



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EN CARNE Y
LECHE DE CAPRINOS DEL NORTE DE MÉXICO**

GUSTAVO MORENO DEGOLLADO

Bellaterra, Septiembre de 2018



Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis Doctoral

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EN CARNE Y LECHE DE
CAPRINOS DEL NORTE DE MÉXICO**

MC. GUSTAVO MORENO DEGOLLADO

Directores

DR. ARTUR XAVIER ROIG SAGUÉS

Profesor Titular del Departament de
Ciència Animal i dels Aliments,
Facultat de Veterinària de la UAB

DR. JUAN JOSÉ ZARATE RAMOS

Profesor Titular del Departamento
de Parasitología, Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia de la UANL

Tutora

DRA. MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO

Profesora Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments,
Facultat de Veterinària de la UAB

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària,
Bellaterra, Septiembre de 2018

DEDICATORIAS

“A mi esposa Anene y a mi hija Lizzie”

*Por todo el amor y apoyo que me han brindado desde que llegaron a mi vida, y ser la
inspiración para mi desarrollo personal y profesional.*

Mil gracias!!!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Artur Xavier Roig Sagués, Profesor Titular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona; por todo su gran apoyo, paciencia, consejos y asesoría para la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Juan José Zarate Ramos, Profesor Titular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León; por todo su apoyo, por todos sus consejos y asesoría; y por el financiamiento para realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila, Profesora Investigadora del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León; por todo el apoyo, asesoría y sus enseñanzas que me brindo para trabajar en el Laboratorio para la realización de este trabajo de investigación.

A la QBP. Stephany Ariatne Castillo Carranza y a la Tec. Cynthia Marisol Padrón Carrillo, por todo el apoyo y consejos que me brindaron en el presente trabajo.

A la Dra. Sibilina Cedillo Rosales, al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño y al Mtro. Ramón Copado García, por todo el apoyo que me brindaron en el presente trabajo.

A mis compañeros del programa doctoral Adelita, Bety, Lety, Lulú, Mirna, Paty, Tere, Arnoldo, José Luis, Marco y Rodrigo, gracias por su amistad, apoyo y esos buenos momentos de convivencia.

GD!

ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice de contenido.....	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xv
Índice de anexos	xvi
Lista de abreviaturas	xvii
Resumen	xix
Abstract.....	xx
Abstract.....	xxi
1.Introducción y objetivos	1
1.1. Introducción	1
1.2. Justificación	4
1.3. Hipótesis	5
1.4. Objetivo general.....	6
1.5. Objetivos específicos	6
2.Literatura citada.....	7
2.1. La caprinocultura en el mundo, en México y en su región norte.....	7

2.2.	Agente Etiológico de la Toxoplasmosis	12
2.3.	Epidemiología	14
2.3.1.	Vías de transmisión	18
2.3.1.1.	Transmisión digestiva	19
2.3.1.2.	Transmisión congénita	20
2.3.1.3.	Transmisión parenteral	20
2.4.	Características de la enfermedad	21
2.4.1.	Patogenia	21
2.4.2.	Toxoplasmosis en rumiantes	22
2.4.3.	Toxoplasmosis en humanos	23
2.5.	Toxoplasma en alimentos	24
2.6.	Diagnóstico	26
2.6.1.	Métodos diagnósticos convencionales.....	26
2.6.2.	Métodos diagnósticos moleculares.....	27
2.6.2.1.	Métodos para la detección de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras biológicas:.....	28
2.6.2.2.	Métodos de alta resolución para la identificación de aislados de <i>T. gondii</i>	29
3.	Materiales y Métodos	31
3.1.	Área de estudio	31
3.2.	Toma de muestras	31

3.2.1.	Muestras de carne	31
3.2.2.	Muestras de leche	33
3.3.	Extracción del ADN genómico de las muestras	33
3.3.1.	Muestras de carne	33
3.3.2.	Muestras de leche	34
3.4.	Análisis y cuantificación del ADN	35
3.5.	PCR del gen constitutivo del Citocromo b	35
3.6.	Estandarización de la técnica de PCR para detección de <i>T. gondii</i>	36
3.7.	Detección de <i>T. gondii</i> mediante la prueba PCR en muestras de carne y de leche.	39
3.8.	Secuenciación y análisis de homología de los productos amplificados.....	39
4.	Resultados.....	40
4.1.	Extracción de ADN.....	40
4.2.	PCR del gen constitutivo del Citocromo b	41
4.3.	Estandarización de la técnica de PCR para amplificación del gen B1 de <i>T.</i> <i>gondii</i> con la cepa de referencia RH	43
4.4.	Resultados de PCR para la detección de <i>T. gondii</i> en muestras de carne de caprinos y leche de cabra	45
4.5.	Secuenciación y análisis de homología	51
5.	Discusión	54
6.	Conclusiones.....	60

7.Bibliografía.....	61
8.Anexos.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Población mundial de cabras. Cabezas de ganado caprino por continente. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Dirección de Estadística. Adaptado de FAOSTAT 2014..... 8
- Figura 2. Distribución del inventario caprino y producción de carne y leche caprina en México. Tomado de Comité Nacional Sistema Producto Caprinos, 2011. 8
- Figura 3. Elaboración propia. Mapa de México. Se indica los 7 estados del norte del país que conforman la región Norte. 11
- Figura 4. Elaboración propia. Mapa de México. Se indica los 4 estados del norte del país donde se recolectaron las muestras de carne de cabrito y las de leche de cabra para esta investigación. 31
- Figura 5. Extracción de ADN del control positivo de *T. gondii*..... 40
- Figura 6. Extracción de ADN de muestras representativas de carne de cabritos de los estados del Norte de México. A) Durango, B) Coahuila, C) Chihuahua y D) Nuevo León. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. 40
- Figura 7. Extracción de ADN de muestras representativas de leche de cabra de los estados del Norte de México. A) Durango, B) Coahuila, C) Chihuahua y D) Nuevo León. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. 41
- Figura 8. Amplificación del gen constitutivo del Citocromo b en muestra de sangre de caprino. Gradiente de temperatura. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. M Marcador de peso molecular 100 pb. 42
- Figura 9. Amplificación del gen constitutivo del Citocromo b en muestras de carne. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. M:

Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo cepa de referencia RH, 187 a 199: Muestras de carne.	42
Figura 10. Amplificación del gen constitutivo del Citocromo b en muestras de leche. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo Cepa de referencia RH, 1 a 6: Muestras representativas de leche.	43
Figura 11. Primera Ronda de PCR de DNA de la cepa de referencia RH de <i>T. gondii</i> . Amplificación de 193 pb del gen B1 con los cebadores N1 C1. M: Marcador de peso molecular 100 pb, Diluciones de la cepa de referencia RH: 1: Dilución 1:10, 2: Dilución 1:50, 3: Dilución 1:100, 4: Dilución 1:200, C+: 1 µl directo de la cepa de referencia RH, C-: (sin ADN).	44
Figura 12. nPCR de la cepa de referencia RH de <i>T. gondii</i> . Amplificación de 97 pb del gen B1 con los cebadores N2 C2. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 1: 1µl del producto amplificado a partir de Dilución 1:10, 2: Dilución 1:50, 3: Dilución 1:100, 4: Dilución 1:200, C+: 1 µl directo de la cepa de referencia RH, C-: (sin ADN).	44
Figura 13. Gradiente de PCR de la cepa de referencia RH de <i>T. gondii</i> . Amplificación de 193 pb del gen B1 con los cebadores N1 C1. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 1: Alineamiento a 49.5°C, 2: Alineamiento a 50.7°C, 3: Alineamiento a 57.4°C, 4: Alineamiento a 60.9°C, 5: Control negativo.	45
Figura 14. Amplificación por PCR con cebadores N1 C1 en muestras de carne de cabrito. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 187-199: Muestras de músculo de diafragma de cabrito positivas a <i>Toxoplasma</i> , C+: Control positivo, C-: Control negativo.	46
Figura 15. Amplificación por nPCR de <i>T. gondii</i> en muestras de carne de cabrito. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 187-199: Muestras de músculo de diafragma de cabrito positivas a <i>Toxoplasma</i> . C+: Control positivo, C-: Control negativo.	46
Figura 16. PCR de <i>T. gondii</i> en combinados de muestras de leche con los cebadores N1 C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 200 pb, C+:	

Control positivo, P1CH a P5CH: Combinados de muestras del Estado de Chihuahua, C-:
Control negativo. 47

Figura 17. PCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N1
C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+:
Control positivo, P1C a P5C: Combinados de muestras del Estado de Coahuila, C-:
Control negativo. 47

Figura 18. PCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N1
C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C-:
Control negativo, P1D a P5D: Combinados de muestras del Estado de Durango, C+:
Control positivo. 48

Figura 19. PCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N1
C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: M: Marcador de peso molecular 100
pb, C+: ADN de cepa control, P1 a P5: Combinados de muestras del Estado de Nuevo
León, C-: control negativo. 48

Figura 20. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2
C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+:
Control positivo, P1CH a P5CH: Combinados de muestras de Chihuahua, C-: Control
negativo. 49

Figura 21. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2
C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+:
ADN de cepa control, P1C a P5C: Combinados de muestras del Estado de Coahuila, C-:
Control negativo. 49

Figura 22. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2
C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+:
Control positivo, P1D a P5D: Combinados de muestras del Estado de Durango, C-:
Control negativo. 50

Figura 23. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2
C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+:

Control positivo, P1NL a P5NL: Combinados de muestras del Estado de Nuevo León, C-
: Control negativo. 50

Figura 24. Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas a partir de los productos de PCR para *T. gondii* de las muestras 187, 188, 192, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 193 y la secuencia AF.179871.1. Las secuencias fueron editadas con el programa Editseq/DNAstar v. 13, el alineamiento múltiple de las secuencias y la secuencia parcial del gen B1 de la cepa RH de *T. gondii* obtenida del GenBank con el número de acceso AF179871.1 se realizó con el programa MegAlign 13/DNAstar v.13. En la primera fila se describe la secuencia de nucleótidos que posee la mayoría. Los números de la segunda fila representan el número de base con respecto a la secuencia del GenBank AF179871.1, las secuencias analizadas de este estudio se describen a continuación, de lado derecho se establece el número de base correspondiente a cada secuencia. 53

Figura 25. Distancia genética de las secuencias de las muestras analizadas (187, 188, 192, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 193) y la cepa RH de *T. gondii* depositada en el GenBank (AF179871.1). El porcentaje de similaridad fue del 100% para las secuencias analizadas con respecto a la reportada al GenBank. No se mostró divergencia en estos casos. 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estados de México con mayor población caprina y su producción de carne y leche.....	10
Tabla 2. Estados de la región norte de México, población caprina y su producción de carne y leche.	11
Tabla 3. Estudios sobre toxoplasmosis en rumiantes de México.	15
Tabla 4. Mortalidad nacional por toxoplasmosis en México en año el 2012.	18
Tabla 5. Distribución de las muestras de carne de cabrito por entidad federativa.	32
Tabla 6. Distribución de las muestras de leche de cabra por entidad federativa.	33
Tabla 7. Condiciones de amplificación para PCR del gen constitutivo del Citocromo b.	36
Tabla 8. Condiciones de amplificación para PCR y para nPCR.	38
Tabla 9. Resultados de las muestras de carne de cabrito analizadas por las técnicas de PCR y para nPCR distribuidas por localidad de origen.....	46
Tabla 10. Secuencias parciales del gen B1 de los productos de PCR de las muestras positivas de <i>T. gondii</i>	51

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Antecedentes históricos de la Toxoplasmosis	79
ANEXO 2. Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en animales de México.	80
ANEXO 3. Principales causas de mortalidad en humanos sujetas a vigilancia epidemiológica nacional y por entidad federativa en México: 2012.	82
ANEXO 4. Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en los humanos adultos de México: 1989-2012.	84
ANEXO 5. Determinación del tamaño de muestra (carne de cabrito) en los estados de Chihuahua y Coahuila, WinEpi.	86
ANEXO 6. Determinación del tamaño de muestra (carne de cabrito) en los estados de Durango y Nuevo León, WinEpi.	87
ANEXO 7. Determinación del tamaño de muestra (leche de cabra) en los estados de Chihuahua y Coahuila, WinEpi	88
ANEXO 8. Determinación del tamaño de muestra (leche de cabra) en los estados de Durango y Nuevo León, WinEpi.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

C+: Control Positivo (cepa de referencia RH)

C-: Control Negativo

Col: Colaboradores

DEPC: Agua tratada con Dietilpirocarbonato

DGIS: Dirección General de Información en Salud

dNTP's: Desoxiribonucleótidos trifosfatados

EDM: Edad promedio a la muerte

EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

fg: Fentogramos

ID: Número de Identificación de Muestra

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

M: Marcador de Peso Molecular

mg: Miligramo

ml: Mililitro

MLST: Micro satélites y Tipificación de Secuencias Multilocus (del inglés: Microsatellite or Multilocus Sequence Typing)

ng: Nanogramo

nm: Nanómetro

nPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (del inglés: Nested Polymerase Chain Reaction)

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

pb: Pares de bases

pg: Picogramos

PBS: Buffer de Fosfatos

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)

PCR-RFLP: Polimorfismo de Fragmentos Largos de Restricción- Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Tiempo Real (del inglés: Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR: Retro Transcriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasa

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

T. gondii: Toxoplasma gondii

TIF: Tipo Inspección Federal

U: Unidades

μl: Microlitro

μM: Micromolar

RESUMEN

El *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un agente parasitario que causa la toxoplasmosis, enfermedad que afecta a un gran número de hospedadores vertebrados incluido el humano y presenta una amplia distribución mundial. El objetivo del presente trabajo fue detectar material genómico de *T. gondii* en carne y leche de caprinos del Norte de México. Se colectaron 326 muestras de carne de cabritos provenientes de 4 estados del norte de la república, en un rastro Tipo Inspección Federal (TIF) ubicado en el estado de Nuevo León; y 120 muestras de leche de cabra colectadas en los predios de los productores de las mismas entidades federativas. Para la detección de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de este parásito se desarrolló la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR anidada (nPCR), para amplificar una región del gen multicopia específico de *T. gondii* B1 utilizando los cebadores N1 C1 para la primer PCR, amplificando un fragmento de 193pb, y para la nPCR los cebadores N2 C2 amplificando un fragmento de 97pb. Del total de las muestras de carne colectadas se obtuvieron positivas 10 (3.06%) a la primer PCR, las mismas que amplificaron en la nPCR, todas ellas provenientes del estado de Chihuahua. Se obtuvieron las secuencias consenso de las muestras positivas de carne, estas secuencias fueron analizadas y alineadas mediante el Método de Clustal W del programa MegAlign/DNAStar versión 13 en busca de homología con secuencias previamente reportadas en el GenBank (Nucleotide), estableciéndose un 100% de homología entre todas las secuencias y con la secuencia reportada en el GenBank con el número de acceso AF179871.1 (Secuencia parcial del Gen B1 de *T. gondii*). Los resultados en las muestras de leche fueron todos negativos. El presente trabajo de investigación es evidencia de la presencia de *T. gondii* en cabritos sacrificados en el Estado de Nuevo León procedentes de distintos estados del norte de México, sugiriendo, que el consumo de carne de caprino mal procesada y mal cocida podría representar un importante riesgo en salud pública.

Palabras clave: Toxoplasmosis, PCR, PCR anidado, *Toxoplasma gondii*, gen B1, consumo, carne, leche, cabra, México.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is a parasitic agent that causes toxoplasmosis, a disease that affects a large number of vertebrate hosts including humans and has a wide global distribution. The objective of the present work was to detect genomic material of *T. gondii* in meat and milk of goats of the North of Mexico. We collected 326 samples of meat from kids from 4 states of the north of the republic, on a Federal Inspection Type Trail (TIF) located in the state of Nuevo León; and 120 samples of goat's milk collected in the farms of the producers of the same states. For the detection of deoxyribonucleic acid (DNA) of this parasite the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) and nested PCR (nPCR) was developed to amplify a region of the multicopy gene specific for *T. gondii* B1 using for the first PCR primers N1 C1, amplifying a fragment of 193 bp, and for nPCR primers N2 C2, amplifying a fragment of 97 bp. From the total of the samples of meat collected positive 10 (3.06%) were obtained at the first PCR, which were amplified in the nPCR, all of them from the state of Chihuahua. The consensus sequences of the positive samples of meat were obtained, these sequences were analyzed and aligned by Clustal Method W of the program MegAlign / DNASTar version 13 in search of homology with previously reported sequences in the GenBank (Nucleotide), establishing a 100% of homology between all sequences and with the sequence reported in GenBank with accession number AF179871.1 (Sequence partial of Gene B1 of *T. gondii*). The results in the milk samples were all negative. This research work is evidence of the presence of *T. gondii* in kids slaughtered in the State of Nuevo Leon from different states of northern Mexico, suggesting that the consumption of badly processed and poorly cooked goat meat could represent an important public health risk.

Key words: Toxoplasmosis, PCR, nested PCR, *Toxoplasma gondii*, B1 gene, consumption, meat, milk, goat, Mexico.

ABSTRACT

El *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) és un agent parasitari que causa la toxoplasmosi, malaltia que afecta un gran nombre d'hostes vertebrats, inclòs l'humà, i presenta una àmplia distribució mundial. L'objectiu del present treball va ser detectar material genòmic de *T. gondii* en carn i llet de cabrum del Nord de Mèxic. Es van recollir 326 mostres de carn de cabrits provinents de 4 estats del nord de la república, en un escorxador Tipus Inspecció Federal (TIF) situat en l'estat de *Nuevo León*; i 120 mostres de llet de cabra recollides en les explotacions dels productors de les mateixes entitats federatives. Per a la detecció d'Àcid Desoxiribonucleic (ADN) d'aquest paràsit es va desenvolupar la tècnica de Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) i PCR imbricada (nPCR), per amplificar una regió del gen multicòpia específic de *T. gondii* B1 utilitzant per a la primer PCR els encebadors N1 C1, amplificant un fragment de 193pb, i per a la nPCR els encebadors N2 C2, amplificant un fragment de 97pb. Del total de les mostres de carn recollides es van obtenir 10 de positives (3.06%) a la primer de la PCR, les mateixes que van amplificar a la nPCR, totes elles provinents de l'estat de Chihuahua. Es van obtenir les seqüències consens de les mostres positives de carn, aquestes seqüències van ser analitzades i alineades mitjançant el Mètode de Clustal W del programa MegAlign / DNASTar versió 13 a la recerca d'homologia amb seqüències prèviament reportades al GenBank (Nucleotide), establint-se un 100% d'homologia entre totes les seqüències i amb la seqüència que apareix al GenBank amb el número d'accés AF179871.1 (seqüència parcial del Gen B1 de *T. gondii*). Els resultats en les mostres de llet van ser tots negatius. El present treball d'investigació és evidència de la presència de *T. gondii* a cabrits sacrificats a l'Estat de Nuevo León procedents de diferents estats del nord de Mèxic, suggerint, que el consum de carn de cabrum mal processada i mal cuita podria representar un important risc en salut pública.

Paraules clau: Toxoplasmosi, PCR, PCR niat, *Toxoplasma gondii*, gen B1, consum, carn, llet, cabra, Mèxic.



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

La Toxoplasmosis es una enfermedad causada por el parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii*, un parásito de distribución mundial, el cual fue descubierto por Nicole y Manceux en el año de 1908, en un pequeño roedor llamado *Ctenodactylus gondii* en el norte de África (Mombro, 1995). Es un protozooario de un grupo de parásitos en los cuales su reproducción sexual tiene lugar exclusivamente en células epiteliales del intestino de su hospedador definitivo, en este caso en particular los felinos; y su reproducción asexual puede ocurrir en cualquier tejido de sus hospedadores intermediarios, que pueden ser una gran cantidad de animales domésticos, silvestres y el hombre (Mital *et al.*, 1990; Dubey *et al.*, 1998; Tenter, 1999).

La infección se puede transmitir por vía digestiva, congénita y parenteral. La digestiva a través de la ingestión de ooquistes infecciosos presentes en el ambiente, siendo la vía principal por la cual los herbívoros son infectados; y en el caso de los carnívoros, al igual que en el hombre, es a través de la ingestión de alimentos contaminados, y de manera importante por la presencia de formas quísticas del parásito en carne cruda y/o mal cocida (Frenkel, 1990; Mital *et al.*, 1990). En el caso de la transmisión congénita, solo se desarrolla cuando la primera infección coincide con un período de gestación (Cordero *et al.*, 1999). En el caso de la vía parenteral, se reporta con menor frecuencia, comparando con la que se produce por los alimentos (Martin y García, 2003).

El curso de la enfermedad en rumiantes, al igual que en el hombre, es de forma subclínica, a excepción de las hembras que se encuentran gestantes, en donde las manifestaciones clínicas reproductivas son severas. La toxoplasmosis adquirida en el caso del ganado caprino, a diferencia del ovino, suele ser más patógena, ya que la congénita es reconocida como una de las más importantes causas de abortos, mortalidad neonatal y pérdidas reproductivas. Está demostrada la persistencia del parásito de por vida en forma latente en los caprinos y ovinos, lo que representa un impacto negativo al sector productivo, así como un gran riesgo en salud pública (Cordero *et al.*, 1999; Ortega, 2001).

Se ha observado que, en el caso de los bovinos, pueden eliminar o detener la reproducción del parásito. No obstante de esta posibilidad, al igual que en los caprinos y los ovinos, el músculo de cualquiera de estas especies infectadas son una fuente de transmisión para los humanos (Quiroz *et al.*, 2011).

Existe una alta prevalencia de la toxoplasmosis en humanos, aunque como ya hemos mencionado, su presentación es normalmente asintomática, y se considera un patógeno oportunista ya que se asocia la infección con graves complicaciones en los principales grupos de riesgo, como son las mujeres embarazadas y los sujetos inmuno comprometidos (Ortega, 2001; Campo-Portacio *et al.*, 2014; Uribarren, 2017).

La toxoplasmosis, a pesar de que han transcurrido muchos años de su descubrimiento, sigue siendo una enfermedad con vigencia para la salud humana y animal, prueba de ello es que a finales del siglo pasado se estima que una tercera parte de la población está crónicamente infectada (Dubey y Beattie, 1988; Tenter *et al.*, 2000). La infección humana es causada primordialmente por la ingestión de carne mal cocida que contiene quistes viables o por la ingestión de ooquistes provenientes de gatos infectados y que contaminan agua y alimentos (Dubey, 2004; Campo-Portacio *et al.*, 2014). Por lo antes mencionado, resulta de singular interés conocer el estatus de infección de especies potencialmente transmisoras al ser humano, como lo son los rumiantes, particularmente los caprinos; en este orden de ideas, se estima que actualmente existe en el mundo una población de 1,006 millones de cabras y en México cerca de los 9 millones, lo que equivale casi al 1% de la población mundial, ocupando en América el segundo lugar después de Brasil (Anónimo, 2015).

La caprinocultura en el mundo ha retomado un interés en particular, derivado de la calidad de los productos que se pueden obtener de los caprinos. Si bien es cierto que para el mundo el consumo de carne de caprino representa solo el 5% de las carnes rojas que se consumen anualmente, y para México representa solo el 1%, es importante considerar la relevancia que tienen los sistemas de producción en los productos finales, ya que cerca del 95% de ellos se desarrollan en países pobres o en desarrollo, con poca tecnología y en condiciones marginales lo que tiene un efecto directo sobre la calidad e inocuidad de la carne. Por consiguiente, es importante resaltar el papel que representa el consumo de carne y leche de cabra en la transmisión de enfermedades y como fuente de infección para el hombre.

El propósito de este trabajo fue detectar la presencia de *T. gondii* en la carne y leche de caprinos del Norte de México destinados a su consumo humano, ya que para esta región no existen reportes al respecto, utilizando como técnica diagnóstica PCR y la variante nPCR.

JUSTIFICACIÓN

1.2. Justificación

En el Norte de México, y en particular en el Estado de Nuevo León, no existen reportes sobre la presencia de *Toxoplasma gondii* en caprinos; considerando que los productos cárnicos y la leche de esta especie constituyen una fuente potencial de contagio para el ser humano, este parásito constituye un riesgo muy importante para la salud pública. En este sentido, generar información respecto a la presencia del mismo es de gran importancia para consideraciones epidemiológicas, así como para proponer alternativas diagnósticas para este padecimiento.

HIPÓTESIS

1.3. Hipótesis

El parásito de *Toxoplasma gondii* se encuentra presente en la carne de cabritos y en la leche de cabra del Norte de México y su presencia puede ser detectada mediante el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

OBJETIVOS

1.4. Objetivo General

Determinar la presencia de *Toxoplasma gondii* en carne y leche de caprinos del Norte de México, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final.

1.5. Objetivos Específicos

Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (nPCR) para determinar la presencia de *Toxoplasma gondii* utilizando la cepa de referencia RH.

Detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en muestras de carne de caprinos provenientes de estados del Norte de México mediante la técnica de PCR y nPCR.

Detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en muestras de leche de cabra provenientes de estados del Norte de México mediante la técnica de PCR y nPCR.

2. LITERATURA CITADA

2.1. La caprinocultura en el mundo, en México y en su región norte

Se asume que los caprinos fueron una de las primeras especies domesticadas, derivado de la necesidad del consumo de su carne, leche, cuero y fibras (Galina *et al.*, 1995b). Estos pequeños rumiantes han jugado un papel importante en el mundo como fuente de carne y leche, ocasionando que una gran cantidad de núcleos de poblaciones de países en desarrollo dependan de ella como base en su alimentación. Durante ese proceso zootécnico, esta especie mostró una gran capacidad para adaptarse a ambientes adversos y poseer preferencias alimenticias muy diversas de vegetación en pastoreo de matorrales y otras especies no consumidas por otros animales (Jiménez *et al.*, 2013); lo que le ha permitido desarrollarse en una amplia variedad de condiciones geográficas, como lo han sido desde desiertos hasta montañas de zonas semiáridas.

Los países con mayor población caprina son China con más de 180 millones, seguido por la India con 133 millones. Según la FAO (Anónimo, 2015) la población mundial se estima en poco más de 1,006 millones, de los cuales el 58% está en Asia, 36% en África, 4% en las Américas, 1.7% en Europa y el 0.3% en Oceanía (Figura 1). Solo los 5 países con mayor población de caprinos cuentan con el 51% del total mundial, China, India, Nigeria, Pakistán y Bangladesh.

Del 4% del inventario caprino que se encuentran en América, que equivale a poco más de 35 millones, cerca de 9 millones se localizan en México, casi el 1% de la población mundial, ocupando un segundo lugar después de Brasil (Anónimo, 2009; Orona *et al.*, 2013).

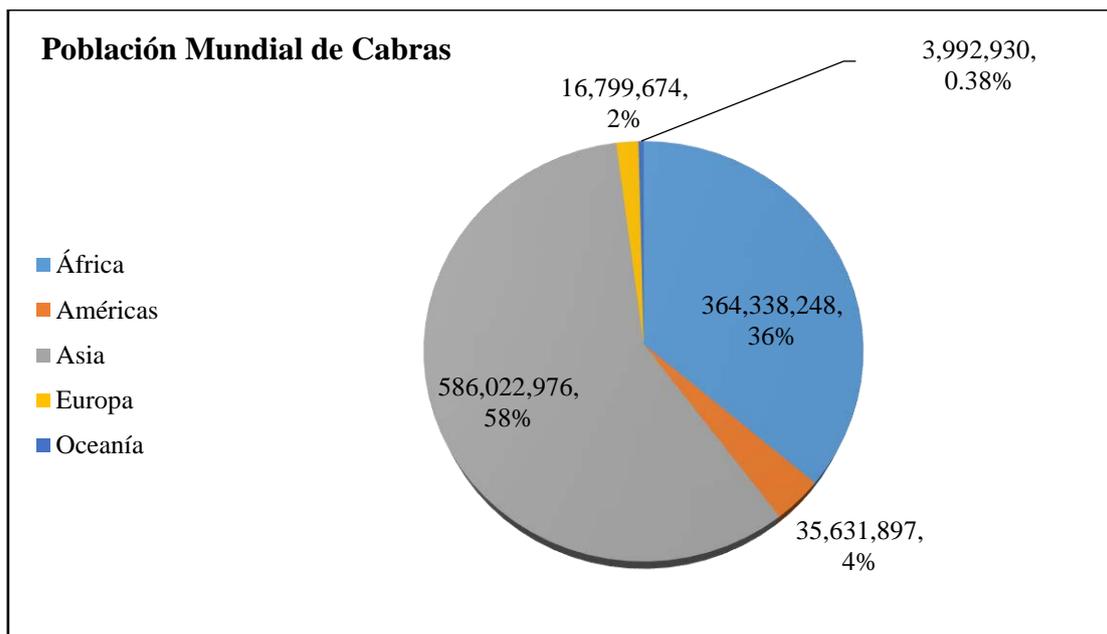


Figura 1. Población mundial de cabras. Cabezas de ganado caprino por continente. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Dirección de Estadística. Adaptado de FAOSTAT 2014.



Figura 2. Distribución del inventario caprino y producción de carne y leche caprina en México. Tomado de Comité Nacional Sistema Producto Caprinos, 2011.

La producción caprina en México se desarrolla en unas 350,000 unidades de producción y cuenta con una diversidad de climas y condiciones ecológicas que hacen que de forma general el territorio se puede dividir en 4 grandes regiones. En el Norte del país (región árida) se cuenta con la segunda mayor concentración de cabezas, lo que equivale a un 33.2% del inventario nacional, debido a la preferencia en la dieta y su adaptación. Como puede verse en la Figura 2, en México el 63% de su territorio se le considera región árida (Jiménez *et al.*, 2013).

En México la producción caprina se desarrolla de manera preponderante en zonas marginales, caracterizándose en su mayoría con bajo grado de tecnificación por la carencia de recurso económico, lo que conlleva unidades de producción con escaso equipamiento y mala infraestructura lo que imposibilita mejorar los índices productivos (Guerrero, 2010). A esto habría que añadir los malos esquemas de alimentación, la genética de los animales orientada a la adaptación y supervivencia más que a la producción, y las malas prácticas de manejo. Esta última deriva en malos resultados cuantitativos y cualitativos en los productos finales para el consumo humano, incrementando significativamente la incidencia de enfermedades zoonóticas en los animales (Jiménez *et al.*, 2013).

Durante el año 2013 en México, 10 de sus 32 estados con la mayor población de cabezas de caprinos aportaron el 75% de la producción nacional en carne de caprino, que alcanzó un poco más de 40,000 toneladas, y el 84% de la producción de leche de cabra, que superó los 152 millones de litros, como se muestra en la Tabla 1. De esos 10 estados, 5 están ubicados en la región norte, región de donde provinieron los cabritos y cabras muestreados en el presente estudio.

Tabla 1. Estados de México con mayor población caprina y su producción de carne y leche.

Estado	Población caprina (cabezas)	Carne (Toneladas)	Leche (miles de litros)
Oaxaca	1,251,122	3,900	-
Puebla	1,219,910	4,069	1,991
Guerrero	673,732	3,520	-
Coahuila	646,009	4,509	48,819
Zacatecas	617,201	4,418	5,744
San Luis Potosí	616,749	2,619	3,127
Guanajuato	572,849	2,202	37,223
Michoacán	461,522	2,574	3,876
Nuevo León	408,238	1,542	3,180
Durango	310,854	1,042	25,222
Resto=	1,909,628	10,198	23,728
Total, Nacional=	8,687,814	40,593	152,910

Elaboración propia a partir de datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2014.

La región Norte de México está formada por los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Zacatecas y Aguascalientes (Figura 3), todos ellos con su mayor porcentaje de territorio ubicado arriba del Trópico de Cáncer; sumando una superficie de 726,338 kilómetros cuadrados, siendo esta una tercera parte del territorio Nacional, y contando con una población de 19, 564,274 habitantes, el 15.8% de la población mexicana. Con relieve montañoso al este y oeste, y plano en las porciones norte y centro, cuenta en gran parte de su territorio con una cobertura vegetal de matorral espinoso, esto derivado de su clima seco y semiseco predominante, y en las partes altas de las sierras se caracteriza por la presencia de algunos bosques de pino y encino.

Dentro de sus actividades económicas se distingue la agricultura, ganadería, forestal, minera e industrial. En la ganadería predomina la explotación de ganado bovino, ovino, caprino y porcino.



Figura 3. Elaboración propia. Mapa de México. Se indica los 7 estados del norte del país que conforman la región Norte.

En esta región se encuentran 5 de los estados más productores de carne y leche de caprinos en México; su producción de carne representa el 37.8% de la producción nacional, y la de leche el 57.7%, tal como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Estados de la región norte de México, población caprina y su producción de carne y leche.

Estado	Población caprina (cabezas)	Carne (Toneladas)	Leche (miles de litros)
Aguascalientes	32,982	181	-
Coahuila	646,009	4,509	48,819
Chihuahua	153,900	719	6,227
Durango	310,854	1,042	25,222
Nuevo León	408,238	1,542	3,180
San Luis Potosí	616,749	2,619	3,127
Zacatecas	617,201	4,418	5,744
Total Región Norte =	2,785,933	15,030	92,319
Total Nacional =	8,687,814	40,593	152,910

Elaboración propia a partir de datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2014.

2.2. Agente Etiológico de la Toxoplasmosis

Pertenece al reino Protista, subreino Protozoo, filo Apicomplexa, clase Coccidia, familia Sarcocystidae, género *Toxoplasma*, especie *Toxoplasma gondii* y del supergrupo Chromalveolata, de un grupo de parásitos en los cuales la esquisogonia y la esporogonia tiene lugar exclusivamente en células epiteliales del intestino de su hospedador definitivo, en este caso en particular en los felinos. Se caracteriza por tener una reproducción asexuada que puede ocurrir en cualquier tejido de los animales que afecta, tanto domésticos como silvestres, y en el hombre (Mital *et al.*, 1990; Dubey *et al.*, 1998; Tenter, 1999).

Tiene tres formas parasitarias: el trofozoíto (taquizoíto) que es semilunar y móvil, y gracias al que recibe su nombre por su forma arqueada, que proviene del griego toxon y que significa arco, y plasma que significa forma; las otras dos formas son quiste y ooquiste (Martin y García, 2003).

El trofozoíto o taquizoíto tiene una longitud de 4 a 8 μm y de ancho de 2 a 3 μm . La porción anterior, más fina, lleva el complejo apical y por detrás se sitúan el núcleo de tipo eucariota, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. El taquizoíto además es la forma replicativa, la cual se realiza de manera intracelular y por fisión binaria. Suele invadir los macrófagos, fibroblastos, endotelios o celdillas epiteliales. El taquizoíto no resiste el jugo gástrico. Las inmunoglobulinas séricas (IgM e IgG) específicas inducen la opsonización-fagocitosis del taquizoíto, por lo que no es fácil encontrarlos después de 7 a 10 días de la primera infección, cuando se encuentra en la fase aguda y a ellos se les atribuye la diseminación y la destrucción tisular (Martin y García, 2003; Carrada, 2005; Uribarren, 2017).

El quiste generalmente esférico parasita diferentes células del organismo, principalmente en el sistema óculo cerebral y muscular, siendo este un estado inactivo durante mucho tiempo. Tienen un diámetro entre 50 a 200 μm , y dentro de ellos contienen centenares de bradizoitos. Estos quistes constituyen una forma de resistencia al medio interior por la envoltura resistente que le permite el intercambio de nutrientes.

El ooquiste u oocisto tiene forma esferoide y se encuentran en las heces de los gatos. Posee un diámetro de 10 a 14 μm y contienen un par de esporoquistes elipsoidales, los

que a su vez contienen cuatro esporozoitos, y es la forma de resistencia en el medio exterior (Carrada, 2005; Díaz *et al.*, 2010).

El ciclo biológico se divide en 2 fases que ocurren por gametogonia en las células epiteliales del intestino delgado de los felinos que actúan como hospedador definitivo, y la fase asexual del ciclo biológico que se desarrolla en los tejidos de los mismos felinos y en otros hospedadores considerados como intermediarios, tales como herbívoros y aves, e incluso el ser humano. Mientras que la fase sexual se desarrolla de manera exclusiva en los felinos, que se infectan principalmente al ingerir tejidos de animales con quistes tisulares activos, o bien a través de la ingestión de alimentos contaminados con ooquistes.

En los enteroquistes, los parásitos se diferencian en gametos femeninos y masculinos, lo que da origen a un ooquiste diploide no esporulado que se elimina junto con las heces. En el transcurso de las tres semanas siguientes a la primoinfección del gato, elimina ooquistes que son la fuente de contaminación (Martin y García, 2003; Besné-Merida *et al.*, 2008; Uribarren, 2017).

Los ooquistes no son infectantes de inmediato, debiendo pasar por un proceso previo de diferenciación que dura de 1 a 5 días. Pueden mantenerse infecciosos aproximadamente un año si el ambiente es húmedo y la temperatura resulta favorable (4-37°C) (Uribarren, 2017).

En la fase asexual, los animales y los humanos se infectan por la ingestión de ooquistes maduros presentes en la materia fecal del gato o de las formas quísticas presentes en los tejidos de otros animales, que se consumen crudas o mal cocidas. De igual forma se pueden dispersar en el ambiente contaminando agua, suelo, frutas, vegetación y hasta animales herbívoros. Al ingerir los hospederos intermediarios estos ooquistes se da una infección extra intestinal, llevándose a cabo un ciclo incompleto de reproducción. Así, se da inicialmente una infección aguda con reproducción intracelular de los taquizoitos, y cuando el hospedero desarrolla inmunidad, la infección se hace crónica y se forman los quistes verdaderos con los bradizoitos (Martin y García, 2003; Díaz *et al.*, 2010).

Es necesario aclarar que el gato también se considera como un hospedero intermediario con un ciclo parasitario tisular, extraentérico y asexual entérico (Pereira y Pérez, 2002).

2.3. Epidemiología

Desde 1908, con el descubrimiento de *Toxoplasma* por Nicole y Manceux, se han desarrollado investigaciones alrededor del mundo para estudiar este patógeno y su papel como agente patógeno en los animales y en el hombre.

Muchos son los acontecimientos durante todos esos años que han contribuido al conocimiento de este parásito y su papel biológico, desde su denominación de morfología como protozoo y la asignación de su nombre científico en 1909 por la Academia de las Ciencias de Paris, su aislamiento en perros (1910), mamíferos y aves (1917), su descubrimiento como quistes en retina de niño (1923), la confirmación de meningo encefalomiелitis mortal relacionado a la toxoplasmosis en humanos (1937), la aparición de los primeros casos de toxoplasmosis fatal en adultos (1940), la descripción clínico patológica de la toxoplasmosis congénita en el hombre (1942), el desarrollo de una prueba serológica de diagnóstico “dye test” (1948), la identificación por primera vez de un caso de toxoplasmosis en cerdos (1952), el reporte de casos de toxoplasmosis en vacas (1953), la sugerencia de transmisión por consumir carne poco cocida (1954), el uso de la técnica directa de anticuerpos fluorescentes para diagnóstico (1957), la asociación de abortos y mortalidad perinatal en ovejas con la presencia del parásito (1957), la demostración de que la prevalencia en vegetarianos estrictos era similar a la de individuos no vegetarianos (1959), la corroboración de la transmisión por consumo de carne (1960), la demostración de la transmisión a través de las heces de gatos (1965), la confirmación del papel epidemiológico del gato (1969, 1972), entre otros. Fue en el año de 1970 cuando varios investigadores como Dubey y colaboradores, Frenkel y colaboradores, Hutchison, Sheffield y Melton, Overdulve, descubrieron la fase sexual del parásito en la pared del intestino del gato, completando así el ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*; y en ese mismo año también Dubey y colaboradores y otros grupos de investigadores descubrieron que los ooquistes eran las estructuras infectantes presentes en las heces del gato; estructuras que años antes Hutchison y Frenkel habían descrito como *Isospora bigemina* (Ortega, 2001).

El *T. gondii* es un agente parasitario intracelular obligado, potencialmente capaz de invadir y multiplicarse en cualquier célula nucleada, lo que origina a la toxoplasmosis,

que afecta a un gran número de hospedadores vertebrados, y lo hace ser el protozoario más común en mamíferos, tanto terrestres como acuáticos, y en las aves. (Mombró *et al.*, 1995; Cordero *et al.*, 1999; Pereira y Pérez, 2002; Ezequiel *et al.*, 2003; Besné-Merida *et al.*, 2008).

Dentro de la amplia variedad de hospedadores se encuentran diversos animales intermediarios. Las especies ovina, caprina, porcina y los lagomorfos resultan importantes por el entorno doméstico en que se encuentran. Para que se pueda infectar un rumiante, como los ovinos, caprinos y bovinos, es necesario que los ooquistes se encuentren en el medio ambiente, ya sea en las praderas de pastoreo o bien en ensilajes y henos; considerando sobre todo la presencia de felinos silvestres y/o gatos domésticos (Cordero *et al.*, 1999; Quiroz *et al.*, 2011).

Besné-Mérida (2011) presentaron información valiosa en el estudio de la toxoplasmosis en 3 especies de rumiantes en diferentes estados de la República Mexicana en diferentes años, lo que se puede observar en la Tabla 3; con un rango de positividad que va desde un 3% a un 84%, presentándose la mayor frecuencia en el ganado ovino.

Tabla 3. Estudios sobre toxoplasmosis en rumiantes de México.

Especie	Año del estudio	Animales Muestreados	% positivos	Prueba usada	Estado	Referencia
Bovinos	1990	300	28	PSB	Tabasco	Martínez y col.
	1993	197	12	ELISA	ND	García y col.
	2005	30	16	HAI	D.F.	Córdova y col.
Caprinos	1990	707	3	ELISA	ND	García y col.
Ovinos	1990	495	30	IFAT	ND	García y col.
	2008a	103	77 a 84	ELISA, IB	ND	Caballero y col.
	2008b	351	>60%	ELISA	Colima	Caballero y col.

PSB: Prueba de Sabin-Feldman; IFAT: Inmunofluorescencia indirecta; IB: Inmuno-punto; HAI: Hemoaglutinación indirecta; %: Según el trabajo, la positividad varió con respecto a la altitud; D.F.: Distrito Federal; ND: El muestreo se realizó en más de 1 estado.

Fuente: Quiroz H, et al. Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos, 2011 (ISBN: 978-607-00-4015-3).

En México, este parásito tiene una amplia distribución territorial. Diversos estudios han comprobado su presencia en animales domésticos considerados mascotas, como los perros y gatos, y en la mayoría de las especies domesticas destinadas al consumo humano y en fauna silvestre. Hernández y colaboradores (2015), estudiaron la situación epidemiológica en humanos y animales de la Toxoplasmosis en México, exponiendo los resultados de diversos estudios realizados desde el año 2004 al 2013 (Anexo 2: Seroprevalencia de *T. gondii* en animales de México) en donde con diferentes métodos diagnósticos se reportaron prevalencias desde un 0.8% hasta un 100%, observándose prevalencias arriba del 75.5% en regiones húmedas-tropicales, y las prevalencias más bajas en regiones seco-templadas.

La prevalencia de *T. gondii* en animales a nivel mundial ha superado el 50% en perros, conejos y en nutrias del mar, en un 60% en ratones, ratas y aves silvestres y hasta un 70% en gatos, ciervos y osos (Campo-Portacio *et al.*, 2014). Tenter y colaboradores, en el año 2000, reportaron una seroprevalencia en ovinos del 92% en algunos países europeos; mientras que Campo-Portacio y colaboradores en el 2014, detectaron ADN de *T. gondii* en el 32% de las carnes analizadas de res, cerdo y pollo en una población de Colombia. En 2015, Lorencova y colaboradores reportaron una prevalencia de *T. gondii* del 29.6% por técnicas serológicas y de un 11% por pruebas moleculares en el tejido muscular en rumiantes silvestres provenientes de reservas para producción y caza en la República Checa. Díaz y colaboradores en el 2016, reportaron seroprevalencias en el noreste de España en ovejas de un 38% a un 58% y en bovinos de un 7%.

El *T. gondii* es probablemente el agente más frecuente de infección protozoaria en el hombre en donde se estima se pueden encontrar anticuerpos en un 30% de la población. La infección humana es muy común, como lo indica la elevada prevalencia de anticuerpos específicos detectados en encuestas seroepidemiológicas en el mundo (Atias, 1991; Dzikowiec *et al.*, 2017).

En diversos estudios seroepidemiológicos, se han reportado prevalencias del anticuerpo anti Toxoplasma muy diversas, que van desde menos del 1% en el caso de Alaska, un 70% en Tahití, hasta un 90% en parisinas jóvenes (Velasco *et al.*, 1992; Pereira y Pérez, 2002; Carrada, 2005; Lora *et al.*, 2007; Dzikowiec *et al.*, 2017), los porcentajes de prevalencia en población pediátrica oscilan entre 0% a 71,43% (Díaz *et al.*, 2010): y en los países desarrollados de clima templado la toxoplasmosis humana puede variar de 10

a 50% a más de 80% en los países en desarrollo de los trópicos (Hernández *et al.*, 2015). En toda esta variabilidad en la seroprevalencia de la toxoplasmosis, además de ver que el rango de incidencia se incrementa con la edad por la constante exposición al riesgo de infección ya sea por consumo de carne cruda o a la ingestión de ooquistes en el ambiente; además inciden variables atmosféricas, hábitos alimenticios, educación y estrato socioeconómico, entre otros (Martin y García, 2003; Campo-Portacio *et al.*, 2014; Uribarren, 2017).

De un lugar a otro los porcentajes de incidencia varían; en el caso de Bélgica se reporta un 16.39% de positividad en personas mayores a los 30 años, en Holanda se reportó un 64% entre la población de 20 a 22 años, y en Estados Unidos hasta un 67% en mayores de 50 años. En América Central, Brasil, Francia y Turquía la seroprevalencia es mayor, alcanzando un 90% (Chancin *et al.*, 2003; Martin y García, 2003).

Se ha reportado variación en los resultados de prevalencia de seropositividad reportados en México. Uno de los factores que influyen en la variación es la distribución geográfica, reportándose una seropositividad baja en la zona norte, debido a la aridez y a las altas temperaturas que alcanza el suelo de esa región, ocasionando que los ooquistes depositados con las materias fecales de los gatos, lejos de madurar, mueren en poco tiempo, como sucede también con los huevos y quistes de otros parásitos humanos. En cambio, en algunos estados de las zonas costeras la prevalencia reportada es tan alta como en Centroamérica, lo que se explica fácilmente por la similitud de las condiciones bioclimatológicas y socioeconómicas de estas regiones, que además de permitir una mayor viabilidad de los ooquistes, los mantiene en cercanía con el hombre, relación que parece incrementarse en las zonas urbanizadas de las regiones costeras (Velasco *et al.*, 1992).

Datos más recientes proporcionados por la Dirección General de Información en Salud (DGIS, 2012a) de la Secretaría de Salud en su anuario “Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2011”, no incluye datos de defunciones a causa de la Toxoplasmosis en los diferentes grupos de edades por entidad Federativa durante el período de 1979 al 2010; pero ya en el anuario “Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad por causas sujetas a vigilancia epidemiológica en México 2012” (DGIS, 2012b), reporta 23 defunciones por Toxoplasmosis en los diversos grupos de edades que

corresponden a 14 estados de la República, como se puede observar en la Tabla 4 y Anexo 3.

Tabla 4. Mortalidad nacional por toxoplasmosis en México en año el 2012.

Estado	Muertes	Grupos por edad						Sexo		*EPM	
		< 1	1 a 4	5 a 14	15 a 24	25 a 44	45 a 64	65 y +	H		M
Campeche	1					1			1		41
Colima	1			1					1		7
Guerrero	2					2				2	38.5
Jalisco	1	1								1	
México (Edo.)	4					3	1		4		41.3
Nayarit	1							1	1		88
Nuevo León	1					1			1		29
Oaxaca	1							1		1	67
Puebla	2			1		1			2		24.5
San Luis Potosí	2				1	1			1	1	25
Sonora	2					2				2	33.5
Tabasco	2					1	1		2		45
Tamaulipas	1					1			1		25
Veracruz	2					1	1		2		41
(14) Totales =	23	1	0	2	1	14	3	2	16	7	

Fuente: Dirección General de Epidemiología / Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones 2012 (DGSI, 2012a)

*EPM: Edad promedio a la muerte.

De igual forma que en los animales, Hernández y colaboradores en el 2015, exponen los resultados de diversos estudios realizados en México desde el año 1989 al 2012 (Anexo 4: Seroprevalencia de *T. gondii* en humanos adultos de México) en donde con diferentes métodos diagnósticos resultaron prevalencias desde 5% hasta un 64%, observándose el mayor porcentaje de prevalencia en propietarios de gatos de la población general, seguido de un 55% en mujeres embarazadas, un 30% en una población de menonitas y entre 22% y un 23% en pobladores de zonas rurales.

2.3.1. Vías de Transmisión

Los pequeños roedores y el ratón doméstico constituyen un importante reservorio de la infección por toxoplasmosis, ya que suelen ser el principal alimento para los gatos (Martin y García, 2003). Los felinos, juegan un papel sumamente importante en la epidemiología y conservación de la enfermedad, ya que pueden completar el ciclo de vida de este

parásito, y como hospederos definitivos son los encargados de excretar miles de ooquistes resistentes en el medio ambiente (Hernández *et al.*, 2015).

Es importante mencionar que algunos invertebrados como moscas y cucarachas pueden contribuir a la difusión de los ooquistes que acompañan a la defecación de los gatos, así como otros agentes físicos como el viento y la lluvia. Los ooquistes que salen con las heces no son de inmediato infectantes, deben pasar por un proceso de diferenciación en la tierra que dura hasta tres semanas y pueden mantenerse infecciosos durante mucho tiempo en la tierra húmeda (Wallace, 1973).

Hoy en día ya se tienen bien identificadas las vías de transmisión de este parásito, la digestiva, la congénita o vertical y la vía parenteral.

2.3.1.1. Transmisión digestiva

Se considera la principal vía de transmisión por la ingesta de ooquistes esporulados eliminados por los gatos a través de sus heces, las cuales contaminan el medio ambiente, ya sea en la ciudad o en el campo, esparciéndolos por su actividad de caza, al igual que en las granjas en los almacenes de forrajes y granos destinados para el consumo de animales herbívoros; los ooquistes que pueden permanecer en el suelo viables hasta por 18 meses (Ortega, 2001).

En el caso de los animales carnívoros, al igual que en el hombre, la infección se da por la ingestión de alimentos contaminados, y de manera importante por la presencia de formas quísticas del parásito en carne cruda y/o mal cocida y por la manipulación inadecuada de la misma (Frenkel, 1990; Mital *et al.*, 1990; Kijlstra y Jongert, 2008; Lorencova *et al.*, 2015). De igual forma, puede darse por la ingestión de oocistos presentes en el agua o en alimentos contaminados por materia fecal de gatos, o inclusive por la manipulación de las cajas de arena de los gatos (Frenkel, 1990; Mital *et al.*, 1990; Pereira y Pérez, 2002; Martin y García, 2003; Lora *et al.*, 2007; Uribarren, 2017).

En el caso particular de los caprinos, en el que la infección es por ingesta de ooquistes, está demostrado la posibilidad de transmisión de taquizoitos a través de la leche, aunque

se desconoce la importancia de esta vía entre los animales y si la transmisión lactogénica tenga un impacto en la salud pública (Cordero *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2016).

2.3.1.2. Transmisión Congénita

Otra vía de transmisión es la vertical o congénita, que generalmente tiene lugar en el curso de una infección materna silenciosa o sin diagnosticar, y que puede ser causa de abortos espontáneos. Esta vía solo se desarrolla cuando la primo infección coincide con un período de gestación (Cordero *et al.*, 1999). En la mujer, al igual que en el caso de hembras de otras especies de mamíferos como la cabra, la oveja y la cerda, entre otras, solo se podrá producir la transmisión transplacentaria en la primera gestación y no en las consecutivas, ya que los anticuerpos IgG desarrollados en la primo infección y presentes en la sangre destruirían a los taquizoitos, evitando así daño alguno y una infección fetal (Dubey y Beattie, 1988).

Se estima que el parásito está presente en una tercera parte de las mujeres gestantes cuando son infectadas por una infección primaria con los taquizoitos en fase de división rápida, circulando por el torrente sanguíneo (Frenkel, 1990; Mital *et al.*, 1990; Pereira y Pérez, 2002; Martín y García, 2003; Lora *et al.*, 2007; Uribarren, 2017).

Cuando la mujer se infecta en el primer tercio de la gestación, las probabilidades de transmisión y de infectar al feto con gravedad variable son de un 10% al 15%. Si esto ocurre en el segundo tercio, las probabilidades llegan a ser de un 30% al 54%, y si es en el último tercio las probabilidades aumentan hasta un 65% (Martín y García, 2003; Hernández *et al.*, 2015).

2.3.1.3. Transmisión parenteral

Para algunos autores la vía de transmisión parenteral es de poca relevancia, se han descrito casos en humanos por transfusión de sangre o leucocitos, trasplantes de órganos e inclusive por inoculación accidental en laboratorio. También pueden ser vías de entrada

la respiratoria, las mucosas y la vía cutánea (Martin y García, 2003; Sullivan y Jeffers, 2012; Kamerkar y Davis, 2012; Uribarren, 2017).

Por otro lado, en estudios serológicos realizados en México, las altas tasas de infección en los menores de 14 años ratifican la elevada frecuencia con que los niños se infectan al jugar en suelos contaminados con materia fecal de gato, es decir, por ingestión de ooquistes, debido al gran contacto que tienen con la tierra, así como a sus hábitos de juego y trabajo, y no por la ingestión de carnes crudas (Velasco *et al.*, 1992; Kijlstra y Jongert, 2008).

2.4. Características de la Enfermedad

2.4.1. Patogenia

Generalmente la infección suele ser asintomática, pero también puede ocasionar severas manifestaciones en su hospedador intermediario o definitivo (Ortega, 2001). La presentación clínica de esta infección es variable según la especie afectada y el estado inmunológico en que se encuentre; puede dar una amplia sintomatología clínica; en algunas especies de mamíferos marinos y marsupiales puede llegar a ser fatal y en otras especies, así como en el hombre, solo un bajo número de ellos desarrollan signos clínicos (Dubey y Jones, 2008).

Es considerada una enfermedad de importancia en salud pública, ya que puede ocasionar diversos daños al humano, mismos que pueden suscitarse también en su principal fuente de contagio, los animales; afectando considerablemente su producción y manteniendo su presencia en medio ambiente (Quiroz *et al.*, 2011).

En los hospedadores después de haberse infectado al consumir ooquistes en sus alimentos, el *Toxoplasma* penetra en las células epiteliales, se replican y migran a los nódulos linfáticos mesentéricos y posteriormente por sangre o linfa a los tejidos y órganos del cuerpo, pudiendo ocasionar la muerte del hospedador a causa de la necrosis intestinal y

de los nódulos mesentéricos antes de generar más daño a otros órganos (Dubey y Frenkel, 1973; Cordero *et al.*, 1999).

2.4.2. Toxoplasmosis en rumiantes

La importancia de la enfermedad está ligada fundamentalmente a la infección congénita que se traduce en trastornos reproductivos, y se sabe que se ha presentado en todo el mundo (Pereira *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2016). De manera general en los rumiantes esta enfermedad es de tipo subclínico, y en el caso particular de los ovinos se puede presentar fiebre; y en caso de los caprinos la enfermedad se torna más severa, presentándose diversos cuadros clínicos a razón del órgano afectado. Los bovinos si pueden adquirir la enfermedad, como lo demuestran los estudios serológicos realizados en esta especie, pero parecen ser resistentes a la infección (Quiroz *et al.*, 2011).

En los ovinos ya infectados, la multiplicación del parásito ocasiona una respuesta febril aproximadamente en el 5° día, iniciando la respuesta inmunitaria entre los días 10 y 12 cesando la parasitemia y dando inicio a la etapa crónica, lo que permitirá que desarrolle una fuerte resistencia a futuras reinfecciones. No es así para los caprinos, donde la infección es más severa, ya que la multiplicación del parásito en esta especie puede ocasionar encefalitis, nefritis, hepatitis, abomasitis necrosante, enteritis y cistitis en cabras adultas. Por lo general, la mayor problemática clínica son los problemas reproductivos, como reabsorción fetal, fetos momificados, abortos, inmovilidad en recién nacidos y muertes en los neonatos (Cordero *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 2016; Bártová *et al.*, 2017).

En el caso del ganado vacuno, se han desarrollado muchos estudios y experimentos, pero en su mayoría los autores coinciden en que en la especie bovina la toxoplasmosis no tiene graves consecuencias. En trabajos de infección experimental no se han desarrollado cuadros clínicos severos, solo un corto cuadro febril y respiratorio, pero al término de 3 semanas hay una recuperación (Ortega, 2001).

2.4.3. Toxoplasmosis en humanos

En el año de 1923, Janku, quien era oftalmólogo Checoslovaco, fue el primero en describir la presencia del *T. gondii* en humanos, observando quistes en la retina de un niño con hidrocefalia (Ortega, 2001). El papel del parásito como patógeno para el hombre fue reconocido por Wolf y colaboradores en el año de 1939, quienes describieron una encefalomiелitis en lactantes, confirmándose la existencia de toxoplasmosis congénita en humanos (Hernández *et al.*, 2015).

En los humanos la infección primaria en el 90% de los casos es habitualmente asintomática, y se le considera un patógeno oportunista, ya que se asocia la infección con graves complicaciones en los principales grupos de riesgo, como las mujeres embarazadas, fetos y recién nacidos, así como los pacientes inmunosuprimidos primaria y secundariamente (Hernández *et al.*, 2015; Lorencova *et al.*, 2015; Uribarren, 2017). No obstante, se estima que el 20% de las personas infectadas podrían desarrollar la enfermedad clínicamente (Kijlstra y Jongert, 2008).

La toxoplasmosis congénita derivada de una infección aguda, cuando es adquirida por primera vez durante el embarazo, puede transmitirse al feto y causarle diversos problemas en su salud al momento de nacer o bien en etapas posteriores de su vida (Rodríguez *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2007). En el caso particular de la toxoplasmosis ocular, tradicionalmente se consideraba que derivaba de la transmisión por vía congénita; sin embargo, estudios recientes establecen que se deben a la enfermedad adquirida y no solo por las mujeres embarazadas, denotando un riesgo en la población en general (Gilbert y Stanford, 2000); un ejemplo de ello es el 50% de los infantes que presentaron coriorretinitis en el Reino Unido, debido a la infección por *Toxoplasma* adquirida después del nacimiento (Standford *et al.*, 2006).

Las problemáticas cuando la infección ocurre al inicio de la gestación pueden ser abortos, encefalomiелitis, hidrocefalia, macrocefalia, trastornos oculares y retraso psicomotriz (De Miguel *et al.*, 2002; Klaren y Kijlstra, 2002; Martin, 2004); y cuando la infección es adquirida en el segundo y tercer trimestre pueden haber lesiones graves con manifestaciones tardías, como calcificaciones cerebrales, retino coroiditis, retardo en el desarrollo neurosíquico y epilepsias (Martin y García, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006), por estas razones es de vital importancia tener un seguimiento de las mujeres durante toda la

gestación. En el caso del hombre, la enfermedad se presenta en forma subclínica, siendo la coriorretinitis la única manifestación específica (Dubey, 1988; Velasco *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1995).

Las condiciones mayormente fatales de la toxoplasmosis en el humano se ven en pacientes donde su sistema inmune se ve presionado por la afectación de tumores malignos y la terapia correspondiente, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, al igual que pacientes sometidos a terapias con fármacos inmunosupresores después de un trasplante de órganos (Hernández *et al.*, 2015).

2.5. Toxoplasma en alimentos

Se han analizado algunas de las variables que pueden afectar la viabilidad de los quistes de *T. gondii* en los alimentos destinados al consumo humano, principalmente el efecto de la temperatura, la salinidad y el tiempo de exposición a estos factores.

El efecto de la congelación en la viabilidad de los quistes de *T. gondii* fue descrito por primera vez en 1965 (Sommer *et al.*, 1965) cuando se reportó que la congelación durante 2 días a -20°C es suficiente para inactivar el parásito. Desde entonces, han surgido numerosos reportes de que la congelación puede inactivar los quistes tisulares de *T. gondii*. Sin embargo, para lograr una eficiencia del 100% de mortalidad, deben de considerarse como factores primordiales el tiempo y la temperatura.

Sierra y colaboradores (1998) reportaron que la seroprevalencia de *Toxoplasma* en España en las gestantes oscilaba entre el 25-50%, pero que esta cifra tendía a disminuir debido al aumento del consumo de carne congelada, proceso que elimina los quistes viables de este parásito, y sugieren como medidas preventivas básicas el no tener contacto con gatos, congelar la carne (-20°C, durante 24 horas), no comer carne cruda o poco cocida (a no ser que haya sido congelada previamente), utilizar guantes en los trabajos de jardinería y lavar las frutas y verduras que vayan a ingerir.

Este protozooario se ha aislado en la carne de varias especies de animales domésticos y de caza destinadas al consumo humano, de igual forma en carnes curadas y otros productos como salchichas crudas, salami y embutidos (Germani y Pacheco, 2002). Se ha reportado

que los quistes en carne pueden sobrevivir a más de 40°C hasta por tres semanas, y pueden seguir viables aún si ésta se ha calentado a 65°C por 5 minutos (Suárez *et al.*, 2005).

Los primeros reportes indican una inactivación de los quistes tisulares de *T. gondii* en agua destilada y una sobrevivencia de varias semanas en solución salina fisiológica (0.85%) y almacenamiento a 4°C (Jacobs *et al.*, 1960). El aumento de la concentración de sal o la temperatura conducen a la inactivación del parásito (Dubey *et al.*, 1990). El congelar la carne a -20°C por más de dos días destruye al parásito; de igual manera ocurre con el salado y ahumado, y en la leche pasteurizada (Suárez *et al.*, 2005).

En el caso del calentamiento, Jacobs y colaboradores (1960) fueron los primeros en demostrar que el calentamiento inactiva los quistes tisulares. A una temperatura de 50°C se requiere de una hora para lograr la inactivación de los quistes, mientras que la destrucción inmediata tiene lugar cuando la temperatura interna de la carne alcanza una temperatura de 67°C (Dubey *et al.*, 1990). Cocinar la carne infectada en un microondas no garantiza matar del parásito, muy probablemente debido a un calentamiento desigual (Lundén y Uggla, 1992).

De igual forma, se ha analizado el efecto de otros procedimientos para el curado de la carne tales como la técnica de salado, el ahumado o la fermentación en la supervivencia de los quistes en tejido. Los estudios realizados por Dubey han demostrado que con NaCl₂ al 6% se logra matar el quiste, independientemente de la temperatura utilizada, observándose también que los quistes pueden sobrevivir durante 56 días en una solución de 0.85% de sal, por 49 días con un 2% y 21 días con un 3.3% (Dubey, 1997). Datos más recientes han demostrado que la inyección de más de un 2% de NaCl₂ y/o más de un 1,4% de soluciones de sal de lactato en la carne de cerdo infectado experimentalmente podría matar el parásito, pero que una solución de NaCl₂ al 1% proporciona resultados variables, mientras que la adición de sales de tripolifosfato no tiene ningún efecto sobre la viabilidad del parásito (Hill *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2006). Por PCR se ha demostrado la presencia de ADN de *T. gondii* en embutidos de cerdo disponibles comercialmente, aunque no se detectó la presencia de quistes tisulares viables en estas muestras (De Oliveira *et al.*, 2004).

Al igual que en carne, existe el reporte de taquizoitos de *T. gondii* aislados de muestras de leche de cabra, reportándose un 3% en Polonia (Cisak *et al.*, 2017), un 6% en Brasil

(Bezerra *et al.*, 2015), un 13% en Italia (Mancianti *et al.*, 2013), un 33% en Eslovaquia (Spisak *et al.*, 2010) y recientemente, hasta en un 65% en Polonia (Sroka *et al.*, 2017). En este último estudio no se contempló un bioensayo para analizar la viabilidad de los taquizoitos, sugiriéndose la posibilidad de que los taquizoitos, ya sea completos o alguna parte de ellos, podrían ser inactivados por otros anticuerpos específicos que se encuentren en altos niveles (títulos de 6,000 o superiores).

2.6. Diagnóstico

El diagnóstico de la toxoplasmosis no siempre es fácil, debido al polimorfismo clínico que se puede presentar en la infección y a la alta prevalencia de títulos serológicos para anticuerpos anti-toxoplasma en la población. Por otro lado, es complicado el aislamiento del parásito, lo que dificulta correlacionar la infección con la manifestación clínica. Por tal razón el trabajo complementario, tanto de laboratorio como clínico, resultan básicos. (Álvarez *et al.*, 2003; Martín y García, 2003; Carrada, 2005).

2.6.1. Métodos diagnósticos convencionales

Los métodos de diagnóstico convencional para *T. gondii* abarcan los estudios serológicos, los bioensayos en gatos y/o ratones o bien la combinación de estas pruebas (Dubey y Beattie, 1988).

Hoy en día se cuenta con diversos procedimientos directos para demostrar la presencia del parásito, así como indirectos basados fundamentalmente en la búsqueda de anticuerpos específicos. Aunque los métodos directos para la observación del parásito son lo ideal y proporcionan con gran seguridad el diagnóstico de infección aguda, no son muy utilizados debido a que la mayor parte de las veces son técnicas y procedimientos laboriosos y lentos, como la cordocentesis. Además, solo es posible realizarlos en un reducido número de casos, como por ejemplo la observación de los taquizoitos en muestras de líquido amniótico o cefalorraquídeo. De igual forma sucede con la inoculación en ratón para cualquier tipo de muestra y la técnica en fibroblastos (Tenter *et al.*, 2000; Martín y García, 2003; Díaz *et al.*, 2010).

Los métodos indirectos son los más utilizados, no obstante, las pruebas serológicas muestran algunos inconvenientes, como la estandarización, dificultad en la interpretación y el escaso resultado que proporcionan en infecciones latentes (Martin y García, 2003).

La prueba serológica que Sabin y Feldman desarrollaron en 1948 es la prueba de referencia de IgG, en la que un título 1:128 se consideraba indicador de toxoplasmosis activa. Esta prueba se fue sustituyendo debido a que utilizaba parásitos vivos y un factor sérico que nunca fue bien conocido, al que se llamó factor accesorio. La prueba de inmunofluorescencia indirecta diseñada por Goldman en 1962 y modificada por Hetcher en 1965, además de poseer idéntica sensibilidad y especificidad, es más accesible y de menos riesgo al no utilizar factor accesorio ni parásitos vivos. Su interpretación es menos subjetiva que la desarrollada por Sabin y Feldman, basada en la coloración resultante por efecto fluorescente (Velasco *et al.*, 1992).

La técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) reúne características similares a la inmunofluorescencia y es muy utilizada, aunque con la desventaja de no detectar los títulos por debajo de 1:16, los cuales con frecuencia se engloban en el rango negativo, muy común en la coriorretinitis toxoplasmósica (Velasco *et al.*, 1992). Títulos de hasta 1:32 se pueden encontrar en individuos no enfermos, y hoy en día se sabe que los títulos de anticuerpos no se relacionan con la gravedad de la enfermedad, motivo por el cual el complemento de estudios serológicos con la clínica es de vital importancia (Frenkel y Ruiz, 1980).

Si se cuenta con gatos en el hogar, el examen de este protozoario se puede efectuar por examen fecal rutinario, demostrándose la presencia de ooquistes mediante la técnica de flotación, usando un número de soluciones con una gravedad específica de 1:18 (Lloria, 2002).

2.6.2. Métodos diagnósticos moleculares

En las últimas dos décadas, se ha potencializado como diagnóstico la búsqueda del ADN específico de *T. gondii* utilizando métodos moleculares como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), debido a que poseen ventajas sobre los métodos

convencionales tales como la simplicidad, una alta sensibilidad, reproducibilidad y una buena relación costo-beneficio (Schoondermark *et al.*, 1994; Bell y Ranford, 2002; Contini *et al.*, 2005; Calderaro *et al.*, 2006; Bastien *et al.*, 2007; Bessieres *et al.*, 2009).

Los métodos moleculares pueden dividirse en dos grupos:

- Métodos para la detección de ADN de *T. gondii* en muestras biológicas: Aquí se incluyen las pruebas de PCR convencional, PCR anidado (n-PCR) y PCR tiempo real (qPCR).
- Métodos de alta resolución para la identificación de aislados de *T. gondii*: Se incluyen las metodologías de PCR-RFLP multilocus, microsatélites, y Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) de secuencias de ADN de una sola copia (Su *et al.*, 2009).

2.6.2.1. Métodos para la detección de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras biológicas:

La prueba que con mayor frecuencia se utiliza para el diagnóstico de *T. gondii* debido a la alta sensibilidad es la PCR de secuencias pequeñas de ADN que se encuentran repetidas, debido a la alta eficiencia de amplificación de un fragmento pequeño comparado con uno grande aunado a que se cuenta con un mayor número de copias del templado.

A lo largo del uso de esta metodología, existen tres secuencias de ADN repetidas que han sido utilizadas con mayor frecuencia para la detección de *T. gondii*, siendo éstas:

- Gen multicopia B1: Este gen se encuentra 35 veces repetido. La primera metodología de PCR convencional para la amplificación de este gen fue desarrollada y reportada por Burg y colaboradores en 1989. Esta metodología ha sido adaptada y modificada en diferentes estudios (Khalifa *et al.*, 1994; Liesenfeld *et al.*, 1994; Bretagne *et al.*, 1995; Pelloux *et al.*, 1998; Contini *et al.*, 2002, 2005; Reischl *et al.*, 2003; Switaj *et al.*, 2005; Bastien *et al.*, 2007).
- Elemento repetido de 529 pb: Este gen cuenta con 300 copias y fue identificado en el año 2000 por Homan y colaboradores y algunos autores han reportado que

es hasta 100 veces más sensible su amplificación que la del gen B1 (Homan *et al.*, 2000; Reischl *et al.*, 2003; Calderaro *et al.*, 2006).

- Gen ITS-1 o gen 18S ribosomal: Este gen cuenta con 100 copias y ha sido utilizado en pocos estudios, en donde ha mostrado una sensibilidad similar a la reportada para el gen B1 (Hurtado *et al.*, 2001; Jauregui *et al.*, 2001; Calderaro *et al.*, 2006). Este gen ha sido de gran interés ya que permite distinguir entre diferentes protozoarios emparentados con *T. gondii*.

La técnica de PCR ha permitido detectar el ADN de *T. gondii* en tejidos y fluidos corporales. Resulta imposible distinguir la infección latente de la activa cuando esta se aplica a los tejidos donde puede haber quistes, pero es válida para diagnosticar la infección aguda, para el estudio en líquido amniótico o líquido cefalorraquídeo donde no hay quistes (Martin y García, 2003; Carrada, 2005)

Buscando incrementar la sensibilidad de la prueba, se ha desarrollado la modalidad de nPCR y se ha utilizado tanto para el gen B1 como para el gen ITS-1, lográndose detectar el ADN hasta de un solo parásito (Hurtado *et al.*, 2001; Jauregui *et al.*, 2001; Calderaro *et al.*, 2006).

De igual forma, la prueba de PCR tiempo real ha mostrado una alta sensibilidad y posee la ventaja de no solo detectar el ADN del parásito, sino también cuantificar la cantidad de ácido nucleico en las muestras. Esta modalidad ha sido utilizada para monitorear la progresión de infecciones en pacientes sometidos a tratamientos (Bell y Ranford, 2002; Contini *et al.*, 2005).

2.6.2.2. Métodos de alta resolución para la identificación de aislados de *T. gondii*

Este tipo de pruebas moleculares han sido de gran utilidad en estudios epidemiológicos para identificar aislados individuales de *T. gondii* y determinar la fuente de contaminación.

Uno de los primeros estudios epidemiológicos y de estructura de la población de *T. gondii* se realizó en 1995 con 106 aislados recolectados de humanos y animales de América del

Norte y Europa, en donde utilizando 6 marcadores para PCR-RFLP se identificaron 3 linajes predominantes (tipo I, II y III), concluyéndose así que este parásito tiene una estructura de población clonal (Howe y Sibley, 1995).

Se han ejecutado diversos estudios lográndose concluir que los aislados de *T. gondii* provenientes de América del Sur son altamente diversos y diferentes de aquellos provenientes de América del Norte y Europa, concluyéndose así que, en América del Sur, *T. gondii* tiene una estructura epidémica poblacional (Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2004, 2006; Pena *et al.*, 2008).

Sin duda alguna, para lograr entender la epidemiología molecular, filogenia y genética poblacional de *T. gondii* es de gran utilidad aplicar de manera integral las técnicas diagnósticas moleculares, tanto de detección como de caracterización, lo cual permitirá impactar positivamente en el control de la transmisión de este parásito y una reducción en la frecuencia de la toxoplasmosis tanto en animales como en humanos (Su *et al.*, 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El muestreo se realizó en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango y Nuevo León, ubicados en la región norte de México y que forman parte de la región semiárida del país.



Figura 4. Elaboración propia. Mapa de México. Se indica los 4 estados del norte del país donde se recolectaron las muestras de carne de cabrito y las de leche de cabra para esta investigación.

3.2. Toma de muestras

3.2.1. Muestras de Carne

Para la realización de este estudio se recolectaron un total de 326 muestras de carne de cabrito de entre 25 a 40 días de edad, todos ellos sacrificados en un rastro especializado en caprinos del estado de Nuevo León, que cuenta con la categoría Tipo Inspección

Federal (TIF) otorgada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) del Gobierno Federal.

Tabla 5. Distribución de las muestras de carne de cabrito por entidad federativa.

#	ID Muestra	Localidad	Totales
1	1-40 / 50-71	Durango	62
2	41-49 / 72-97	Coahuila	35
3	98-221	Chihuahua	124
4	222-326	Nuevo León	105
		Totales =	326

Se tomaron las muestras de las canales de los cabritos con ayuda de pinzas hemostáticas y tijeras quirúrgicas utilizando guantes de látex y se guardaron de manera individual en un empaque de plástico con sellado Ziploc® de medida 10 x 10 cm, no estéril y se identificaron con su número de muestra progresiva, mientras que los datos de fecha de colecta y nombre de la entidad de procedencia se anotaban en la hoja de registro del muestreo; posteriormente se colocaron por cantidades de 20 bolsitas de muestras individuales en otra bolsa de plástico grande y transparente con sellado Ziploc® de medida 20 x 30 cm, procurando extraerle aire y así se colocaron dentro de una hielera con refrigerantes, y en un lapso de tiempo no mayor a 6 horas se hicieron llegar al Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde se resguardaron en un congelador a una temperatura de -22°C hasta su procesamiento.

El muestro de carne para el presente estudio fue determinado por el proveedor de las mismas, de acuerdo a la cantidad de cabritos sacrificados por visita. Para validar la cantidad de muestras se usó el software WIN EPISCOPE 2.0: “Improved epidemiological software for veterinary medicine” (Anexo 5 y 6) (Thrusfield *et al.*, 2001), considerando la población caprina del estado a muestrear, un nivel de confianza del 95% y una prevalencia mínima esperada del 20%, toda vez que en trabajos anteriores en México, y a partir de sueros de diversas especies, se encontró una prevalencia del 30%, y del 29% en rumiantes de manera particular.

3.2.2. Muestras de Leche

Para el muestreo de leche de cabra se recolectaron un total de 120 muestras. Las cuales fueron tomadas del tambo homogenizado del ordeño de la mañana en un tubo plástico, obteniendo una cantidad de 15 ml aproximadamente, y resguardándolas en hielera con gel refrigerante hasta su traslado al Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

En el muestro de leche para el presente estudio, se estableció la cantidad de muestras usando para ello el software WIN EPISCOPE 2.0: “Improved epidemiological software for veterinary medicine” (Anexo 7 y 8) (Thrusfield *et al.*, 2001), considerando la población caprina del estado a muestrear, un nivel de confianza del 95% y una prevalencia mínima esperada del 10% tomado en cuenta los resultados previos de este estudio en muestras de carne.

Tabla 6. Distribución de las muestras de leche de cabra por entidad federativa.

#	ID Muestra	Localidad	Totales
1	1-30	Chihuahua	30
2	31-60	Coahuila	30
3	61-90	Durango	30
4	91-120	Nuevo León	30
		Totales =	120

3.3. Extracción del ADN genómico de las muestras

3.3.1. Muestras de carne

Se inició con el manejo de las muestras para el proceso de extracción de ADN, trabajo que se desarrolló en la campana de seguridad biológica (Termo Scientific 1300 series A2, EEUU) con el propósito de evitar la contaminación de las muestras. Se procedió a tomar una fracción de aproximadamente 1 cm² de cada muestra, que se colocó en un mortero de cerámica, al cual se le adicionó nitrógeno líquido y con ayuda de un macerador (mano de mortero) se logró obtener una porción aproximadamente de 5 g del tejido de la muestra

colocándolo en tubos tipo Eppendorf® de 2 ml para su posterior uso en el proceso de la PCR.

Para la extracción del ADN, se utilizó el protocolo propuesto por el fabricante (Wizard Genomics, de Promega, EEUU). Se procedió a la lisis con 2 ml de solución tampón de lisis (10 μ M de Tris-HCl [pH 8.3], 1.5 μ M de MgCl₂, 50 μ M de KCl, 0,1 mg/ml de gelatina, 0.5% Tween 20) y 50 μ l de proteinasa K. La mezcla se realizó ejerciendo presión física en un mortero durante 10 minutos y se dejó reposar durante 5 minutos más. La muestra resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, descartando el sobrenadante, y a continuación se le adicionó 250 μ l de buffer PBS al sedimento. Éste se centrifugó a 1.000 g (Eppendorf 5430, USA Scientific, Inc) durante 10 minutos y se adicionó al sedimento 600 μ l de solución de lisis nuclear (Nuclei Lysis Solution, Promega), incubando la mezcla a 37°C por 15 minutos y a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de la solución de precipitación de proteína (iso-propanol 100% y 0.5 μ l de solución de glucógeno [20 mg/ml]), agitando vigorosamente por 20 segundos en el vortex, dejándolo reposar luego durante 5 minutos en hielo. A continuación, la muestra resultante se centrifugó (Eppendorf 5430) entre 13.000 y 16.000 g por 4 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, mezclándose con 200 μ l de alcohol isopropílico (CTR Scientific, México). La mezcla resultante se centrifugó nuevamente entre 13.000 y 16.000 g por un minuto, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 μ l de etanol (CTR Scientific) al 70%, mezclando por inversión. La mezcla resultante se centrifugó entre 13.000 y 16.000 g por un minuto. Se eliminó el etanol cuidadosamente por aspiración y se invirtió el tubo sobre un papel absorbente limpio durante 10 a 15 minutos, a fin de eliminar cualquier resto de etanol. A continuación, se le adicionaron 100 μ l de solución de rehidratación (10 μ M de Tris-HCl – pH 7.4; 1 μ M de EDTA – pH 8.0). La muestra se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

3.3.2. Muestras de leche

Para la extracción del ADN de las muestras de leche, se utilizó el protocolo y los reactivos propuesto por el fabricante (Wizard Genomics de Promega). A un volumen de 400 μ l de leche, se le adicionaron 900 μ l de la solución de lisis celular, y la mezcla fue sometida a

10 homogenizaciones con el equipo Fast-Prep®-24 (MP Biomedicals. Irvine, California, EEUU) en intervalos de 1 minuto de agitación y 5 minutos de reposo. Las muestras se centrifugaron (Eppendorf 5430) 15 minutos a 16.000 g y el sobrenadante se transfirió a otro tubo, al cual se le adicionaron 300 µl de la solución de lisis nuclear, se homogenizó por pipeteo y se incubó a 37°C por 1 hora. Se agregó 1.5 µl de RNAsa, se mezcló de 2-5 veces por inversión y se incubó a 37°C por 15 minutos dejándose enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 100 µl de la solución de Proteína y se agitó mediante un vórtex durante 10-20 segundos; posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 4 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml al que se agregaron 300 µl de isopropanol. La mezcla se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. A continuación se adicionaron 300 µl de etanol al 70% y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto, decantándose el sobrenadante. El precipitado (ADN) se dejó secar a 37°C por 30 minutos. El ADN se rehidrató con 100 µl de la solución de rehidratación del kit. Posteriormente, las muestras se incubaron a 65°C por 1 hora.

3.4. Análisis y cuantificación del ADN

Para verificar la pureza y concentración del ADN obtenido a partir de las muestras, se procedió a realizar un análisis por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm nos proporcionó la concentración de ADN y la relación 260/280 nm la pureza del ácido nucleico obtenido (Preparaciones puras de ADN tienen un valor de 260/280 de 1.8, Wilfinger *et al.*, 1997). De igual forma, se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar la banda de ADN.

3.5. PCR del gen constitutivo del Citocromo b

Para verificar la calidad e integridad del ADN, se analizó la expresión del gen del Citocromo b. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 2.5 U (0.5 µl) de Taq DNA polimerasa, 5 µl de buffer de reacción 5X MyTaq (BIOLINE™ Reagents, Probiotek, México) con 2.5 µM de dNTP's y 7.5 µM de MgCl₂ y 100 ng/µl de cada uno

de los cebadores, aforando con agua DEPC (Dietil-pirocarbonato) hasta un volumen final de 25 µl.

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron:

MM1 - CTGCTCTGCCTGCCCTGGACT

MM3 – GGTCCCTCAGTTCCTCCCATTGT

Dando como resultado una banda de amplificación de 219 pb.

Ya realizada la mezcla, el tubo se llevó a un termociclador Maxygen II de la marca Axygen (Corning Life Sciences, Union City, CA, EEUU) bajo las condiciones de amplificación recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de amplificación para PCR del gen constitutivo del Citocromo b.

PCR para citocromo b			
Paso	Temperatura °C	Tiempo Minutos	Ciclos
Desnaturalización previa	95	1	1
Desnaturalización	95	1	30
Alineamiento	65	1	
Extensión	72	1	
Extensión posterior	72	10	1

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 volts. Los geles fueron visualizados mediante el fotodocumentador PhotoDoc-it™ (Ultra Violet Products, Ltd., Upland, California, EEUU) el cual cuenta con una cámara Canon de 14.1 megapíxeles.

3.6. Estandarización de la técnica de PCR para detección de *T. gondii*.

Se analizó la presencia de *T. gondii* mediante PCR y nPCR utilizando la cepa de referencia RH, con la finalidad de mejorar la especificidad y sensibilidad de la prueba diagnóstica. Se buscó amplificar el gen B1, el cual es específico para *Toxoplasma* y es el

más usado para su diagnóstico ya que se encuentra repetido hasta 35 veces. Esta metodología fue previamente validada con una sensibilidad de 10 fg de ADN de *Toxoplasma*, lo que equivale al ADN de un solo parásito presente en la muestra (Burg *et al.*, 1989).

En el presente estudio se utilizó como control positivo el ADN de la cepa de referencia RH, material que fue proporcionado por el Dr. Juan Antonio Castillo Hernández, Profesor Investigador del departamento de Patología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España.

Se validó la técnica del PCR primera ronda y nPCR mediante la amplificación de 1 µl directo del ADN de la cepa de referencia (control positivo) y de cada una de las diluciones analizadas: 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200 utilizando una solución que contenía 2.5 U (0.5 µl) de Taq DNA polimerasa, 5 µl de buffer de reacción 5X MyTaq (BIOLINE™) con 2.5 µM de dNTP's y 7.5 µM de MgCl₂ y 100 ng/µl de cada uno de los cebadores, aforando con agua DEPC hasta un volumen final de 25 µl. Esta mezcla de reacción se utilizó para las dos rondas de PCR, diferenciándose en los cebadores utilizados y que en el nPCR se utilizó como ADN 1 µl del producto del primer PCR.

- Para la primera PCR los cebadores utilizados fueron:

Toxo N1: 5' – GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG -3' y

Toxo C1: 5' – TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC- 3'

Dando como resultado una banda de amplificación de 193 pb.

- Los cebadores utilizados para la nPCR fueron:

Toxo N2: 5' – TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG -3' y

Toxo C2: 5' – GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC -3'

Dando como resultado una banda de amplificación de 97 pb.

Ya realizada la mezcla, el tubo se llevó a un termociclador Axygen MaxyGene® II (Corning Life Sciences). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las

previamente reportadas por Ponce y Gómez (2003), que se utilizaron para las dos rondas de PCR, tal y como se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de amplificación para PCR y para nPCR.

Primer PCR			
Paso	Temperatura °C	Tiempo Minutos	Ciclos
Desnaturalización previa	94	5	1
Desnaturalización	94	1	40
Alineamiento	53	1	
Extensión	72	1	
Extensión posterior	72	10	1
nPCR			
Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización previa	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	1 minutos	14
Alineamiento	53	30 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión posterior	72	10 minutos	1

De igual forma, la temperatura de alineamiento de los cebadores utilizados en la primera ronda de PCR se validó mediante un gradiente de temperatura (49.5°C, 50.7°C, 57.4°C y 60.9°C) bajo las mismas condiciones de amplificación ya descritas.

Los productos de amplificación se mezclaron con 1 µl de reactivo GelRead® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, EEUU) y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 volts. Los geles fueron visualizados mediante un fotodocumentador PhotoDoc-it ® (Ultra Violet Products, Ltd.) el cual cuenta con una cámara Canon de 14.1 megapíxeles.

3.7. Detección de *T. gondii* mediante la prueba PCR en muestras de carne y de leche.

Para la búsqueda de ADN de *T. gondii* en las muestras de carne y de leche, se analizaron los ADN mediante PCR bajo las condiciones de amplificación previamente descritas, en un volumen final de 25 µl que contenía: 1 µl de ADN de la muestra, 2.5 U (0.5 µl) de Taq DNA polimerasa, 5 µl de buffer de reacción 5X MyTaq® (BIOLINE®) con 2.5 µM de dNTP's y 7.5 µM de MgCl₂, y 100 ng/µl de cada uno de los cebadores, aforando la mezcla con agua DEPC.

Los productos de amplificación se mezclaron con 1 µl de reactivo GelRead® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 volts. Los geles fueron visualizados mediante un fotodocumentador PhotoDoc-It® Imaging System (Ultra Violet Products, Ltd.) el cual cuenta con una cámara Canon de 14.1 megapíxeles.

3.8. Secuenciación y análisis de homología de los productos amplificados

Los productos de PCR de las muestras positivas de carne fueron enviados a la compañía Macrogen (Rockville, MD, EEUU) para su secuenciación. Se editaron las secuencias obtenidas en el proceso de secuenciación mediante el programa EditSeq del Software DNASTAR versión 13 (DNASTAR, Inc, Wisconsin USA), para obtener la secuencia consenso. Los análisis genéticos se realizaron con el mismo software DNASTAR versión 13, donde se realizaron los alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas y las de referencia del GenBank con el programa MegaAlign. A partir de los alineamientos se hicieron las comparaciones de los pares de bases y el grado de divergencia genética (distancias genéticas), mediante el método Kimura 2-Parametro (Kimura, 1980).

4. RESULTADOS

4.1. Extracción de ADN

Se analizó por electroforesis y espectrofotometría el ADN de la cepa de referencia RH (Figura 5), obteniéndose una concentración de 510.8 ng/μl y una pureza de 1.8. De igual manera se logró obtener ADN de calidad en todas las muestras procesadas, siendo analizadas por electroforesis y cuantificadas por espectrofotometría, obteniéndose para las muestras de carne concentraciones en el rango de 1.830 ng/μl a 4.000 ng/μl y con una pureza de 1.8 a 1.9 (Figura 6), y para las muestras de leche un rango de concentración de 53 ng/μl a 113 ng/μl con la misma pureza (Figura 7), lo cual garantiza una buena calidad de ácido nucleico para realizar las reacciones de PCR.

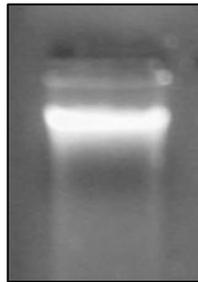


Figura 5. Extracción de ADN del control positivo de *T. gondii*.

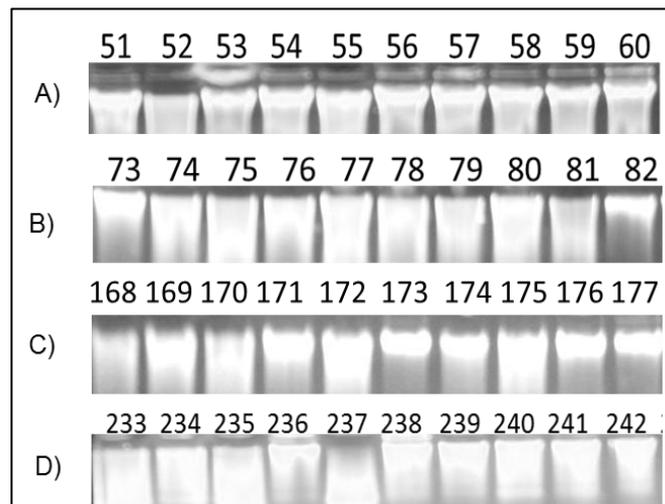


Figura 6. Extracción de ADN de muestras representativas de carne de cabritos de los estados del Norte de México. A) Durango, B) Coahuila, C) Chihuahua y D) Nuevo León. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador.

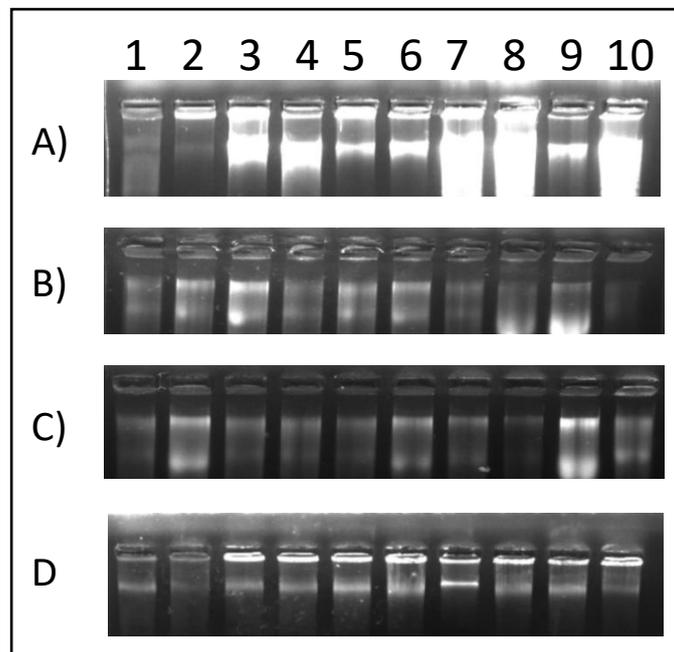


Figura 7. Extracción de ADN de muestras representativas de leche de cabra de los estados del Norte de México. A) Durango, B) Coahuila, C) Chihuahua y D) Nuevo León. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador.

4.2. PCR del gen constitutivo del Citocromo b

Para analizar la integridad del ADN, éstos fueron analizados por la amplificación del gen constitutivo del Citocromo b, la cual se estandarizó con muestra de sangre de cabra a través de un gradiente de temperatura de alineamiento, lográndose amplificar la banda esperada a 65°C como estaba previamente reportada (Figura 8). Al analizar las muestras de carne de cabrito y leche de cabra, se logró observar la banda de amplificación en la totalidad de las muestras, tanto de carne como de leche (Figuras 9 y 10).

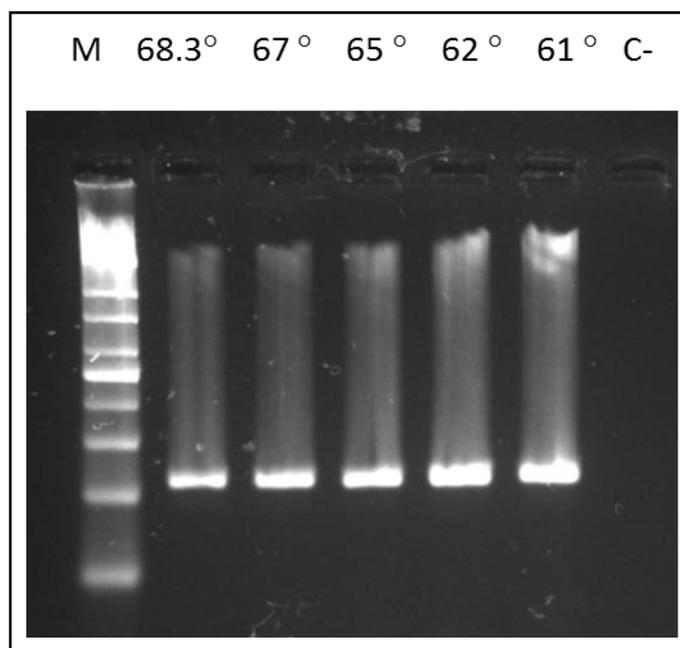


Figura 8. Amplificación del gen constitutivo del Citocromo b en muestra de sangre de caprino. Gradiente de temperatura. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. M Marcador de peso molecular 100 pb.

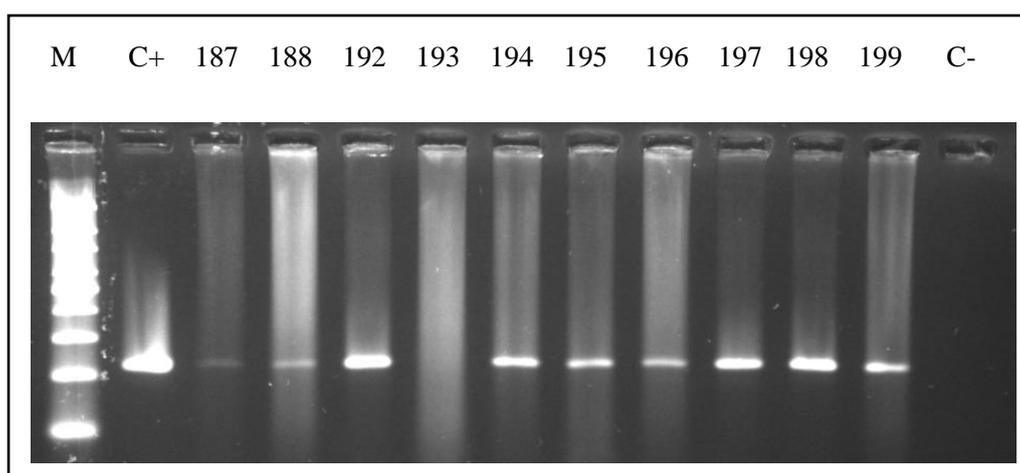


Figura 9. Amplificación del gen constitutivo del Citocromo b en muestras de carne. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo cepa de referencia RH, 187 a 199: Muestras de carne.

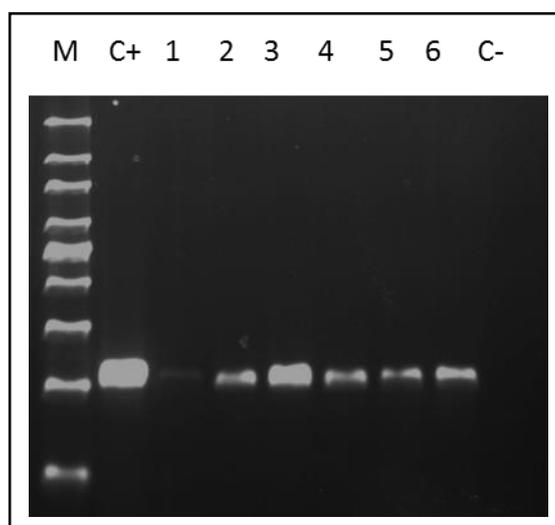


Figura 10. Amplificación del gen constitutivo del Citocromo b en muestras de leche. Electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizado bajo la luz UV del transiluminador. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo Cepa de referencia RH, 1 a 6: Muestras representativas de leche.

4.3. Estandarización de la técnica de PCR para amplificación del gen B1 de *T. gondii* con la cepa de referencia RH

Se procedió a realizar la estandarización del PCR y nPCR para la amplificación del gen B1 de *T. gondii* utilizando la cepa de referencia.

Se utilizaron las condiciones previamente reportadas para los cebadores utilizados y se utilizaron diluciones (1:10, 1:50, 1:100 y 1:200) de la cepa de referencia RH.

En la primera ronda de PCR, se logró obtener la amplificación esperada de 193 pb en todas las diluciones probadas. De igual forma, no se observó banda de amplificación en el control negativo (reactivos de PCR más agua) como se observa en la Figura 11, lo cual nos indica una alta sensibilidad de los cebadores y las condiciones de no contaminación de reactivos y de manejo para proceder con las amplificaciones de las muestras problema.

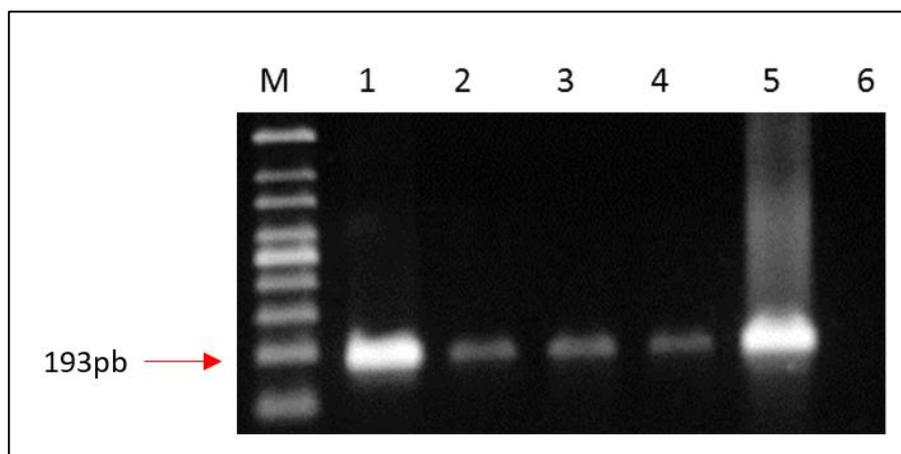


Figura 11. Primera Ronda de PCR de DNA de la cepa de referencia RH de *T. gondii*. Amplificación de 193 pb del gen B1 con los cebadores N1 C1. M: Marcador de peso molecular 100 pb, Diluciones de la cepa de referencia RH: 1: Dilución 1:10, 2: Dilución 1:50, 3: Dilución 1:100, 4: Dilución 1:200, C+: 1 µl directo de la cepa de referencia RH, C-: (sin ADN).

Posteriormente, se analizaron las condiciones de amplificación del nPCR, utilizando como templado 1 µl de los productos de amplificación de la primera ronda de PCR, obteniéndose en todos los casos la banda esperada de amplificación de 97 pb. De igual forma, no se observó banda de amplificación en el control negativo (reactivos de PCR más agua) como se observa en la Figura 12, lo cual nos indica la sensibilidad de los cebadores y las condiciones de no contaminación de los reactivos y de manejo para proceder con las amplificaciones de las muestras problema.

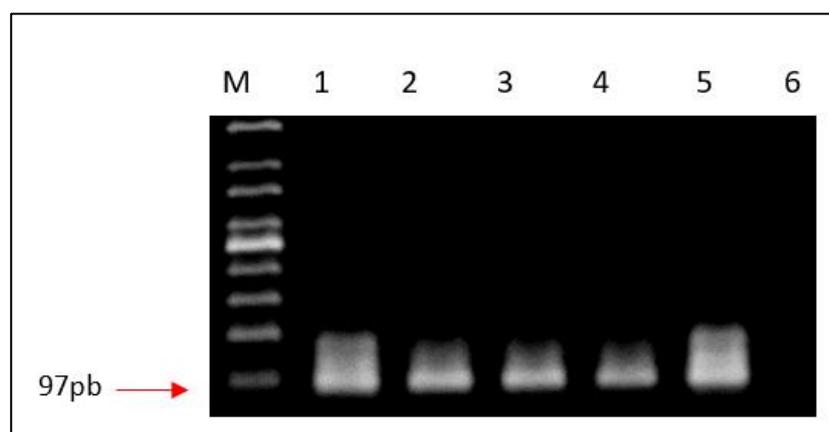


Figura 12. nPCR de la cepa de referencia RH de *T. gondii*. Amplificación de 97 pb del gen B1 con los cebadores N2 C2. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 1: 1µl del producto amplificado a partir de Dilución 1:10, 2: Dilución 1:50, 3: Dilución 1:100, 4: Dilución 1:200, C+: 1 µl directo de la primera ronda de PCR, C-: (sin ADN).

Al validar la temperatura de alineamiento de los cebadores utilizados en la primera ronda de PCR, logramos observar que se obtuvo la banda esperada de amplificación de 193 pb en el rango de temperaturas establecidas por el termociclador, por arriba y por debajo de la establecida en el protocolo previamente reportado, motivo por el cual se decidió correr los PCR de las muestras de carne y leche con la temperatura de 53°C, reportada originalmente para los cebadores utilizados.

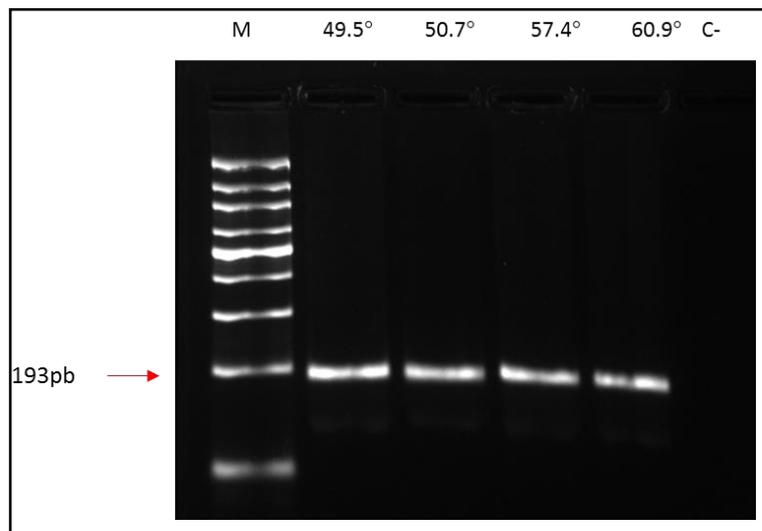


Figura 13. Gradiente de PCR de la cepa de referencia RH de *T. gondii*. Amplificación de 193 pb del gen B1 con los cebadores N1 C1. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 1: Alineamiento a 49.5°C, 2: Alineamiento a 50.7°C, 3: Alineamiento a 57.4°C, 4: Alineamiento a 60.9°C, 5: Control negativo.

4.4. Resultados de PCR para la detección de *T. gondii* en muestras de carne de caprinos y leche de cabra

Una vez validadas las condiciones de amplificación del PCR y nPCR con el ADN de la cepa de referencia, se analizaron las 326 muestras de ADN de carne de cabritos.

En la primera ronda de PCR, se obtuvieron 10 muestras positivas (ID 187-188, 192-199), las cuales mostraron la banda de amplificación esperada de 193 pb, como se muestra en la Figura 14.

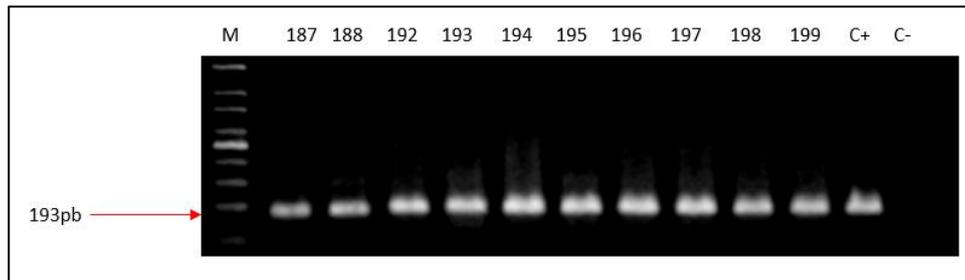


Figura 14. Amplificación por PCR con cebadores N1 C1 en muestras de carne de cabrito. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 187-199: Muestras de músculo de diafragma de cabrito positivas a *Toxoplasma*, C+: Control positivo, C-: Control negativo.

El total de las muestras se analizó por nPCR, y en las 10 muestras positivas en la primera ronda se observó la banda de amplificación esperada de 97 pb (Figura 15), lo que representa un 3.06%. Como puede observarse en la Tabla 9, el 100% de las muestras positivas para *T. gondii* provenían del estado de Chihuahua.

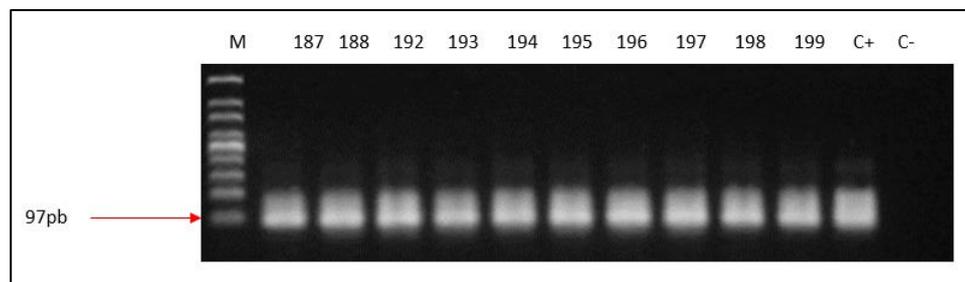


Figura 15. Amplificación por nPCR de *T. gondii* en muestras de carne de cabrito. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, 187-199: Muestras de músculo de diafragma de cabrito positivas a *Toxoplasma*. C+: Control positivo, C-: Control negativo.

Tabla 9. Resultados de las muestras de carne de cabrito analizadas por las técnicas de PCR y para nPCR distribuidas por localidad de origen.

Localidad	ID Muestras	Totales	Amplifico
Durango	1-40 / 50-71	62	0
Coahuila	41- 49 / 72 - 97	35	0
Chihuahua	98 – 221	124	10
Nuevo León	222 – 326	105	0
	Totales =	326	10

En el caso de las muestras de leche, se corrieron 5 combinados de 6 muestras de leche cada una, de las diferentes localidades (30 combinados por entidad federativa= 120 unidades de producción caprina). En la primera ronda de PCR y nPCR las muestras fueron negativas, como se muestran en las Figuras de la 16 a la 19 para los cebadores N1 C1, y de la 20 a la 23 para los cebadores N2 C2.

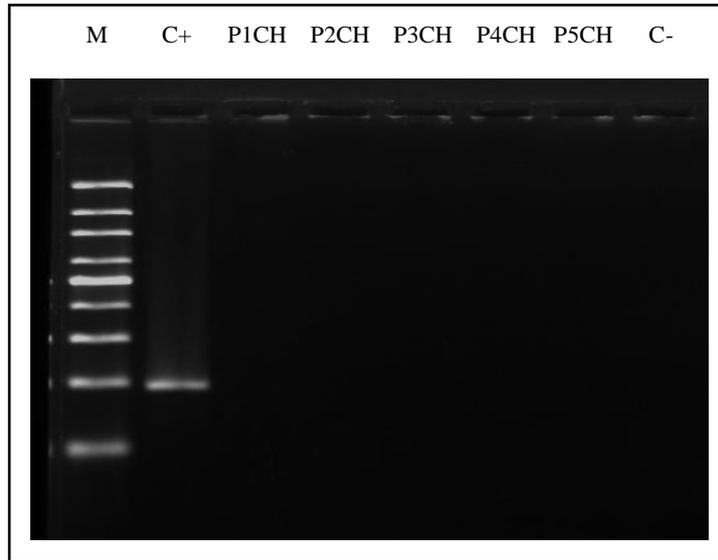


Figura 16. PCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N1 C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo, P1CH a P5CH: Combinados de muestras del Estado de Chihuahua, C-: Control negativo.

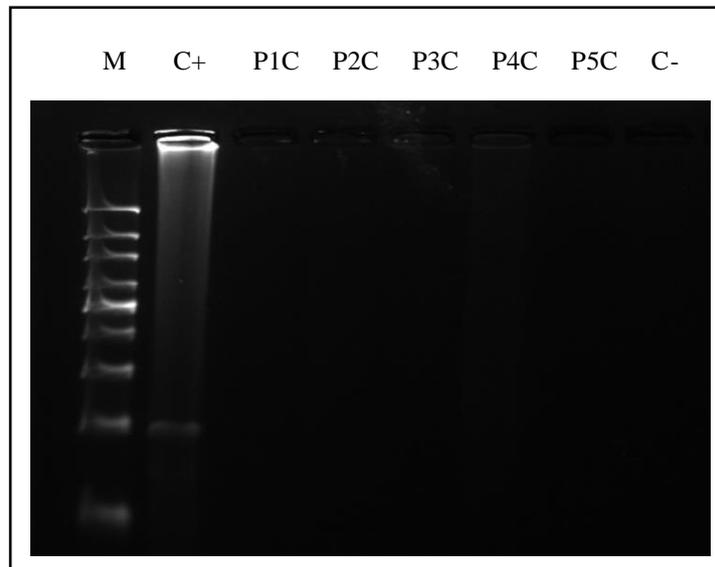


Figura 17. PCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N1 C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo, P1C a P5C: Combinados de muestras del Estado de Coahuila, C-: Control negativo.

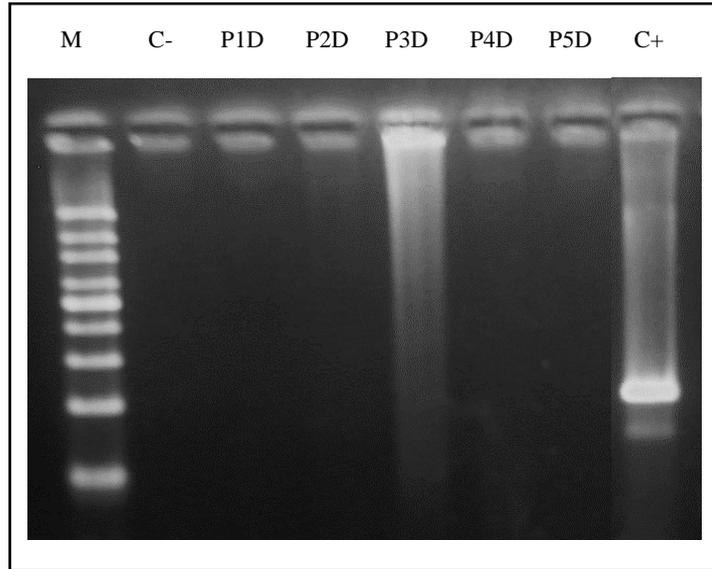


Figura 18. PCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N1 C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C-: Control negativo, P1D a P5D: Combinados de muestras del Estado de Durango, C+: Control positivo.

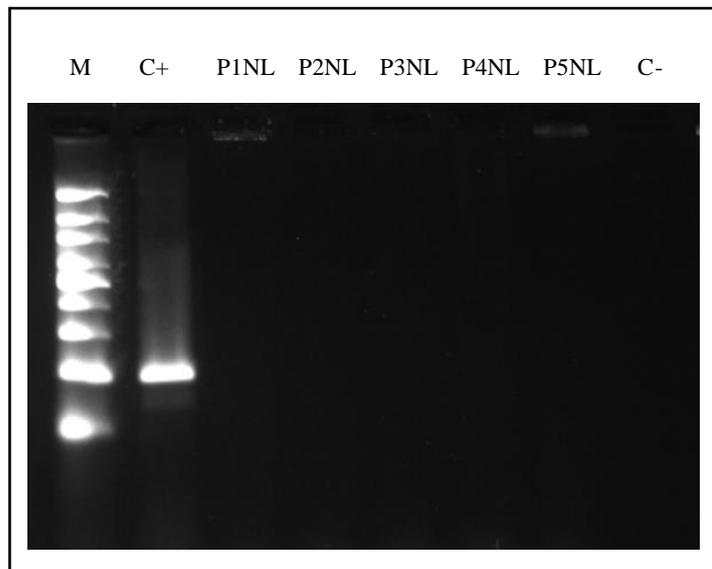


Figura 19. PCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N1 C1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: ADN de cepa control, P1 a P5: Combinados de muestras del Estado de Nuevo León, C-: control negativo.

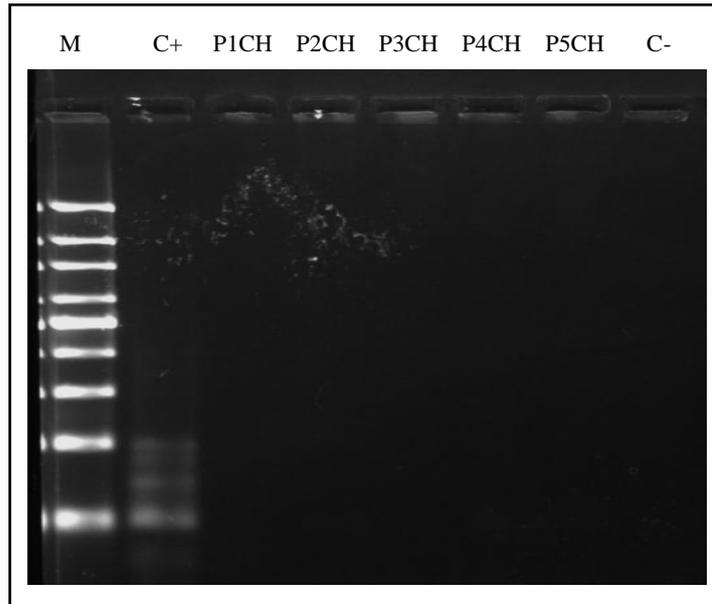


Figura 20. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2 C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo, P1CH a P5CH: Combinados de muestras de Chihuahua, C-: Control negativo.

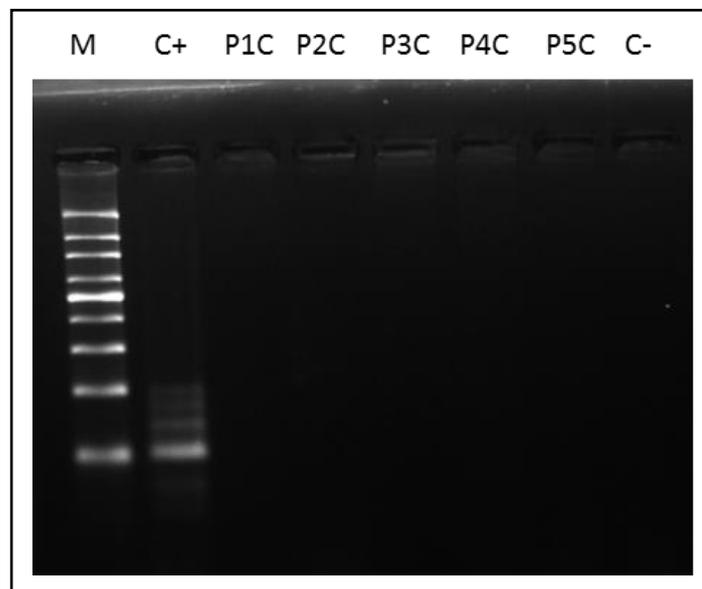


Figura 21. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2 C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: ADN de cepa control, P1C a P5C: Combinados de muestras del Estado de Coahuila, C-: Control negativo.

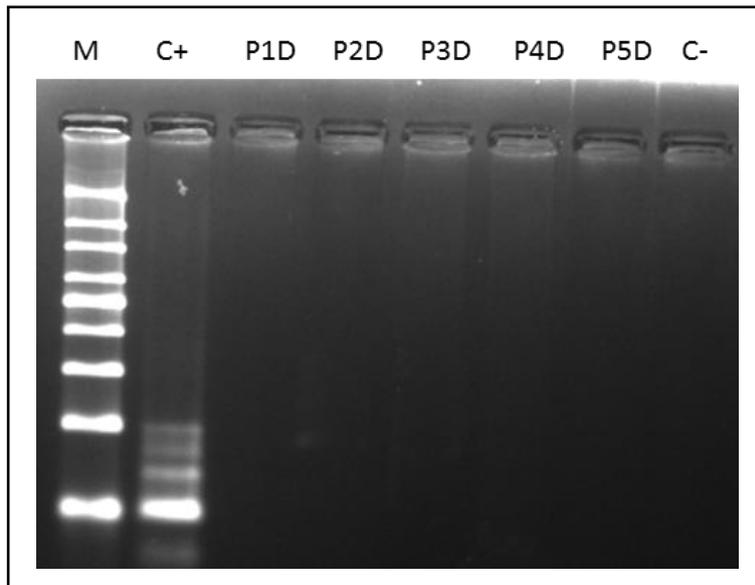


Figura 22. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2 C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo, P1D a P5D: Combinados de muestras del Estado de Durango, C-: Control negativo.

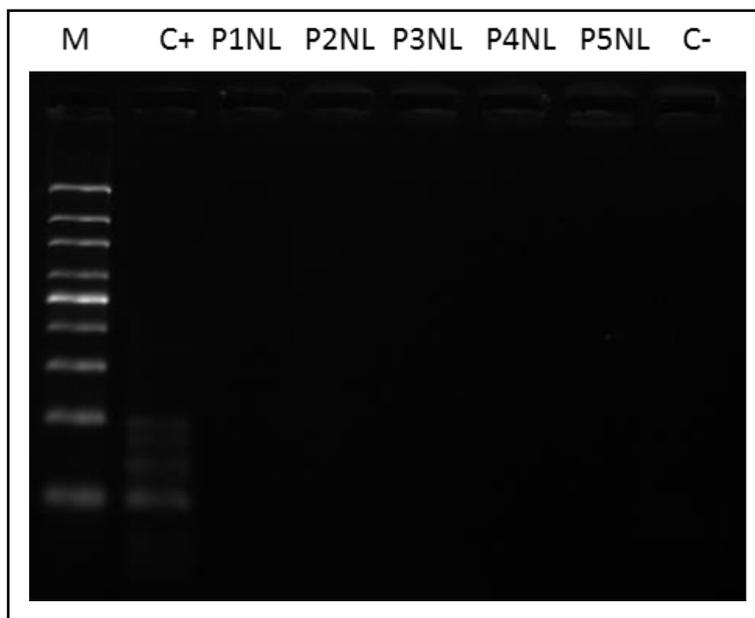


Figura 23. nPCR de *T. gondii* en combinados de muestras de leche con los cebadores N2 C2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular 100 pb, C+: Control positivo, P1NL a P5NL: Combinados de muestras del Estado de Nuevo León, C-: Control negativo.

Figura 24. Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas a partir de los productos de PCR para *T. gondii* de las muestras 187, 188, 192, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 193 y la secuencia AF.179871.1. Las secuencias fueron editadas con el programa Editseq/DNAStar v. 13, el alineamiento múltiple de las secuencias y la secuencia parcial del gen B1 de la cepa RH de *T. gondii* obtenida del GenBank con el número de acceso AF179871.1 se realizó con el programa MegAlign 13/DNAStar v.13. En la primera fila se describe la secuencia de nucleótidos que posee la mayoría. Los números de la segunda fila representan el número de base con respecto a la secuencia del GenBank AF179871.1, las secuencias analizadas de este estudio se describen a continuación, de lado derecho se establece el número de base correspondiente a cada secuencia.

Para establecer las distancias genéticas entre las secuencias establecidas en este estudio y la secuencia parcial del gen de la glycerol-3-phosphato deshidrogenasa (B1) de la cepa RH de *T. gondii* depositada en el GenBank, con el número de acceso AF179871.1, se utilizó el alineamiento múltiple de secuencias realizado anteriormente con el programa MegAlign/DNAStar v. 13., estableciéndose una homología del 100% entre todas las secuencias y con la reportada en el GenBank (Figura 25).

Porcentaje de similitud

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	af179871.1
2	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	2	187
3	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	3	188
4	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	4	192
5	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	5	194
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	6	195
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	7	196
8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	8	197
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	9	198
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	10	199
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	11	193
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

Figura 25. Distancia genética de las secuencias de las muestras analizadas (187, 188, 192, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 193) y la cepa RH de *T. gondii* depositada en el GenBank (AF179871.1). El porcentaje de similitud fue del 100% para las secuencias analizadas con respecto a la reportada al GenBank. No se mostró divergencia en estos casos.

5. DISCUSIÓN

La Toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica parasitaria de distribución mundial, causada por el parásito intracelular de *T. gondii*. Desde su descubrimiento, se han realizado numerosos estudios en diversas partes del mundo enfocados a conocer la biología de este microorganismo en los hospedadores y su impacto en la salud pública. Se han reportado una gran variedad de hospederos intermediarios, donde cabe destacar su presencia en especies domésticas tales como las especies ovina, caprina, porcina y lagomorfos (Cordero *et al.*, 1999; Quiroz *et al.*, 2011).

Sin duda alguna, uno de los factores claves para la detección de este agente zoonótico es el método diagnóstico utilizado. Éstos han partido desde el uso del método convencional por serología, para la detección de anticuerpos en suero y en algunas ocasiones el aislamiento del parásito por inoculación en ratones. Algunos de los inconvenientes de la técnica de aislamiento en ratones es el tiempo de duración que puede demorar de 3 a 6 semanas, y de 4 a 10 días en el aislamiento en cultivo celular. Aunado al factor tiempo, las técnicas de aislamiento conllevan un posible riesgo de contaminación durante el manejo (Montoya *et al.*, 1996; Mei-Hui *et al.*, 2000).

El diagnóstico serológico, por su parte, presenta múltiples limitaciones, por ejemplo, la falla para detectar IgG anti-Toxoplasma específica o IgM durante la fase activa de la infección, debido a que estos anticuerpos no se producen hasta después de varias semanas de la parasitemia (Mei-Hui *et al.*, 2000), aunado a que en los casos de reactivación se pueden presentar falsos negativos, ya que éste proceso no siempre va acompañado de cambios en los niveles de anticuerpos (Kompalic *et al.*, 2007).

Aun con estas limitaciones, la mayor cantidad de reportes sobre la presencia de este parásito alrededor del mundo, y de manera particular en México, derivan de estudios realizados con técnicas serológicas.

Por lo anteriormente expuesto, se han utilizado herramientas de diagnóstico molecular, las cuales han mostrado grandes beneficios al contar con metodologías simples y

reproducibles, con una alta sensibilidad y especificidad, motivos por los cuales han sido aplicados como métodos diagnósticos en una gran variedad de muestras de animales y humanos.

Los métodos moleculares para el estudio de *T. gondii* se pueden dividir en dos grupos: 1. Aquellos que se enfocan en la detección de ADN de *Toxoplasma* en muestras biológicas: PCR convencional, nPCR, qPCR, y 2. Aquellos que permiten la identificación de cepas de *T. gondii*: PCR-RFLP, microsatélites y tipificación por secuencias multilocus (MLST). (Su *et al.*, 2009).

Dentro del primer grupo, se ha trabajado principalmente en la amplificación por PCR de diversos genes como el B1 o el P30 y el 18S ADN ribosomal. Éstos son genes altamente conservados en *T. gondii* (Jones *et al.*, 2000) y se han amplificado tanto en una ronda, como en la modalidad de nPCR, en donde éste último ha sido reportado como el ensayo más significativo y sensible para el diagnóstico de Toxoplasmosis (Homan *et al.*, 2000). La amplificación de gen B1 ha sido utilizada para la detección de *Toxoplasma* en diferentes tipos de muestras, el éxito de esta prueba diagnóstica se debe a su alta sensibilidad debida al número de repeticiones del gen B1 presentes en el genoma de *T. gondii*, que va de 25-50 copias, haciéndose referencia a 35 copias (Boothroyd *et al.*, 1987).

Las amplificaciones con estos tres genes han sido probadas en una gran variedad de tejidos en pacientes, tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, y se han probado en numerosos tipos de muestras tales como sangre, lavado bronco alveolar, fluido cerebroespinal, vítreo, hígado, orina, líquido amniótico, tejido cardiaco, tejido cerebral y retina. En un estudio de detección de *T. gondii* en muestras de humor acuoso (Jones *et al.*, 2000), se realizó una comparación entre los genes B1, P30 y 18S de ADN ribosomal, en donde después de una ronda de amplificación con P30 y el 18S fue posible detectar 1pg de ADN genómico de *Toxoplasma*. Sin embargo, con B1 fue posible detectar 50 fg, que es aproximadamente lo correspondiente a un solo taquizoito, manteniéndose este nivel de sensibilidad en la segunda ronda de PCR. Aunado a esto, los cebadores para B1 mostraron alta especificidad por *Toxoplasma* y no así por ADN fúngico, bacteriano o de linfocitos humanos. Además, esta alta sensibilidad de detección no se vio mermada con altas concentraciones de ADN de linfocitos humanos.

En un estudio donde se realizó una comparación de la amplificación de los genes B1 y P30 como blancos para el diagnóstico de *Toxoplasma* en borregos infectados experimentalmente (Wastling *et al.*, 1993), ambos genes se pudieron detectar en muestras de linfa, sangre y de nódulos linfáticos de los borregos infectados, aun habiendo sido éstos congelados y descongelados; sin embargo, con el PCR para B1 fue posible la detección en la sangre periférica de los borregos en una etapa más temprana y por un periodo significativamente mayor, concluyéndose que el PCR para B1 era más sensible que los resultados con la amplificación de P30. Las amplificaciones de los dos genes mostraron resultados similares en cuanto a falsos positivos en comparación con el método de inyección en ratones, que podía deberse a las muestras que contenían el ADN del parásito pero que no eran organismos viables.

La amplificación del gen B1 ha mostrado numerosas ventajas con respecto a otros: los cebadores para P30 han mostrado ser menos específicos que los de B1, debido a que se ha probado que amplifican ADN de especies de *Nocardia* y *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que los cebadores para B1 no amplifican ADN de una gran variedad de especies bacterianas y fúngicas (Jones *et al.*, 2000).

Con la finalidad de incrementar la sensibilidad del PCR para *Toxoplasma*, se han establecido protocolos de PCR tiempo real para los genes B1 y P30. Ambos pueden detectar diluciones del ADN de *Toxoplasma* equivalentes a un rango de 10 hasta 100,000 taquizoitos por ensayo (Buchbinder *et al.*, 2003), así como estudios de polimorfismos del gen B1 para una genotipificación directa de *Toxoplasma gondii* en muestras clínicas de humanos, sin la necesidad de realizar aislamiento o cultivo (Costa *et al.*, 2013).

Por todo lo anteriormente mencionado, en el presente trabajo de investigación se utilizó la variante de PCR anidado para amplificar un fragmento de 97 pb del gen B1 de *Toxoplasma*, eligiéndose éste debido a la alta sensibilidad previamente reportada.

Cabe destacar que, aunque los oligonucleótidos y el protocolo para la amplificación del gen B1 se encontraba previamente reportada por Ponce y Gómez (2003), se realizó la estandarización para determinar las condiciones óptimas de amplificación en base a los reactivos y termociclador utilizados, analizando principalmente la concentración para

definir un límite de detección, así como la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, utilizando para ello la cepa de referencia RH. Aunado a esto, y previo al análisis de las muestras de carne y leche, la calidad e integridad del ADN obtenido se analizó por electroforesis, espectrofotometría y por la amplificación del gen constitutivo del Citocromo b. Todas estas variables, sumado a los controles positivo y negativo que se corrieron en cada una de las rondas de PCR, nos permitió la obtención de resultados reproducibles y confiables.

En el presente estudio se obtuvo un 3.06% de muestras de carne positivas del total muestreado, y todas ellas provenientes del estado de Chihuahua (el 8.06% positivas de la muestra estatal). Este porcentaje de positividad está dentro del rango (8-14%) reportado recientemente en el 2015 por Lorencova, utilizando la misma metodología de diagnóstico molecular, en donde se analizó el tejido muscular de rumiantes silvestres de la República Checa. Bajo la misma metodología, en Colombia, Campo-Portacio y colaboradores (2014), reportaron un 32% de positividad en carnes analizadas de res, cerdo y pollo; este porcentaje mayor puede deberse a las condiciones geográficas que favorecen el desarrollo de este parásito, contrastando con nuestra zona de muestreo, que abarcó zonas del Norte de México que se caracterizan por tener un clima seco de tipo desértico, menos apropiado para el desarrollo de *Toxoplasma*.

En México, *T. gondii* se encuentra distribuido ampliamente. Se han realizado reportes de 12 estados del país en diferentes especies domésticas y silvestres, reportándose en el periodo de 2004 al 2013 (Hernández *et al.*, 2015) una seroprevalencia del parásito en diferentes especies animales en un rango de un 0.5% hasta un 100%, donde los mayores porcentajes se encuentran en regiones húmedas-tropicales, y que correspondieron a especies tales como linco, gato, perro, cerdo, oveja y delfín.

Específicamente en la especie de estudio en este trabajo, los caprinos, existen dos reportes en el país: uno del año 2011 en Durango, con un 31%, y otro del 2013 en Michoacán, con un 15.2%, realizados mediante la técnica serológica de aglutinación modificada (Hernández *et al.*, 2015).

Este rango de positividad está contemplado en el amplio margen reportado por Besné-Mérida, en el 2011, en donde se reporta para más de dos mil rumiantes (bovinos, caprinos

y ovinos) muestreados en diferentes estados de México durante el periodo 1990-2008, un rango de seropositividad de un 3% a un 84%, en donde el porcentaje más bajo correspondió a los caprinos.

Sin embargo, no se encuentran reportes del porcentaje de positividad mediante el uso técnicas de diagnóstico molecular, siendo éste el primer reporte de su tipo sobre caprinos en la región norte de México.

El diagnóstico en esta especie en México, y de manera particular en el Norte del país, es de suma relevancia, ya que dentro de los cuatro estados muestreados, dos de ellos son los más importantes en producción de leche y carne de caprino, aunado a que el estado de Nuevo León es el de mayor consumo per cápita de carne de cabrito. Dicho lo anterior, el diagnóstico oportuno de este agente zoonótico a través de un método de diagnóstico molecular con alta sensibilidad, especificidad y de resultados reproducibles, contribuye de manera importante en el área de salud pública al dar la pauta para emprender investigaciones que permitan establecer una posible asociación entre la transmisión de este parásito y su afectación en la salud humana.

En el presente trabajo, se contempló la búsqueda de ADN de *T. gondii* en muestras de leche de cabra, debido a que existen reportes de la presencia y aislamiento de taquizoitos de este parásito en leche de esta especie (*Capra aegagrus hircus*), sugiriendo la posibilidad de adquirir los humanos la infección al consumir la leche de forma no pasteurizada (Mancianti *et al.*, 2013). Esta posible asociación ha sido reportada en casos clínicos de toxoplasmosis en humanos (Dubey *et al.*, 2014). De igual forma, se ha reportado que los productos frescos elaborados con leche de cabra pudieran constituir una posible fuente de infección por este agente patógeno (Walsh *et al.*, 1999).

En un estudio realizado en Polonia por Sroka y colaboradores (2017), se analizó la expresión del gen B1 por PCR tiempo real y PCR anidado en muestras de leche de cabra, obteniéndose un 65% de positividad (39/60) por qPCR y un 43% (26/60) por nPCR, donde se destaca que 11 de las muestras positivas por PCR fueron recolectadas de cabras seronegativas, lo cual podría explicarse debido a que se encontraban en la fase inicial de la infección, con niveles indetectables de anticuerpos específicos.

Es importante recalcar, que el hallazgo de ADN en leche no garantiza la viabilidad del parásito. Sin embargo, se ha asociado como un factor de riesgo en mujeres embarazadas en Europa (Cook *et al.*, 2000) y en Estados Unidos (Dubey *et al.*, 2014). En este último reporte se demostró la deliberación intermitente del parásito en la leche de cabra.

Los resultados previamente citados contrastan con los obtenidos en este trabajo, en donde se analizaron un total de 120 muestras (combinados) de leche y todas ellas fueron negativas, lo que pudiera deberse a que el parásito se encontraba enquistado en tejido. Sin embargo, no existían las condiciones de disminución en la inmunidad de los animales para un posible resurgimiento de la infección que conllevara a una excreción en la leche (Bezerra *et al.*, 2015). Aunado a esto, la técnica de PCR tiempo real utilizada en el estudio citado incrementa la sensibilidad de la técnica de diagnóstico, lo cual representa un área de oportunidad para incrementar la sensibilidad de la prueba diagnóstica estandarizada e implementada en el presente trabajo.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (nPCR) para determinar la presencia de *Toxoplasma gondii*, lo cual nos permite contar con una técnica diagnóstica validada de alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de este parásito.

Esta investigación reporta el hallazgo de la detección de ADN de *T. gondii* en el 3.06% del total muestreado (10/326 muestras de carne de cabrito), todas ellas provenientes del estado de Chihuahua lo que representa el 8.06% de muestras positivas a nivel estatal; mediante la prueba estandarizada de la PCR y su variante de nPCR. Este porcentaje es menor al reportado por técnicas serológicas en otros estudios reportados en México, en los estados de Michoacán (15.2%) y Durango (31%), aunque se encuentra dentro del rango de positividad reportado por esta técnica molecular en otros países.

A partir del análisis de la identidad de los productos amplificados del tejido por secuenciación, se obtuvo un 100% de homología entre todas las secuencias analizadas, así como con la secuencia reportada en el GenBank AF179871.1, corroborándose así la especificidad de la técnica diagnóstica estandarizada.

En lo referente a la leche de cabra, no se logró detectar material genético de *T.gondii* en 120 muestras analizadas, contrastando con lo reportado en otros países.

Este es el primer estudio que reporta la presencia de ADN de *T. gondii* en carne de cabrito mediante diagnóstico molecular en el Norte de México, región donde se encuentran dos de los 10 estados con mayor producción de cabritos (Coahuila y Nuevo León) y el estado con mayor consumo per cápita (Nuevo León) del país, sugiriendo así un riesgo para la salud pública como posible fuente de infección a través de los alimentos, lo que denota la importancia de contar con un método de diagnóstico efectivo que permita establecer medidas de prevención y control para patógenos transmitidos por los alimentos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ajzenberg, D., Banuls, A.L., Su, C., Dumetre, 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.

Alvarado, C., Alanis, O.P., Arreola, M.A., Rodríguez, A., Piedra, L.J., Duran, E., *et al.* 2006. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in psychiatric inpatients in a northern Mexican city. BMC Infect Diseases, 6:178.

Alvarado, C., Sifuentes, A., Narro, S.G., Estrada, S., Díaz, J.H., Liesenfeld, O., *et al.* 2006. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in a public hospital in northern Mexico. BMC Infect Diseases, 6:113.

Alvarado, C., Liesenfeld, O., Herrera, R.G., Ramírez, B.E., González, A., Martínez, S.A., *et al.* 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, Mexico. Journal of Parasitology, 93:1214-6.

Alvarado, C., Mercado, M.F., Rodríguez, A., Fallad, L., Ayala, J.O., Nevarez, L.J., *et al.* 2007. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, Mexico. BMC Infect Diseases, 7:75.

Alvarado, C., Cruz, H.M., Esquivel, R., Estrada, S., Rivas, M., Liesenfeld, O., *et al.* 2008. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in human adults from three rural communities in Durango State, Mexico. Journal of Parasitology, 94:811-6.

Alvarado, C., Liesenfeld, O., Márquez, J.A., Cisneros, A., Estrada, S., Martínez, S.A., *et al.* 2008. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in waste pickers and waste workers in Durango, Mexico. Zoonoses Public Health, 55:306-12.

Alvarado, C., Torres, A., Liesenfeld, O., García, C.R., Estrada, S., Sifuentes, A., *et al.* 2009. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in rural Durango, Mexico. Journal of Parasitology, 95:271-4.

Alvarado, C., Liesenfeld, O., Márquez, J.A., Estrada, S., Dubey, J.P. 2010. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in workers occupationally exposed to water, sewage, and soil in Durango, Mexico. *Journal of Parasitology*, 96:847-50.

Alvarado, C., Rojas, A., Estrada, S., Sifuentes, A., Liesenfeld, O., García, C.R., *et al.* 2010. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in a Mennonite community in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 96:941-5.

Alvarado, C., Estrada, S., Pizarro, H., Arce, M., Liesenfeld, O., Dubey, J.P. 2011. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in general population in a northern Mexican city. *Journal of Parasitology*, 97:40-3.

Alvarado, C., Estrada, S., Liesenfeld, O. 2011. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to unwashed raw fruits and vegetables: a case control seroprevalence study. *BMC Parasites & Vectors*, 4:235.

Alvarado, C., García, C., Alvarado, D., González, A.M., Briones, C., Vitela, J., *et al.* 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 97:616-9.

Alvarado, C., García, C., Vitela, J., Villena, I., Dubey, J.P. 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Durango State, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 183:43-6.

Alvarado, C., Liesenfeld, O., Estrada, S., Félix, J. 2011. *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to raw meat. *Occupational Medicine (Lond)*, 61:265-9.

Alvarado, C., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C., Choudhary, S., Alvarado, D., *et al.* 2011. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *Journal of Parasitology*, 97:809-12.

Alvarado, C., Torres, J.L., Estrada, S., Liesenfeld, O., Mercado, M.F. 2011. *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: a case-control study in a northern Mexican population. *MBC Parasites & Vectors*, 4:75.

Alvarado, C., Urbina, J.D., Estrada, S., Torres, A., Molotla, G., Liesenfeld, O., *et al.* 2011. *Toxoplasma gondii* infection and schizophrenia: a case control study in a low *Toxoplasma* seroprevalence Mexican population. *Parasitology International*, 60:151-5.

Alvarado, C., Estrada, M.A., Reyes, S.O., Pérez, J.A., Trujillo, J.I., Villena, I., *et al.* 2012. High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 98:1248-50.

Alvarado, C., Estrada, S., García, C.R., Rojas, A., Sifuentes, A., Liesenfeld, O. 2012. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in Tepehuanos in Durango, Mexico. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12:138-42.

Alvarado, C., García, C., Alvarado, D., Vitela, J., Villena, I., Dubey, J.P. 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 98:271-3.

Alvarado, C., González, A.M., Alvarado, D., Ontiveros, F., Vitela-Corrales, J., Villena, I., *et al.* 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 98:431-2.

Alvarado, C., Liesenfeld, O., Burciaga, B.D., Ramos, A., Estrada, S., Cerrillo, S.M., *et al.* 2012. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in elderly people in a northern Mexican city. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 12:568-74.

Alvarado, C., Rodríguez, S., Villena, I., Dubey, J.P. 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic horses in Durango State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 98:944-5.

Alvarado, C., Sánchez, R., Dubey, J.P. 2012. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in captive marine mammals in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 184:321-4.

Alvarado, C., Torres, A., Liesenfeld, O., Estrada, S., Urbina, J.D. 2012. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in a subset of Mexican patients with work accidents and low socioeconomic status. *BMC Parasites & Vectors*, 5:13.

Alvarado, C., Estrada, M.A., Reyes, S.O., Pérez, J.A., Trujillo, J.I., Villena, I., et al. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic sheep in Oaxaca State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 99:151-2.

Alvarado, C., Silva, D., Villena, I., Dubey, J.P. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy goats in Michoacán State, Mexico. *Journal of Parasitology*, 99:540-2.

Álvarez, L., Pineda, N., Rojas, E. 2003. Detección de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en una comunidad rural en el estado de Trujillo Venezuela. *Academia*, 2(3):36-38.

Anónimo. 2009. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. <http://www.fao.org/docrep/012/i0680s/i0680s.pdf>

Anónimo. 2012. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México, 2011. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/mortalidad/PEE_Mortalidad_VE2011.pdf

Anónimo. 2012. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad por causas sujetas a vigilancia epidemiológica en México 2012. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/mortalidad/PEE_Mortalidad_VE2012.pdf

Anónimo. 2014. Anuario estadístico de la FAO. La alimentación y la agricultura en America Latina y el Caribe. <http://www.fao.org/3/a-i3592s.pdf>

Anónimo. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>

Anónimo. 2015. FAO Statistical Pocketbook World food and agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. <http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>

Atias A. 1991. Parasitología Clínica. Publicaciones técnicas Mediterráneo. 3era. Edición. Santiago, Chile., Capítulo 131:269-282.

Bártová, E., Kobédová, K., Lamka, J., Kotrba, R., Vodička, R., Sedlák, K. 2017. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in exotic ruminants and camelids in the Czech Republic. Parasitology Research, 116(7):1925-1929.

Bastien, P., Jumas-Bilak, E., Varlet-Marie, E., Marty, P. 2007. Three years of multi-laboratory external quality control for the molecular detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid in France. Clinical Microbiology and Infection, 13:430-433.

Bell, A. S., Ranford-Cartwright, L. C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends in Parasitology, 18(8):338-342.

Besné-Merida, A., Figueroa-Castillo, J.A., Martinez-Maya, J.J., Luna-Pasten, H., Calderon-Segura, E., Correa, D. 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. Veterinary Parasitology, 157:310-313. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.06.019.

Bessieres, M.H., Berrebi, A., Cassaing, S., Fillaux, J., Cambus, J.P., Berry, A., Magnaval, J.F. 2009. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(2):389-392.

Bezerra, M.J., Kim, P.C., Moraes, É.P., Sá, S.G., Albuquerque, P.P., Silva, J.G., Alves, B.H., Mota, R.A. 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. Transboundary Emerging Diseases, 62:421–424.

Boothroyd, J.C., Burg, J.L., Nagel, S.D., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L., Prince, J.B., Sharma, S.D., Remington, J.S. 1987. Antigen and tubulin genes of *Toxoplasma gondii*. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, 42:237-250.

Bretagne, S., Costa, J.M., Fleury-Feith, J., Poron, F., Dubreuil-Lemaire, M.L., Vidaud, M. 1995. Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. Journal of Clinical Microbiology, 33(6):1662-1664.

Buchbinder, S., Blatz, R., Rodloff, A.C. 2003. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45:269-271.

Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., Boothroyd, J.C. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(8):1787-1792.

Caballero, H., Palma, J.M., García, L.J., Gildo, A., Correa, D. 2008a. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology*, 135:1385-9.

Caballero, H., Quiroz, H., Olazarán, S., Correa, D. 2008b. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology*, 135:897-902.

Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Peruzzi, S., Zerbini, L., Bommezzadri, S., Chezzi, C. 2006. Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomedica-Ateneo Parmense*, 77(2):75-80.

Campo-Portacio, D.M., Discuviche-Rebolledo, M.A., Blanco-Tuirán, P.J., Montero-Pérez, Y.M., Orozco-Méndez, K.E., Assia-Mercado, Y.M. 2014. Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen B1 en carnes de consumo humano. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*, 18(3):93-99.

Carrada, T. 2005. Toxoplasmosis: Parasitosis reemergente del nuevo milenio. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 52(3):151-162.

Castillo, V.J., Acosta, K.Y., Guzmán, E. del S., Jiménez, M., Segura, J.C., Aguilar, A.J., et al. 2012. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from the tropics of Mexico using serological and molecular tests. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*; 2012: ID 529108.

Cedillo, C., Díaz, I.D., Jiménez, M.I., Sánchez, G., Correa, D. 2012. Frequency of antibodies to *Toxoplasma gondii* in stray dogs of Oaxaca, México. *Journal of Parasitology*, 98:871-2.

Chancin, L., Sánchez, Y., Estévez, J. 2003. Prevalence of human toxoplasmosis in San Carlos Island, Venezuela. INCI, 28(8):457-462.

Cisak, E., Zając, V., Sroka, J., Sawczyn, A., Kloc, A., Dutkiewicz, J., Wójcik-Fatla, A. 2017: Presence of pathogenic rickettsiae and protozoan in samples of raw milk from cows, goats, and sheep. Foodborne Pathogens and Disease, 14:189-194.

CNSP. (2011). Boletín. Comité Nacional Sistema Producto Caprinos. México.

Contini, C., Cultrera, R., Seraceni, S., Segala, D., Romani, R., Fainardi, E., Delia, S. 2002. The role of stage-specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated *Toxoplasma gondii* encephalitis in patients with AIDS. Journal of Medical Microbiology, 51(10):879-890.

Contini, C., Seraceni, S., Cultrera, R., Incorvaia, C., Sebastiani, A., Picot, S. 2005. Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. International Journal for Parasitology, 35(3):275-283.

Cook, A.J.C., Holliman, R., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Dunn, D.T. 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control studyCommentary: Congenital toxoplasmosis—further thought for food. British Medical Journal, 321(7254), 142-147.

Cordero, M., Rojo, G.A., Martínez, A.R., Sánchez, C. Hernández, S., Navarrete, J, Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M. 1999. Parasitología Veterinaria McGraw-Hill-International de España, S.A.U. España. pp: 968.

Costa, J.M., Alanio, A., Moukoury, S., Clairet, V., Debruyne, M., Poveda, J.D., Bretagne, S. 2013. Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluids base don B1 gene polymorphism using minisequencing analysis. BioMed Central Infectious Diseases, 1-6.

De Miguel, J., Cavero, A., Montero, J. 2002. Toxoplasmosis: principales problemas materno-fetal. Actualidad Obstétrica Ginecológica, 14:45-51.

De Oliveira, A., Domingues, P.F., Vieira Da Silva, A., Bergamaschi Pezerico, S., Langoni, H. 2004. Detection of *Toxoplasma gondii* in swine sausages. *Parasitología Latinoamericana*, 59(1-2):42-45.

DGIS. 2012a. “Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2011”. Anuario de la Dirección General de Información en Salud, Secretaria de Salud. México.

DGIS. 2012b. “Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad por causas sujetas a vigilancia epidemiológica en México 2012”. Anuario de la Dirección General de Información en Salud, Secretaria de Salud. México.

Díaz, L., Zambrano, B., Chacón, G., Rocha, A., Díaz, S. 2010. Toxoplasmosis y embarazo. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 70(3):190-205.

Díaz, P., Cabanelas, E., Díaz, J.M., Viña, M., Béjar, J.P., Pérez-Creo, A., Prieto, A., López, C.M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P. 2016. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats from north-western Spain. *Annals Agricultural and Environmental Medicine*, 23(4):587-590. doi: 10.5604/12321966.1226851

Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. 1973. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *The Journal of Parasitology*, 59:505-512.

Dubey, J.P., Beattie, C.P. 1988. *Toxoplasmosis of Animal and Man*. CRC Press, Boca Ratón. FL. USA. p 220.

Dubey, J.P., Kotula, A.W., Sharar, A., Andrews, C.D., Lindsay, D.S. 1990. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *The Journal of Parasitology*, 76(2):201-204

Dubey, J.P., 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20°C. *The Journal of Parasitology*, 83:946-949.

Dubey, J.P., Lindsay D.S., Speer C.A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11:267-299.

Dubey, J.P. 2004. Toxoplasmosis a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126(1):57-72.

Dubey, J.P., Morales, E.S., Lehmann, T. 2004. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *The Journal of Parasitology*, 90:411-3.

Dubey, J.P., Alvarado, C., Liesenfeld, O., Herrera, R.G., Ramírez, B.E., González, A., *et al.* 2007. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango City, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 93:1033-5.

Dubey, J.P. 2008. Quiste de *Toxoplasma gondii* en tejido cerebral de ratón. United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service. <https://www.ars.usda.gov/oc/images/photos/sep08/d1210-1/>

Dubey, J.P., Jones, J. L. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38(11):1257-1278.

Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Alvarado, C., Alvarado, D., Rodríguez, S., Martínez, S., *et al.* 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 95:319-22.

Dubey J.P., Lindsay D.S., Lappin M.R. 2009. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 39(6):1009-34.

Dubey J.P., Verma S.K., Ferreira L.R., Oliveira S., Cassinelli A.B., Ying Y., Kwok O.C., Tuo W., Chiesa O.A., Jones J.L. 2014. Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. *Journal of Food Protection*, 10:1747-53.

Dzikowiec, M., Góralaska, K., Błaszowska, J. 2017. Neuroinvasions caused by parasites. *Annals of Parasitology*, 63(4):243-253.

Ezequiel, N., Muñoz, A.D., Albuquerque, G.R., Lopes, C.W.G., Ferreira, A.M.R. 2003. Ocorrência de gatos soropositivos para *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae) na Cidade de Niteroi, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12(4):145-149.

Figueroa, J.A., Duarte, V., Juárez, M., Luna, H., Correa, D. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. The Journal of Parasitology, 92:394-5.

Frenkel, J.K., Ruiz, A. 1980. Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 29:1167-1180.

Frenkel, J.K. 1990. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. Journal of the American Veterinary Medical Association, 196:223-240.

Galina, M., Palma, G., Pacheco, D., Morales, R. 1995b, "Effect of goats milk, cow's milk, calves replacement and partial substitution with whey of the replacement mixture in artificial feeding of lactating female kids". Small Ruminant Research, 17(2):153-158.

Galván, M.L., Soto, J.L., Velasco, O., Pérez, R. 1995. Incidence of anti-*Toxoplasma* antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 28:333-7.

Galván, M.L., Sánchez, G., Vielma M., Soto, J.L. 1999. Presence of anti-*Toxoplasma* antibodies in humans and their cats in the urban zone of Guadalajara. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32:483-8.

García, L.J., Gutiérrez, M.A., Correa, D., Luna, H., Palma, J.M. 2007. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico. The Journal of Parasitology, 93:1527-8.

Germani, C., Pacheco, F. 2002. Comparação entre os testes de imunofluorescência indirecta e hemaglutinação indirecta para detecção de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. Acta Scientiae Veterinariae, 30(3):185-189.

Gilbert, R.E., Stanford, M.R. 2000. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? Br J Ophthalmol, 84:224-226.

Goldsmith, R.S., Kagan, I.G., Zárate, R., Reyes, M.A., Cedeno, J. 1991. Low *Toxoplasma* antibody prevalence in serologic surveys of humans in southern Mexico. Archivos de Investigación Médica (Mex), 22:63-73.

Gómez, J., González, M., Montoya, M., Giraldo, A., Castaño, J. 2007. A newborn screening programme for congenital toxoplasmosis in the setting of a country with less income. *Archives of Disease in Childhood*, 92-88.

Gómez, J.E., Castaño, J.C., Montoya, M.T. 1995. Toxoplasmosis congénita en Colombia: Un problema subestimado de salud pública. *Colombia Médica*, 26:66-70.

Guerrero, M.M. 2010. La caprinocultura en México, Una estrategia de desarrollo. *Revista Universitaria Digital de Ciencias Sociales*. : 1 Disponible en: <http://www.cuautitlan.unam.mx/rudics/ejemplares/0101/art06.html>

Hernández, I., Acosta, K.Y., Ortega, A., Guzman, E.S., Aguilar, A.J., Jiménez, M. 2015. Toxoplasmosis in Mexico: epidemiological situation in humans and animals. *Revista de Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57(2):93-103.

Hill, D.E., Sreekumar, C., Gamble, H.R., Dubey, J.P. 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *Journal of Food Protection*, 67:2230-2233.

Hill, A.E., Benedetto, S.M.C., Coss, C., McCrary, J.L., Fournet, V.M., Dubey, J.P. 2006. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *Journal of Food Protection*, 69:1961-1965.

Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H. 2000. Identification of a 200 to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Note: Nucleotide sequence data report in this paper have been submitted to GenBank™ database with the accession number AF146527 (*Toxoplasma gondii* genomic repetitive 529bp fragment). *International Journal for Parasitology*, 30(1):69-75. Doi: 10.1016/S0020-7519(99)00170-8. [PubMed: 10675747].

Howe, D.K., Sibley, L.D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, 172(6):1561-1566.

Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García, A.L. 2001. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology*, 102(1):17-27.

Jacobs, L., Remington, J.S., Melton, M.L. 1960. The Resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 46(1):11-21.

Jauregui, L.H., Higgins, J., Zarlenga, D., Dubey, J.P., Lunney, J.K. 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6):2065-2071.

Jiménez, M., Guzmán, E., Ortega, A., Acosta, K.Y. 2011. Immunological status against *Toxoplasma gondii* in non-cat owners from an endemic region of Mexico. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11:1057-61.

Jiménez, M.R., Braña, D., Partida, J.A., Alfaro, R.H., Soto, S., Torres, M.G. 2013. Evaluación de la calidad en la canal caprina, Libro técnico No. 4 ISBN: 978-607-37-0027-6, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Querétaro, México.

Jones, C.D., Okhravi, N., Adamson, P., Tasker, S., Lightman, S. 2000. Comparison of PCR detection methods for B1, P030, and 18S rDNA genes of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(3):634-644.

Kamerkar, S., Davis, P.H. 2012. *Toxoplasma* on the Brain: Understanding Host-Pathogen Interactions in Chronic CNS Infection. *Journal of Parasitology Research*. Article ID 589295. p 10.

Khalifa, E.S.K., Roth, A., Roth, B., Arasteh, K. N., Janitschke, K. 1994. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11):2813-2819.

Kijlstra, A., Jongert, E. 2008. Control of the risk of human Toxoplasmosis transmitted by meat. *International Journal for Parasitology*, 38:1359-1370.

Kikuchi, Y., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Martenson, J.S., Swift P.K., O'Brien, S.J. 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Veterinary Parasitology*, 120:1-9.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2):111-120.

Klaren, V., Kijlstra, A., 2002. Toxoplasmosis: An overview with emphasis on ocular involvement. *Journal Ocular Immunology Inflammation*, 10:1-26.

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

Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E.R., Bahia-Oliveira, L.M., Gennari, S.M., Dubey, J.P. 2004. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(2):107-114.

Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P. 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30):11423-11428.

Liesenfeld, O., Roth, A., Weinke, T., Foss, H.D., Hahn, H. 1994. A case of disseminated toxoplasmosis value of PCR for the diagnosis. *Journal of Infection*, 29(2):133-138.

Lloria, M.T., 2002. Toxoplasmosis, revisión clínica. *Farmacia Profesional*, 16(10):80-82.

Lora, F., Aricapa, H.J., Pérez, J.E., Arias, L.E., Idarraga, S.E., Mier, D., Gómez, J.E. 2007. Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetalero. *Asociación Colombiana de Infectología*, 11(3):117-123.

Lorencova, A., Lamka, J., Slany, M. 2015. *Toxoplasma gondii* in wild ruminants bred in game preserves and farms with production destined for human consumption in the Czech Republic. *Scientific Journal for Food Industry, Potravinarstvo®*, 9(1):288-292.

Lundén, A., Uggla, A. 1992. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *International Journal of Food Microbiology*, 15(3-4):357-363.

Mancianti, F., Nardoni, S., D'Ascenzi, C., Pedonese, F., Mugnaini, L., Franco, F., Papini, R. 2013: Seroprevalence, detection of DNA in blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. *Biomed Research International*, ID 905326. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/905326>.

Martin, I., García, S.M., 2003. Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*, 3(3):19-27.

Martin, I. 2004. Toxoplasmosis congénita, una mirada al problema. *Revista Biomédica*, 15:181-90.

Mei-Hui Lin, Tse-Ching Chen, Tseng-Tong Kuo, Ching-Chung Tseng, Chin-Ping Tseng. 2000. Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11):4121-4125.

Mital, V., Bhatia, R., Schgal, S. 1990. Prevalence of *Toxoplasma* antibodies among woman win BOH and general population in Delhi. *The Journal of Communicable Diseases*, 22(3):223-226.

Mombró, M., Perathoner, C., Leone, A., Nicocia, M., Moiraghi Ruggenini, A., Zotti, C., Lievre, M.A., Fabris, C. 1995. Congenital toxoplasmosis 10 years follows. *European Journal of Pediatrics*, 154:635.

Montoya, M.T., Gómez, J.E., Castaño, J.C., Marx, C. Aubert, D Bonhomme, A., Pinon, J.M. 1996. Avances Diagnósticos en Toxoplasmosis. *Acta Médica Colombiana*, 21:127-137.

Orona, I., Sangerman, D.M., González, J.A., Salazar, E., García, J.L., Navarro, A., Schwentesiusde, R. 2013. Proyección económica de unidades representativas de producción en caprinos en la Comarca Lagunera, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(4):625-636.

Olamendi, M., Caballero, H., Correa, D., Sánchez, M.A., Cruz, C., Medina, L., et al. 2012. Serosurvey of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in white-tailed deer from Northern Mexico. *Veterinary Parasitology*, 189:369-73.

Ortega, M. (2001). Prevalencia de la toxoplasmosis en rumiantes de abasto de la provincia de Sevilla. Universidad de Córdoba. España.

Ortega, A., Acosta, K.Y., Guzman, E., Uitzil, B., Rodríguez, J.C., Jiménez, M. 2011. Infection dynamic of *Toxoplasma gondii* in two fattening pig farms exposed to high and low cat density in an endemic region. *Veterinary Parasitology*, 175:367-71.

Pelloux, H., Guy, E., Angelici, M.C., Aspöck, H., Bessières, M.H., Blatz, R., Johnson, J. 1998. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiology Letters*, 165(2):231-237.

Pena, H.F.J., 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.

Pereira, A., Pérez, M., 2002. Toxoplasmosis. *Ámbito Farmacéutico*, 21(4):128-129.

Pereira, J., Quintanilla, A., Pérez, V., Álvarez, G., Fernández, E., Ortega, L.M. 2004. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Sapin by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 121:33-43.

Ponce Zapata, N.C., Gomez Marin, J.E. 2003. Estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por VIH. *Revista Infecto, Asociación Colombiana de Infectología*, 7(1):8-14.

Quiroz, H., Figueroa, J., Ibarra, F., López, M. 2011. Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. 1ª Edición. Departamento de Parasitología, FMVZ-UNAM. Pp: 330-332.

Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., Costa, J.M. 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infectious Diseases*, 3(1):7.

-
- Rendón, E., Caso, A., Jiménez, N.G., Hernández, D.M., Sandoval, A.L., Zepeda, H.M. 2012. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in free-ranging ocelots (*Leopardus pardalis*) from Tamaulipas, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 48:829-31.
- Rodríguez, M., Rodríguez, D., Ginorio, D., Martínez, R., Casanova, P., Fraga, J., et al. 2006. Primoinfección por *Toxoplasma gondii* durante el embarazo. *Revista Panamericana de Infectología*, 8:43-6.
- Romero, R., Buitrón, R., Amancio, O., Tay, J., Sánchez, J.T. 1998. Toxoplasmosis and threatened abortion. *Ginecología y Obstetricia de México*, 66:495-8.
- Schoondermark, E., Melchers, W., Camps, W., Eskes, T., Meuwissen, J., Galama, J. 1994. Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9):1930-1936.
- Sierra, M., Bosch, J., Juncosa, T., Mata, L., Muñoz, C. 1998. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. *Boletín Control de Calidad SEIMC*, 10:31-44.
- Sommer, R., Rommel, M., Levetzow, R. 1965. Die überlebensdauer von toxoplasmazysten in fleisch und fleischzubereitungen. *Fleischwirtsch*, 45:454-457.
- Spišák, F., Turčeková, L., Reiterová, K., Spilovská, S., Dubinský, P. 2010. Prevalence estimation and genotypization of *Toxoplasma gondii* in goats. *Biologia*, 65:670-674.
- Sroka, J., Kusyk, P., Bilaska-Zajac, E., Karamon, J., Dutkiewicz, J., Wójcik-Fatla, A., Zajac, V., Stojacki, K., Rózycki, M., Cencek, T. 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats from the south-west region of Poland and the detection of *T. gondii* DNA in goat milk. *Folia Parasitologica*, 64:023. doi: 10.14411/fp.2017.023
- Stanford, M.R., Tan, H.K., Gilbert, R.E., 2006. Toxoplasmic retinochoroiditis presenting in childhood: clinical findings in a UK survey. *British Journal Ophthalmology*, 90:1464-1467. Doi: 10.1136/bjo.2005.083543
- Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P. 2009. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Journal Parasitology*, 137(1):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>.

Suárez, M., González, A., Gardón, B.Y., Martínez, R. 2005. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincial de Ciego de Ávila, Cuba. *Revista Biomedica*, 16:21-27.

Sullivan, W.L., Jeffers V. 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3):717-733.

Suzán, G., Ceballos, G. 2005. The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two nature reserves within Mexico City limits. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36:479-84.

Switaj, K., Master, A., Skrzypczak, M., Zaborowski, P. 2005. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(3):170-176.

Tenter, A.M. 1999. Current Knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 23(6):391.

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.

Thrusfield, M., Ortega, C., Blas, I. de, Noordhuizen, J.P., Frankena, K. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *The Veterinary Record*, 148:567-572.

Uribarren, T., 2017. Toxoplasmosis. Recursos en Parasitología UNAM. Rev., 1-10. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiología/.../toxoplasmosi.html>

Vado, I.A., Suárez, V.M., Jiménez, B., Zavala, J.E., Segura, J.C. 2013. *Toxoplasma gondii* presence in women with spontaneous abortion in Yucatan, Mexico. *Journal of Parasitology*, 99:383-5.

Velasco, O., Salvatierra, B., Valdespino, J.L., Sedano, AM., Galindo, S., Magos, C., Llausas, A., Tapia, R., Gutiérrez, G., Sepulveda, J. 1992. Seroepidemiología de la Toxoplasmosis en México. *Salud Pública México*, 34(2):222-229.

Wallace, G.D. 1973. The role of the cat in the natural history of *Toxoplasma gondii*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 22:313-322.

Walsh C.P., Hammond S.E., Zajac A.M., Lindsay D.S. 1999. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. Journal Eukaryot Microbiology, 46:73S–74S.

Wastling, J.M., Nicoll, S., Buxton, D. 1993. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. Journal Medical Microbiology, 38:360-365.

Wilfinger, W., Mackey, K. and Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: BioTechniques, 22:474-481.

Zavala, J., Guzmán, E., Barrera, M., Rodríguez, M.E. 1989. Toxoplasmosis and abortion in patients at the o'Horan Hospital of Merida, Yucatan. Salud Publica Mexico, 31:664-8.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Antecedentes históricos de la Toxoplasmosis

Año	Investigadores	Contribución
1908	Nicole y Manceaux, Instituto Pasteur de Túnez	Descubrimiento
1909	Academia de las Ciencias de Paris	Denominación de morfología protozoo, y se nombró: <i>Toxoplasma gondii</i>
1910	Mello, en Turin	Se describe la toxoplasmosis como enfermedad en el perro (aislando el parásito en tejidos)
1917	Chatton y Blanc	Aislado en mamíferos y aves
1923	Janku, Checoslovaquia	Descubre quistes en retina de niño
1937	Wolf y Cowen	Confirman Meningo encefalomieltis mortal en recién nacido relacionando a Toxoplasmosis en humanos
1940	Pinkerton y Weinman	Primeros casos de toxoplasmosis fatal en adultos.
1942	Sabin	Descripción clínico patológica de la toxoplasmosis congénita en el hombre
1948	Sabin y Feldman	Desarrollo “dye test” Prueba serológico de diagnóstico (anticuerpos específicos en animales y hombre)
1948	Warren y Russ, Frenkel	Contribución con sus descubrimientos al campo del Diagnóstico
1952	Farrel	Identifica por primera vez un caso de toxoplasmosis en cerdos
1953	Sanger y colaboradores	Informan de casos de toxoplasmosis en vacas
1954	Weinman y Chandler	Sugieren transmisión por consumir carne poco cocida.
1957	Goldman	Contribución con sus descubrimientos al campo del Diagnóstico (Técnica directa de anticuerpos fluorescentes)
1957	Hartley y Marshall	Aspectos clínicos: Asocian abortos y mortalidad perinatal en ovejas con presencia del parásito
1959	Rawal	Demostró prevalencia en vegetarianos estrictos era similar a la de individuos no vegetarianos
1960	Jacobs y colaboradores	Corroboran transmisión por consumo de carne, al descubrir que los <i>T. gondii</i> liberados de los quistes por las enzimas proteolíticas eran resistentes a ellas.
1965	Desmots y colaboradores	Confirmación de la hipótesis de Jacobs y col. mediante un experimento.
1965	Hutchison	Primero en demostrar la transmisión a través de las heces de los gatos alimentados con ratones experimentalmente infectados
1966	Ambroise-Thomas	Contribución con sus descubrimientos al campo del Diagnóstico
1969, 1972	Wallace y Munday sucesivamente	Confirman el papel epidemiológico del gato en la transmisión de la toxoplasmosis
1970	Hutchison, Frenkel y col., Dubey y col., Sheffied y Melton, Overdule	Completaron el ciclo vital de <i>T. gondii</i> al descubrir las fases sexuales del parásito en la pared del intestino del gato
1970	Dubey y colaboradores	Descubrieron que los elementos infectantes presentes en las heces del gato eran ooquistes
1970, 1972	Frenkel y Miller sucesivamente	Relación de los hospedadores intermediarios y definitivos

Adaptado de Ortega, M., 2001.

ANEXO 2. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en animales de México.

Año	Estado	Animal	Nombre científico	Prevalencia (%)	Prueba	Referencia
2004	Estado de México	Pollo	<i>Gallus domesticus</i>	6.2	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2004
2004	México	Puma	<i>Felis concolor</i>	16.7	IHA	Kikuchi <i>et al.</i> , 2004
		Lince	<i>Lynx rufus</i>	66.6	ILAT	
2005	Ciudad de México	Zarigüeya	<i>Didelphis virginianus</i>	23.9	CF	Suzán <i>et al.</i> , 2005
		Gato de cola anillada	<i>Bassariscus astutus</i>			
		Zorrillo	<i>Spilogale gracilis</i>			
		Comadreja	<i>Mustela frenata</i>			
		Ardilla de las rocas	<i>Spermophilus variegatus</i>			
		Ardilla gris	<i>Sciurus aureogaster</i>			
		Gato feral	<i>Felis catus</i>			
Perro feral	<i>Canis familiaris</i>					
2006	Estado de México	Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	26.9 IgG	ELISA	Figuroa <i>et al.</i> , 2006
2007	Colima	Gato doméstico	<i>Felis silvestris catus</i>	28.8 IgG	ELISA	García <i>et al.</i> , 2007
2007	Durango	Gato domestico	<i>Felis silvestris catus</i>	21	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2007
2007	Durango	Perro	<i>Canis familiaris</i>	51.5	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2007
2008	Ciudad de México	Gato doméstico	<i>Felis silvestris catus</i>	21.8 IgG	ELISA	Besné <i>et al.</i> , 2008
2008	Colima	Oveja	<i>Ovis aries</i>	29.1 IgG	ELISA	Caballero <i>et al.</i> , 2008
2008	Puebla-Veracruz	Oveja	<i>Ovis aries</i>	77-84 IgG	ELISA	Caballero <i>et al.</i> , 2008
2009	Durango	Perro	<i>Canis familiaris</i>	45.3	MAT	Dubey <i>et al.</i> , 2009
		Gato	<i>Felis catus</i>	9.3		
		Zarigüeya	<i>Didelphis virginianus</i>	16.6		
		Rata	<i>Rattus spp.</i>	0.8		
		Ratón	<i>Mus musculus</i>	3.1		
2011	Durango	Aves silvestres	<i>Toxostoma curvirostre</i>	2.6	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
			<i>Anas platyrhynchos</i>			

			<i>Anas diazi</i>			
			<i>Aquila sp</i>			
			<i>Quiscalus mexicanus</i>			
			<i>Columba livia</i>			
			<i>Coturnix coturnix</i>			
2011	Durango	Cabra	<i>Capra hircus</i>	31	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
2011	Durango	Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	32.1	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
2011	Yucatán	Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	100 IgG	ELISA	Ortega <i>et al.</i> , 2011
2012	Ciudad de México	Delfín	<i>Tursiops truncatus gillii</i>	87.3	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
		León marino	<i>Zalophus californianus</i>			
	Quintana Roo	Delfín	<i>Tursiops truncatus truncatus</i>			
2012	Coahuila	Ciervo	<i>Odocoileus virginianus</i>	13.9 IgG	ELISA	Olamendi <i>et al.</i> , 2012
	Nuevo León					
	Tamaulipas					
2012	Durango	Pollo	<i>Gallus domesticus</i> (Traspatio)	25.5	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
			<i>Gallus domesticus</i> (Granjas)	4.9		
2012	Durango	Caballo	<i>Equus caballus</i>	6.1	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
2012	Durango	Oveja	<i>Ovis aries</i>	15.1	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
2012	Oaxaca	Cerdo	<i>Sus scrofa</i> Criado (Traspatio)	17.2	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
			<i>Sus scrofa</i> (Granjas)	0,5		
2012	Oaxaca	Perro callejero	<i>Canis familiaris</i>	61.7 IgG	ELISA	Cedillo <i>et al.</i> , 2012
2012	Tamaulipas	Ocelote	<i>Leopardus pardalis</i>	69	ILAT	Rendon <i>et al.</i> , 2012
2012	Yucatán	Gato doméstico	<i>Felis silvestris catus</i>	75,5 IgM 91,8 IgG	ELISA	Castillo <i>et al.</i> , 2012
2013	Michoacán	Cabra lechera	<i>Capra hircus</i>	15.2	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2013
2013	Oaxaca	Oveja	<i>Ovis aries</i>	23.1	MAT	Alvarado <i>et al.</i> , 2012

ILAT: Aglutinación en Látex. **MAT:** Aglutinación Modificada. **IHA:** Aglutinación Indirecta. **CF:** Fijación de Complemento. **ELISA:** Ensayo Inmunoenzimático. (Hernández *et al.*, 2015).

ANEXO 3. Principales causas de mortalidad en humanos sujetas a vigilancia epidemiológica nacional y por entidad federativa en México, 2012.

#	Causa	Muertes	*	%	Grupos por edad								Sexo			**
					Tasa	1	1-4	5-14	15-24	25-44	45-64	65 y +	NE	H	M	NE
	TOTAL	8,260	20.25	100	165	75	90	578	3,912	2,260	1,135	45	6,077	2,181	2	42.9
1	VIH-SIDA	4,974	12.19	60.2	26	14	18	348	3,089	1,284	168	27	4,050	922	2	38.8
2	Tuberculosis	2,015	4.94	24.4	1	5	17	103	464	696	712	17	1,451	564		54.9
3	Muerte materna	239	0.59	2.9				64	175				239			29.8
4	Influenza A(H1N1)	209	0.51	2.5	12		4	14	51	98	30		117	92		46.5
5	Meningitis bacteriana no específica	155	0.38	1.9	14	5	3	15	31	45	42		92	63		44.7
6	Dengue hemorrágico	148	0.36	1.8	7	6	14	16	37	39	29		77	71		40.8
7	Influenza	143	0.35	1.7	19	7	4	2	14	42	55		74	69		51
8	Picadura de abejas	74	0.18	0.9		1	4		6	21	41	1	61	13		62.6
9	Tosferina	63	0.15	0.8	57	4		2					27	36		0.8
10	Picadura de alacrán	49	0.12	0.6	11	23	5	2	2	3	3		27	22		11.7
11	Enfermedad de Chagas	31	0.08	0.4					3	12	16		17	14		64.7
12	Leptospirosis	24	0.06	0.3			4	2	6	5	7		12	12		44.8
13	Toxoplasmosis	23	0.06	0.3	1		2	1	14	3	2		16	7		36.4
14	Tétanos	16	0.04	0.2			1	1	1	5	8		13	3		58.9
15	Dengue Clásico	15	0.04	0.2		1	4	1	5	1	3		4	11		35.3
16	Fiebre maculosa	12	0.03	0.1		4	3	1	4				4	8		25.3

17	Rickettsiosis no específicas	12	0.03	0.1		1	3	3	4		1		6	6		24.8
18	Sífilis congénita	9	0.02	0.1	9								5	4		
19	Neumonía	8	0.02	0.1		1			1		6		5	3		70.6
20	Efectos diversos por vacunas	7	0.02	0.1	1	1		1	1	2	1		3	4		33.3
	Las demás	34	0.08	0.4	7	2	4	2	4	4	11		16	18		38.1

Fuente: Dirección General de Epidemiología / Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones 2012

*Tasa por 100,000 habitantes. **Edad promedio de la muerte

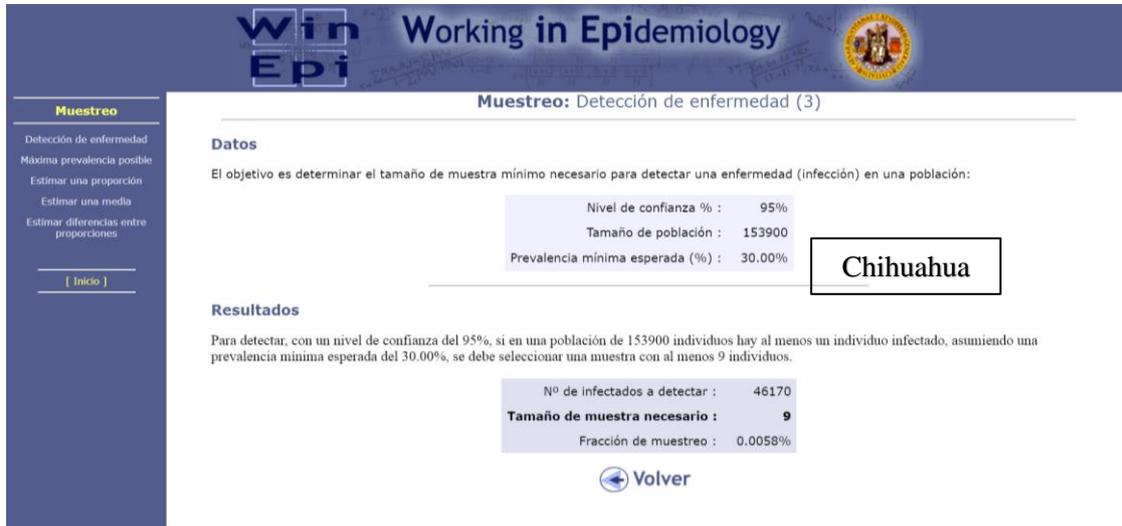
ANEXO 4. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en los humanos adultos de México: 1989-2012.

Año	Región	Estado	Prueba	Categoría	Prevalencia (%)	Pacientes probados	Referencia
1989	Sudeste	Yucatán	SF	Mujeres con abortos involuntarios	47	100	Zavala <i>et al.</i> , 1989
1991	Sudeste	Oaxaca	IHA	Población general	5.1	3229	Goldsmith <i>et al.</i> , 1991
1992	Sudeste	Tabasco	IFA	Población general	67.5	29279	Castrejón <i>et al.</i> , 1992
	Central	Estado de México			32.1		
	Norte	Baja California Sur			17.4		
1995	Central	México	ELISA	Mujeres embarazadas	34,9 IgG 20,7 IgM	350	Galván <i>et al.</i> , 1995
				Mujeres con Abortos Involuntarios	44,9 IgG 33,3 IgM		
1998	Sudeste	Chiapas	IFA	Población general	5	50	Romero <i>et al.</i> , 1998
				Mujeres embarazadas	18		
1999	Central	Jalisco	ELISA	Propietarios de la población en general los gatos	64 IgG	59	Galván <i>et al.</i> , 1999
2006	Norte	Durango	ELISA	Mujeres embarazadas	6.1 IgG	343	Alvarado <i>et al.</i> , 2006
2006	Norte	Durango	ELISA	Pacientes con enfermedades mentales	18.2 IgG 4.4 IgM	137	Alvarado <i>et al.</i> , 2006
				Donantes de sangre	8.9 IgG 2.2 IgM	180	
2007	Norte	Durango	ELISA	Donantes de sangre	7.4 Ig G 1.8 IgM	432	Alvarado <i>et al.</i> , 2007
2008	Norte	Durango	ELISA	Recicladores	21.1 IgG 2.2 IgM	90	Alvarado <i>et al.</i> , 2008
				Trabajadores de residuos	8.4 IgG	83	
2008	Norte	Durango	ELISA	Población rural	23.8 IgG 2.2 IgM	463	Alvarado <i>et al.</i> , 2008
2009	Norte	Durango	ELISA	Las mujeres embarazadas	8.2 IgG 2.3 IgM	439	Alvarado <i>et al.</i> , 2009
2010	Norte	Durango	ELISA	Población rural (menonitas)	30.3 IgG 3.3 IgM	152	Alvarado <i>et al.</i> , 2010
2010	Norte	Durango	ELISA	Fontaneros	6.6 IgG	61	Alvarado <i>et al.</i> , 2010
				Trabajadores de la construcción	8.4 IgG 1.4 IgM	203	
				Jardineros	6 IgG 2.4 IgM	168	
2011	Sudeste	Yucatán	ELISA	Población general sin contacto gatos	25 IgG 37 IgM	80	Jiménez <i>et al.</i> , 2011

2011	Norte	Durango	ELISA	Pacientes con enfermedades mentales	20 IgG	50	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
				Población general	5.3 IgG	150	
2011	Norte	Durango	ELISA	Población general	6.1 IgG 2.1 IgM	974	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
2011	Norte	Durango	ELISA	Carniceros	7 IgG 4 IgM	124	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
				Población general	9 IgG 2 IgM	248	
2011	Norte	Durango	ELISA	Pacientes con enfermedad hepática	13.3 IgG 2.7 IgM	75	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
				Población general	10.7 IgG 3.3 IgM	150	
2011	Norte	Durango	ELISA	Trabajadores de frutas y verduras	7.5 IgG 1 IgM	200	Alvarado <i>et al.</i> , 2011
				Población general	7.8 IgG 2.8 IgM	400	
2012	Norte	Durango	ELISA	Población rural	22.4 IgG 9.6 IgM	156	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
2012	Norte	Durango	ELISA	Pacientes con accidentes de trabajo	8.3 IgG 0.8 IgM	133	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
				población general	5.3 IgG 2.3 IgM	266	
2012	Norte	Durango	ELISA	Personas mayores	12 IgG 2.9 IgM	483	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
2012	Sudeste	Yucatán	ELISA	Mujeres con abortos involuntarios	55 IgG 20 IgM	100	Vado <i>et al.</i> , 2012
			PCR		19 PCR		

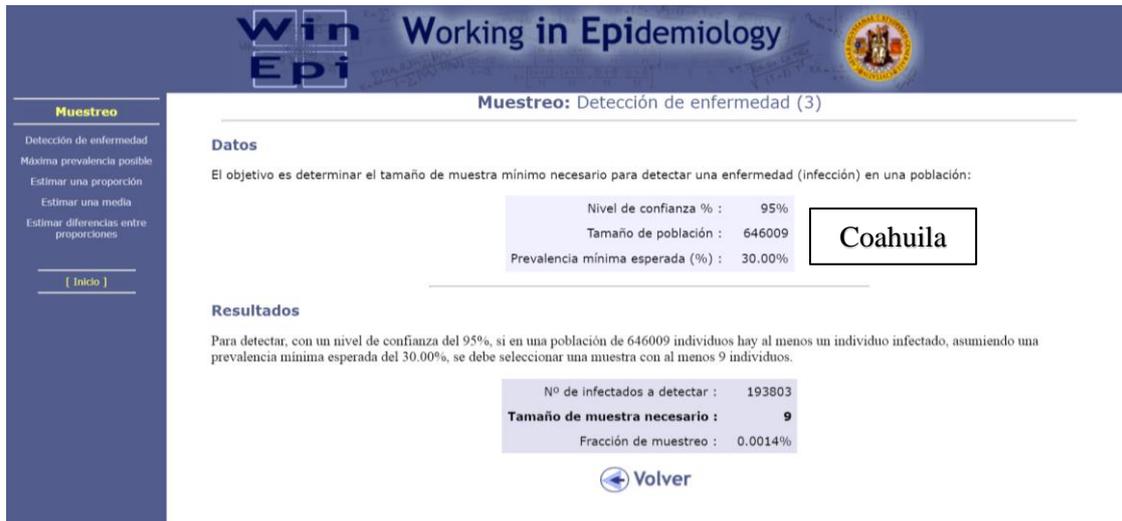
ELISA: ensayo inmunoenzimático. **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa. **SF:** Sabin Feldman Técnica. **IFA:** indirecta de anticuerpos fluorescentes Técnica. **IHA:** prueba de hemaglutinación indirecta. (Hernández *et al.*, 2015)

ANEXO 5. Determinación del tamaño de muestra (carne de cabrito) en los estados de Chihuahua y Coahuila, WinEpi.



The screenshot shows the WinEpi interface for Chihuahua. The header includes the WinEpi logo and the text 'Working in Epidemiology'. The main title is 'Muestreo: Detección de enfermedad (3)'. The 'Datos' section states the objective and lists the following parameters: Nivel de confianza % : 95%, Tamaño de población : 153900, and Prevalencia mínima esperada (%) : 30.00%. The 'Resultados' section explains that for a 95% confidence level, at least 9 individuals must be selected from a population of 153900, assuming a 30.00% prevalence. A table shows: N° de infectados a detectar : 46170, Tamaño de muestra necesario : 9, and Fracción de muestreo : 0.0058%. A 'Volver' button is at the bottom.

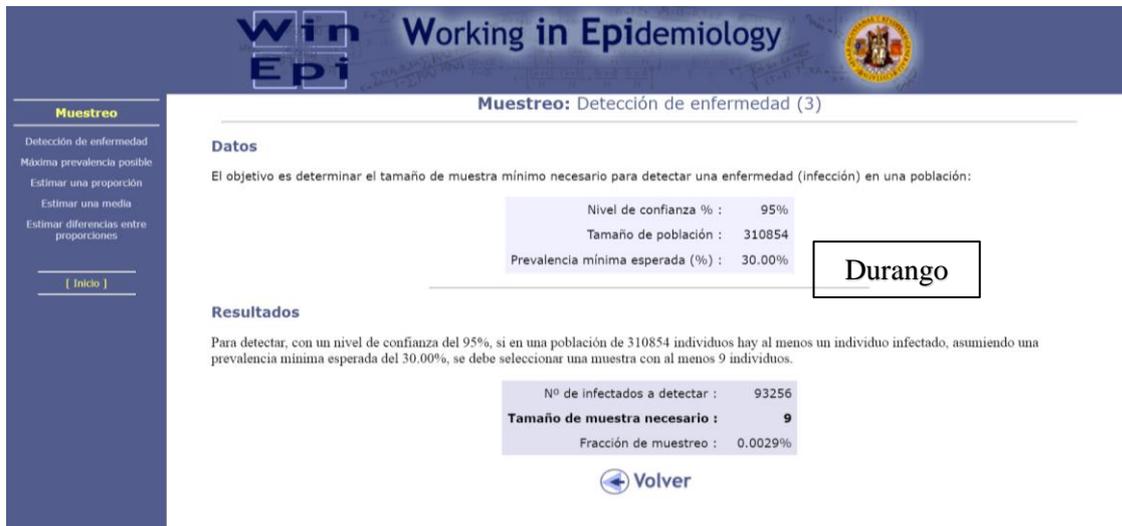
Parameter	Value
Nivel de confianza %	95%
Tamaño de población	153900
Prevalencia mínima esperada (%)	30.00%
N° de infectados a detectar	46170
Tamaño de muestra necesario	9
Fracción de muestreo	0.0058%



The screenshot shows the WinEpi interface for Coahuila. The header includes the WinEpi logo and the text 'Working in Epidemiology'. The main title is 'Muestreo: Detección de enfermedad (3)'. The 'Datos' section states the objective and lists the following parameters: Nivel de confianza % : 95%, Tamaño de población : 646009, and Prevalencia mínima esperada (%) : 30.00%. The 'Resultados' section explains that for a 95% confidence level, at least 9 individuals must be selected from a population of 646009, assuming a 30.00% prevalence. A table shows: N° de infectados a detectar : 193803, Tamaño de muestra necesario : 9, and Fracción de muestreo : 0.0014%. A 'Volver' button is at the bottom.

Parameter	Value
Nivel de confianza %	95%
Tamaño de población	646009
Prevalencia mínima esperada (%)	30.00%
N° de infectados a detectar	193803
Tamaño de muestra necesario	9
Fracción de muestreo	0.0014%

ANEXO 6. Determinación del tamaño de muestra (carne de cabrito) en los estados de Durango y Nuevo León, WinEpi.



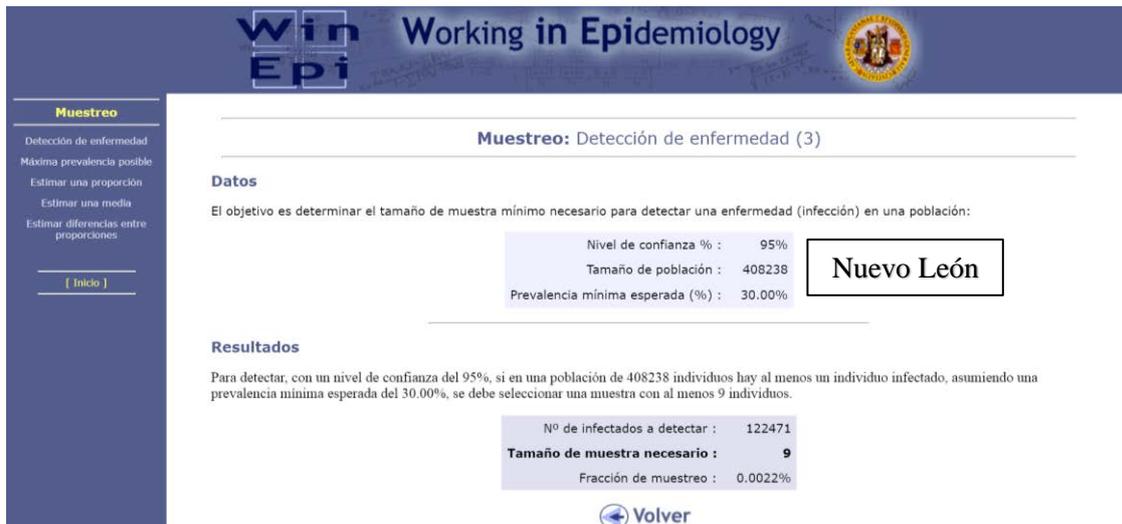
The screenshot shows the WinEpi interface for Durango. The header includes the WinEpi logo and the text 'Working in Epidemiology'. The main title is 'Muestreo: Detección de enfermedad (3)'. The 'Datos' section contains the following information:

Nivel de confianza % :	95%
Tamaño de población :	310854
Prevalencia mínima esperada (%) :	30.00%

The state name 'Durango' is displayed in a box. The 'Resultados' section states: 'Para detectar, con un nivel de confianza del 95%, si en una población de 310854 individuos hay al menos un individuo infectado, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 30.00%, se debe seleccionar una muestra con al menos 9 individuos.'

Nº de infectados a detectar :	93256
Tamaño de muestra necesario :	9
Fracción de muestreo :	0.0029%

A 'Volver' button is located at the bottom.



The screenshot shows the WinEpi interface for Nuevo León. The header includes the WinEpi logo and the text 'Working in Epidemiology'. The main title is 'Muestreo: Detección de enfermedad (3)'. The 'Datos' section contains the following information:

Nivel de confianza % :	95%
Tamaño de población :	408238
Prevalencia mínima esperada (%) :	30.00%

The state name 'Nuevo León' is displayed in a box. The 'Resultados' section states: 'Para detectar, con un nivel de confianza del 95%, si en una población de 408238 individuos hay al menos un individuo infectado, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 30.00%, se debe seleccionar una muestra con al menos 9 individuos.'

Nº de infectados a detectar :	122471
Tamaño de muestra necesario :	9
Fracción de muestreo :	0.0022%

A 'Volver' button is located at the bottom.

ANEXO 7. Determinación del tamaño de muestra (leche de cabra) en los estados de Chihuahua y Coahuila, WinEpi

Win
Epi Working in Epidemiology

Muestreo
 Detección de enfermedad
 Máxima prevalencia posible
 Estimar una proporción
 Estimar una media
 Estimar diferencias entre proporciones
[\[Inicio \]](#)

Muestreo: Detección de enfermedad (3)

Datos

El objetivo es determinar el tamaño de muestra mínimo necesario para detectar una enfermedad (infección) en una población:

Nivel de confianza % :	95%	Chihuahua
Tamaño de población :	153900	
Prevalencia mínima esperada (%) :	10.00%	

Resultados

Para detectar, con un nivel de confianza del 95%, si en una población de 153900 individuos hay al menos un individuo infectado, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 10.00%, se debe seleccionar una muestra con al menos 29 individuos.

Nº de infectados a detectar :	15390
Tamaño de muestra necesario :	29
Fracción de muestreo :	0.02%

[Volver](#)

Win
Epi Working in Epidemiology

Muestreo
 Detección de enfermedad
 Máxima prevalencia posible
 Estimar una proporción
 Estimar una media
 Estimar diferencias entre proporciones
[\[Inicio \]](#)

Muestreo: Detección de enfermedad (3)

Datos

El objetivo es determinar el tamaño de muestra mínimo necesario para detectar una enfermedad (infección) en una población:

Nivel de confianza % :	95%	Coahuila
Tamaño de población :	646009	
Prevalencia mínima esperada (%) :	10.00%	

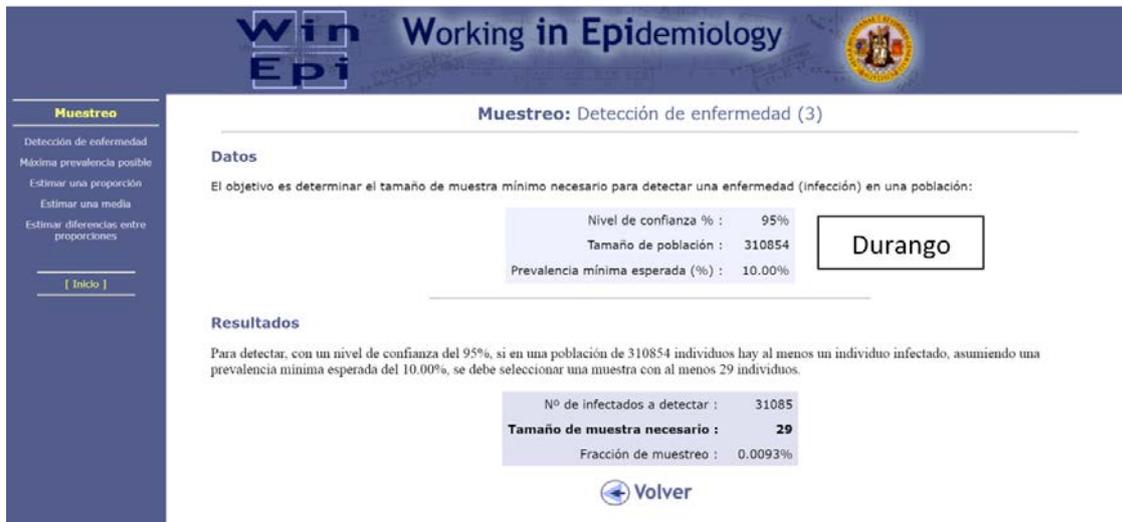
Resultados

Para detectar, con un nivel de confianza del 95%, si en una población de 646009 individuos hay al menos un individuo infectado, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 10.00%, se debe seleccionar una muestra con al menos 29 individuos.

Nº de infectados a detectar :	64601
Tamaño de muestra necesario :	29
Fracción de muestreo :	0.0045%

[Volver](#)

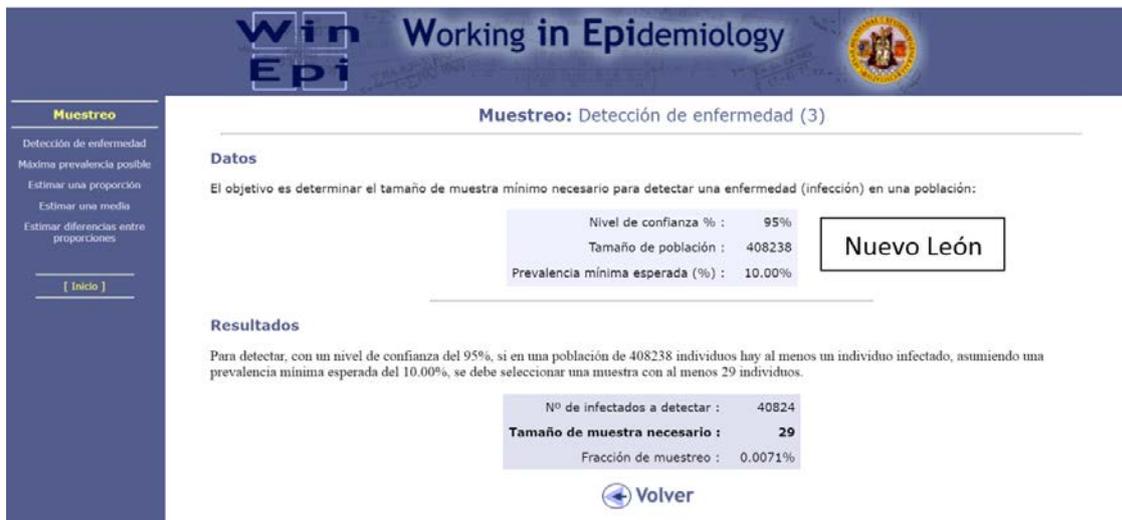
ANEXO 8. Determinación del tamaño de muestra (leche de cabra) en los estados de Durango y Nuevo León, WinEpi.



The screenshot shows the WinEpi software interface for Durango. The header includes the WinEpi logo and the text 'Working in Epidemiology'. The main title is 'Muestreo: Detección de enfermedad (3)'. Under 'Datos', it states the objective and lists parameters: 95% confidence level, population of 310854, and 10.00% expected prevalence. A box labeled 'Durango' is present. Under 'Resultados', it explains that at least 29 individuals must be sampled. A table shows 31085 infected individuals to detect, a required sample size of 29, and a sampling fraction of 0.0093%. A 'Volver' button is at the bottom.

Parameter	Value
Nivel de confianza %	95%
Tamaño de población	310854
Prevalencia mínima esperada (%)	10.00%

Parameter	Value
Nº de infectados a detectar	31085
Tamaño de muestra necesario	29
Fracción de muestreo	0.0093%



The screenshot shows the WinEpi software interface for Nuevo León. The header includes the WinEpi logo and the text 'Working in Epidemiology'. The main title is 'Muestreo: Detección de enfermedad (3)'. Under 'Datos', it states the objective and lists parameters: 95% confidence level, population of 408238, and 10.00% expected prevalence. A box labeled 'Nuevo León' is present. Under 'Resultados', it explains that at least 29 individuals must be sampled. A table shows 40824 infected individuals to detect, a required sample size of 29, and a sampling fraction of 0.0071%. A 'Volver' button is at the bottom.

Parameter	Value
Nivel de confianza %	95%
Tamaño de población	408238
Prevalencia mínima esperada (%)	10.00%

Parameter	Value
Nº de infectados a detectar	40824
Tamaño de muestra necesario	29
Fracción de muestreo	0.0071%