

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRIA EN BIOMEDICINA

Trabajo de Fin de Maestría Titulado:

**“DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS”**

Realizado por:

YANIRA ALEJANDRA MONTALVO LALALEO

Director del Proyecto:

Juan Carlos Navarro, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MASTER EN BIOMEDICINA

Quito, 2021

**DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, YANIRA ALEJANDRA MONTALVO LALALEO, con cédula de identidad # 1721640751, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1721640751

**DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS”**

Realizado por:

YANIRA ALEJANDRA MONTALVO LALALEO

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAESTRIA EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO, Ph.D.

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Navarro', with a horizontal line underneath.

FIRMA

**DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii*
MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

José Rubén Ramírez Iglesias, Ph.D.

Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 17 de agosto de 2021

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

DEDICATORIA

Esta investigación se la quiero dedicar en primer lugar a Dios, por brindarme la vida y las fuerzas para salir adelante cada día, también se la quiero dedicar a las personas que siempre han estado a mi lado, principalmente a mis padres quienes cada día me han dado su apoyo incondicional junto con sus consejos y sabiduría.

En segundo lugar, a mi hermano y hermana que siempre han estado junto a mí para motivarme. Así como a mi pareja que ha sabido estar junto a mí en cada momento, sin permitir que me dé por vencida y no me ha dejado desfallecer en ningún momento. De manera general esta investigación está dedicada a toda mi familia que siempre ha estado en las buenas y malas, mis abuelitos, mis tíos, mis primos, y mi querida ahijada quienes han sabido ser mi inspiración.

Finalmente, y sin quitar importancia a mis maestros quienes cada uno con su forma de ser se encargaron de encaminarme y enseñarme todo lo necesario para crecer personal y profesionalmente.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer principalmente a mis padres, quienes día a día se esfuerzan para apoyarme en mi crecimiento tanto personal como profesional, ellos son y serán siempre mis modelos a seguir y quienes siempre me impulsarán a cumplir mis metas. También quiero agradecer a mi pareja quien es mi inspiración, a mis hermanos quienes siempre están a mi lado, ellos son quienes me motivan a seguir adelante.

Por otro lado, agradecer a mi tutor Juan Carlos Navarro por brindare su apoyo, guiarme con sus conocimientos y enseñarme no solo a lo largo de la maestría sino en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Finalmente, agradecer a la Universidad Internacional SEK y a todos mis docentes que me apoyaron a crecer profesionalmente.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

To be submitted:

Para ser sometido a:

Diagnóstico y Ecoepidemiología Molecular de *Toxoplasma gondii* mediante el gen SAG3 y Análisis Filogenéticos

Yanira Montalvo Lalaleo^{1,3}, Juan Carlos Navarro^{2,4}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, yamontalvo.mbme@uisek.edu.ec

²Universidad Internacional SEK, Grupo de Investigación de Enfermedades Emergentes,
Desatendidas, Ecoepidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud,
juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

³Centro de Investigación Clínica “Unidad de Terapia Intensiva- HPAS” Latitud GPCI,
Miembro asociada, ymontalvo0707@gmail.com

⁴Universidad Internacional SEK, Director de Investigación e Innovación

***Autor de correspondencia:** Yanira Montalvo Lalaleo, yamontalvo.mbme@uisek.edu.ec/
ymontalvo0707@gmail.com

Titulo corto

Running title: Análisis filogenético molecular de *Toxoplasma gondii*.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Resumen:

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica reemergente su agente etiológico es *Toxoplasma gondii*, un parásito protozoo intracelular, en donde su reservorio definitivo es *Felis catus* y hospederos intermediarios como roedores, aves, animales salvajes, animales de granja o domésticos. Se generó una matriz de diagnóstico y ecoepidemiología molecular con el objetivo de realizar un análisis filogenético de secuencias específicas de *Toxoplasma gondii* que pueda ser utilizado para la identificación molecular rápida de cualquier aislado de *T. gondii* en el país y en la región. Se analizó el marcador molecular óptimo para el diagnóstico de *T. gondii*. Se encontró que el marcador SAG3 era el adecuado para el análisis filogenético con 170 secuencias. Se utilizó el software MEGAX para el análisis filogenético realizando primero un alineamiento múltiple con el algoritmo de CLUSTALW y una depuración manual hasta tener un tamaño de 566pb. Posteriormente se empleó el método de Maximum Parsimony con el algoritmo Tree-Bisection-Regrafting (TBR) para generar el árbol filogenético.

Se observó que SAG3 muestra una alta variabilidad genética al ser altamente polimórfico encontrando una relación directa entre el linaje circulante y la virulencia, expansión geográfica y éxito evolutivo, esto permite su uso tanto para diagnóstico, así como en epidemiología molecular y vigilancia genómica. Además, el linaje I predomina en el continente Americano con pequeñas introducciones en Europa y Asia, mientras que el linaje II predomina en el continente Europeo y afecta directamente a la producción ganadera y el linaje III se encuentra circulando alrededor del mundo tanto en hospederos definitivos como intermediarios.

Palabras clave:

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Toxoplasma gondii, Filogenética, linajes evolutivos, diagnóstico, epidemiología molecular, virulencia, expansión geográfica.

Abstract

Toxoplasmosis is a reemerging zoonotic disease whose etiological agent is *Toxoplasma gondii*, an intracellular protozoan parasite, where its definitive reservoir is *Felis catus* and intermediate hosts such as rodents, birds, wild animals, farm or domestic animals. A diagnostic and molecular ecoepidemiology matrix was generated with the aim of performing a phylogenetic analysis of specific sequences of *Toxoplasma gondii* that can be used for the rapid molecular identification of any *T. gondii* isolate in the country and in the region. The optimal molecular marker for the diagnosis of *T. gondii* was analyzed. The SAG3 marker was found to be suitable for phylogenetic analysis with 170 sequences. MEGAX software was used for phylogenetic analysis by first performing multiple alignment with the CLUSTALW algorithm and manual purification to a size of 566bp. Subsequently, the Maximum Parsimony method with the Tree-Bisection-Regrafting (TBR) algorithm was used to generate the phylogenetic tree.

It was observed that SAG3 shows a high genetic variability as it is highly polymorphic, finding a direct relationship between the circulating lineage and virulence, geographic expansion and evolutionary success, which allows its use for diagnosis, as well as in molecular epidemiology and genomic surveillance. In addition, lineage I predominates in the Americas with small introductions in Europe and Asia, while lineage II predominates in Europe and directly affects livestock production and lineage III is found circulating around the world in both definitive and intermediate hosts.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Key words

Toxoplasma gondii, Phylogenetics, evolutionary lineages, diagnosis, molecular epidemiology, virulence, geographic spread.

Introducción

Las enfermedades zoonóticas son aquellas que se pueden transmitir entre los animales silvestres y/o domésticos al ser humano, estas representan 70% de las enfermedades infecciosas. Así mismo, se pueden denominar enfermedades emergentes o reemergentes aquellas producidas por patógenos desconocidos y que por razones multifactoriales son transmitidas al humano en determinado momento produciendo casos aislados o brotes inesperados. Por otra parte, patógenos que circulan en ciclos silvestres o enzoóticos de forma silente para la salud pública, pueden aparecer periódicamente en humanos denominándose enfermedades o patógenos reemergentes (Dabanch P., 2003; Eiros Bouza & Oteo Revuelta, 2011; Vargas & Galindo, 2013).

La toxoplasmosis a su vez es una enfermedad zoonótica reemergente, que se presenta en muchos de los casos de manera asintomática, de modo que no genera problemas en la salud y a su vez produce títulos altos de anticuerpos IgG. Por otro lado, cuando se presenta en personas embarazadas puede producir daños en el feto llegando a producir hasta abortos y en personas con inmunodeficiencia puede llegar a provocar hasta la muerte (Grandía et al., 2013; Pereira & Perez, 2002).

Según un boletín publicado por la Organización Mundial de la Salud, la incidencia anual de toxoplasmosis congénita es aproximadamente de 190100 casos (Torgerson & Mastroiacovo, 2013); en el Ecuador el mayor porcentaje de mujeres seropositivas se registra

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

en la Costa con un porcentaje del 74%, mientras que le siguen ciudades como Quito que va desde 42% hasta 50%, y Riobamba y Cuenca que poseen un 30% (Fernández et al., 2011); la variación en estos porcentajes se puede deber en su gran mayoría a las diferencias climáticas que posee cada región, ya que este parásito es más frecuente en lugares cálidos y húmedos, que en lugares fríos, otros aspectos a tomar en cuenta son el nivel socioeconómicos y los hábitos poblacionales como: malas prácticas sanitarias y malos hábitos de alimentación (Galván & Mondragón, 2017; Pappas et al., 2009; Saadatnia & Golkar, 2012).

Los datos de seroprevalencia en los gatos en el mundo varían de acuerdo a la localidad mostrando que en países occidentales como Europa, América, Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica se presenta entre el 24.9% al 69.9%, en países del Medio Oriente como Irán, Irak, Israel presentan un 35%, Asia tiene una seroprevalencia entre el 8.7% al 17.9% (Bojorque, 2016; Hong et al., 2013).

En estudios realizados en la isla Isabela de Galápagos, ésta presentó una seroprevalencia del 63% en el 2008 (Toscano, 2015), mientras que en Quito en el 2012 presento un 36% en lugares como Solanda, Espín y Espinoza (Espinosa & Espín, 2012). En el 2015 en la ciudad de Cuenca se logró estimar que existe una seroprevalencia en gatos del 16%, esto se presentó en parroquias como: El Vecino, El Batán y Gil Ramírez Dávalos (Bojorque, 2016).

El agente etiológico de la toxoplasmosis es *Toxoplasma gondii*, un parásito protozoo intracelular, cuyo reservorio definitivo es *Felis catus* y hospederos intermediarios son roedores, aves, animales salvajes, animales de granja o domésticos (Mimica et al., 2015). En cuanto a la clasificación taxonómica de *Toxoplasma gondii* sigue el criterio de Levine en

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

1973 dando como resultado que pertenece al Reino *Protozoa*, phylum *Apicomplexa*, Clase *Sporozoa*, Sub-clase *Coccidia*, Orden *Eucoccidia*, Familia *Sarcocystidae*, Subfamilia *Toxoplasmatinae*, Género *Toxoplasma* y Especie *Toxoplasma gondii* (Gómez & Felices, 2002; Grandía et al., 2013; Petersen & Dubey, 2001).

Su ciclo de vida tendrá tres fases en función a su hospedero; en el caso de los felinos se puede llegar a generar tanto una fase sexual al ser el reservorio, como una fase asexual; mientras que en los hospedadores intermediarios únicamente se estará generando una fase asexual, finalmente es importante saber que en el ambiente se genera la fase esporogónica (Dubey, 2010; Grandía et al., 2013; Mimica et al., 2015; Rivera-Fernández & Garcia, 2017).

Fase asexual: es una fase extraintestinal; esta empieza cuando el hospedero ingiere ooquistes, ya que en su interior se encuentran esporozoítos que con una división rápida se transformaran en taquizoítos, mismos que son capaces de infectar a cualquier célula nucleada, los taquizoítos se multiplican en la célula hasta que rompen la membrana plasmática, en ese momento son liberados al torrente sanguíneo produciendo la fase aguda de la enfermedad. Posteriormente se transforman a bradizoítos, que son quistes con una división lenta, que pueden llegar a generar una infección crónica; por lo general estos quistes se encuentran en los nervios, cerebro, huesos y músculos (Mimica et al., 2015; Rivera-Fernández & Garcia, 2017).

Fase sexual: es una fase enteroepitelial que ocurre en el intestino del felino; empieza al momento que este ingiere ooquistes a partir de las heces felinas o al ingerir quistes presentes en los tejidos de las presas, en donde se generará una multiplicación asexual. Posteriormente en los enterocitos intestinales empieza la multiplicación sexual con la diferenciación de los

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

bradizoítos en macrogametocitos femeninos y microgametocitos masculinos, los cuales se fusionarán para formar cigotos que después se transformarán a ooquistes. Finalmente, estos ooquistes son liberados mediante las heces al ambiente (Dubey, 2006, 2010; Grandía et al., 2013; Rivera-Fernández & Garcia, 2017).

Fase esporogónica: esta fase se produce al momento que los ooquistes no esporulados son eliminados al ambiente; si las condiciones son favorables estos se transforman a ooquistes esporulados, que forman en su interior esporozoítos, mismos que llegaran a ser infecciosos (Dubey, 2010; Grandía et al., 2013).

Se presentan diferentes estructuras infecciosas de acuerdo a la etapa del ciclo de vida en el que se encuentren, y estas son:

Ooquiste: es de forma oval; y al momento que es excretado por los felinos no es infectante, ya que en ese momento no tiene desarrollado los esporozoítos, por lo que debe pasar un periodo aproximado de 5 días en condiciones óptimas en el ambiente para empezar a formar esporozoítos y pasar a ser una forma infecciosa (Rivera-Fernández & Garcia, 2017). Su sobrevivencia depende de las diferentes condiciones ambientales, por ejemplo, en ambientes húmedos y ventilados puede sobrevivir por un periodo de 9 hasta 12 meses, en el caso de encontrarse en agua a temperatura ambiente hasta 18 meses, y en tierra húmeda aproximadamente 6 meses, es importante saber que se los puede destruir al exponerlos a temperaturas de 56°C o -20°C, así como, con amoníaco al 1% (Mimica et al., 2015).

Esporozoítos: estos están en la parte interna del ooquiste que es excretado por los felinos a través de las heces después de la fase sexual (Bachand et al., 2019).

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Taquizoítos: es la forma infectante asexual con forma de arco o media luna, se transforma a partir de los esporozoítos y son los que tienen la capacidad de estar en el torrente sanguíneo e infectar a todo tipo de célula con núcleo, además son susceptibles a los jugos gástricos (Bachand et al., 2019; Mimica et al., 2015; Rivera-Fernández & Garcia, 2017).

Bradizoítos: son una forma parasitaria intracelular que presenta una multiplicación lenta y son responsables de que la célula hospedadora se convierta en quiste tisular, además son resistentes a los jugos gástricos (Mimica et al., 2015; Rivera-Fernández & Garcia, 2017).

Quiste tisular: puede sobrevivir por 68 días a 4°C y se los puede eliminar al elevar la temperatura a 56°C, o mediante procesos de desecación, salado o ahumado (Mimica et al., 2015).

Existen diferentes vías de transmisión. En primer lugar, se puede transmitir debido al consumo de ooquistes, taquizoítos o quistes tisulares infectantes que se dan al momento de realizar diferentes actividades como: la ingesta de frutas y vegetales contaminados, estar en contacto frecuente con los areneros de los gatos o tierra contaminada, y por el consumo de carnes o leche cruda (Pinto-Ferreira et al., 2019). Por otro lado, se tiene la transmisión congénita, misma que se dará entre madre e hijo con una transmisión vertical por vía transplacentaria durante la primo infección (Mimica et al., 2015; Rivera-Fernández & Garcia, 2017) Finalmente, está la transmisión por transfusión sanguínea o trasplante de órganos a partir de personas asintomáticas que tengan formas latentes (taquizoítos), esto estará afectando directamente a las personas con inmunodeficiencias (Pereira & Perez, 2002).

Para el diagnóstico se cuenta con métodos serológicos como una alternativa rápida que permite la identificación de títulos de anticuerpos, en base a esto algunos ejemplos de pruebas

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

son: la prueba de aglutinación del látex, fijación de complemento, hemaglutinación y ELISA. Otro método de diagnóstico es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mismo que al ser un método molecular aumenta la sensibilidad y especificidad para la confirmación precoz, cuando muchas veces un examen serológico no presenta resultados concluyentes; también *T. gondii* puede aislarse a partir de tejidos fetales (Gómez & Felices, 2002; Mimica et al., 2015).

Desde el punto de vista molecular, el genoma de *T. gondii* es haploide con un tamaño de 69.53Mb y con el 52% de GC, tiene un total de 14 cromosomas con 7860 genes que codifican proteínas y 216 ADN no codificante. Presenta un contenido repetido total del 15.98% compuesto por transposones, LINE (elementos dispersos largos), SINE (elementos dispersos cortos), LTR (secuencias terminales largas). La longitud promedio de exones es de 419 pb e intrones de 548 pb (Lau et al., 2016).

En los estudios moleculares hay una estructura poblacional clonal de 3 linajes: I, II, III donde su diferenciación es inferior al 2% (Grigg et al., 2001), esta pequeña diferencia puede deberse a que el parásito es capaz de transmitirse entre los hospedadores intermedios a través del carnivorismo y la recolección, evitando los eventos de recombinación sexual en los gatos hospedadores definitivos (Howe & Sibley, 1995; Su et al., 2003); otra alternativa es que muchos macrogametos del parásito permanecen sin fertilizar, pero son capaces de formar oocitos en el intestino delgado de los gatos por partenogénesis (Ferguson, 2002), finalmente en el caso de una diferenciación, esta será baja ya que los gatos infectados simultáneamente con diferentes cepas de *T. gondii* son eventos muy raros en la naturaleza, por lo tanto, existe una barrera temporal para que ocurra la recombinación (Grigg et al., 2001; Howe & Sibley, 1995). Dicha estructura

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

clonal se puede apreciar en América del Norte, Europa y África; mientras que en América del Sur y Asia se presenta una estructura poblacional epidémica con cepas mucho más complejas que poseen genotipos atípicos debido a la diversidad y la recombinación de genes (Afsaneh et al., 2019; Ajzenberg et al., 2002).

La toxoplasmosis en algunos casos puede generar una enfermedad grave e incluso la muerte, principalmente en personas con inmunodeficiencias, esto conlleva a la necesidad de identificar el genotipo de las diferentes cepas de *T. gondii*, debido a que este se encuentra relacionado estrechamente con la gravedad de la enfermedad. Una matriz de diagnóstico molecular óptima permitirá hacer una identificación eficaz, reconocer a que cepa/linaje corresponde, hacer un seguimiento epidemiológico molecular y vigilancia genómica permitiendo así tener un tratamiento oportuno con base en su virulencia (Jianchun & Yolken, 2016; Khan et al., 2005; Pena et al., 2008).

De acuerdo a lo antes señalado la investigación se enfoca en responder la siguiente pregunta: ¿Cómo es la variabilidad genética existente entre cepas circulantes a nivel mundial de *Toxoplasma gondii* para un correcto diagnóstico molecular con base en el tipo de cepa y su virulencia? Con base en lo planteado, nuestra hipótesis operativa se centra en que el análisis filogenético de *Toxoplasma gondii* debe generar una matriz de diagnóstico con base en la variabilidad genética y diversidad genética de esta especie; en donde, se espera encontrar la relación directa entre el tipo de cepa circulante, la virulencia y determinados patrones geoepidemiológicos de introducción.

La investigación propone generar una matriz de diagnóstico molecular con la finalidad de realizar un análisis filogenético de secuencias de *T. gondii* que pueda ser utilizado para la identificación molecular rápida de cualquier aislado de *T. gondii* en el país y en la región, así

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

como poder realizar inferencias ecoepidemiológicas moleculares. Para esto se seleccionó el marcador molecular óptimo para el diagnóstico y variabilidad de *T. gondii*, estructuración de la matriz o plataforma de alineamiento, y finalmente los análisis filogenéticos.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Materiales y Métodos

- Selección del marcador molecular para *Toxoplasma gondii*

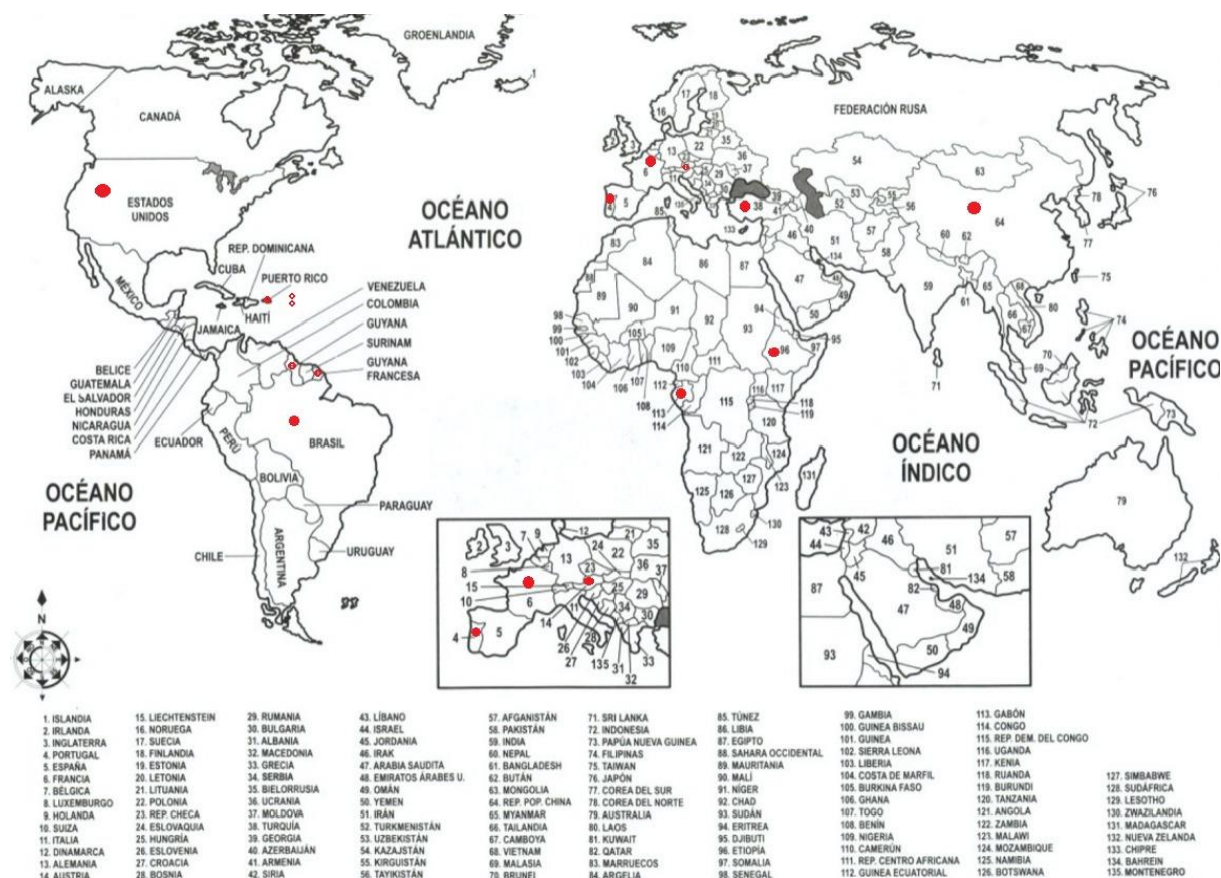
Toxoplasma gondii tiene varias estructuras infecciosas con antígenos de superficie (SAG); los antígenos de superficie estarán presentes en momentos específicos del ciclo de vida convirtiéndose en una opción como marcadores moleculares. En el caso de SAG1, SAG2 y SRS3 se encuentran solo en la superficie del taquizoíto; mientras que SAG3 anteriormente conocido como P43 presenta una ventaja sobre los demás SAGs al momento de analizar dicho marcador debido a que se encuentra en la superficie tanto del taquizoíto como del bradizoíto (Kazemi et al., 2007). Asimismo, SAG3 al tener una tasa alta de polimorfismos permite evaluar la diversidad genética que presenta *T. gondii* proporcionando la capacidad de clasificar los diferentes genotipos circulantes relacionando el genotipo-fenotipo con base en su virulencia diferencial tanto en humanos como en animales (Arshadi et al., 2019; Kazemi et al., 2007; Sudan et al., 2012).

- Recolección o muestreo de secuencias de *Toxoplasma gondii* en Genbank

Se realizó la recolección de secuencias de *T. gondii* utilizando NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=>) pertenecientes a amplificaciones de secuencias de SAG3. El criterio principal de inclusión fue secuencias de DNA lineal del marcador SAG3 con una amplia representación geográfica de diferentes regiones del mundo (figura 1) con hospedadores definitivos o intermediarios de tamaño similar. El tamaño del marcador SAG3 está entre 638pb-1158pb. Secuencias altamente divergentes que arrojaron problemas de alineamiento posicional fue el criterio fundamental de exclusión.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Figura 1. Ubicación geográfica de las secuencias de SAG3 de *Toxoplasma gondii* utilizadas.



- Análisis y alineamiento de secuencias

Para el análisis de las secuencias (Anexo A) se generaron diversos grupos en base a su tamaño; en el primer caso se agrupó secuencias entre 638pb a 1158pb mientras que en el segundo grupo se usaron las secuencias de 638pb.

Cada grupo de secuencias fueron analizadas para la búsqueda de una máxima homología posicional mediante un alineamiento múltiple con el algoritmo de CLUSTALW con un gap opening penalty de 15.00 y un gap extensión penalty de 10.00 con el software MEGA-X. En el marcador SAG3 se hizo un alineamiento inicial de 1277pb y con una depuración posterior se redujo a 574pb; mientras que en el segundo caso se tuvo un alineamiento inicial de 638pb y después de la depuración se obtuvo un alineamiento de 566pb.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

- *Análisis filogenético*

Se seleccionó *Sarcocystis* sp. perteneciente a la familia *Sarcocystidae* como grupo de referencia o externo (outgroup), por ser parásitos coccidianos y grupo evolutivamente cercano para enraizar nuestro alineamiento y optimizar la serie de transformación de caracteres del análisis filogenético (Nixon & Carpenter, 1993).

Se utilizaron secuencias de *Toxoplasma gondii* con una amplia representación geográfica de diferentes regiones del mundo, mismas que nos permiten apreciar una gran diversidad de hospedadores dadas por familias como: *Canidae*, *Felidae*, *Phasianidae*, *Mustelidae*, *Bovidae*, *Suidae*, *Cervidae*, *Caviidae*, *Anatidae*, *Cercopithecidae*, *Homínidos* debido a la gran capacidad de adaptación evolutiva (Pereira & Perez, 2002).

Se tiene que tomar en cuenta que se utilizó el marcador molecular SAG3 debido a su alta tasa de polimorfismos, el mismo que permitió evaluar la diversidad genética que presenta *T. gondii* en base a los diferentes genotipos circulantes (Arshadi et al., 2019; Kazemi et al., 2007; Sudan et al., 2012)

Se utilizó el programa MEGAX para la construcción de los árboles filogenéticos para el marcador SAG3 con un bootstrap de 500 para los métodos de distancia como Neighbor-Joining, filogenético como Maximum Parsimony e inductivo de probabilidad a priori por Maximum Likelihood.

Se aplicó Neighbor-Joining con el método de p-distance (probabilidad no corregida) mientras que en Maximum Parsimony se empleó el algoritmo de Wagner con barrido de ramas mediante Tree-Bisection and Reconnection (TBR), mediante la adición aleatoria de secuencias (100 repeticiones) (Nei & Kumar, 2000); previo al análisis con Maximum Likelihood se realizó el análisis para determinar el mejor modelo de sustitución (Model Test en MEGAX), que arrojó el modelo de ajuste de Tamura-3-parameter.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

El apoyo de grupos o clados se calculó mediante un análisis estadístico de bootstrapping con 10 adiciones al azar y 500 pseudoréplicas. Se muestran los valores sobre los clados o ramas por encima de 50%.

Se usó el programa FigTree v1.4.4 para importar los árboles filogenéticos, el cual permitió la edición para una mejor visualización.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Resultados y Análisis de Cladograma

Se muestrearon un total de 224 secuencias del marcador SAG3 para *Toxoplasma gondii* con un tamaño de 638 a 1158 pb (Anexo A) (matrices de 170 secuencias x 638pb y 224 secuencias x 1158pb respectivamente)

En el primer análisis después del alineamiento se obtuvo una matriz con tamaño de 224 x 574pb, el cual mostró un árbol filogenético con topología sesgada por diferencias en tamaño de secuencias generando ruido al momento del alineamiento y árboles con un grupo de secuencias excluidas; mientras que en el segundo análisis con un total de 170 secuencias y un tamaño de 566pb después del alineamiento y la depuración se obtuvo árboles con topología óptima mostrando los linajes de interés.

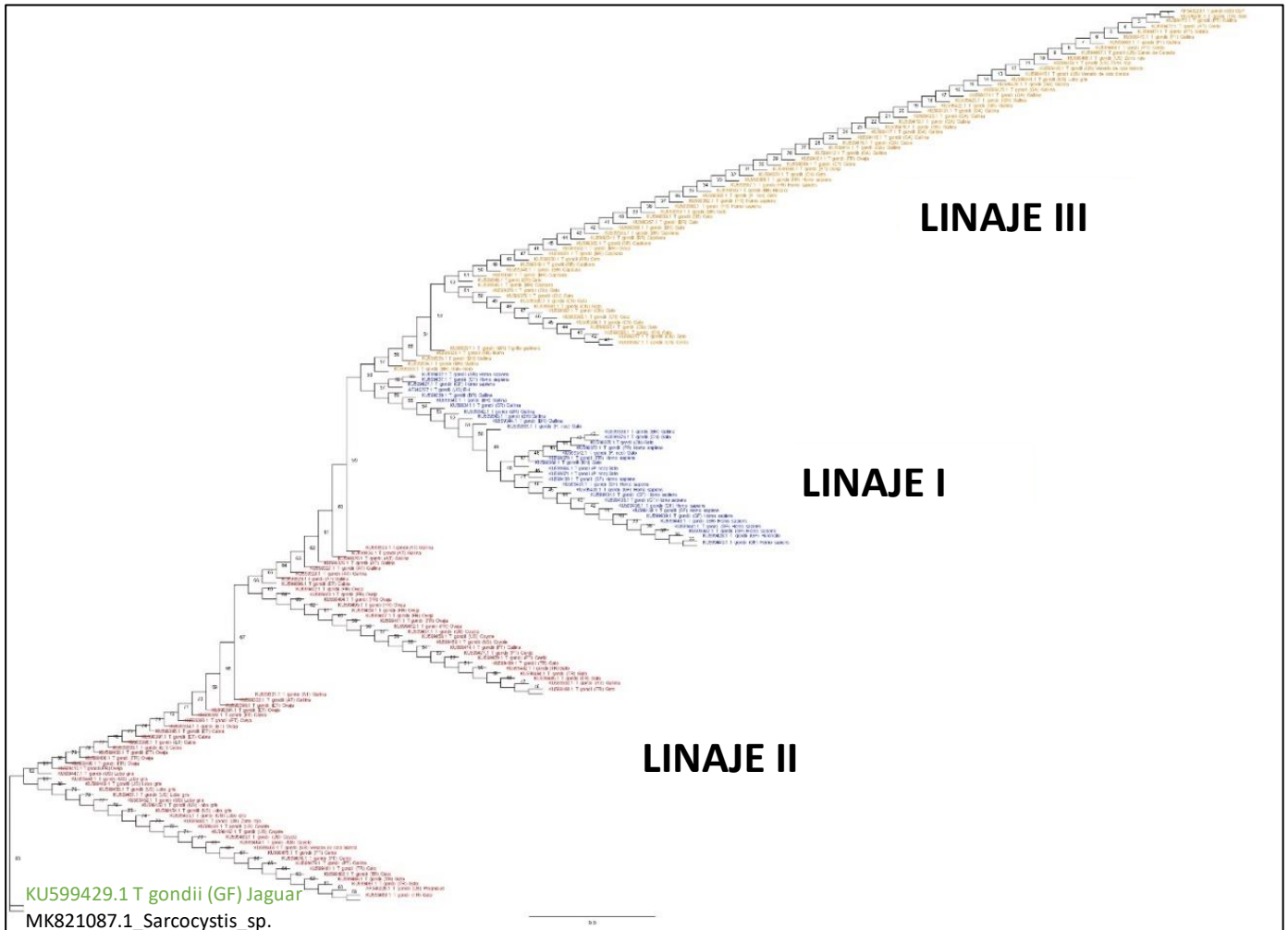
La generación de los árboles se realizó con Maximum Parsimony, Neighbor-Joining y Maximum Likelihood con el modelo de sustitución de Tamura-3-parameter; dichos árboles mostraron topologías similares, por lo que, los árboles finales se muestran con Maximum Parsimony (MP).

Sarcocystis sp. el cual se tomó como grupo externo permitió la generación de enraizamientos satisfactorios mostrando grupos, donde se pueden apreciar los diferentes linajes y a la vez un grupo basal.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Maximum Parsimony con los 2 árboles más parsimoniosos (longitud = 566). El índice de consistencia (IC) fue de 0,92, el índice de retención (RI) fue 0,94 y el índice compuesto (RCI) fue 0,88 mostrando una matriz de alta homología y baja homoplasia (eventos paralelos o convergentes). En los clados se indica el porcentaje de réplicas de árboles en los que los taxones asociados mostrando el apoyo de grupos o clados mediante la prueba estadística de bootstrap (figura2) (Felsenstein, 1985).

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

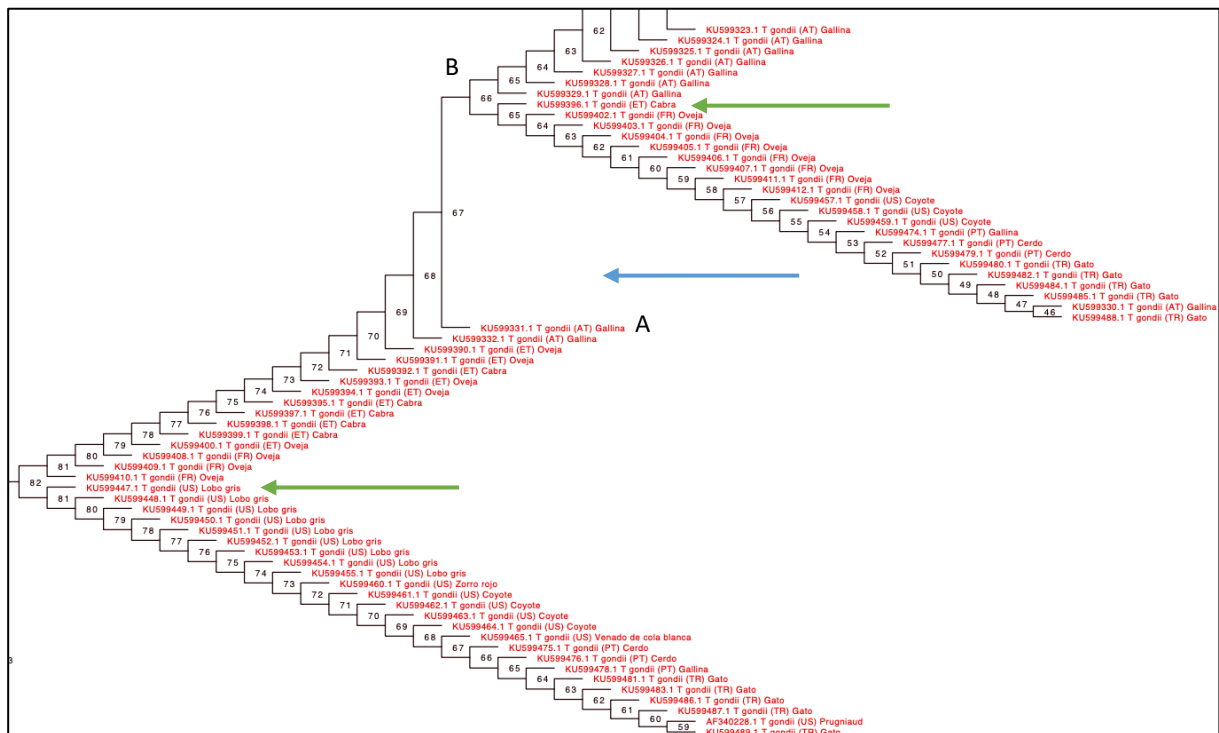
Figura 2. Análisis con el algoritmo de Maximum Parsimony de las secuencias del gen SAG3 de *Toxoplasma gondii*, que muestra el outgroup, secuencia basal o ancestral y los tres linajes filogenéticos.



Como se puede observar en la figura 2 el análisis filogenético de las secuencias de SAG3 permitió tipificar los diferentes linajes obteniendo 3 clados o grupos definidos y apoyados por valores de bootstrap (83%, 57%, 57%); el primer grupo corresponde al linaje II, el segundo al linaje I y el tercero al linaje III. Por otro lado, en la parte inferior se tiene un grupo basal, mismo que fue encontrado en un hospedador salvaje (jaguar, *Felis concolor*) en la Guayana Francesa y muestra ser el más ancestral, y al grupo externo el cual enraíza todo el árbol (figura 2, clado basal aumentado en tamaño).

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Figura 3. Linaje II de *Toxoplasma gondii* a partir de secuencias SAG3



En la figura 3 se puede observar el linaje II de *Toxoplasma gondii* el mismo que se encuentra formando dos subclados de taxones hermanos. Por un lado, se tiene un primer grupo de taxones monofiléticos (flecha verde) que poseen un ancestro en común junto con sus descendientes, mismos que han ido presentando pequeñas mutaciones puntuales. Por otro lado, el segundo grupo (flecha azul) que tiene un ancestro común con A, siendo el grupo B (flecha azul) como grupo hermano y sus taxones derivados.

El linaje II muestra un comportamiento interesante ya que este se encuentra circulando en animales tanto salvajes como domésticos con una migración tanto en Europa, Asia, África y América. Mientras que el linaje I se encuentra en los seres humanos, esto se puede deber a que estos se encuentran en convivencia con animales domésticos como el gato o la gallina, dicho linaje predomina en el Continente Americano con pequeñas introducciones en Europa (C) y Asia (D) como se puede ver en la figura 4.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Figura 4. Linaje I de *Toxoplasma gondii* a partir de secuencias SAG3

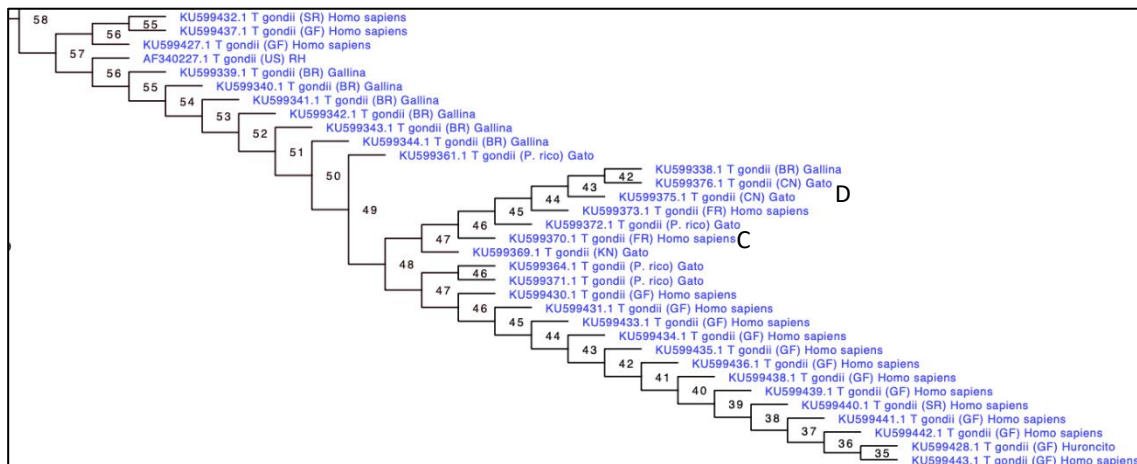
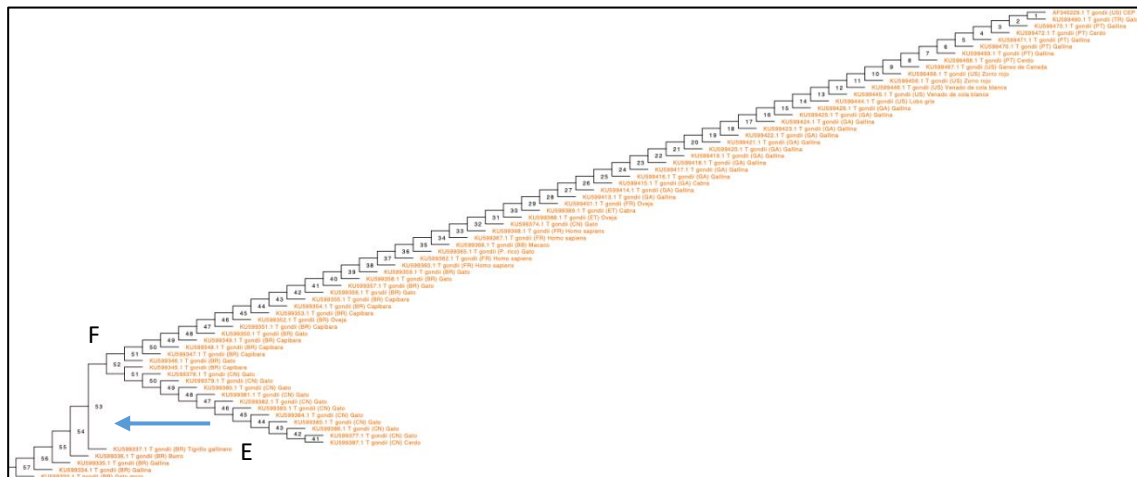


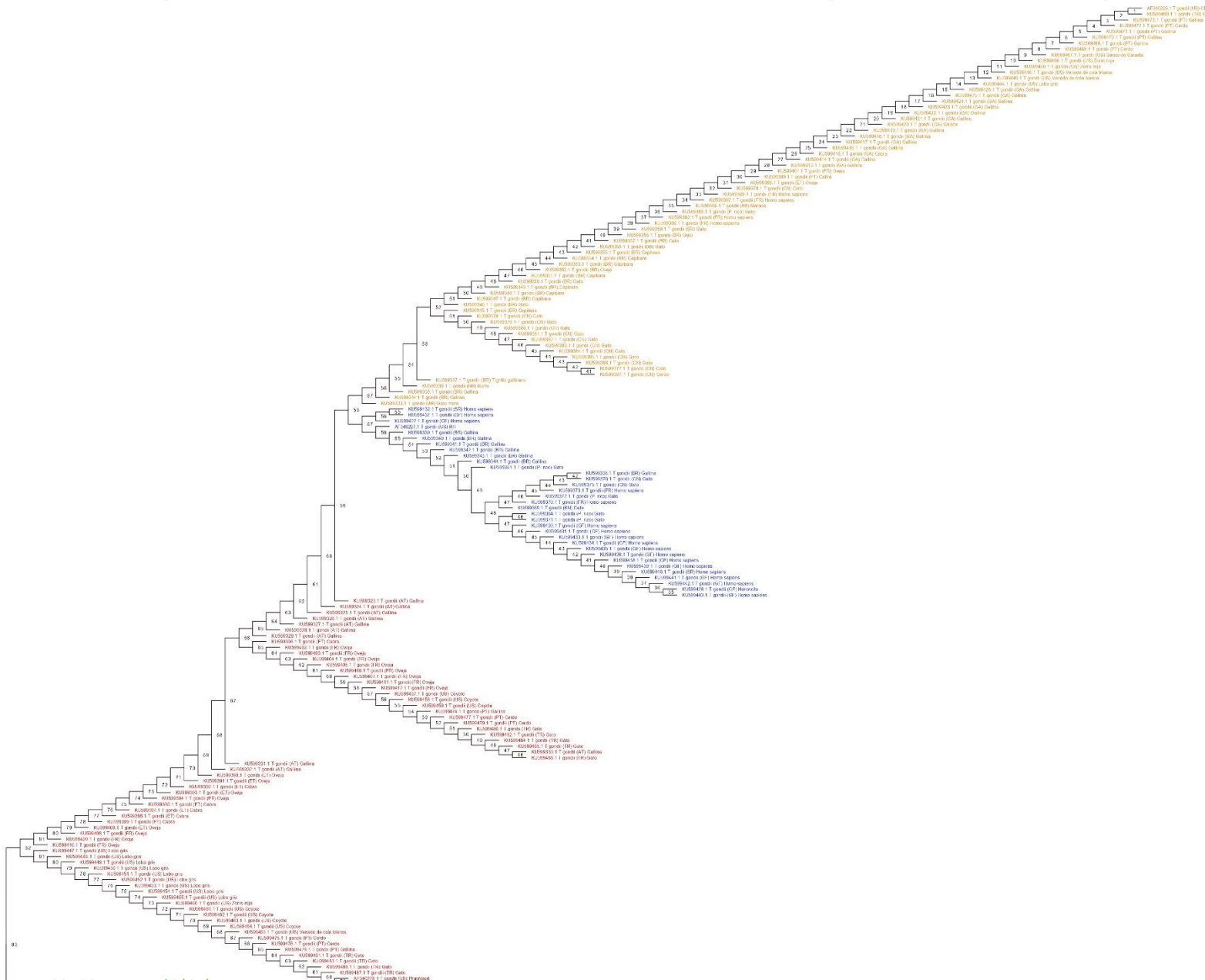
Figura 5. Linaje III de *Toxoplasma gondii* a partir de secuencias SAG3.



En la figura 5 se muestra el linaje III; en donde se puede observar un taxón hermano (flecha azul) con un ancestro común E del clado F derivado (linaje III); este linaje ha circulado alrededor del mundo llegando a todos los continentes (expansión) con una versatilidad de hospedadores tanto definitivos como intermediarios, mostrando una hipótesis de intercambio genético y expansión debido posiblemente a una alta movilidad. La topología mostrada de ancestralidad en la serie de transformación de caracteres: secuencia de jaguar basal / linaje II (animales silvestres/domésticos) / linaje I (animales domésticos/humanos) / linaje III de expansión, arroja una clara tendencia de origen zoonótico, colocando a nuestra hipótesis filogenética con base en la evidencia a felinos como fuente de origen (figura 6).

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Figura 6. Hipótesis filogenética del origen y evolución de linajes, zoonosis y expansión geográfica y de hospedadores de *Toxoplasma gondii*.



KU599429.1 *T. gondii* (GF) Jaguar
MK821087.1 *Sarcocystis* sp.

LINAJE III
Expansión
Avirulento en ratones
Infección crónica

LINAJE I
Seres humanos y animales
domésticos
Virulento en ratones
Infección congénita

LINAJE II
Animales silvestres y
domésticos
Avirulento en ratones
Infección congénita

Ancestro *T. gondii* (Jaguar)
Outgroup (*Sarcocystis* sp.)

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Discusión

Para el desarrollo de la investigación, se realizó una matriz de diagnóstico y ecoepidemiología molecular, con el objetivo de realizar un análisis filogenético de secuencias específicas de *Toxoplasma gondii*, el cual pueda ser utilizado para la identificación molecular rápida de cualquier aislado de *T. gondii* en el país y en la región, ya que este es el agente causal de la toxoplasmosis, dicha enfermedad posee una alta prevalencia en todo el mundo debido a su facilidad de contagio, ya sea a través de los alimentos o a su vez mediante el contacto directo con hospedadores portadores del parásito (Sanchez et al., 2019).

El gen SAG3 permitió identificar un ancestro común de *T. gondii* originario de Sudamérica en la familia *Felidae*; la familia *Felidae* llegó a Sudamérica a final del Plioceno después de migrar de América del Norte mostrando adaptaciones morfológicas y fisiológicas, estos al ser hospedadores definitivos de *Toxoplasma gondii*, así como los únicos que permiten que se dé una recombinación meiótica logran hacer que el parásito se expanda rápidamente originando nuevos linajes con acumulación de mutaciones puntuales (O'Brien et al., 2008; Pereira & Perez, 2002), dados estos resultados se sostiene la hipótesis de que *T. gondii* se originó en los felinos silvestres en América del Sur generando una diseminación posterior a través de las aves migratorias y el comercio produciendo una migración en animales domésticos como los gatos así como ratones y ratas (Lehmann et al., 2006).

En primer lugar, el linaje II, derivado del ancestro felino, es avirulento en ratones, pero en humanos se ha comprobado que puede llegar a provocar una infección congénita (Dubey, 2010; Sanchez et al., 2019), en el presente estudio se comprobó que este linaje de *T. gondii* predomina en animales salvajes y domésticos como: *Canidae*, *Felidae*, *Phasianidae*, *Bovidae*, *Suidae*, *Cervidae*, mismos que estarían afectando directamente a la producción ganadera ya que en el caso de ovejas y cabras una infección con *T. gondii* conllevaría a la muerte de los fetos, y aquellos que logren sobrevivir no presentarían síntomas clínicos

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

convirtiéndolos en una fuente directa de contagio para los humanos al momento de consumir sus carnes, este mismo precedente se presentaría en el caso de los cerdos (Aguirre et al., 2019; Dubey, 2010). Así mismo se puede ver ampliamente que el linaje tipo II se está diseminado en el continente Europeo sosteniendo la hipótesis que menciona Sanchez et al., (2019), a su vez este mantiene pequeñas introducciones en el continente Africano a través del comercio de esclavos, mientras que se introdujo al continente Asiático y Americano mediante el comercio de productos agrícolas, textiles y armamentistas (Lehmann et al., 2006).

Este linaje II muestra haber derivado, por mutaciones fundamentales a identificar a *posteriori*, en dos subclados, el linaje I y el linaje III. El linaje tipo I es altamente virulento llevando al 100% de mortalidad en los ratones (Dubey, 2010), mientras que en humanos lleva a una infección congénita, en el presente estudio se muestra que este se encuentra presente en hospedadores como *Homínidos*, *Felidae*, *Phasianidae* y *Mustelidae* predominando en el continente Americano con pequeñas introducciones en Europa y Asia; estas introducciones pueden deberse en su gran mayoría al comercio; ya que en los barcos de América del Sur y Central se cargaban con grandes cantidades de productos agrícolas como arroz y caña de azúcar, los mismos que podían contener tierra contaminada con ooquistes dando como consecuencia la infestación de los mismos y la propagación hacia los distintos continentes (Lehmann et al., 2006). En estos casos las infecciones con *Toxoplasma gondii*, cuando se habla de los animales, pueden deberse a que el ambiente se encuentra contaminado con ooquistes y al encontrarse en constante exposición al ambiente estos pueden llegar a contagiarse, por otro lado, ya que estos se usan como fuente de alimento para el ser humano, provocan un ciclo de transmisión continua debido al consumo de dicha carne contaminada (Aguirre et al., 2019; Dubey, 2010; Lehmann et al., 2006).

El otro subclado derivado y hermano del linaje I, el linaje III, mantiene su avirulencia en ratones, genera infecciones crónicas, y muestra tener una mayor capacidad de circulación

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

alrededor del mundo llegando a todos los continentes con una versatilidad de hospedadores tanto definitivos como intermediarios, los mismos que están dados por: *Canidae*, *Felidae*, *Phasianidae*, *Mustelidae*, *Bovidae*, *Suidae*, *Cervidae*, *Caviidae*, *Anatidae*, *Cercopithecidae*, *Homínidos*, *Équidos*, lo que puede representar una mayor adaptación y éxito evolutivo.

Conclusiones

El análisis filogenético de *Toxoplasma gondii* generó una matriz de diagnóstico con base en el marcador molecular SAG3 que muestra una alta variabilidad genética al ser altamente polimórfico encontrando una relación directa entre el linaje circulante y la virulencia, expansión geográfica y éxito evolutivo, esto permite su uso tanto para diagnóstico, así como en epidemiología molecular y vigilancia genómica.

El linaje tipo I predomina en el continente Americano con pequeñas introducciones en Europa y Asia, mientras que el linaje de tipo II predomina en el continente Europeo y afecta directamente a la producción ganadera y el linaje tipo III se encuentra circulando alrededor del mundo tanto en hospederos definitivos como intermediarios.

Para finalizar el marcador molecular SAG3 es una opción para la identificación molecular rápida de cualquier aislado de *T. gondii* en el país y la región, a la vez permite conocer el grado de afectación a la población.

Agradecimientos

Universidad Internacional SEK y a su cuerpo docente por la ayuda para el desarrollo de este trabajo de investigación.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Referencias Bibliográficas

- Afsaneh, A., Shahabeddin, S., Mehdi, S., Sargis, A., Javidnia, J., Mizani, A., Moosazadeh, M., Shams, N., Abdollah, S., Hosseininejad, Z., Nayeri, T., Badali, H., & Daryani, A. (2019). A systematic review of *Toxoplasma gondii* genotypes and feline: Geographical distribution trends. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 46–64.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13340>
- Aguirre, A. A., Longcore, T., Barbieri, M., Dabritz, H., Hill, D., Klein, P. N., Lepczyk, C., Lilly, E. L., McLeod, R., Milcarsky, J., Murphy, C. E., Su, C., VanWormer, E., Yolken, R., & Sizemore, G. C. (2019). The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth*, 16(2), 378–390.
<https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>
- Ajzenberg, D., Bañuls, A., Tibayrenc, M., & Dardé, M. (2002). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology*, 32(1), 27–38.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00301-0)
- Arshadi, M., Akhlaghi, L., Meamar, A. R., Alizadeh Ghavidel, L., Nasiri, K., Mahami-Oskouei, M., Mousavi, F., Rampisheh, Z., Khanmohammadi, M., & Razmjou, E. (2019). Sero-molecular detection, multi-locus genotyping, and clinical manifestations of ocular toxoplasmosis in patients in northwest Iran. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 113(4), 195–202. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try137>
- Bachand, N., Ravel, A., Leighton, P., Stephen, C., Ndao, M., Avard, E., & Jenkins, E. (2019). Serological and molecular detection of *Toxoplasma gondii* in terrestrial and marine wildlife harvested for food in Nunavik, Canada. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–10.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3408-9>

Bojorque, M. P. (2016). Actualización de la seroepidemiología de *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Cuenca. *Repositorio Digital Universidad de Cuenca*, 1–76.

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25508/1/Tesis.pdf>

Dabanch P., J. (2003). Zoonosis. *Revista Chilena de Infectología*, 20(SUPPL. 1), 47–51.

<https://doi.org/10.2307/j.ctvxw3p70.22>

Dubey, J. P. (2006). Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology*, 140(1–2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.018>

Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans* (CRC Press).

Eiros Bouza, J. M., & Oteo Revuelta, J. A. (2011). Enfermedades infecciosas zoonóticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(SUPPL. 3), 51–54.

[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70028-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70028-3)

Espinosa, G., & Espín, L. (2012). Incidencia de toxoplasmosis en gatos mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta (kit on site toxo igg / igm) en el barrio de Solanda de la ciudad de Quito. 25, 1–83. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/670>

Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783. <https://doi.org/10.2307/2408678>

Ferguson, D. J. P. (2002). *Toxoplasma gondii* and sex: Essential or optional extra? *Trends in Parasitology*, 18(8), 351–355. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02330-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02330-9)

Fernández, T., Acosta, Y., & Montaña, M. (2011). Toxoplasmosis congénita: reporte de

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

casos. *Rev. Med. FCM-UCSG*, 17(3), 192–197.

Galván, M. de la L., & Mondragón, R. (2017). *Toxoplasmosis humana* (ECORFAN, Vol. 1).

Gómez, O., & Felices, R. (2002). Determinación de la seroprevalencia de la toxoplasmosis en alpacas y llamas en la estación experimental INIA-PUNO. In *Unmsm*.

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Salud/Gomez_O_F/Rev_Lit.htm

Grandía, R., Entrena, Á., & Cruz, J. (2013). Toxoplasmosis en *Felis catus*: etiología, epidemiología y enfermedad. *Revista Perú*, 24(2), 131–149.

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v24n2/a01v24n2.pdf>

Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B., Suzuki, Y., & Boothroyd, J. C. (2001). Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*, 294(5540), 161–165. <https://doi.org/10.1126/science.1061888>

Hong, S. H., Jeong, Y. Il, Kim, J. Y., Cho, S. H., Lee, W. J., & Lee, S. E. (2013). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in household cats in Korea and risk factors. *Korean Journal of Parasitology*, 51(3), 357–361. <https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.3.357>

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. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

Jianchun, X., & Yolken, R. (2016). Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Physiology & Behavior*, 213(4), 828–845. <https://doi.org/10.1111/apha.12458>

Kazemi, B., Maghen, L., Bandehpour, M., Shahabi, S., & Haghighi, A. (2007). Gene cloning of P43 surface protein of *toxoplasma gondii* tachyzoite and bradyzoite (SAG3).

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Research Jppournal of Microbiology, 2(2), 170–174.

Khan, A., Su, C., German, M., Storch, G. A., Clifford, D. B., & Sibley, L. D. (2005).

Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5881–5887.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5881-5887.2005>

Lau, Y. L., Lee, W. C., Gudimella, R., Zhang, G. P., Ching, X. T., Razali, R., Aziz, F.,

Anwar, A., & Fong, M. Y. (2016). Deciphering the draft genome of *Toxoplasma gondii* RH strain. *PLoS ONE*, 11(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157901>

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 of the United States of America*, 103(30), 11423.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.0601438103>

Mimica, F., Muñoz-Zanzi, C., Torres, M., & Padilla, O. (2015). Toxoplasmosis, zoonosis parasitaria prevalente en Chile: Recuento y desafíos. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 541–549. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000600008>

Nei, M., & Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. In *Oxford University Press*.

Nixon, K. C., & Carpenter, J. M. (1993). ON OUTGROUPS. *Cladistics*, 9(4), 413–426.
<https://doi.org/10.1111/J.1096-0031.1993.TB00234.X>

O'Brien, S. J., Johnson, W., Driscoll, C., Pontius, J., Pecon-Slattery, J., & Menotti-Raymond, M. (2008). State of cat genomics. *Trends in Genetics*, 24(6), 268.
<https://doi.org/10.1016/J.TIG.2008.03.004>

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

- Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385–1394.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- Pereira, A., & Perez, M. (2002). *Toxoplasmosis*. 21(4), 123–128. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-toxoplasmosis-13028954>
- Petersen, E., & Dubey, J. P. (2001). Biology of toxoplasmosis. *Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide*, 1–42.
https://assets.cambridge.org/9780521019422/excerpt/9780521019422_excerpt.pdf
- Pinto-Ferreira, F., Teles-Caldart, E., Sbruzzi, A., Mitsuka-Breganó, R., Lemos-Freire, R., & Navarro, I. (2019). Patterns of transmission and sources of infection in outbreaks of human toxoplasmosis. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), 2177–2182.
<https://doi.org/10.3201/eid2512.181565>
- Rivera-Fernández, N., & Garcia, P. (2017). *El papel de los gatos en la toxoplasmosis*. 60, 7–18.
- Saadatnia, G., & Golkar, M. (2012). A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44(11), 805–814.
<https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>
- Sanchez, R., Rmos, Y., Cobos, D., Barba, M. A., Brossard, E., & Sanchez, L. (2019). Un

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

lenguaje claro sobre Toxoplasmosis. In H. Moscoso (Ed.), *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. (Unach).

Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., & Sibley, L. D. (2003). Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, 299(5605), 414–416. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>

Sudan, V., Kumar-Tewari, A., Singh, H., Saravanan, B. C., & Sankar, M. (2012). Molecular characterization of surface antigen 3 (SAG3) gene of *Toxoplasma gondii* RH-IVRI strain. *Journal of Parasitic Diseases*, 36(2), 210–214. <https://doi.org/10.1007/s12639-012-0107-2>

Torgerson, P. R., & Mastroiacovo, P. (2013). The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, 91(7), 501. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>

Toscano, L. (2015). *Determinación de la prevalencia de Toxoplasma gondii mediante test de microelisa en gatos domésticos, propietarios y personal de la Clínica Veterinaria Planeta Vida*.

Vargas, R., & Galindo, M. (2013). Aspectos Epidemiológicos De Las Zoonosis. *Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. FMVZ/UNAM.*, 1–15.

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Anexos

Anexo A. Secuencias del marcador SAG3 de *Toxoplasma gondii* presentes en NCBI

PAIS	GenBank (número de acceso)					
Estados unidos	AF340227.1	AF340228.1	AF340229.1	KU599444.1	KU599445.1	KU599446.1
	KU599447.1	KU599448.1	KU599449.1	KU599450.1	KU599451.1	KU599452.1
	KU599453.1	KU599454.1	KU599455.1	KU599456.1	KU599457.1	KU599458.1
	KU599459.1	KU599460.1	KU599461.1	KU599462.1	KU599463.1	KU599464.1
	KU599465.1	KU599466.1	KU599467.1			
Brasil	AY187280.1	KU599333.1	KU599334.1	KU599335.1	KU599336.1	KU599337.1
	KU599338.1	KU599339.1	KU599340.1	KU599341.1	KU599342.1	KU599343.1
	KU599344.1	KU599345.1	KU599346.1	KU599347.1	KU599348.1	KU599349.1
	KU599350.1	KU599351.1	KU599352.1	KU599353.1	KU599354.1	KU599355.1
	KU599356.1	KU599357.1	KU599358.1	KU599359.1		
Irán	JF312642.1	EF445545.1				
Iraq	MK801816.1	MK801817.1	MK801818.1	MK801819.1	MK801820.1	MK801821.1
	MK801822.1	MK801823.1	MK801824.1	MK801825.1	MK801826.1	MK801827.1
	MK801828.1	MK801829.1	MK801830.1	MN747839.1	MN747840.1	MN747841.1
	MN747842.1	MN747843.1	MW338750.1	MW338751.1	MW338752.1	MW133084.1
	MW133085.1	MW133086.1	MW133087.1	MW338753.1	MW338754.1	MW338755.1
	MW338756.1	MW338747.1	MW338748.1	MW338749.1	MW133088.1	MW133089.1
	MW133090.1	MW133091.1	MW133092.1	MW133093.1	MW133094.1	MW338737.1
	MW338738.1	MW338739.1	MW338740.1	MW338741.1	MW338742.1	MW338743.1
	MW338744.1	MW338745.1	MW338746.1			
Austria	KU599323.1	KU599324.1	KU599325.1	KU599326.1	KU599327.1	KU599328.1
	KU599329.1	KU599330.1	KU599331.1	KU599332.1		
Francia	KU599360.1	KU599362.1	KU599367.1	KU599368.1	KU599370.1	KU599373.1
	KU599401.1	KU599402.1	KU599403.1	KU599404.1	KU599405.1	KU599406.1
	KU599407.1	KU599408.1	KU599409.1	KU599410.1	KU599411.1	KU599412.1
Puerto	KU599361.1	KU599364.1	KU599365.1	KU599371.1	KU599372.1	

DIAGNÓSTICO Y ECOEPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* MEDIANTE EL GEN SAG3 Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Rico	
Barbados	KU599366.1
San Cristóbal y Nieves	KU599369.1
China	KU599374.1 KU599375.1 KU599376.1 KU599377.1 KU599378.1 KU599379.1 KU599380.1 KU599381.1 KU599382.1 KU599383.1 KU599384.1 KU599385.1 KU599386.1 KU599387.1
Etiopia- África	KU599388.1 KU599389.1 KU599390.1 KU599391.1 KU599392.1 KU599393.1 KU599394.1 KU599395.1 KU599396.1 KU599397.1 KU599398.1 KU599399.1 KU599400.1
Gabón- África	KU599413.1 KU599414.1 KU599415.1 KU599416.1 KU599417.1 KU599418.1 KU599419.1 KU599420.1 KU599421.1 KU599422.1 KU599423.1 KU599424.1 KU599425.1 KU599426.1
Guayana Francesa	KU599427.1 KU599428.1 KU599429.1 KU599430.1 KU599431.1 KU599433.1 KU599434.1 KU599435.1 KU599436.1 KU599437.1 KU599438.1 KU599439.1 KU599441.1 KU599442.1 KU599443.1
Suriname	KU599432.1 KU599440.1
Portugal	KU599468.1 KU599469.1 KU599470.1 KU599471.1 KU599472.1 KU599473.1 KU599474.1 KU599475.1 KU599476.1 KU599477.1 KU599478.1 KU599479.1
Turquía	KU599480.1 KU599481.1 KU599482.1 KU599483.1 KU599484.1 KU599485.1 KU599486.1 KU599487.1 KU599488.1 KU599489.1 KU599490.1