2), afectando una amplia variedad de especies de animales incluyendo al humano. A nivel mundial se han realizado múltiples estudios con resultados determinantes. En México, éste parásito ha sido detectado en diferentes partes del país, principalmente en las áreas tropicales donde el parásito

puede permanecer infeccioso por largos periodos de tiempo gracias a las condiciones ambientales (Hernández-Cortazar et al., 2015).



(Esch and Petersen., 2013)

Figura 2. Seroprevalencia de *T. gondii* en humanos a nivel mundial.

Estudios de prevalencia para monitorear *T. gondii* realizados en otros países

Brasil

En el noreste de Brasil se realizó un estudio de prevalencia y factores de riesgo asociados a *T. gondii* en ovejas. Se tomó muestras de suero sanguíneo de 930 ovinos para detectar anticuerpos con la prueba de ELISA. Los resultados mostraron una seroprevalencia de 22.1% del total de los individuos estudiados. Además, se analizaron las siguientes variables para determinar si constituían factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos: fuentes de agua (agua de arroyos o agua de pozo), tipo de suelo (cemento o suelo descubierto), localización de las fuentes de agua (directo de arroyos o recipientes dentro de las instalaciones), tipo de comederos (cemento o madera), presencia de gatos y edad. De las anteriores, se detalla en el Cuadro 2, las que constituyeron factores de riesgo con sus respectivos valores de OR (Andrade et al., 2013).

Cuadro 2. Factores de riesgo asociados con toxoplasmosis en ovejas en el noreste de Brasil.

Factores de riesgo	O.R.	IC	Valor de P
Fuentes de agua			
Agua de pozo	1	-	-
Agua de arroyos	1.61	1.25-2.09	0.000
Presencia de gatos			
No	1	-	-
Si	1.55	1.11-2.16	0.009
Edad			
Corderos	1	-	-
Adultos	2.44	1.58-3.75	0.000

(Andrade et al., 2013)

Italia

Continuando con los estudios en ovejas, en la región sur de Italia se estudió una muestra de 1170 ovejas mayores a 18 meses de edad provenientes de 117 granjas (10 individuos por explotación). Se tomó muestra de suero sanguíneo para detección de anticuerpos y se tomaron muestras de leche haciendo una muestra mixta representativa de cada granja. Los resultados mostraron que el 77.8% (91/117) de las granjas presentaron animales positivos, siendo 28.5% del total de los animales muestreados seropositivos a la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Por otra parte, en 3.4%(4/117) de las muestras de leche analizadas se detectó ADN de *T. gondii* utilizando PCR dando por manifiesto el riesgo de transmisión vertical a través de la leche a las crías (Fusco et al., 2007).

Francia

En Francia se han detectado casos de toxoplasmosis que han sido ligados a consumo de carne de caballo que ha sido importada del continente americano. En este estudio se tomaron 231 muestras de carne de caballo compradas en mercados de Francia. Estas fueron evaluadas con PCR para determinar la presencia de ADN de *T. gondii*. Como resultado se obtuvo un 43%(99/231) de las muestras positivas a la prueba de PCR. Posteriormente se inocularon ratones con 97 de las muestras positivas a PCR y 21 de las muestras negativas pero no se encontraron cepas de *T. gondii* al intentar realizar aislamiento lo que podría indicar una baja distribución de quistes del parásito en el músculo esquelético del caballo y por ende baja probabilidad de adquirir la enfermedad por consumo de carne de caballo. En el Cuadro 3 se detallan los países de procedencia de las muestras de

Cuadro 3 Origen de las muestras de carne equina en mercados de Francia analizadas y su prevalencia según los resultados de la prueba de PCR.

País	Cantidad de muestras % (N°)	Prevalencia % (N°)
México	32 (13,85%)	6.25% (2)
Canadá	46 (19.92)	26.09% (12)
Alemania	2 (0.86%)	50% (1)
Origen desconocido	40 (17.32%)	52.50% (21)
Argentina	93 (40.26%)	53.76% (50)
Francia	14 (6.06%)	71.46% (10)
Uruguay	4 (1.73%)	75% (3)
Total	231 (100%)	42.86% (99)

(Aroussi et al., 2015).

carne analizada con su respectivo porcentaje de prevalencia según la cantidad de muestras positivas (Aroussi et al., 2015).

Túnez

Otro estudio se enfocó en estimar la prevalencia de *T. gondii* en carne de ovejas, vacas y cabras destinadas a consumo humano en el noreste de Túnez, África. 150 muestras de carne de oveja, 120 de cabra y 150 de vaca fueron tomadas en el rastro regional para un total de 420 muestras de músculos del cuello, fueron analizadas usando PCR para determinar la presencia de ADN del parásito. Los

resultados mostraron la siguiente prevalencia; muestras de ovejas 33.3% (50/150), muestras de cabras 32.5 (39/120) y bovinos 19.3% (29/150). El factor de riesgo que resaltó en estos resultados fue la edad. En términos generales, los animales adultos parecen tener mayor susceptibilidad al parásito en comparación con animales jóvenes (Cuadro 4) (Amdouni et al., 2017).

Estudios en México

México cuenta con diferentes estudios tanto en humanos como en animales acerca de este importante tema, los mismos se describen a continuación:

Cuadro 4 Asociación entre la prevalencia de *T. gondii* en muestras de carne de ovejas, cabras y vacas y grupos de edad en Túnez, Africa.

Especie	Grupo de edad en años	Positivos	OR	Valor de P
Ovejas	<1	13/75	0.22	<0.001
	≥1	37/75		
Cabras	≤3	18/30	0.08	<0.001
	4 a 5	20/60		
	≥6	1/30		
Vacas	<2	2/54	0.10	0.0009
	2 a 8	17/66		
	≥8	10/30		

(Amdouni et al., 2017)

Estudios de prevalencia en Humanos en México

Se han realizado estudios para determinar la presencia del parásito en la población adulta de México, por ejemplo, en Oaxaca, la seroprevalencia general fue de 3.8% (124/3229) con una pequeña variación dependiendo de la comunidad rural muestreada. Posteriormente, en la ciudad de Comitán, Chiapas se detectó una prevalencia de 5% de anticuerpos contra *T. gondii* en la población general y 18% previo al parto en mujeres diagnosticadas con riesgo de aborto. En un hospital de Durango, 343 mujeres embarazadas fueron evaluadas. 21 de ellas resultaron positivas a anticuerpos tipo IgG pero ninguna a IgM. En la misma región se reportó la prevalencia de IgG en 32 de 432 donadores de sangre aparentemente saludables con 8 de ellos siendo positivos también a IgM. (Hernández-Cortázar et al., 2015).

Un estudio fue realizado en el Hospital comunitario de la ciudad de Ticul y el Hospital Materno-Infantil de Mérida, Yucatán entre 2008 y 2009. La población de estudio fueron mujeres con aborto espontáneo. Se tomaron muestras de suero de 100 pacientes con aborto espontáneo para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgM contra *T. gondii*. Además, se utilizó PCR para determinar la presencia de ADN del parásito en muestras de sangre. Los resultados muestran que 58% (58/100) de las muestras resultaron positivas a al menos un análisis y se clasifican de la siguiente manera, 55% (32/58) fueron positivas a IgG, 3.4% (2/58) positivas a IgM, 8.6% (5/58) positivas a IgG e IgM, 10% (6/58) a IgG y PCR, 1.7% (1/58) a IgM y PCR, y 20.6% (12/58) a IgG, IgM, y PCR. Diferencias entre los hospitales fueron significativas sólo para IgM (valor de $P < 0.05$). Más estudios son necesarios

para evaluar el impacto de esta enfermedad y establecer medidas de control (Vado-Solís et al., 2013)

En el estado de Baja California, específicamente en el municipio de Ensenada se realizó un estudio en humanos donde se colectaron 139 muestras con la ayuda de tres laboratorios de la ciudad y con previo consentimiento de los participantes. Se utilizó la técnica de ELISA para detección de IgG contra *T. gondii*. Los resultados mostraron una prevalencia general de 8.6% sin diferencia entre hombres y mujeres (Cotázares J. et al, 2019).

Estudios de prevalencia en animales en México

Para el caso de las poblaciones animales en México también se han realizado algunos estudios donde se ha encontrado una amplia distribución del parásito.

Gatos: en el estado de Durango se detectó una prevalencia de 21% en una de 105 gatos muestreados. En el estado de Colima se encontró un 28.8% de seroprevalencia en 80 muestras analizadas. En la ciudad de México la prevalencia fue de 21.8%(n: 169). En el noreste de México se muestrearon 26 ocelotes resultando positivos el 69% de ellos. En el estado de Yucatán la seroprevalencia fue de 75.5% para IgM y de 91.8% para IgG siendo la población muestreada de 220 gatos(Hernández-Cortazar et al., 2015).

Otras especies: Aves; la crianza de aves de traspatio (gallinas, patos y pavos) nos ayuda a determinar la presencia del parásito ya que se alimentan directamente del suelo. El primer reporte en México muestra una seropositividad de

6.2% (13/208). *Ovejas*: La seroprevalencia en ovejas ha sido poco estudiada en México. En el estado de Oaxaca fueron estudiadas dos granjas ovinas con un total de 429 individuos resultando positivos a *T. gondii* 99 ovejas que representa 23.1%(Alvarado-Esquivel et al., 2013).

Signos asociados a la presencia de *T. gondii* en diferentes especies

Felinos: A pesar de la alta frecuencia de infección en gatos, la enfermedad clínica es rara, sin embargo, enteritis, inflamación de linfonodos mesentéricos, neumonía, trasmisión congénita, cambios degenerativos en sistema nervioso central y encefalitis han sido reportados en infecciones experimentales.

Caninos: el inicio de la enfermedad está marcado por fiebre, depresión, anorexia y diarrea. La neumonía y manifestaciones neurológicas también son comunes (Taylor et al., 2007).

Otras especies: En caballos, se han registrado fiebre, encefalitis, ataxia y degeneración retiniana. El ganado bovino rara vez tiene síntomas; pero en terneros infectados experimentalmente se ha descrito fiebre, dificultad respiratoria, rinorrea e hiperemia conjuntival. Las infecciones sintomáticas, algunas letales, pueden verse en conejos, cobayos y otros mamíferos pequeños. Los roedores infectados pueden abortar en forma repentina. Algunas especies de marsupiales y monos del Nuevo Mundo (familias Cebidae, Aotidae, Pitheciidae, Atelidae y Callitrichidae) son muy susceptibles a la toxoplasmosis. Las infecciones en las aves son comunes, pero rara vez sintomáticas (TCFSPH y IICAB, 2005).

Humanos: la toxoplasmosis es clínicamente relevante en individuos con inmunodepresión ocasionada por infecciones como el VIH o por tratamiento médico con inmunosupresores. Los pacientes desarrollan problemas graves, como encefalitis, retinocoroiditis, daño sistémico generalizado, hepato o esplenomegalia y alteraciones de glándulas, entre otros. La toxoplasmosis es causa de abortos, pues la mayoría de los embriones infectados muere (Correa, 2017).

T. gondii también se asocia con desórdenes mentales y particularmente con esquizofrenia basado en la habilidad que tiene el parásito de sobrevivir en las células nerviosas. Un estudio realizado en Rusia donde se tomaron muestras serológicas en 155 pacientes diagnosticados con esquizofrenia y 152 muestras de un grupo control sano muestra que 40%(62/155) de las personas con esquizofrenia fueron seropositivos a *T. gondii* mientras que en el grupo control solo se reportó un 25%(39/152) de seropositividad (Stepanova et al., 2019).

Tratamiento

En el tratamiento de la toxoplasmosis se han empleado las sulfonamidas y la pirimetamina, fármacos que actúan sinérgicamente mediante el bloqueo de la vía metabólica, donde participa el ácido p-aminobenzoico y el ciclo del ácido fólico-folínico. Debido a la formación de cristales en los túbulos renales por las sulfonamidas, se recomienda una adecuada hidratación en los gatos durante el uso de este tratamiento (Dubey 2010). Por otra parte, López (2018), menciona el uso de Pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina y trimetoprim-sulfametoxazol como terapia contra toxoplasmosis en humanos.

Diagnóstico

La toxoplasmosis es usualmente detectada con base en la detección de anticuerpos. Sin embargo las técnicas moleculares son parte del complemento en el diagnóstico primordialmente en tejidos (Díaz et al, 2014).

Diagnóstico serológico

La detección de anticuerpos es la herramienta principal en la detección de la enfermedad. La presencia de anticuerpos IgG es indicativo de afección crónica mientras que la detección de anticuerpos IgM solos o junto a IgG se asocia a infestación aguda. Las pruebas serológicas específicas que con mejor aceptación son: Sabin-Feldman (solo en humanos) y ELISA IgM e IgG. (Jones et al., 2003).

Ybañez et al. (2020), realizaron un estudio utilizando 100 muestras de suero sanguíneo de gatos, para valorar la efectividad de la prueba serológica de inmunocromatografía utilizando como antígeno proteína de gránulos densos de membrana celular de *T. gondii* obteniendo resultados favorables a esta técnica que resultó en una sensibilidad de 97.4 a 100% y una especificidad de 89.7 a 100% para la detección de anticuerpos IgG. Además, los autores hacen referencia a la prueba de ELISA indirecto con una sensibilidad de 100% y especificidad de 87.7 a 89%. Por otra parte Batista et al. (2014), reportaron el uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. gondii* en recién nacidos, misma que mostró un 100% de sensibilidad y 95.8 % de especificidad mientras que Cotázares J. et al en 2019 reporta el uso de un kit de

diagnóstico de ELISA para el análisis de muestras de humanos que cuenta con 100% de sensibilidad y 99.1% de especificidad utilizado en su estudio de prevalencia en Ensenada, Baja California, México.

En California, EUA, se realizó un estudio donde se evaluaron tres pruebas rápidas para detección de anticuerpos IgG e IgM contra *Toxoplasma* denominadas Biopanda, Onsite y LDBIO basadas en la técnica de inmunocromatografía. Para someterlas pruebas se utilizaron 310 muestra de suero obtenidas de los bancos biológicos de la fundación medica Palo Alto (210) y del centro de control y prevención de enfermedades (100) ambos en California, 170 confirmadas positivas y 140 negativas con la técnica de Sabin-Feldman Dye Test la cual es la prueba confirmatoria en humanos. La sensibilidad para los tres kits de diagnóstico coincidió en 100% mientras que la especificidad fue variada; Biopanda 62,2%, Onsite 28% y LDBIO 100%. A pesar de que los autores no enfatizan en las posibles causas de tan marcada variación nos queda claro que la inmunocromatografía podría ser usada como una prueba confiable (Gomes et al 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y localización del área de estudio

Con el fin de responder al objetivo general de trabajo se realizó un estudio epidemiológico transversal o de prevalencia. La colección de muestras se llevó a cabo en gatos atendidos en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies (HVPE) del Instituto en Ciencias Veterinarias (IICV) perteneciente a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y en el laboratorio privado Hema-Diagnóstico Veterinario, ambos ubicados en el municipio de Mexicali, Baja California, México. Las muestras obtenidas fueron procesadas en el Laboratorio de Serología de la Unidad de Laboratorios de Diagnóstico del IICV de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en la ciudad de Mexicali, Baja California, México. El municipio de Mexicali presenta un clima árido-seco con temperaturas cálidas que oscilan entre los 32 a 44 grados Celsius en verano y disminuyen entre 5 a 21 grados en invierno. La precipitación pluvial promedio es de 79 mm al año (CENAPRED, 2012).

Criterios de inclusión

Fueron incluidos en el estudio durante el periodo septiembre 2020 a mayo 2021 todas aquellas muestras de sangre de pacientes felinos domésticos que llegaron por cualquier motivo de consulta al HVPE. Además, se solicitó el consentimiento de los propietarios para participar en el estudio y para llenar una encuesta para identificar factores de riesgo. Además se incluyeron todas las muestras de sangre de gatos que llegaron para diagnóstico al laboratorio Hema.

Toma de muestra de sangre

Con el fin de detectar la presencia de anticuerpo contra *T. gondii*, se tomaron 262 muestras de sangre mediante la punción de la vena yugular colectando de 2 a 3 ml que fueron colocadas en tubos al vacío con anticoagulante EDTA Vacutainer™. Las muestras colectadas fueron identificadas y conservadas en hieleras térmicas con refrigerantes en gel por no más de 30 minutos mientras fueron transportadas al Laboratorio de Serología de la ULADI en el IICV-UABC, se almacenaron en refrigeración a 4 °C por 24 horas para permitir la separación del plasma del paquete celular por sedimentación natural y posteriormente aspirar el plasma utilizando micropipetas. Al finalizar el proceso de separación el plasma y capa flogística fueron colectados en volúmenes de 1 ml en tubos cónicos de tapa hermética de 1.5 ml de capacidad, identificados y almacenados en congelación a -20°C hasta el momento de las pruebas serológicas.

Toma de muestras de heces

Las muestras de heces se colectaron solicitando a los propietarios su recolección en la zona de la casa donde el paciente normalmente defeca. Estas fueron procesadas con un plazo máximo de 7 días, siendo refrigeradas entre 4-5 °C en el entretiem po. Las muestras de heces se procesaron usando la técnica de flotación descrita por Bowman (2004). Esta técnica inicia con la mezcla de 2 g de heces con 20ml sulfato de zinc en un recipiente desinfectado. La disolución restante se filtró y vertió en otro frasco previamente desinfectado, sobre este último se colocó un cubre-objeto dejándolo reposar por 15 minutos, transcurrido el tiempo se colocó

el cubre-objeto sobre un porta-objeto y se observó al microscopio con objetivo 10x y 40x en busca de oocitos de *T. gondii*.

Estandarización del sistema ELISA-rSAG1

Proteína recombinante SAG1 de *Toxoplasma gondii*

Para las pruebas serológicas se utilizó como antígeno de fase sólida la proteína recombinante SAG1 (rSAG1) de *T. gondii*, la cual se encuentra disponible comercialmente por la compañía *My-Biosource* (San Diego, CA). La proteína SAG1 pertenece a la familia de antígenos granulares de superficie (Wiethoelter et al., 2021). La proteína SAG1 es un polipéptido de 30 Kilo Daltons (KDa) de peso molecular el cual es altamente inmunogénico e inmunodominante que se expresa abundantemente en la superficie del parásito y es altamente conservado entre las diferentes cepas de *T. gondii* (Chahed, Bouratbine y Mousli, 2013).

Controles positivos y negativos

Para la identificación de controles positivos y negativos, se probaron 92 muestras de plasma seleccionadas aleatoriamente del banco de muestras colectadas para el presente estudio (n=262). Para tal efecto, se sensibilizaron 2 placas de 96 pozos con una concentración de 10 nanogramos (ng) y 2 placas de 96 pozos con una concentración de 50 ng de antígeno rSAG1 por pozo en solución de carbonato-bicarbonato pH 9.6 e incubadas a 4 °C toda la noche. Las muestras de plasma se probaron por duplicado a razón de 46 por cada placa sensibilizada utilizando una dilución de trabajo 1:100 en solución de hidroximetil-aminometano adicionada con 0.05% de Tween-20 (TRIS). Después de 1 hora de incubación a 36

°C y lavado por cinco veces con solución salina de fosfatos adicionada con 0.05% de Tween-20 (PBST), se agregó en cada pozo el conjugado enzimático anti-gato IgG + peroxidasa diluido 1:10,000 en TRIS y se incubó por una hora a 36 °C, seguido de cinco lavados como ya se mencionó anteriormente (Figura 3). Posteriormente se agregó el sustrato enzimático de tetrametilbencidina (TMB) preparado en solución de ácido cítrico y peróxido de hidrógeno e incubando a temperatura ambiente por 15 minutos protegido de la luz. La reacción de color resultante fue detenida agregando a cada pozo solución de ácido sulfúrico 0.16M. Los valores de densidad óptica (DO) se obtuvieron utilizando un lector de ELISA automatizado a 450 nm de longitud de onda. Todos los pasos de escrutinio para controles positivos se realizó con un volumen de 100 µl del reactivo correspondiente.

rSAG1: 20 ng/pozo; plasma 1:100; conjugado: 1:5,000													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E												H ₂ O	E
F												H ₂ O	F
G												H ₂ O	G
H												H ₂ O	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

rSAG1: 20 ng/pozo; plasma 1:100; conjugado: 1:10,000													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E												H ₂ O	E
F												H ₂ O	F
G												H ₂ O	G
H												H ₂ O	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

rSAG1: 40 ng/pozo; plasma 1:100; conjugado: 1:5,000													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E												H ₂ O	E
F												H ₂ O	F
G												H ₂ O	G
H												H ₂ O	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

rSAG1: 40 ng/pozo; plasma 1:100; conjugado: 1:10,000													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E												H ₂ O	E
F												H ₂ O	F
G												H ₂ O	G
H												H ₂ O	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

Figura 3. Escrutinio de muestras de plasma (n=92) para identificación de controles positivos y negativos.

Estandarización de la prueba ELISA-rSAG1

La proteína rSAG1 fue estandarizada como antígeno de fase sólida para la detección de anticuerpos contra *T. gondii* en un sistema ELISA indirecto. La concentración óptima de antígeno, plasma y las diluciones del anticuerpo conjugado enzimático fueron determinadas mediante el procedimiento estándar de titulación en formato de tablero de ajedrez (Lin et al, 2018).

Brevemente, la proteína rSAG1 fue diluida en solución de carbonato-bicarbonato pH 9.6 a una concentración de 40.0, 20.0, 10.0 y 5.0 ng de antígeno de proteína rSAG1 por pozo en platos separados. Después de incubarse durante 24 horas a 4 °C, las placas estuvieron listas para usarse. Para realizar las pruebas, las placas se lavaron cinco veces con PBST, los controles positivos y negativos fueron diluidos en forma seriada de 1:25 a 1: 200 y agregados por duplicado en pozos específicos de los platos de ELISA. Después de incubar a 37 °C durante 1 hora, las placas fueron lavadas como se describió anteriormente y se agregó a cada pozo 100 µl de conjugado de anti-gato IgG + HRP a concentraciones decrecientes de 1: 5,000, 1: 10,000, 1: 20,000 y 1: 40,000 en PBST (Figura 2). Después de otra ronda de incubación y lavado, se agregó a cada pozo 100 µl de solución de sustrato TMB. La reacción de color fue detenida después de 10 a 15 minutos de incubación a temperatura ambiente agregando a todos los pozos 30 µl de solución de ácido sulfúrico 0.16M. Los valores de DO se obtuvieron a 450 nm de longitud de onda usando un lector de ELISA automatizado. Las concentraciones y distribución en las placas de ELISA de antígeno, muestras de plasma y conjugado enzimático utilizadas durante los experimentos de estandarización se muestran en la Figura 4.

Los criterios de selección para el mejor rendimiento del sistema ELISA se determinaron en función de la cantidad de antígeno por pozo, la dilución de la muestra de plasma y la dilución del conjugado enzimático que resultó en la máxima amplitud de diferencia entre el valor medio de la DO del suero de control positivo sobre el valor medio de OD del suero de control negativo, el cual se expresa como el cociente de la relación positivo/negativo (Pandolfi et al, 2017).

Análisis de datos para la pruebas ELISA-rSAG1

Los resultados de las pruebas ELISA-rSAG1 fueron generados y analizados con base en la DO obtenida después de 15 minutos de reacción con el sustrato TMB y lectura a 450 nm. A partir de los datos de estandarización empleando controles positivos y negativos, se calcularon los indicadores estadísticos básicos de promedio (media aritmética), mediana, desviación estándar (DE) y razón positivo/negativo de cada experimento. A partir de la DO de las muestras, se calculó el límite inferior (Li), límite superior (Ls) y se construyeron tablas de frecuencia absoluta y frecuencia acumulada empleando distribución por cuartiles.

Base de datos

Se diseñó una base de datos en el programa de Excel para la captura y manejo de la información generada en el HVPE. Las variables capturadas fueron las siguientes: identificación del paciente, edad (joven menos de 1 año/adulto), raza (mixto/raza pura), sexo (hembra/macho), tipo de agua que consume (purificada/no purificada), actividad cazadora (si/no), desparasitación periódica (si/no) y disponibilidad de caja

de arena (si/no). Las variables fueron obtenidas de la encuesta aplicada a los propietarios de los felinos.

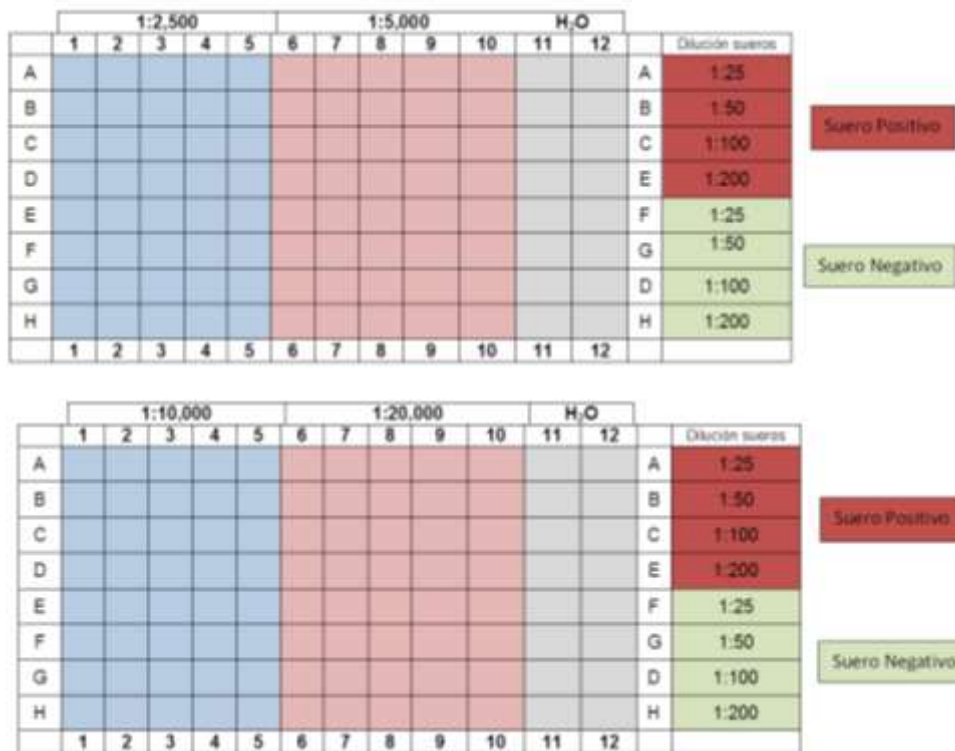


Figura 4. Estandarización del sistema ELISA-rSAG1 para *T. gondii* empleando un formato de tablero para establecer las condiciones óptimas de sueros controles positivos, negativos y conjugado enzimático.

Análisis estadísticos

La Prevalencia de la enfermedad se determinó a partir del cociente del número de casos positivos entre el número de pacientes atendidos en el periodo de estudio.

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Casos positivos}}{\text{Total de pacientes atendidos}}$$

La significancia de la asociación entre la presencia del parásito y los factores de riesgo se analizó con la prueba estadística χ^2 . A su vez, se determinó la magnitud de asociación entre pacientes positivos y los factores de riesgo calculando la tasa de momios (OR) y su intervalo de confianza al 95%. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistix 9.0.

RESULTADOS Y DICUSIÓN

Estandarización del sistema ELISA-rSAG1

Controles positivos y negativos

Con el propósito de identificar al menos una muestra reactiva para ser utilizada como control positivo, se probaron por duplicado 92 muestras de plasma seleccionadas aleatoriamente del banco de muestras colectadas para el presente estudio (n=262) y probadas en placas sensibilizadas con 10 y 50 ng de antígeno SAG1. Los resultados de las pruebas con una concentración de 10 ng de SAG1 por pozo demostraron la presencia de una muestra que desarrolló una DO promedio de 0.893 y otra muestra que desarrolló una DO promedio de 0.174, para una razón positivo/negativo de 5.25 en ese experimento. De la misma forma, los resultados de las pruebas con una concentración 50 ng de SAG1 por pozo, las mismas muestras desarrollaron una DO promedio de 0.873 y una DO promedio de 0.190, para una razón positivo/negativo de 4.95. Con base en lo anterior y siguiendo los lineamientos establecidos por Pandolfi y col (2017), dicha muestra cumple con los criterios de DO y amplitud de diferencia para producir una razón positivo/negativo ≥ 3.0 y ser utilizado como control positivo para las pruebas ELISA de este trabajo. Por lo anterior, para efectos de este estudio las muestras fueron consideradas como positivas cuando presentaban valores ≥ 0.300 DO.

Estandarización del sistema ELISA-rSAG1

La proteína rSAG1 fue probada como antígeno de fase sólida en un sistema ELISA que incluyó una combinación de distintas concentraciones de suero

control positivo, controles negativos, conjugado enzimático y sustrato indicador de color (Lin et al., 2018).

El análisis de los valores de DO obtenidos de esos experimentos indican que la mayor amplitud entre los controles positivos y negativos se logró al inmovilizar 10 ng de rSAG1 pozo con una dilución de los sueros problema 1:200 y conjugado enzimático diluido 1:10,000, para una razón positivo/negativo de 7.21 (Cuadro 1.).

En general, el grado de reactividad del suero control positivos y suero negativo seleccionados, junto con el resto de los reactivos del ELISA-LipL32 resultó en el desarrollo de DO con valores constantes y uniformes para todas las combinaciones probadas. Las concentraciones y diluciones que mostraron el mejor desempeño en los experimentos de estandarización (Cuadro 5) fueron utilizadas para probar las 262 muestras de plasma.

Cuadro 5. Concentraciones de antígeno rSAG1, diluciones de sueros controles, dilución del conjugado enzimático y razón positivo/negativo de los experimentos de estandarización del sistema ELISA-rSAG1.

	Promedio DO	Promedio DO	Razón
Dilución Suero	Suero Positivo ⁽¹⁾	Suero Negativo ⁽¹⁾	POS/NEG
1:25	0.606	0.155	3.910
1:50	0.636	0.153	4.160
1:100	0.675	0.132	5.110
1:200	0.665	0.102	7.210 ⁽²⁾

(1) Conjugado diluido a 1:10,000

(2) Condiciones seleccionadas para probar muestras desconocidas

Detección de *T. goondii* por medio de análisis coprológicos

Se analizaron un total de 35 muestras utilizando la técnica de flotación; en ninguna de las muestras se observaron ooquistes de *T. goondii*. Una posible explicación a este comportamiento es que dentro del ciclo de vida del parásito, el periodo de tiempo que es excretado en heces es muy corto, de 3 a 10 días post-exposición (Palmezano-Díaz et al, 2015) y en ocasiones, cuando el sistema inmune es competente, existe nula excreción al medio ambiente, por el contrario el parásito migra directamente al torrente sanguíneo y diferentes tejidos corporales (TCFSPH y IICAB. 2005).

La mayoría de los estudios orientados en detectar el ooquiste en muestras de heces de gatos se han realizado usando PCR para detectar material genético de *T. gondii* mostrando muy bajas prevalencias. Lily y Worthman (2013) utilizaron PCR y detectaron un 6% (3/49) de prevalencia en muestras de heces de gatos callejeros en Virginia. Davis et al (2018) realizaron un estudio con la misma metodología detectando una prevalencia del 5% (3/60) de muestras de heces de gatos callejeros en Hawái. Es evidente que debido a la naturaleza del ciclo biológico del parásito es difícil detectarlo en heces y esta es la razón primaria por la que su monitoreo epidemiológico se orienta principalmente a la detección de anticuerpos en suero/plasma sanguíneo.

Seroprevalencia de *T. gondii* utilizando el sistema ELISA-rSAG1 en muestras de plasma de gatos

Las muestras serológicas fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo a su procedencia calculando la prevalencia en cada uno de ellos. El primero grupo de muestras procedente del HVPE mostró una seroprevalencia de 40.7%, el segundo grupo procedente del laboratorio privado presentó 47.7% de prevalencia mientras que el conjunto de muestras procedentes de ambos, HVPE y laboratorio privado, demuestran un 45.4% de prevalencia. Los resultados se resumen en el cuadro 6.

Cuadro 6. Seroprevalencia de *T. gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*) de acuerdo al origen de las muestras.

ORIGEN DE LA MUESTRA	PREVALENCIA (pos/n)
HVPE	40.7%(35/86)
Laboratorio Privado	47.7%(84/176)
General	45.4%(119/262)

Al comparar nuestros resultados con la prevalencia de otros países observamos comportamientos similares. En Estados Unidos, Dubey et al (2002), reportó en el estado de Ohio un 48% (n=133) de seroprevalencia en gatos domésticos, por otra parte, DeFeo et al (2002), reportó una seroprevalencia de 42% (n=200) en el estado de Rhode Island al norte de E.U.A. Sin embargo, otros países como Sri Lanka (Kulasena et al, 2011) y Japón (Salman et al, 2018) mostraron prevalencias más bajas de 30.2% (n=86) y 16.1% (n=353) respectivamente.

Analizando la prevalencia de nuestro estudio en comparación con la reportada en otros estados dentro de la República Mexicana podemos observar que el rango de prevalencias también es muy amplio. Alvarado-Esquivel et al (2007), reportaron un 21% (n=105) en el estado de Durango, Hernández-Cotázar et al (2015), reportaron un 28.8% (n=80) en Colima, 21.8% (n=169) en Ciudad de México y 91.8%(n=220) en Yucatán.

De acuerdo a la historia natural de este parásito, es conocido que este tiene una mayor probabilidad de sobrevivencia en su etapa de ooquiste en condiciones ambientales cálidas y con alta humedad, siendo este el clima que caracteriza la región centro-sur de México que reporta prevalencias de hasta 91% (Hernández-Cotázar et al, 2015). Por el contrario, su desempeño es afectado en condiciones de sequía, baja humedad y altas temperaturas (Grandia et al, 2013), considerando que Mexicali se encuentra en un área geográfica con condiciones poco favorables para el desarrollo de este parásito la prevalencia mostrada en nuestro estudio sorprende aun cuando se encuentra dentro del promedio nacional. Una posible explicación a este comportamiento es que quizás el parásito ha encontrado un nicho adecuado en nuestra región por lo que es necesario realizar estudios ecológicos sobre la

diversidad biológica y el funcionamiento del ecosistema regional sobre su sobrevivencia.

Una posible explicación a éste fenómeno es la diferencia entre la virulencia y capacidad de migración que caracteriza a cada uno de los 3 tipos de linajes de *T. gondii*. Saeij et al (2005), demostraron que el linaje Tipo I de posee mayor capacidad in vitro para atravesar la membrana renal y mayor movilidad a través de la matriz extracelular, al mismo tiempo, demostraron en una prueba in vivo que tuvo mayor capacidad de migración a través del vaso en perros.

La posibilidad que la diferencia en la prevalencia se deba a factores intrínsecos del agente más que solo del ambiente es válido a considerar ya que estos estudios se basan en la detección de anticuerpos y no en la caracterización genética del agente.

Nuestro trabajo es el primer reporte en Baja California donde se documenta la seroprevalencia de toxoplasmosis en gatos. Considerando que esta enfermedad puede transmitirse a los humanos se tienen que diseñar políticas públicas que permitan desarrollar programas constantes de vigilancia epidemiológica sobre todo en estados donde se tienen registrados casos de toxoplasmosis en humanos como el nuestro (Velasco-Castrejón et al, 1991; Field-Cortázar, et al, 2019; Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2021).

Análisis de factores de riesgo

Los estudios observacionales se utilizan para identificar factores de riesgo, y estimar los efectos cuantitativos de las diversas causas que contribuyen a la aparición de la enfermedad. Las investigaciones se basan en el análisis de la

aparición de enfermedades naturales en las poblaciones por comparar grupos de individuos con respecto a aparición de enfermedades y exposición a riesgos hipotéticos (Thrusfield, 2007). Diversos estudios han identificado factores de riesgo asociados a la presencia de toxoplasmosis en gatos. Lopes et al, (2008) encontraron que la edad está asociada a la presencia de toxoplasmosis, es decir a mayor edad, mayor posibilidad de ser positivo. Además, se identificó que los gatos que consumen carne cruda o mal cocida están más expuestos a la enfermedad. En contraste con el estudio realizado por Besné-Mérida et al, (2008), el contacto con otros gatos no resultó ser un factor de riesgo. Must et al (2015) reportaron que gatos adultos, gatos criollos y contar con acceso a la calle estuvieron asociados a la presencia del parásito. En nuestro trabajo, ningún factor de riesgo analizado fue estadísticamente significativo (cuadro 7). Una posible explicación a este evento es que las muestras que analizamos en nuestro estudio provienen de gatos que cuentan con dueños y que al ser cuestionados sobre programas de desparasitaciones el 29% (25/86) de ellos mencionaron que sus mascotas fueron desparasitadas a diferencia de los estudios previamente reportados.

Otro factor que tiene trascendental importancia es la higiene de los propietarios, en estudios en humanos se determinó que la exposición y contacto directo con el suelo así como bajo nivel socio-económico son factores de riesgo a *T. gondii* (Jones et al, 2014), desafortunadamente las variables mencionadas anteriormente no pudieron ser evaluadas en este estudio aunque suponemos que como los animales tiene dueños y los llevan a clínicas veterinarias para su atención estos propietarios cuentan con nivel socioeconómico mediano o alto.

Cuadro 7. Magnitud de asociación de factores de riesgo asociados con de *T. gondii* en gatos domésticos (*Felis catus*).

Variable	Categoría	-	+	OR	IC95%	Valor P
¹ Edad	Joven	39	35	1.0	Ref	N.A.
	Adulto	104	81	1.15	0.67-1.98	0.61
¹ Sexo	Macho	83	70	1.0	Ref	N.A.
	Hembra	60	49	1.03	0.63-1.69	0.90
¹ Raza	Raza pura	9	12	1.0	Ref	N.A.
	Mixto	134	107	1.67	0.68-4.11	0.26
² Actividad cazadora	Si	26	2	1.0	Ref	N.A.
	No	51	7	0.56	0.11-2.89	0.4843
² Desparasitación periódica	Si	22	3	1.0	Ref	N.A.
	No	55	6	1.25	0.29-5.44	0.7659
² Posee Caja de Arena	Si	54	7	1.0	Ref	N.A.
	No	23	2	1.49	0.29-7.72	0.6326
² Consumo de agua	Purificada	24	4	1.0	Ref	N.A.
	No purificada	53	5	1.77	0.43-7.17	0.4213

Nota: 1, datos en conjunto (HVPE y Laboratorio Privado); 2, Datos del HVPE

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado-Esquivel, C., M. A. Estrada-Malacón, S. O. Reyes-Hernández, J. A. Pérez-Ramírez, J. I. Trujillo-López, I. Villena and J. P. Dubey. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Domestic Sheep in Oaxaca State, Mexico. *Journal of Parasitology*. 99(1): 151-152.
- Amdouni, Y., M. R. Rjeibi, M. Rouatbi, S. Amairia, S. Awadi, and M. Gharbi. 2017. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered ruminants (sheep, goats and cattle) in Northwest Tunisia. *Meat Science*. 133: 180-184.
- Andrade, M. M. C., M. Carneiro, A. D. Medeiros, V. A. Neto and R. W. A. Vitor. 2013. Seroprevalence and risk factors associated with ovine toxoplasmosis in Northeast Brazil. *Parasite*. 20(20): 1-5.
- Aroussi, A., P. Vignoles, F. Dalmay, L. Wimel, M.-L. Dardé, A. Mercier and D. Ajzenberg. 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. *Parasite*. 22(14): 8-15.
- Batista, L. Y. G., D. C. Valdes, D. R. Sánchez, L. A. M. Cruz, L. Z. T. Ponce, y L. Mulet 2014. Comparación de dos métodos serológicos para el diagnóstico de

anticuerpos en neonatos. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 33(4):393-401.

Besné-Mérida, A., Figueroa-Castillo, J. A., Martínez-Maya, J. J., Luna-Pastén, H., Calderón-Segura, E., & Correa, D. 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Veterinary Parasitology*, 157(3-4), 310–313.

Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, del 26 de diciembre del 2021 al 1 de enero del 2022. 52:38.

Chahed Bel-Ochi N, Bouratbine A, Mousli M. 2013. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G antibodies in human sera and saliva. *Clin Vaccine Immunol*. 20(4):468-73.

Crespillo-Andujar, C., M. Díaz-Menéndez and M. Mora-Rillo. 2018. Transmission of Protozoan Parasites. *Emerging Infectious Diseases*. 24(3):602-603.

Correa D. 2017. Toxoplasmosis. *Ciencia*. 68(1): 54-57.

Davis A., Lepczyk C., Haman K., Morden W., Crow S., Jensen N., Lohr M. 2018. *Toxoplasma gondii* Detection in Fecal Samples from Domestic Cats (*Felis catus*) in Hawai'i. *Bio One Complete*.

Dubey, J. P. 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans* (2nd ed). CRC Press. U.S.A. 304 p.

Djurković-Djaković O., J. Dupouy-Camet, J. Van der Giessen and J. P. Dubey. 2019. *Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective*. *Food and Waterborne Parasitology*. 12(54):1-4 .

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

Esch, K. J., and C. A. Petersen. 2013. *Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(1): 58-85.

Fernández, N. R., y P. G. Dávila. 2017. *El papel de los gatos en la toxoplasmosis*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 60(6): 7-18.

Fonseca J. 2002. *PCR en Toxoplasmosis*. *Rev. Salud Pública*. 4(2):63-64.

Fusco, G., L. Rinaldi, A. Guarino, Y. T. R. Proroga, A. Pesce, D. M. Giuseppina and G. Cringoli. 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region, Italy. *Veterinary Parasitology*. 149(3-4): 271-274.

Grandía G. R., G. Á. Entrena and H., J. Cruz. 2013. Toxoplasmosis en *Felis catus*: etiología, epidemiología y enfermedad. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 24(2): 131-149.

Gomez, C. A., Budvytyte L., Press C., Zhou L., McLeod R., Maldonado Y., y Montoya, J. 2018. Evaluation of Three Point-of-Care Tests for Detection of Toxoplasma Immunoglobulin IgG and IgM in the United States: Proof of Concept and Challenges. Open Forum Infectious Diseases. 1-8.

Despina G. Contopoulos-Ioannidis². 2013. Toxoplasmosis en *Felis catus*: etiología, epidemiología y enfermedad. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 24(2): 131-149.

Hernández-Cortazar, I., K. Y. Acosta-Viana, A. Ortega-Pacheco, E. del S. Guzman-Marin, A. J. Aguilar-Caballero and M. Jiménez-Coello. 2015. Toxoplasmosis in Mexico: epidemiological situation in humans and animals. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 57(2): 93-103.

Hurley, R. A. and K. H. Taber. 2012. Latent *Toxoplasmosis gondii*: Emerging Evidence for Influences on Neuropsychiatric Disorders. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences. 24(4): 376-383.

Jones J., A. López and M. Wilson. 2003. Congenital toxoplasmosis. American family physician. 67(10): 2131-2138.

Kochanowsky, J. A., and A. A. Koshy 2018. *Toxoplasma gondii*. Current Biology. 28(14): 770-771.

Lin, H., Zhou, H., Gao, L., Li, B., He, K., & Fan, H. 2018. Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant spike protein. BMC veterinary research. 14(1). 243.

Lilly E. y Worthman C.. 2013. High prevalence of *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. BMC veterinary research. 14(1). 243.

Liyanage, K., Wiethoelter, A., Hufschmid, J., & Jabbar, A. 2021. Descriptive Comparison of ELISAs for the Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Animals: A Systematic Review. Pathogens. 10(5). 605.

Lopes, P., Cardoso, L., y Rodrigues, M. 2008. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. Veterinary Parasitology, 155(3-4), 184–189.

Lopes, W. D. Z., J. D. Rodriguez, F. A. Souza, T. R. dos Santos, R. S. dos Santos, W. M. Rosanese, W. R. Z. Lopes, C. A. Sakamoto and A. J. da Costa. 2013. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 195(1-2): 47-56.

Montoya J. G., and O. Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 363: 1965 p.

Moreno G. 2018. Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carne y leche de caprinos del norte de México. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Barcelona. 62-170.

Must, K., Lassen, B., & Jokelainen, P. 2015. Seroprevalence of and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Cats in Estonia. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 15(10).

Pandolfi R, Ramos de Almeida D, Alves Pinto M, Kreutz LC, Frandoloso R. 2017. In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti-hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil. *PLoS ONE*. 12(5).

Retmanasari, A., B. S. Widartono, M. A. Wijayanti and W. T. Artama. 2017. Prevalence and Risk Factors for Toxoplasmosis in Middle Java, Indonesia. *EcoHealth*. 14(1): 162-170.

Santana, L. F., A. J. Costa da, J. Pieroni, W. D. Z. Lopes, R. S. Santos, G. P. de Oliveira, R. P. de Mendonça and C. A. M. Sakamoto. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 19(3): 179-182.

Saeij, J., Boyle, J., & Boothroyd, J. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*, 21(10). 476–481.

Smith, J. R., and E. T. Cunningham. 2002. Atypical presentations of ocular toxoplasmosis: *Current Opinion in Ophthalmology*, 13(6), 387-392.

Stelzer, S., W. Basso, J. Benavides Silván, L. M. Ortega-Mora, P. Maksimov, J. Gethmann, F. J. Conraths and G. Schares. 2019. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology*. 12(37): 1-32.

Stepanova E. V., A. V. Kondrashin, V. P. Sergiev, L. F. Morozova, N. A. Turbabina, M. S. Maksimova, D. V. Romanov, M. A. Kinkulkina, A. V. Lazareva and E. N. Morozov. 2019. Toxoplasmosis and mental disorders in the Russian Federation (with special reference to schizophrenia). *Plos One*. 14(7): 1- 0.

TCFSPH y IICAB. 2005. Toxoplasmosis. College of veterinary medicine, Iowa State University. 1-6.

Vado-Solís, I. A., V. Suárez-Solís, B. Jiménez-Delgadillo, J. E. Zavala-Velázquez and J. C. Segura-Correa. 2013. *Toxoplasma gondii* Presence in Women with Spontaneous Abortion in Yucatan, Mexico. *Journal of Parasitology*. 99(2): 383-385.

Velasco-Castrejón, O., Salvatierra-Izabal, B., Valdespino, JL., Sedano-Lara, AM., Galindo-Virgen, S., Magos, C., Llausas A., Tapia-Conyer, R., Gutiérrez, G., Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiology of toxoplasmosis in Mexico. *Salud Publica Mex*. 34:222-229.

Wolf A., D. Cowen and B. Paige. 1939. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*. 89(2306): 226-227.

Ybañez, R., H. Kyan and Y. Nishikawa. 2020. Detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats using an immunochromatographic test based on GRA7 antigen. *The Journal of Veterinary Medical Science*. Advance Publication. Manuscript. 1-17.