



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Maestría en Medicina Canina y Felina II Cohorte**

**TÍTULO:**

“Implementación del método amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras sanguíneas de gatos (*Felis catus*)”

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título  
de Magíster en Medicina Canina y Felina.**

**AUTOR:** María Fernanda Aguirre Serrano. MVZ.

0103563201 feraguirre83@hotmail.com

**DIRECTOR:** Dr. Teófilo Estuardo Palacios Ordoñez. MVZ. Mg. Sc.

0101330579

**CUENCA – ECUADOR**

**19/Noviembre/2019**



## RESUMEN

Toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria, cuyo agente etiológico es un protozoo llamado *Toxoplasma gondii*, este parásito es el responsable de una de las infecciones parasitarias más comunes en humanos y animales de sangre caliente, siendo los felinos los únicos hospedadores definitivos.

Varias técnicas de diagnóstico han sido empleadas para detectar *T. gondii* en todo tipo de muestras, siendo hasta la fecha las técnicas indirectas ELISA y PCR las más confiables, pero así mismo no muy asequibles por el costo que representan.

El comportamiento errático del parásito no facilita su detección en todas las etapas de vida del parásito en el organismo del animal, por lo que nos puede arrojar resultados falso negativos, aunque el animal si haya padecido en algún momento de su vida la enfermedad. En el presente trabajo se planteó implementar un ensayo LAMP para detectar material genético de *T. gondii* en muestras sanguíneas de gatos (*Felis catus domesticus*) sin distinción de raza, edad o sexo, cuya característica principal era mantener contacto directo con el medio exterior, tener hábitos de caza y no tener acceso a un arenero, factores de riesgo que exponen al animal a adquirir más fácilmente la enfermedad. Se obtuvo ADN total de 100 muestras y se aplicó el método LAMP. Los resultados obtenidos mostraron 1 muestra positiva a *T. gondii*. Luego con este resultado se hizo una comparación con el estudio de seroprevalencia de *T. gondii* en la Ciudad de Cuenca utilizando la técnica de Inmunofluorescencia indirecta con 300 muestras sanguíneas de gatos de los cuales hubo 48 muestras seropositivas. Aunque los dos ensayos difieren en la metodología, cantidad de muestras y no pertenecen a los mismos individuos, los resultados positivos concuerdan en estar expuestos a los mismos factores de riesgo. El análisis estadístico aplicado la prueba de Diferencia de proporciones, se encontró que hay una diferencia significativa entre ambos ensayos, siendo el ensayo de serodiagnóstico más específico para este tipo de muestras. Sin embargo, aunque LAMP no haya mostrado una mayor cantidad de resultados positivos, se puede atribuir a que el tipo de muestra (sangre) no es el más adecuado para la identificación de ADN de *T. gondii*.

**PALABRAS CLAVE:** TOXOPLASMOSIS, LAMP, DIAGNOSTICO.



## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease, which etiologic agent is a protozoan called *Toxoplasma gondii*. This parasite is responsible for one of the most common parasitic infections in humans and warm-blooded animals, being cats the only definitive hosts. Several diagnostic techniques have been used to find *T. gondii* in all types of samples, with the indirect ELISA methodology and direct PCR being the most reliable but not very affordable by the cost.

The erratic behavior of the parasite does not facilitate the possibility of finding positive results throughout the life cycle of the parasite in the organism of the animal, so it can give us false negative results, although the animal has suffered the disease at some point in its life.

The present study proposed to implement a LAMP test to detect genetic material of *T. gondii* in blood samples of cats (*Felis catus domesticus*) without distinction of race, age or sex, which main characteristic was to maintain direct contact with the outside environment, to have hunting habits and not having access to a sandbox, risk factors that expose the animal to acquire the disease more easily.

Total DNA was obtained from 100 samples and the LAMP method was applied; the results showed 1 positive sample to *Toxoplasma gondii*. Then with this result a comparison was made with the study of Seroprevalence of *T. gondii* in the City of Cuenca using the Indirect Immunofluorescence technique with 300 blood samples from cats of which 48 were positive samples. Although the two trials differ in methodology, number of samples and do not belong to the same individuals, the positive results agree to be exposed to the same risk factors. The statistical analysis applied with the Difference of proportions test, found that there is a significant difference between both tests, being the most specific the Serodiagnosis. Despite, LAMP has not shown a greater amount of positive results, it can be attributed to the fact that the type of sample (blood) is not the most suitable for the study of Toxoplasmosis.

**KEY WORDS:** TOXOPLASMOSIS, LAMP, DIAGNOSIS.



## TABLA DE CONTENIDOS

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....                                 | 2  |
| ABSTRACT.....                                | 3  |
| TABLA DE CONTENIDOS.....                     | 4  |
| DERECHOS DE AUTOR.....                       | 5  |
| AGRADECIMIENTO.....                          | 7  |
| DEDICATORIA.....                             | 8  |
| CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....      | 9  |
| 1.1 Agente causal.....                       | 9  |
| 1.2 Taxonomía.....                           | 10 |
| 1.3 Ciclo de vida.....                       | 10 |
| 1.4 Hospedadores.....                        | 13 |
| 1.5 Signos clínicos.....                     | 14 |
| 1.6 Lesiones Anatomopatológicas.....         | 16 |
| 1.7 Respuesta Inmune.....                    | 17 |
| 1.8 Diagnóstico.....                         | 19 |
| 1.9 Epidemiología.....                       | 21 |
| 1.10 Tratamiento.....                        | 22 |
| 1.11 Control.....                            | 23 |
| 1.12 LAMP.....                               | 24 |
| CAPÍTULO II: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 26 |
| CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....      | 28 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....                 | 36 |
| CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....                   | 39 |
| CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....               | 41 |
| CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....           | 41 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                            | 42 |
| ANEXOS.....                                  | 47 |



## DERECHOS DE AUTOR

### Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, María Fernanda Aguirre Serrano en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Implementación del método amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) para la detección de Toxoplasma gondii en muestras sanguíneas de gatos (Felis catus)*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 19 de noviembre del 2019

María Fernanda Aguirre Serrano

0103563201



## CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

### Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, María Fernanda Aguirre Serrano, autora del trabajo de titulación "*Implementación del método amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) para la detección de Toxoplasma gondii en muestras sanguíneas de gatos (Felis catus)*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca 19 de noviembre del 2019

María Fernanda Aguirre Serrano

C.I: 0103563201



## AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las instituciones y personas que me ayudaron a la recopilación de las muestras, de manera especial al Dr. Estuardo Palacios director de esta investigación, al Dr. Antonio Vallecillo quien me facilitó las instalaciones del laboratorio de la Universidad de Cuenca para el procesamiento de las muestras y fue parte esencial en la elaboración de esta tesis, a mi esposo gracias por su apoyo incondicional, y sobre todo a mi madre, padre y hermanos que sin su apoyo no hubiera podido llegar a esta meta.



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis hijos Miguel, Constanza y María Clara ya que para ellos es mi esfuerzo de superarme cada día a mi esposo Santiago y su amor por los animales.





## CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Agente Causal.

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria entérica y sistémica producida por *T. gondii*.

*T. gondii* es un patógeno protozoario intracelular obligado que fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux que trabajaban en el norte de África y por Splendore que trabajaba en Brasil. La designación de la especie se originó a partir del nombre del roedor norteafricano (*Ctenodactylus gondi*). (Black y Boothroyd, 2000).

Ambos autores lo confundieron con *Leishmania* pero Nicolle y Manceux llamaron al género *Toxoplasma* por su forma de arco (del griego: toxo = arco, plasma = vida). El gato fue identificado como el hospedero definitivo por varios grupos que trabajaron de forma independiente, incluidos Dubey y Frenkel en 1970. (Kim y Weiss, 2008).

Este parásito puede infectar a todos los animales de sangre caliente siendo los felinos su hospedador definitivo, sus signos son muy variables y pueden pasar desapercibidos o confundirse con otras enfermedades, sin embargo, en individuos inmunocomprometidos, o en pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores o durante la gestación, la infección con *T. gondii* puede causar graves consecuencias clínicas e incluso la muerte (Tian *et al.*, 2017).

Se estima que *T. gondii* infecta a un tercio de la población humana del mundo (Weiss y Dubey, 2009).

Siendo el felino el hospedador definitivo y los hospedadores intermediarios todos los animales de sangre caliente, incluyendo el hombre. El gato también puede convertirse en hospedador intermediario, cuando padece la fase extraintestinal del ciclo. (Martínez-Fernández, 2002).



## 1.2 Taxonomía

La mayoría de autores coinciden en la clasificación de *T. gondii*. Se da de la siguiente manera:

En su inicio, la clasificación del género toxoplasma se basó en el tipo de hospedador, nombrándose a nueve especies: *T. alencari*, *T. bahiensis*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. gondii*, *T. hammondi*, *T. pardalis*, *T. ranae* y *T. serpai* (Grandía et al, 2013).

*T. gondii* se incluye dentro de Phylum: Apicomplexa, Clase Sporozoea, Subclase Coccidea, Orden Eucoccidida, Suborden Eimeriina, Familia Toxoplasmatinae, Género Toxoplasma.

Todas las cepas de Toxoplasma son morfológica y serológicamente similares, lo que lleva a su designación como una sola especie distribuida globalmente el *T. gondii* (Howe y Sibley, 1995).

La morfología del Toxoplasma pertenece al filo Apicomplexa, que consiste en parásitos intracelulares que tienen una estructura celular característicamente polarizada y una compleja disposición citoesquelética y organelar en su extremo apical (Black y Boothroyd, 2000).

## 1.3 Ciclo de vida

En los años 30 se observó que los ciclos biológicos y las características inmunológicas de todas estas especies eran idénticos, por lo que se les agrupó bajo una misma especie: *T. gondii* (Dubey y Dubey, 2010) (Grandía et al, 2013).

Toxoplasma es capaz de infectar y replicarse dentro de prácticamente cualquier célula nucleada mamífera o aviar. Su ciclo de vida está dividido entre infecciones felinas y no felinas, que se correlacionan con la replicación sexual y asexual, respectivamente. La etapa asexual consiste en dos diferentes etapas de crecimiento dependiendo de si la infección es de fase aguda o crónica. La etapa de taquizoíto define la forma de rápido crecimiento del parásito encontrado durante la fase aguda de la toxoplasmosis (Black y Boothroyd, 2000).



En gatos, la reproducción sexual de *T. gondii* ocurre solo dentro de las células epiteliales intestinales, culminando en la producción de ooquistes que se vierten en el medio ambiente a través de sus heces. (Howe y Sibley, 1995).

Hay tres etapas infecciosas de *T. gondii*: los taquizoitos (en grupos o clones), los bradizoitos (en quistes tisulares) y los esporozoitos (en oocistos) (Dubey, Lindsay y Speer, 1998).

### 1.3.1 Taquizoito

Es la forma asexual invasiva del parásito, mide aproximadamente 2 X 6  $\mu\text{m}$  y tiene forma de arco o media luna, con un extremo anterior conoidal y un extremo posterior redondeado. En su estructura contiene diversas organelas como mitocondrias, complejo de Golgi, ribosomas, roptrias, retículo endoplasmático rugoso y liso, cuerpos de inclusión, película protectora, microtúbulos subpeliculares, anillos apicales, anillos polares, conoide, micronemas, microporo, gránulos densos, gránulos de amilopectina (a veces ausentes) y apicoplasto. (Grandía *et al*, 2013)

Estos microtúbulos están constituidos por proteínas que dan la forma al parásito y permiten su movilidad. La invasión celular es un evento decisivo del toxoplasma por ser un parásito intracelular obligado que infecta a cualquier célula nucleada, por medio de la formación de la vacuola parasitófora (VP).

Después de esta invasión, las células hospederas se rompen y los taquizoitos se diseminan a través del torrente sanguíneo e infectan muchos tejidos, como el sistema nervioso central, el ojo, el músculo esquelético y del corazón, y la placenta. La replicación conduce a la muerte celular e invasión rápida de las células vecinas. La forma taquizoíta provoca una fuerte respuesta inflamatoria y destrucción tisular y, por lo tanto, causa manifestaciones clínicas de la enfermedad. Los taquizoitos se transforman en bradizoítos bajo la presión de la respuesta inmune para formar quistes. (Montoya y Liesenfeld, 2004)

Debido a su capacidad para movilizarse y secretora, el taquizoíto es la forma más invasiva y con mayor capacidad de diseminación tisular.



### 1.3.2 Bradizoito

Denominados también cistozoitos, se multiplican lentamente dentro de un quiste tisular. Se encuentran dentro de los quistes tisulares de diverso tamaño. Los quistes pequeños miden 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen sólo dos bradizoitos, y los quistes grandes contienen cientos de organismos en su interior. Aunque los quistes de tejido pueden desarrollarse en los órganos viscerales, incluidos los pulmones, el hígado y los riñones, son más frecuentes en los tejidos nerviosos, como el cerebro y nervio óptico y musculares como los músculos esqueléticos y cardíacos (Dubey, Lindsay y Speer., 1998).

Los bradizoitos difieren estructuralmente de los taquizoitos. Tienen un núcleo situado hacia el extremo posterior, mientras que el núcleo en los taquizoitos se localiza más centralmente. La mayoría de los bradizoitos tienen de uno a tres roptrios, que se devuelven sobre sí mismos. Los bradizoitos son más delgados que los taquizoitos y son menos susceptibles a la destrucción por las enzimas proteolíticas que los taquizoitos y el período pre patente en gatos después de la alimentación de bradizoitos es más corto que el que sigue a la alimentación de taquizoitos (Dubey, Lindsay y Speer, 1998).

### 1.3.3 Esporozoitos

Los esporozoítos miden 2 X 6-8  $\mu\text{m}$  con un núcleo subterminal y presentan abundantes micronemas, roptrios, gránulos de amilopectina y lípidos. La cantidad de lípidos es superior al presente en los taquizoítos y bradizoítos. Los ooquistes miden 10 X 12  $\mu\text{m}$  aproximadamente, son de forma ovoide y contienen esporozoitos. Sólo se producen en los hospederos definitivos como resultado de la fase sexual del parásito en el intestino de los felinos. Durante la infección activa los felinos excretan millones de ooquistes en las heces durante 7 a 21 días. Para que el ooquiste sea infeccioso es necesario que esporule o madure lo cual ocurre posterior al ser excretado en el medio ambiente y puede tardar entre 2 a 3 días a temperaturas altas, o entre 14 a 21 días a temperaturas más bajas. Los ooquistes pueden permanecer viables hasta 18 meses en tierras húmedas, las cuales sirven de reservorio ambiental.



En el ambiente doméstico, el gato es el responsable del mantenimiento del ciclo vital del parásito, ya que en él ocurre la reproducción sexual y asexual. El gato se infecta al ingerir roedores o aves que tengan quistes tisulares o al consumir alimentos con ooquistes fecales. La reproducción sexual del *T. gondii* ocurre exclusivamente en el intestino del gato; comienza 3 a 15 días después de la ingestión del material infectante para luego excretar en las heces ooquistes no infecciosos, los cuales al cabo de varios días y dependiendo de las condiciones ambientales de temperatura, humedad y disponibilidad de Oxígeno, maduran para dar origen a los ooquistes esporulados que contienen esporozoitos. Los ooquistes esporulados pueden sobrevivir durante varios meses en el suelo o en las plantas y conservar su infectividad tanto para los hospederos definitivos como para los intermediarios. Los gatos desarrollan una respuesta inmune que los protege contra nuevas infecciones y les permite mantener una infección crónica latente, en tanto los gatos mantengan unas condiciones de inmunidad normal, no eliminarán más ooquistes en la materia fecal, no serán fuente de infección, ya que pierden la capacidad de transmitir el parásito (Giraldo, 2008).

#### 1.4 Hospedadores

Las infecciones por *T. gondii* son ampliamente prevalentes en seres humanos y otros animales en todo el mundo, siendo los gatos muy importantes en el ciclo de vida natural de *T. gondii* porque son los únicos hospedadores definitivos que pueden propagar directamente *T. gondii* a través del medio ambiente (Dubey *et al.* 2006).

Según Jones y Dubey (2010), se han descrito como hospederos definitivos a otras 33 especies de felinos: *Panthera spp* (*P. tigris*, *P.t. altaica*, *P. leo*, *P. pardus*, *P. onca*, *P. uncia*), *Lynx spp* (*L. rufus*, *L. canadiensis*, *L. lynx*, *L. pardinus*, *L. caracal*), *Felis spp* (*F. concolor*, *F. concolor*, *F.c. vancouverensis*, *F. chaus*, *F. euptylurus*, *F. margarita*, *F. manul*, *F. lynx*, *F. silvestris*, *F.s. gordonii*, *F. viverrinus*, *F. serval*, *F. temminckii*, *F. catus*), *Oncifelis spp* (*O. geoffroyi*, *O. colocolo*), *Leopardus spp* (*L. pardalis*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*), *Acinonyx jubatus*, *Neofelis nebulosa* y *Herpailurus yogouarundi*.

Dentro de estos hospederos definitivos, el gato juega un papel importante en la transmisión al ser humano por su estrecha relación como animal de compañía.



El felino se infecta al ingerir cualquiera de los estadios del parásito; ya sea por ooquistes esporulados, así como por quistes o pseudoquistes que se encuentran en cualquiera de los tejidos de los hospedadores intermediarios posterior a su ingesta. No sólo los gatos domésticos pueden alojar al parásito, sino casi todas las especies de felinos pueden arrojar ooquistes de *T. gondii* (Dubey y Dubey, 2010).

Como hospedador intermediario se han descrito a todos los animales de sangre caliente incluyendo al hombre.

Este protozoo parasita a numerosas especies acuáticas y terrestres, fundamentalmente a mamíferos y aves; sin embargo, los felinos son los únicos hospederos de la forma sexuada del parásito y productores de ooquistes, por lo que su presencia es esencial en su ciclo biológico (Montoya, 2002).

Los roedores son la especie de mayor sensibilidad al parásito, al tener estos una estrecha relación con el hombre y con los gatos a lo largo de la historia y actualmente, lo cual mantiene así el ciclo del parásito siempre viable; dando a estos una gran importancia epidemiológica (Bojorque, 2016).

*T. gondii* es un parásito inusual debido a su amplia gama de hospederos y por ser una sola especie en el género. Antes del desarrollo de marcadores genéticos se realizaron numerosos estudios en ratones para agrupar los aislados de *T. gondii* según su patogenicidad. Durante los años 80 y 90 se desarrollaron métodos para el reconocimiento de las diferencias genéticas entre los aislados de *T. gondii* procedentes de humanos y animales (Darde, 2007), clasificándolos en tres linajes o tipos genéticos (I, II, III), donde los aislados del tipo I pueden ser 100% letales para ratones, independientemente de la dosis, mientras que los tipos II y III son generalmente avirulentos para esta especie (Grandía *et al.*, 2013).

### 1.5 Signos clínicos

Clínicamente, la infección por *T. gondii* en el humano puede manifestarse de forma variada (desde asintomática hasta causar la muerte); por ejemplo, las manifestaciones clínicas son diferentes en un hospedero inmunocompetente y en un hospedero inmunocomprometido, o si es una toxoplasmosis ocular o una congénita. En los hospederos inmunocompetentes la infección primaria usualmente tiene curso



asintomático. En humanos la fase aguda de la infección adquirida se puede observar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, la mayoría de las cuales son inespecíficas: fiebre moderada, mononucleosis, exantema, adenopatías, astenia, cefalea, mialgia, hepatitis, neumonía o encefalitis. La evolución clínica de la toxoplasmosis aguda depende de la condición inmunológica del hospedero, de forma que en individuos inmunocompetentes la fase aguda de la infección es autolimitada. La fase crónica de la toxoplasmosis adquirida es asintomática y se caracteriza por la persistencia, durante toda la vida del hospedero inmunocompetente, de quistes tisulares que se ubican preferencialmente en el músculo esquelético, el sistema nervioso central y el ojo (Giraldo, 2008).

En gatos la presentación clínica es poco usual, y puede estar asociada con la terapia glucocorticoides y con infecciones concomitantes como *Bartonella spp*, con el virus de inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la leucemia felina (VLF<sub>e</sub>) y virus de la peritonitis infecciosa felina (PIF) causantes de inmunosupresión (Grandía *et al.*, 2013).

Se han descrito casos con fiebre, anorexia, letargia, síntomas respiratorios, vómitos, diarrea, retinocoroiditis, y uveítis anterior, cambios perivasculares y degenerativos del SNC, encefalitis y nefritis intersticial crónica. Los signos clínicos son mucho más frecuentes en gatitos infectados por vía transplacentaria, los animales infectados pueden nacer muertos o morir al cabo de unas horas (Martínez-Fernández, 2002).

También se informaron signos atribuidos a la afectación neural tales como: hipotermia, ceguera parcial o total, aumento del comportamiento afectivo, estupor, falta de coordinación, llanto atípico, contracciones en las orejas, caminar en círculos, tortícolis, sacudidas de la cabeza, anisocoria y convulsiones (Dubey y Dubey, 2010).

La reactivación de la toxoplasmosis latente es, usualmente, secundaria en los gatos tratados con Ciclosporina que induce a inmunodepresión y la presencia de signos respiratorios o digestivos (Durlach y Martino, 2009).

Se sabe que la edad del gato, las infecciones concurrentes y las inmunodeficiencias afectan el resultado de la toxoplasmosis clínica. Aunque los gatitos jóvenes son más susceptibles a la toxoplasmosis clínica que los gatos adultos, no existe evidencia que



indiquen que la toxoplasmosis primaria en gatos de edad avanzada es más grave que en gatos jóvenes maduros (Park *et al.*, 2007).

La toxoplasmosis congénita tiene lugar cuando la fase aguda de la infección sucede en mujeres gestantes. La probabilidad de infección congénita es prácticamente nula en hijos de mujeres con anticuerpos e inmunidad específica contra el parásito; no obstante, puede ser difícil discriminar el momento de la infección aguda y el inicio de la gestación (Giraldo, 2008).

En el perro también las infecciones son asintomáticas, pero en las más intensas, los signos clínicos más típicos son trastornos digestivos, respiratorios y nerviosos. *T. gondii* puede causar una enfermedad congénita grave en el feto en desarrollo, pero generalmente no es patógeno en adultos sanos. Sin embargo, las infecciones crónicas persisten durante muchos años en un estado subclínico y pueden reactivarse para causar una enfermedad grave en pacientes inmunocomprometidos (Howe y Sibley, 1995).

En humano puede causar signos neurológicos severos o enfermedad ocular en el feto durante el embarazo. Los humanos adquieren la infección por ingestión de agua contaminada con ooquistes, de quistes tisulares en carne poco cocida, por trasplante, transfusión de sangre, accidentes de laboratorio, o de forma congénita (Elmore *et al.*, 2010).

La predilección de este parásito por el sistema nervioso central (SNC) causa alteraciones en el comportamiento y la personalidad, así como encefalitis necrotizante mortal, y es especialmente peligrosa para los pacientes infectados por el VIH (Weiss y Kim, 2011).

### **1.6 Lesiones anatomopatológicas**

La mayoría de las lesiones se localizan en orden de importancia de la siguiente manera: pulmonares (donde la neumonía es el hallazgo más frecuente y rápidamente fatal), abdominales, hepáticas (hepatitis), neurológicas, oculares (irritación acuosa, iritis, hemorragias en retina, oftalmitis y uveítis), cutáneas (ulceración y nódulos dérmicos y subcutáneos en las extremidades), pancreáticas (pancreatitis) y por último cardíacas (Grandía *et al.*, 2013).





Durante la gestación las gatas pueden desarrollar placentitis, con invasión fetal congénita de forma grave, presentándose abortos espontáneos, nacimientos prematuros y malformaciones congénitas (Dubey, Lindsay y Speer, 1998).

## 1.7 Respuesta inmune

### a) Inmunidad innata

La respuesta inmune inducida por el *T. gondii* se caracteriza por una fuerte inmunidad celular que limita la replicación de los taquizoitos durante la fase adaptativa de la infección y promueve el establecimiento de las formas latentes del parásito. El sistema inmune innato es fundamental para limitar la replicación de los taquizoitos durante el período en el cual aún no se ha establecido la inmunidad adaptativa. Además, la interacción inicial de los parásitos con el sistema inmune innato es determinante en el direccionamiento hacia un patrón de citoquinas tipo uno (Th1), caracterizado por altos niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12. La producción excesiva de citoquinas proinflamatorias es perjudicial para el hospedero y por tanto se requiere la secreción de citoquinas reguladoras, provenientes de los propios macrófagos como son la IL-10 y el factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Giraldo, 2008).

### b) Inmunidad celular

La inmunidad celular durante la toxoplasmosis se caracteriza por la generación de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Estas células producen citoquinas y desarrollan funciones citotóxicas. La principal función de los linfocitos T CD4+ es la secreción de la IL-2 necesaria para la proliferación de los linfocitos T CD8+, consideradas las células citotóxicas por excelencia. Las T CD4+ también producen IFN- $\gamma$  necesario para los macrófagos. (Giraldo, 2008)

### c) Inmunidad humoral

En la respuesta humoral del gato contra la toxoplasmosis aparecen las IgM e IgG, donde esta última comienza a circular a partir de las dos primeras semanas de la infección. Si bien la detección de IgM indica la presencia de una toxoplasmosis activa, los niveles de esta inmunoglobulina pueden mantenerse elevados durante un año (Montoya, 2002).



En el gato, se plantea que las IgM específicas contra *T. gondii* aparecen en 1-2 semanas y persisten por 12-16 semanas, mientras que las IgG aparecen a las 2-4 semana pero persisten durante un año o más (Durlach y Martino, 2009).

La IgA también es parte de la respuesta humoral contra *T. gondii* en los gatos. Esta inmunoglobulina se ha detectado en suero, contenido intestinal y humor acuoso. En el tracto intestinal participa en el reconocimiento en la superficie de la mucosa de los antígenos de taquizoitos originados de bradizoitos y esporozoitos incorporados oralmente. Este reconocimiento antigénico finaliza con la reducción de la actividad de penetración celular y el establecimiento de la infección (Grandía *et al.*, 2013).

En humanos después de ingerir los quistes u ooquistes infecciosos, se liberan taquizoitos los cuales primero invaden y se multiplican en las células epiteliales intestinales desde el tracto gastrointestinal, los taquizoitos se diseminan a otros órganos del cuerpo humano. En el lumen del intestino, los linfocitos intra epiteliales se encuentran entre las células epiteliales y participan en la modulación de la inmunidad del huésped a través de la liberación de varias citoquinas, la mayoría aparentemente induce una inmunidad similar a los linfocitos intraepiteliales, los linfocitos mesentéricos pueden migrar al intestino y prevenir la invasión de parásitos (Bhopale, 2003).

*T. gondii* se adquiere comúnmente por la ingestión oral de quistes tisulares que contienen bradizoítos; Sin embargo, también se puede adquirir por la ingestión de ooquistes que contienen esporozoitos que son el producto de un ciclo sexual en el intestino del gato. El consumo de carne poco cocida, especialmente de cerdo y cordero, se ha atribuido como el principal factor de riesgo para la adquisición de toxoplasmosis (Weiss y Dubey, 2009).



## 1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la toxoplasmosis puede hacerse por métodos directos o indirectos. Los métodos directos se basan en la demostración de formas parasitarias completas o su material genético en fluidos o tejidos corporales. Los métodos indirectos para el diagnóstico de la toxoplasmosis se basan en la demostración de la presencia de anticuerpos IgM, IgG o IgA específicos contra el parásito y o sus componentes.

En humanos como métodos directos tenemos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que se determina la presencia del ADN de *T. gondii* en muestras de fluidos y tejidos corporales. Es muy útil para el diagnóstico de la infección congénita a partir de líquido amniótico, sangre u orina del neonato. La realización de esta prueba en humor vítreo o en humor acuoso permite el diagnóstico de casos inespecíficos y de difícil manejo de toxoplasmosis ocular.

Mientras que los métodos serológicos indirectos son ampliamente utilizados en pacientes inmunodeprimidos, el diagnóstico definitivo en personas inmunocomprometidas se realiza principalmente mediante la detección directa del parásito. La demostración directa se la realiza por inoculación en ratón, cultivo celular o PCR para el ADN de *T. gondii*; en muestras de líquido cefalorraquídeo, sangre, orina, y exudados oculares. Las pruebas, los estudios radiológicos y el examen del líquido cefalorraquídeo podrían ayudar al diagnóstico de enfermedad congénita (Montoya, 2002).

En gatos según Elmore (2010), para el examen coproparasitario la mayoría de los individuos infectados solo arrojarán ooquistes en un solo punto de su vida, generalmente por un período de una a dos semanas, y se ha estimado que solo el 1% del total de gatos infectados en un momento dado están vertiendo la infección al medio ambiente, por esa razón, la probabilidad de encontrar ooquistes en las heces del gato es complicada debido también al hecho de que los ooquistes de otros coccidios se parecen morfológicamente y molecularmente a las de *T. gondii*.

A pesar de estos avances, el diagnóstico de infección por *T. gondii* sigue siendo insatisfactorio porque los métodos serológicos no pueden diferenciar el pasado y el



presente de la infección, mientras que los métodos de PCR están limitados por su costo.

En humanos el diagnóstico de toxoplasmosis constituye una importante medida para el control de la enfermedad, particularmente durante el embarazo. También puede evitar serias pérdidas económicas en la industria ovina y caprina. Varios métodos de diagnóstico, basado ya sea en antígenos (diagnóstico serológico) o ácido nucleico (diagnóstico molecular) han sido reportados. El ensayo LAMP es la metodología más desarrollada recientemente y es conocida por ser muy sensible, fácil y de rápida elaboración (Notomi, 2000).

LAMP, es un nuevo método de detección que amplifica ADN con alta sensibilidad y especificidad diagnóstica (Sotiriadou y Karanis 2008) y ha sido utilizado para la detección de muchas enfermedades virales, bacterianas, protozoarias y fúngicas. Recientemente, este método de amplificación de genes se ha desarrollado y utilizado con éxito para el diagnóstico de infecciones parasitarias, como la malaria, la tripanosomiasis, la teileriosis y babesiosis (Zhang *et al.*, 2009).

Posteriormente, se desarrolló y evaluó el ensayo LAMP para la detección de la infección por *T. gondii* en ganglios linfáticos de los cerdos, diversos órganos extraídos de ratones, y muestras de sangre en humanos (Kong *et al.*, 2012).

Recientemente, se descubrió que el ensayo LAMP era una poderosa herramienta de diagnóstico, y el LAMP dirigido al gen SAG1 (SAG1-LAMP) y el gen repetitivo de 529 pb de *T. gondii* de 200 a 300 veces se usó con éxito para el diagnóstico de toxoplasmosis en modelos animales, especialmente ratones. Se aplicó SAG1-LAMP para detectar la presencia de *T. gondii* en órganos infectados de ratón, esto hace que el método sea atractivo para la detección de *T. gondii* en muestras de biopsia. LAMP basado en el gen repetitivo de 529 pb también ha demostrado ser útil para la detección de ADN de *T. gondii* extraído de nódulos linfáticos de muestras veterinarias (Lau *et al.*, 2010).



Se aplicaron métodos convencionales de LAMP y PCR en tiempo real para detectar el ADN de *T. gondii* en muestras de sangre de 284 cerdos y 292 ovejas. Se obtuvieron resultados positivos con 0,4%, 3,2% y 4,2% de las muestras de cerdo y 3,8%, 17,1% y 17,8% de las muestras de ovejas con análisis de PCR convencional, LAMP y PCR en tiempo real, respectivamente. El ensayo de PCR en tiempo real proporcionó el diagnóstico más sensible de toxoplasmosis, pero el ensayo LAMP tiene potencial como herramienta alternativa para la detección de *T. gondii* en el campo (Lin *et al.*, 2012).

En un estudio comparativo entre LAMP y PCR, para diagnóstico de *Giardia* se obtuvo que la evaluación de sensibilidad del ensayo LAMP fue 10 veces más sensible que PCR concluyendo que LAMP es una técnica de amplificación de ADN rápida, altamente sensible y específica para la detección de *Giardia* (Li *et al.*, 2013)

## 1.9 Epidemiología

La seroprevalencia estimada para *T. gondii* en gatos domésticos (*Felis catus domesticus*), en todo el mundo, es 30-40% (Elmore *et al.*, 2010).

En gatos domésticos, anticuerpos contra *T. gondii* puede detectarse en hasta el 74% de las poblaciones de gatos adultos, dependiendo del tipo de alimentación y si los gatos permanecen dentro o fuera de casa. La seroprevalencia es generalmente más alta en gatos callejeros o salvajes que en gatos que viven en un entorno urbano o suburbano. Sin embargo, entre 9 y 46% de los gatos domésticos en Europa, América del Sur y los Estados Unidos muestran evidencia serológica de exposición pasada al parásito, mientras que las seroprevalencias de las infecciones por *T. gondii* en Asia se estima que oscila entre el 6 y el 9% (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000).

En los Estados Unidos, se estima que aproximadamente el 30% de los gatos, los portadores principales, han sido infectados por *T. gondii* (Weiss y Kim, 2011).

Aproximadamente 1 de cada 4 (más de 60 millones) de personas en los EE. UU. Están infectadas con el parásito, y en el Reino Unido entre el 0,5 y el 1% de las personas se infectan cada año (Elmore *et al.*, 2010).



En Galápagos, no hay estudios publicados sobre la epidemiología de *T. gondii* en especies domésticas o silvestres, con la excepción de un estudio de prevalencia de anticuerpos en el que el 63% de los gatos domésticos evaluados en Puerto Villamil, Isla Isabela tenían anticuerpos demostrables para *T. gondii* (Levy, 2008; Deem, 2010)

Un reciente estudio que muestra la exposición a *T. gondii* en especies aviares endémicas en las islas Galápagos demuestra que *T. gondii* puede ser perjudicial en pingüinos de Galápagos y aves no voladoras, debido a su falta de inmunidad natural diversa (Bollmer, 2007), y es muy probablemente que se deba a una introducción reciente de gatos salvajes que viven en el archipiélago cercanos a colonias de pingüinos (Deem *et al.*, 2010).

En 2017 se realizó un estudio que demostró la presencia de Toxoplasmosis bovina en la provincia de Pichincha, presentando un porcentaje de positivos de 23,45% (Salazar Medina, 2017).

En 2016 se realizó un estudio comparativo de la seroprevalencia de *T. gondii* en la ciudad de Cuenca, donde el resultado con otro estudio realizado en 1994, el porcentaje es significativamente menor en la actualidad (Bojorque, 2016).

La detección de *T. gondii* en muestras de agua por LAMP fue descrito por primera vez en un estudio de Sotiriadou (2008). Posteriormente, se desarrolló y evaluó el ensayo LAMP para la detección de infección por *T. gondii* en muestras de sangre de ratones previamente infectados (Kong *et al.* 2012).

En la industria agrícola, la toxoplasmosis congénita también tiene una importancia económica considerable, ya que es una de las principales causas del aborto, la muerte fetal en todos los tipos de ganado, especialmente en cerdos, cabras y ovejas (Qu, 2013).

### 1.10 Tratamiento

Algunos de los medicamentos disponibles contra el parásito son la Pirimetamina, la Sulfadiazina, la Espiramicina y la Clindamicina, ellos controlan parcialmente la replicación de los taquizoitos pero no evitan la formación de quistes tisulares ni tienen acción sobre los existentes. El tratamiento de esta enfermedad es difícil debido a los



efectos tóxicos de los medicamentos disponibles, y la reinfección se produce rápidamente. En el escenario actual, el desarrollo de nuevos fármacos antitoxoplasma o una vacuna es una alternativa (Bhopale 2003).

### 1.11 Control

Las medidas preventivas dirigidas al hospedero definitivo buscan minimizar su contacto con *T. gondii*, para lo cual es recomendable suministrar a los gatos domésticos solamente alimentos procesados y evitar que salgan fuera de casa. Debe resaltarse que una vez infectado, el gato sólo elimina los ooquistes durante la fase aguda de la infección (unos pocos días), hasta cuando se establece la inmunidad celular específica, por lo que no sería ético deshacerse el gato o recurrir a la eutanasia.

Los dueños de gatos pueden reducir el riesgo de exposición de sus mascotas mediante controles relacionados a: 1) Mantener a todos los gatos en lugares cerrados para que no se infecten al ingerir roedores y aves; 2) No alimentar a los gatos con carne cruda; y 3) El control de posibles hospederos intermediarios como los roedores (Elmore, 2010).

Los humanos contraen toxoplasmosis al comer carne, vegetales o productos lácteos crudos o poco cocidos y contaminados con quistes, o cuando entran en contacto directo con las heces de los gatos mientras limpian la caja de arena (Weiss y Kim, 2011).

Igualmente pueden infectarse con *T. gondii* por manejo de carne cruda o ingerir carne cruda (principalmente cerdo y cordero) que contiene quistes de tejidos o agua o alimentos que contienen ooquistes excretados en las heces de gatos infectados. La mayoría de los individuos se infectan de manera inadvertida, por lo que la ruta específica de transmisión generalmente no se puede establecer. Las variaciones en la seroprevalencia de *T. gondii* parecen correlacionarse con los hábitos de alimentación e higiene de una población (Montoya, 2002).



En términos generales, para prevenir la toxoplasmosis humana se recomienda evitar el consumo de carne cruda o con cocción deficiente; así mismo, los productos cárnicos crudos deben manipularse con guantes, consumir leche pasteurizada. Se deben lavar con abundante agua y soluciones desinfectantes apropiadas las frutas, verduras y demás alimentos destinados a consumo sin cocción. Los propietarios de gatos deben utilizar guantes para manipular las cajas donde duermen y defecan, de igual manera está indicado en ellas el uso de guantes para las labores de jardinería. Finalmente, el control prenatal oportuno y de calidad constituye una de las estrategias más eficaces para reducir los casos de toxoplasmosis congénita.

### 1.12 LAMP

El ensayo LAMP (Amplificación isotérmica mediada por un lazo) del inglés Loop mediated isothermal amplification, fue reportado por primera vez en el año 2000 por Notomi, este ensayo amplifica ADN con alta sensibilidad y especificidad bajo condiciones isotérmicas (60 – 65°C) en un tiempo relativamente corto (30 min a 1h) (Mori y Notomi, 2009).

Su especificidad de amplificación resulta de seis diferentes cebadores (oligonucleótidos), dos cebadores externos: F3, B3; dos cebadores internos FIP, BIP; que tienen secuencias tanto de sentido y antisentido y dos cebadores de lazo LF, LB (Krasteva *et al.*, 2009).

La reacción genera en corto tiempo una cantidad extraordinaria del producto de amplificación el cual está representado por una estructura de múltiples lazos con tallos sobre el ADN blanco (Notomi, 2000).

El enfoque actual en la metodología LAMP se ha desarrollado como un sistema de diagnóstico para ser empleado en laboratorios de recursos limitados en países en desarrollo, donde muchas enfermedades tropicales fatales son endémicas. LAMP mostró una sensibilidad superior a la PCR convencional para la detección de infecciones por *T. gondii* en muestras veterinarias. Una ventaja adicional de LAMP es que la amplificación de ADN se puede detectar fácilmente mediante una inspección





visual de la turbidez o la fluorescencia de la mezcla de reacción, o mediante un turbidímetro en tiempo real (Zhang, 2009).



## CAPITULO II: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la toxoplasmosis es una enfermedad transmitida principalmente por el gato, la demanda de un diagnóstico certero ha crecido por parte de los propietarios de estos. Los gatos han adquirido una mayor acogida por su fácil cuidado y requerimiento de espacio reducido. Desde que se aisló por primera vez el parásito *T. gondii*, se han elaborado varios métodos diagnósticos que ayudaran a identificar la existencia del parásito en animales y humanos.

Los métodos directos para diagnosticar *T. gondii* en el gato, como el examen físico, examen fecal, no son muy confiables, debido a la similitud que tiene *T. gondii* con otras enfermedades parasitarias, el método reacción de cadena polimérsica (PCR) es más específico, pero también más inaccesible y costoso.

Los métodos indirectos como Inmunofluorescencia Indirecta, ELISA, bioquímica del suero, estudios radiográficos y análisis de orina son lo que se pueden utilizar en la clínica diaria pero así mismo están limitados por los costos y su baja especificidad.

LAMP, es una metodología biomolecular que detecta ADN del parásito en muestras de tejidos, aunque no se ha realizado en sangre de gatos, con este trabajo se espera encontrar material genético de *T. gondii* en muestras sanguíneas.

## JUSTIFICACIÓN

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica, por lo que es un problema de salud pública, se sabe por otras investigaciones que existen factores de riesgo que facilitan la propagación y contagio de esta enfermedad, pero se sabe poco sobre métodos de diagnóstico actuales que nos permitan saber con certeza que el animal posee o no la enfermedad.

Existen muchas pruebas para diagnosticar *T. gondii* en gatos, unas más específicas o sensibles que otras, pero ninguna nos puede dar un resultado netamente positivo, ninguna es totalmente confiable ya que el comportamiento del parásito es inconstante. Por cuanto se busca actualizar la metodología diagnóstica de *T. gondii* utilizando un nuevo ensayo (LAMP) que identificará o no material genético de *Toxoplasma gondii* en muestras sanguíneas de gatos que cumplen con los requisitos de riesgo exposición.



## OBJETIVOS

### a. Objetivo General:

Evaluar la aplicación de un ensayo LAMP para la detección de material genético de *Toxoplasma gondii* en muestras sanguíneas de gatos en riesgo de exposición a esta parasitosis.

### b. Objetivos Específicos:

- Obtención de ADN total susceptible de ser amplificado, a partir de sangre de gatos potencialmente expuestos a *Toxoplasma gondii*.
- Aplicar el ensayo LAMP para detección de material genético de *Toxoplasma gondii* en muestras validadas mediante la aplicación del control de proceso.
- Contrastar las frecuencias de muestras positivas al ensayo LAMP con la seroprevalencia previamente estimada en los animales pertenecientes a un grupo de riesgo.

## HIPÓTESIS

Es posible identificar la presencia de material genético de *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre de gatos potencialmente expuestos utilizando la metodología LAMP.



## **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Área de estudio y unidad de análisis**

Las muestras fueron tomadas de gatos que se encontraban en libertad, la mayoría de ellos habitantes de zonas rurales de la ciudad de Cuenca, cumpliendo así con los requisitos planteados en esta investigación: tener contacto directo con el exterior, tener hábitos de caza, no contar con acceso a un arenero para las deposiciones.

La muestra de sangre fue tomada de 100 gatos en riesgo de exposición sin distinción de raza, edad o sexo.

### **3.2. Materiales y Métodos empleados en la realización de la colecta de las muestras sanguíneas para la obtención de ADN de los animales seleccionados.**

Previo a la toma de la muestra, se realizó una encuesta a cada propietario para asegurar que estos cumplan con las características requeridas por la investigación. (Anexo 1).

La metodología realizada en esta investigación fue basada en la ya realizada por (Abril y Siguenza, 2019) variando en algunos aspectos como: tipo de reactivos y cantidades.

#### **3.2.1. Materiales de trabajo**

Mandil

Guantes de látex descartables

Mascarillas

Torniquete

Marcador rotulador de muestras

Tubos con anticoagulante (EDTA)

Tijeras

Torundas de algodón

Catlones tamaño 22G

Gel refrigerante

Cooler



### 3.2.2. Materiales químicos

Alcohol etílico al 70%

### 3.2.3. Procedimiento

**Paso 1.** Se tomó 1ml o 0.5ml de sangre de cada gato, dependiendo del tamaño, de la vena cefálica utilizando un catlon tamaño 22Gx1, la cual fue colocada inmediatamente en el tubo con solución (EDTA).

**Paso 2.** Para el transporte se utilizó un cooler con gel refrigerante para su posterior conservación en refrigeración a (4 °C) por un máximo de 4 días.

**Paso 3.** Estas muestras se trasladaron al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en donde se conservaron a temperaturas de refrigeración (4 °C) para luego ser colocadas en el refrigerador a -80 °C para su posterior procesamiento. Este procedimiento se realizó una vez por semana durante cinco semanas hasta completar las 100 muestras.

## 3.3. Extracción de ADN

El ADN se extrajo utilizando el método descrito por (Abril y Siguenza, 2019).

### 3.3.1. Materiales biológicos

Sangre completa

### 3.3.2. Soluciones

Buffer de lisis (40 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM de NaCl, 8 mM de EDTA, 2% de SDS (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, 53014, EDS y 71725)).

Proteinasa K (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA, 50% de Glicerol, 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, EDS; G5516 y Fisher bioReagents, Cat. no: BP1700)).

Fenol/Cloroformo/A isoamílico 25:24:1 (Sigma, No. cat.: 77619).

Etanol absoluto (Sigma, No. cat.: E7148).

Solución de Etanol al 70% (Sigma, No. cat.: E7148 y W4502).

### 3.3.3. Equipos

Centrifuga

Vortex

Baño María o bloque de calentamiento

Refrigeradora



### 3.3.4. Proceso para la extracción de ADN de muestras de sangre completa

**Paso 1.** Se tomó 200 µl de sangre completa y se le agregó 200 µl de la solución Buffer de lisis y 40 µl de la solución de Proteinasa K, para tener total de 440 µl.

**Paso 2.** Ésta mezcla se colocó a Baño María por 12 a 14 h a una temperatura de 56 °C, posteriormente se le agregó 440 µl de la Solución de Fenol/Cloroformo/A isoamílico 25:24:1 y fueron mezcladas con la ayuda de un vortex por 10 a 15 s.

**Paso 3.** La mezcla fue centrifugada a 14,000 x g por 10 min, posterior a lo anterior se observó que la solución se separó en dos partes, la inferior que corresponde a la mezcla de solventes y la superior acuosa.

**Paso 4.** Se tomó 350 µl aproximadamente de la parte acuosa o sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, al cual se le agregó 875 µl de Etanol absoluto frío (4 °C).

**Paso 5.** Ambas soluciones se mezclaron por inversión y se sometieron a centrifugación a 14,000 x g por 10 min para formar la pastilla de los ácidos nucleicos totales, posterior a la centrifugación se decantó el sobrenadante.

**Paso 6.** Al precipitado o pastillas del tubo se le agregó 500 µl de la Solución de Etanol al 70% fría (4 °C), se lavó la superficie interior del tubo por inversión y posteriormente se volvió a centrifugar en las condiciones arriba descritas.

**Paso 7.** El sobrenadante se decantó nuevamente y el precipitado con el ADN total se dejó secar a temperatura ambiente durante 12-14 h protegido del polvo y la luz directa.

### 3.4 Amplificación del ADN de *Felis catus domesticus* – gato, mediante un ensayo LAMP.

#### 3.4.1 Materiales biológicos

ADN total extraído de las muestras de sangre.

#### 3.4.2. Materiales químicos o reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502).

Buffer de amplificación 10X (20 mM de Tris-HCl, pH 8.8; 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10 mM de KCl; 2 mM de MgSO<sub>4</sub> y 0.1% de Triton X-100) y enzima *Bsm* ADN polimerasa (Thermo scientific, No. cat.: EPO691).

Solución de Betaína 4 M (Sigma, No. cat.: EPO692).

Solución de dNTP´s a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191)

Solución del oligonucleotido FIP CAT 5' AGT AGA AAG GAT GGA GGG AGG AGA



CAT AGC ATT TCC CCG A 3' 50N, D. (Invitrogen) a 100  $\mu$ M.

Solución del oligonucleotido BIP CAT 5' GGA ACT GGC TGA ACA GTA TAC CAA AAA TAG TTA GGT CTA CGG ATG 3' 50N, (Invitrogen) a 100 Mm.

Solución del oligonucleotido F3 CAT (5' GTC CCA TTA ATA ATT GGA GCT 3' 50N, D). (Invitrogen) a 25  $\mu$ M.

Solución del oligonucleotido B3 CAT (5' CAA GAT TGA GGA GAC ACC T 3' 50N, D.) (Invitrogen) a 25 Mm.

Solución del oligonucleótido LF CAT 5' (GTC TAG ATT CAT TAA TGC AGC TGG C 3' 50N. D. INVITROGEN (Invitrogen) a 100  $\mu$ M.

Solución del oligonucleótido LB CAT 5' (GTA AAT TGC GGA CGT GAC ATA GCT GTT TCC TGT GTG 3' 50N. D. (Invitrogen) a 100  $\mu$ M.

### 3.4.3. Materiales de laboratorio y equipos

Termociclador y/o baño María

Tubos de PCR

Set de micropipetas (1 ml, 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l con puntas estériles)

| Reactivo:                     | Concentración |             | Volumen de la premezcla: |
|-------------------------------|---------------|-------------|--------------------------|
|                               | inicial:      | final:      |                          |
| Agua grado biología molecular | No aplica     | No aplica   | 58.5 $\mu$ l             |
| Buffer de amplificación 10X   | 10X           | 1X          | 12.5 $\mu$ l             |
| dNTP`s                        | 10 mM         | 1.4 mM      | 3.5 $\mu$ l              |
| Oligonucleótido FIP-CAT       | 100 $\mu$ M   | 1.6 $\mu$ M | 2 $\mu$ l                |
| Oligonucleótido BIP-CAT       | 100 $\mu$ M   | 1.6 $\mu$ M | 2 $\mu$ l                |
| Oligonucleótido F3-CAT        | 25 $\mu$ M    | 0.2 $\mu$ M | 1 $\mu$ l                |
| Oligonucleótido B3-CAT        | 25 $\mu$ M    | 0.2 $\mu$ M | 1 $\mu$ l                |
| Oligonucleótido LF-CAT        | 100 $\mu$ M   | 0.8 $\mu$ M | 1 $\mu$ l                |
| Oligonucleótido LB-CAT        | 100 $\mu$ M   | 0.8 $\mu$ M | 1 $\mu$ l                |
| Betaina                       | 4 M           | 800 mM      | 25 $\mu$ l               |
| <b>Volumen final</b>          | -----         | -----       | 107.5 $\mu$ l            |



### 3.4.4. Procedimiento de la amplificación de ADN de *T. gondii* mediante el ensayo de LAMP

**Paso 1.** Previo a realizar el ensayo de amplificación LAMP se procedió a realizar un control de proceso, para detectar ADN total, esto con el objetivo de validar que el protocolo de extracción de ADN de la sangre fuera adecuado, utilizando oligonucleótidos específicos para el gato y los otros reactivos antes mencionados y se siguió los pasos para la amplificación del control de proceso detallado anteriormente.

**Paso 2.** Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de *T. gondii* con todos los reactivos antes descritos con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (10 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total.

**Paso 3.** La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a 14,000 x g durante 15 a 20 s.

**Paso 4.** Se marcaron los tubos de PCR (200 µl) y se les colocó 10 µl de la premezcla y se les adicionó 2 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

**Paso 5.** Los tubos con las reacciones de amplificación (12 µl) se colocaron en el termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturalización del ADN total y el alineamiento de los oligonucleotidos a la secuencia diana de gato a amplificar:

| Paso:        | Desnaturalización: | Alineamiento: |
|--------------|--------------------|---------------|
| Tiempo:      | 5 min              | 5 min         |
| Temperatura: | 94 °C              | 4 °C          |

**Paso 6.** Finalizada este tiempo incubación, se sacaron los tubos de PCR con las reacciones (200 µl) del termociclador y se añadió la enzima *Bsm* ADN polimerasa para que se suceda la amplificación del material genético:

| Reactivo:                        | Concentración |            | Volumen por reacción: |
|----------------------------------|---------------|------------|-----------------------|
|                                  | inicial:      | final:     |                       |
| Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa | 8 U/ µl       | 0.32 U/ µl | 0.5 µl                |
| Volumen final:                   | -----         | -----      | 10 µl                 |





**Paso 7.** Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el termociclador o en el baño María.

| <b>Paso:</b>        | <b>Extensión:</b> | <b>Inactivación:</b> |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| <b>Tiempo:</b>      | 60 min            | 10 min               |
| <b>Temperatura:</b> | 60 °C             | 80 °C                |

### **3.5 Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio**

#### **3.5.1. Materiales biológicos**

Productos amplificados mediante el ensayo de LAMP

#### **3.5.2. Materiales químicos y reactivos**

Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-500)

Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-Acetato; 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045.)

Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, Cat. no.: E7637)

Solución Buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516).

Solución con el marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen, Cat no: 15628050).

#### **3.5.3. Materiales de laboratorio y equipos**

Micropipetas (10, 100 y 1000 µl).

Puntas para las micropipetas.

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.

Tubos de PCR.

Vortex.

Cámara de electroforesis horizontal.

Horno de microondas.

Balanza analítica.

Potenciómetro (pHmetro).



Transiluminador.

Fotodocumentador.

Computadora de escritorio.

#### **3.5.4. Procedimiento de la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel al 1.5% de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio**

**Paso 1.** Se pesó 1.08 g de agarosa y se adicionó a un matraz Erlenmeyer con 90 ml de Solución buffer TAE 1X, la agarosa se disolvió por calor con ayuda de un horno de microondas.

**Paso 2.** Una vez disuelta completamente la agarosa en la solución TAE se dejó enfriar y se adicionó 3  $\mu$ l de una Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml. Se mezcló completamente, y la mezcla se vació en el molde para el gel y se colocó inmediatamente dos peines para formar dos filas de pozos.

**Paso 3.** Una vez gelificada la solución de agarosa, el gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se adicionó la cantidad de Solución buffer TAE 1X necesaria para cubrir completamente el gel.

**Paso 4.** Posteriormente se cargaron los 13  $\mu$ l (10  $\mu$ l de la reacción de PCR más 3  $\mu$ l de la Solución buffer de carga para ADN 6X) de cada una de las muestras en cada pocillo del gel, y en uno de los pocillos de cada fila se colocó 6  $\mu$ l del marcador de peso molecular de ADN (500 ng totales).

**Paso 5.** Concluido el cargado de las muestras y el marcador de peso, se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se conectó a la corriente eléctrica a un voltaje de 90 por 30 a 45 min.

**Paso 6.** Una vez separado o resueltos los productos de PCR, se visualizaron en el transiluminador y con ayuda del fotodocumentador se tomó una imagen del mismo.

**Paso 7.** Se consideró como una amplificación positiva la observación de una banda de aproximadamente 808 bp.

Todas las muestras (positivas) validadas con este ensayo fueron sometidas a la detección de material genético de *T. gondii* en gato con el ensayo de LAMP.

Con el ensayo LAMP se consideró muestra positiva aquella en la que se observó el



patrón de segmentos de ADN multimérico de *T. gondii* amplificado.

### **3.6 Análisis estadístico.**

Una vez obtenidos los resultados del ensayo LAMP, aplicados a las 100 muestras sanguíneas de gatos para la detección *T. gondii* más los resultados ya existentes del ensayo con Inmunofluorescencia Indirecta a 300 gatos, se realizó un estudio comparativo en el cual se utilizó la prueba de Diferencia de proporciones.

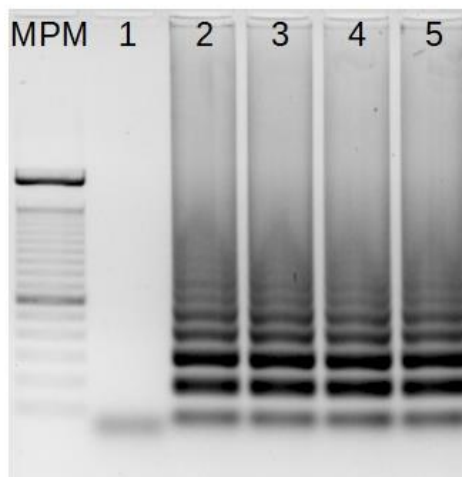
## CAPITULO IV: RESULTADOS

### 4.1 Obtención de datos

Durante el proceso se obtuvieron 100 muestras de sangre completa de gatos a los cuales se les realizó a cada uno de sus propietarios una encuesta, en donde debían cumplir con los parámetros requeridos para la investigación (Anexo 1) y resultados de la encuesta (Anexo 2).

### 4.2 Control de Proceso

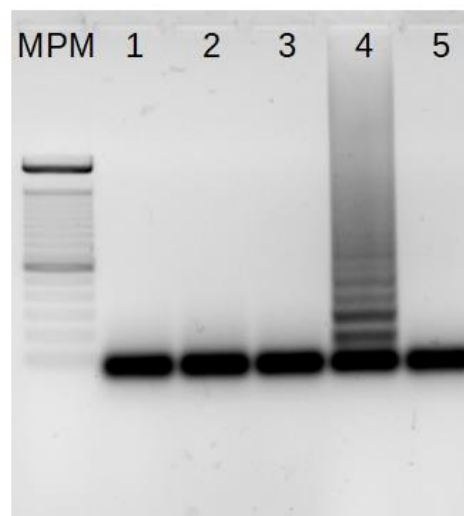
Después de la extracción de ADN de cada muestra se realizó un control de proceso para determinar si las muestras de ADN total eran viables o no para realizar el ensayo de amplificación y detección de material genético de *T. gondii*: como resultado se obtuvo que 100 de las 100 (100%) muestras fueron validadas para poder continuar con el procedimiento (Figura 1).



**Figura 1:** Ejemplo de electroforesis de los ensayos LAMP para el control de proceso. Carril MPM, Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen Cat. no. 15628050); Carril 1, Control negativo; Carriles 2, 3, 4 y 5, muestras de ADN. (Autor)

#### 4.3. Ensayo de LAMP para la detección de material genético de *T.gondii* en las muestras de sangre total

Con las muestras de sangre validadas mediante el proceso de Control de proceso se realizó un ensayo de LAMP para la amplificación de ADN de *T. gondii* en las 100 muestras de sangre de gato, como resultado se encontró 1 muestra positiva (1%) (Figura 2).



**Figura 2:** Ejemplo de electroforesis de los ensayos LAMP para la detección de material genético de *Toxoplasma gondii*. Carril MPM, Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen Cat. no. 15628050); Carril 1, Control negativo; Carriles 2, 3, 4 y 5, muestras de ADN número 47, 48, 49 y 50. Se observa el patrón de amplificación esperado en el caso de la muestra 49 (Autor).

#### 4.4 Comparación entre los ensayos LAMP e Inmunofluorescencia Indirecta mediante la prueba de Diferencia de proporciones

A pesar que las muestras de cada ensayo no correspondían a los mismos individuos, y el número del ensayo LAMP era considerablemente menor, las muestras correspondían a un mismo grupo de riesgo, los casos positivos del ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta fueron casos que calzaban con las mismas características que los casos del ensayo LAMP.



Para este ensayo se utilizó la prueba de Diferencia de proporciones que permite contrastar dos muestras aleatorias e independientes como son los estudios de LAMP e Inmunofluorescencia Indirecta. Con los resultados del análisis estadístico se obtuvo que hay una diferencia significativa entre los dos ensayos con un resultado de  $p = 0,0015$  (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resultados de la comparación estadística mediante la prueba de Diferencia de proporciones.

| MÉTODOS                          | N   | positivos | %     | significancia |
|----------------------------------|-----|-----------|-------|---------------|
| LAMP                             | 100 | 1         | 1,00  | 0, < 0,05     |
| INMUNOFLUORESCENCIA<br>INDIRECTA | 300 | 48        | 16,00 |               |



## CAPITULO V: DISCUSIÓN

En esta investigación se logró cumplir con el objetivo de obtener ADN de muestras sanguíneas de gatos expuestos a condiciones que favorecen la infección de *T. gondii*. También estas muestras fueron validadas mediante un Control de Proceso donde se verificó que el 100% las muestras fueron correctamente tomadas, almacenadas y conservadas para su posterior extracción de ADN, garantizando así que puedan ser utilizadas para el ensayo.

Cada individuo del que fue tomada la muestra debía cumplir las características de: tener acceso con el medio ambiente exterior, tener hábitos de caza y no tener acceso a un arenero, lo que concuerda con lo dicho por Heezik "La prevalencia de *T. gondii* aumenta en gatos que salen a cazar para alimentarse, por esta razón es mayor en gatos que viven en libertad en comparación con los gatos domésticos" (van Heezik *et al.* 2010).

A pesar de que la sangre de los individuos que se utilizaron en esta investigación correspondía a animales con riesgo de exposición, los resultados obtenidos una vez aplicada la metodología LAMP, no tuvieron significancia, ya que sólo el 1% arrojó un resultado positivo.

Aunque la metodología LAMP se ha utilizado en varias investigaciones para una cantidad muy variada de enfermedades, no existe un estudio específico que garantice que podamos encontrar material genético de *T. gondii* en muestras sanguíneas de gatos, aunque estos estén expuestos a todas las características antes mencionadas. LAMP es una metodología que ha dado muy buenos resultados en investigaciones relacionadas con *T. gondii* en donde se han utilizado muestras cosechadas de cerebro, corazón, hígado, bazo y riñón de ratones previamente inoculados con el parásito. (Krasteva *et al.* 2009).

Los factores que probablemente generan inconsistencia entre los resultados de esta investigación y los obtenidos en otras investigaciones pueden ser debido a que la permanencia del parásito en sangre es muy corta antes de diseminarse a los tejidos y órganos del hospedador, por lo cual cabe no descartar que el animal haya estado en contacto con el parásito, sino que el tipo de muestra no es el más adecuado para el tipo de metodología (LAMP) utilizados en esta investigación.



Puesto que no se encontró estudios específicos en sangre de gato utilizando la metodología LAMP, si existen otros estudios realizados en sangre en humanos en donde se comparó las técnicas LAMP y PCR utilizando 110 muestras sanguíneas en niños con leucemia que previamente salieron positivos a pruebas serológicas con anticuerpos IgM e IgG a *T. gondii* donde se encontró un 92% de positivos para LAMP y un 82% de positivos para PCR (Fallahi *et al.* 2014).

Se han realizado otros estudios utilizando muestras sanguíneas en humanos que previamente fueron diagnosticados con *T. gondii*, en donde de la misma manera se obtuvo una alta sensibilidad y especificidad usando LAMP frente a PCR (Lau *et al.* 2010).

Nos da un indicio que probablemente antes de utilizar esta metodología se deba como primer paso hacer un diagnóstico previo de la enfermedad utilizando pruebas serológicas donde indiquen la presencia de anticuerpos IgM e IgG para *T. gondii*. O incluso someter las muestras a la metodología directa PCR para obtener mayor posibilidad de contar con resultados positivos.

Otro estudio nos indica la utilización de muestras de cerebro de pacientes felinos en donde se detectaron anticuerpos específicos de *T. gondii* utilizando la prueba indirecta IFAT como primero paso, para luego utilizar la prueba directa PCR que arrojó un 57% de positividad para *T. gondii* (Montoya *et al.* 2009).

Con esto no se debería descartar la positividad de las muestras, puesto que, aunque no se encontró un resultado satisfactorio en sangre, se puede utilizar otro tipo de muestra que corresponda al mismo individuo como cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñones, diafragma, bazo y nódulos linfáticos como indica (Dubey, 1997) en donde se utilizó gatos infectados naturalmente.





## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Se obtuvo exitosamente material genético de las muestras de sangre, con lo que se logró amplificar el ADN de *T. gondii*. El resultado nos indica que a pesar de que las muestras correspondían a individuos expuestos a factores de riesgo de contraer la enfermedad, no fueron concluyentes, por lo que de las 100 muestras solo una resultó positiva.

## CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

Para futuros estudios se debería tomar en cuenta otro tipo de muestras, como cerebro, músculo esquelético, bazo, corazón, pero que los sujetos a analizar sean estrictamente gatos que vivan en el exterior y mantengan contacto constante con el medio ambiente y también tengan la posibilidad de cazar.

También se debería incluir dentro del estudio hacer un análisis previo a cada muestra verificando que tenga anticuerpos específicos IgM e IgG para *T. gondii*, así de esta manera se pueda encontrar mayor cantidad de resultados positivos, con certeza de que las muestras fueron ya evaluadas y el animal en verdad estuvo expuesto al parásito.

Así mismo también se pueda evaluar conjuntamente con un ensayo PCR, ya que la mayoría de bibliografía hace mención a la comparación de estos dos estudios (PCR y LAMP).



## BIBLIOGRAFÍA

- Abril, V.M.E. y Siguenza, G.N.M., 2019. "Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro)". [en línea]. S.I.: Universidad de Cuenca. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31739/1/Trabajo%20de%20titulaci%c3%b3n.pdf>.
- Bhopale, G., 2003. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes and Infection*, vol. 5, no. 5, pp. 457-462. DOI 10.1016/S1286-4579(03)00048-0.
- Black, M.W. y Boothroyd, J.C., 2000. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 3, pp. 607-623. DOI 10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000.
- Bojorque P., 2016. Actualización de la seroepidemiología de *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Cuenca. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Deem, S.L., Merkel, J., Ballweber, L., Vargas, F.H., Cruz, M.B. y Parker, P.G., 2010. Exposure to *Toxoplasma gondii* in *Galapagos Penguins* (*Spheniscus mendiculus*) and Flightless Cormorants (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 46, no. 3, pp. 1005-1011. DOI 10.7589/0090-3558-46.3.1005.
- Dubey, J.P., 1997. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology*, vol. 115, no. 1, pp. 15-20. DOI 10.1017/S0031182097008949.
- Dubey, J.P. y Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9781420092363 1420092367. SF809.T6 D83 2010
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S. y Speer, C.A., 1998a. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, no. 2, pp. 267-299. ISSN 0893-8512, 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.11.2.267.
- Dubey, J.P., SU, C., Cortés, J.A., Sundar, N., Gomez-Marin, J.E., Polo, L.J., Zambrano, L., Mora, L.E., Lora, F., Jimenez, J., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., Zhang, X., Nieto, A. y Thulliez, P., 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Veterinary Parasitology*, vol. 141, no. 1-2, pp. 42-47. ISSN 03044017. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.04.037.
- Durlach y Martino, 2009. *Toxoplasma gondii*: Infección en Perros y Gatos. 2009. pp. 11.



- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S. y Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends in Parasitology, vol. 26, no. 4, pp. 190-196. ISSN 14714922. DOI 10.1016/j.pt.2010.01.009.
- Fallahi, S., Seyyed Tabaei, S.J., Pournia, Y., Zebardast, N. y Kazemi, B., 2014. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and nested-PCR assay targeting the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* in blood samples of children with leukaemia. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 79, no. 3, pp. 347-354. ISSN 0732-8893. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.014.
- Giraldo Restrepo M., 2008. Toxoplasmosis. Medicina & Laboratorio. Julio 2008, vol. Medicina & Laboratorio, Volumen 14, Números 7-8, 2008, pp. 17. Module 12 (Parasitology), number 5. Editora Médica Colombiana S.A., 2008 ©
- Grandía G., R., Entrena G., Á. y Cruz H., J., 2013. Toxoplasmosis en *Felis catus domesticus*: etiología, epidemiología y Enfermedad. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, vol. 24, no. 2, pp. 131-149. ISSN 1609-9117.
- Howe, D.K. y Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. Journal of Infectious Diseases, vol. 172, no. 6, pp. 1561-1566. ISSN 0022-1899, 1537-6613. DOI 10.1093/infdis/172.6.1561.
- Kim, K. y Weiss, L.M., 2008. Toxoplasma: the next 100years. Microbes and Infection, vol. 10, no. 9, pp. 978-984. ISSN 12864579. DOI 10.1016/j.micinf.2008.07.015.
- Kong, Q.-M., Lu, S.-H., Tong, Q.-B., Lou, D., Chen, R., Zhen, B., Kumaga, T., Wen, L.-Y., Ohta, N. y Zhou, X.-N., 2012b. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. Parasites & Vectors, vol. 5, no. 1, pp. 2. ISSN 1756-3305. DOI 10.1186/1756-3305-5-2.
- Krasteva, D., Toubiana, M., Hartati, S., Kusumawati, A., dubremetz, J.F. y Widada, J.S., 2009. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. Veterinary Parasitology, vol. 162, no. 3-4, pp. 327-331. ISSN 03044017. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.03.014.
- Lau, Y.L., Meganathan, P., Sonaimuthu, P., Thiruvengadam, G., Nissapatorn, V. y CHEN, Y., 2010a. Specific, Sensitive, and Rapid Diagnosis of Active Toxoplasmosis by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Using Blood Samples from Patients. Journal of Clinical Microbiology, vol. 48, no. 10, pp. 3698-3702. ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.00462-10.
- Li, J., Wang, P., Zhang, A., Zhang, P., Alsarakibl, M. y Li, G., 2013. Sensitive and rapid detection of *Giardia lamblia* infection in pet dogs using loop-mediated isothermal amplification. En: PMID: 23710094PMCID: PMC3662070, The Korean Journal of Parasitology, vol. 51, no. 2, pp. 237-241. ISSN 1738-0006. DOI 10.3347/kjp.2013.51.2.237.



- Lin, Z., Zhang, Y., Zhang, H., Zhou, Y., Cao, J. y Zhou, J., 2012. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology*, vol. 185, no. 2-4, pp. 296-300. ISSN 03044017. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.10.016.
- Martínez-Fernández, A.R., 2002. *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill. ISBN 8448602366 9788448602369.
- Montoya, A., Miró, G., Mateo, M., Ramírez, C. y Fuentes, I., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology*, vol. 160, no. 1, pp. 159-162. ISSN 0304-4017. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.10.029.
- Montoya, J. y Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet*, vol. 363, no. 9425, pp. 1965-1976. ISSN 01406736. DOI 10.1016/S0140-6736(04)16412-X.
- Montoya, J.G., 2002. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, no. s1, pp. S73-S82. ISSN 0022-1899, 1537-6613. DOI 10.1086/338827.
- Mori, Y. y Notomi, T., 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 15, no. 2, pp. 62-69. ISSN 1341321X. DOI 10.1007/s10156-009-0669-9.
- Notomil, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 12, pp. 63e-663. ISSN 13624962. DOI 10.1093/nar/28.12.e63.
- Park, C.-H., Ikadal, H., Yoshida, E., Isomura, H., Inukai, H. y Oyamada, T., 2007. Cutaneous Toxoplasmosis in a Female Japanese Cat. *Veterinary Pathology*, vol. 44, no. 5, pp. 683-687. ISSN 0300-9858, 1544-2217. DOI 10.1354/vp.44-5-683.
- Qu, D., Zhou, H., Han, J., Tao, S., Zhen, B., Chi, N., Su, C. y Du, A., 2013. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in pork. *Veterinary Parasitology*, vol. 192, no. 1-3, pp. 98-103. ISSN 03044017. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.10.010.
- Salazar Medina J., 2017. Determinación de la presencia de anticuerpos de *Toxoplasma gondii* en suero de bovinos de la provincia de Pichincha. [en línea]. S.l.: Universidad Central del Ecuador. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13173/1/T-UCE-0014-044-2017.pdf>.
- Sotiriadou, I. y Karanis, P., 2008. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings



- by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 62, no. 4, pp. 357-365. ISSN 07328893. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.009.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R. y Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, vol. 30, no. 12-13, pp. 1217-1258. ISSN 00207519. DOI 10.1016/S0020-7519(00)00124-7.
- Tian, A.-L., Gu, Y.-L., Zhou, N., Cong, W., Li, G.-X., Elsheikha, H.M. y Zhu, X.-Q., 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in arthritis patients in eastern China. *Infectious Diseases of Poverty* [en línea], vol. 6, no. 1. [Consulta: 11 diciembre 2018]. ISSN 2049-9957. DOI 10.1186/s40249-017-0367-2. Disponible en: <http://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-017-0367-2>.
- Van Heezik, Y., Smyth, A., Adams, A. y Gordon, J., 2010. Do domestic cats impose an unsustainable harvest on urban bird populations? *Biological Conservation*, vol. 143, no. 1, pp. 121-130. ISSN 00063207. DOI 10.1016/j.biocon.2009.09.013.
- Weiss, L.M. y Dubey, Jitender.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no. 8, pp. 895-901. ISSN 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2009.02.004.
- Weiss, L.M. y KIM, K., 2011. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexa: perspectives and methods [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 13 diciembre 2018]. ISBN 9780080475011 0080475019. Disponible en: [https://nls.ldls.org.uk/welcome.html?ark:/81055/vdc\\_100027320021.0x000001](https://nls.ldls.org.uk/welcome.html?ark:/81055/vdc_100027320021.0x000001)
- Zhang, H., Thekisoe, O.M.M., Aboge, G.O., Kyan, H., Yamagishi, J., Inoue, N., Nishikawa, Y., Zakimi, S. y Xuan, X., 2009. *Toxoplasma gondii*: Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Experimental Parasitology*, vol. 122, no. 1, pp. 47-50. ISSN 00144894. DOI 10.1016/j.exppara.2009.01.012.



## ANEXOS

### Anexo 1. Cuestionario al propietario

|                 |  |
|-----------------|--|
| FICHA MÉDICA #  |  |
| PROPIETARIO     |  |
| DIRECCIÓN       |  |
| TELÉFONO        |  |
| NOMBRE DEL GATO |  |
| RAZA            |  |
| SEXO            |  |
| EDAD            |  |

| PREGUNTA   | SI     | NO         |
|--|--------|------------|
| Su gato tiene acceso al exterior?                  |        |            |
| Su gato se alimenta de comida casera o balanceado? | casera | balanceado |
| Su gato utiliza arenero?                           |        |            |

## ANEXO 2.

### Resultados de la encuesta

| Número | Nombre   | Acceso Exterior | Usa Arenero | Tipo alimento |
|--------|----------|-----------------|-------------|---------------|
| 1      | Luna     | si              | si          | balanceado    |
| 2      | Perla    | si              | si          | balanceado    |
| 3      | Manuela  | si              | si          | balanceado    |
| 4      | Chiquita | si              | no          | mix           |
| 5      | Peludita | si              | no          | mix           |
| 6      | Suco     | si              | no          | mix           |
| 7      | Cereza   | si              | no          | mix           |
| 8      | Mía      | si              | no          | mix           |
| 9      | Mishica  | si              | no          | mix           |
| 10     | Negra    | si              | no          | mix           |
| 11     | Tigra    | si              | no          | mix           |
| 12     | Cielo    | si              | no          | mix           |
| 13     | Colita   | si              | no          | mix           |
| 14     | Pantera  | si              | no          | mix           |
| 15     | Gaby     | si              | Si          | balanceado    |
| 16     | Gaby     | si              | si          | balanceado    |
| 17     | Tuco     | si              | no          | mix           |
| 18     | Martin   | si              | no          | mix           |
| 19     | Suco     | si              | no          | mix           |
| 20     | Jima     | si              | Si          | mix           |



|    |             |    |    |            |
|----|-------------|----|----|------------|
| 21 | Jima        | si | Si | mix        |
| 22 | Jima        | si | si | mix        |
| 23 | Froster     | si | si | balanceado |
| 24 | Merlina     | si | no | mix        |
| 25 | Tina        | si | no | mix        |
| 26 | Gatubela    | si | no | mix        |
| 27 | Dalia       | si | Si | balanceado |
| 28 | Moreno      | si | si | balanceado |
| 29 | Julieta     | si | si | mix        |
| 30 | Preta       | si | si | mix        |
| 31 | Felicia     | si | si | balanceado |
| 32 | Lorena      | si | si | balanceado |
| 33 | Minina      | si | si | balanceado |
| 34 | Puffy       | si | si | balanceado |
| 35 | Karina      | si | si | balanceado |
| 36 | Florinda    | si | si | balanceado |
| 37 | Rubí        | si | si | balanceado |
| 38 | Mini        | si | no | balanceado |
| 39 | Memo        | si | si | balanceado |
| 40 | Cheeza      | si | si | balanceado |
| 41 | Canela      | si | si | balanceado |
| 42 | Paisley     | si | si | balanceado |
| 43 | Filipo      | si | si | balanceado |
| 44 | Felix       | si | si | balanceado |
| 45 | Blue        | si | si | balanceado |
| 46 | Kitty       | si | no | mix        |
| 47 | Linda       | si | no | mix        |
| 48 | Tigre       | si | no | mix        |
| 49 | Tomás       | si | no | balanceado |
| 50 | Michi       | si | no | mix        |
| 51 | Sasy        | si | no | mix        |
| 52 | José        | si | no | mix        |
| 53 | Chilindrina | si | no | mix        |
| 54 | Pelusa      | si | no | Mix        |
| 55 | Panchito    | si | no | Mix        |
| 56 | Rebeca      | si | no | Mix        |
| 57 | Cleo        | si | si | Balanceado |
| 58 | Pepe        | si | no | Mix        |
| 59 | Nieve       | si | no | Mix        |
| 60 | Azúcar      | si | no | Mix        |
| 61 | Nina        | si | no | Mix        |
| 62 | SN          | si | no | Mix        |
| 63 | SN          | si | no | Mix        |
| 64 | Félix       | si | no | Mix        |
| 65 | García      | si | no | Mix        |
| 66 | Lila        | si | no | Mix        |



|     |          |    |    |            |
|-----|----------|----|----|------------|
| 70  | Yuya     | Si | No | Mix        |
| 71  | Motas    | Si | No | Mix        |
| 72  | Pepa     | Si | No | Mix        |
| 78  | Mishifu  | Si | No | Mix        |
| 73  | Ramón    | Si | No | Mix        |
| 74  | Solita   | Si | No | Mix        |
| 75  | Pepe     | Si | No | Mix        |
| 76  | Jorge    | Si | No | Mix        |
| 77  | Mini     | si | No | Mix        |
| 79  | SN       | si | no | Mix        |
| 80  | Padre    | si | no | Mix        |
| 81  | Padre    | si | no | Mix        |
| 82  | Padre    | si | no | Mix        |
| 83  | Padre    | si | no | Mix        |
| 84  | Luis     | si | no | Mix        |
| 85  | Amable   | si | no | Mix        |
| 86  | Rosa     | si | no | Mix        |
| 87  | Rosa     | si | no | Mix        |
| 88  | SN       | si | no | Mix        |
| 89  | SN       | si | no | Mix        |
| 90  | SN       | si | no | Mix        |
| 91  | SN       | si | no | Mix        |
| 92  | SN       | si | no | Mix        |
| 93  | SN       | si | no | Mix        |
| 94  | SN       | si | no | Mix        |
| 95  | SN       | si | no | Mix        |
| 96  | Negro    | Si | no | Mix        |
| 97  | Luis     | Si | no | Mix        |
| 98  | Pluma    | Si | No | Mix        |
| 99  | Paquita  | si | no | Mix        |
| 100 | Toby     | si | Si | Balanceado |
| 101 | Paca     | Si | Si | Balanceado |
| 102 | Negra    | si | si | Balanceado |
| 103 | Princesa | si | si | Balanceado |
| 104 | Choco    | si | no | Mix        |