Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

Identificación de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* mediante dos métodos serodiagnósticos *in house* en felinos (*Felis catus domesticus*)

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autores:
Sebastián Andres Estevez Bustos
Jonatan Fernando Tenezaca Morocho

Director:
Antonio Javier Vallecillo Maza
ORCID: 0000-0001-9141-0176

Cuenca, Ecuador

2025-07-10

Resumen

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario, considerado como el agente responsable de la Toxoplasmosis, cuya enfermedad zoonótica representa una preocupación significativa en la salud humana y animal. Los gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) desempeñan un papel crucial en la transmisión de la infección, siendo los únicos hospedadores definitivos con la capacidad de replicación sexual. El presente estudio tuvo como objetivo la detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en felinos posiblemente infectados, para lo cual se recogieron un total de 85 muestras sanguíneas de gatos residentes de la ciudad de Cuenca, estas se analizaron mediante las técnicas de diagnóstico Dot-blot y ELISA indirecto, con el uso de la proteína de superficie recombinante TgSAG2 en ambos ensayos. Los resultados de los sueros analizados mostraron la presencia de anticuerpos para Dot-blot en 6/85 (7,06 %) y ELISA indirecto en 10/85 (11,76 %) del número total de muestras recolectadas, respectivamente. Los resultados obtenidos con la prueba de McNemar indican que no hay una diferencia estadística significativa al comparar los dos ensayos serodiagnósticos, esto sugiere que ambos métodos son igual de útiles en la identificación de anticuerpos generados en contra de *Toxoplasma gondii*.

Palabras del clave del autor: toxoplasmosis, gatos, antígeno, TgSAG2, anticuerpos

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: https://dspace.ucuenca.edu.ec/

Abstract

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite, considered the responsible agent of Toxoplasmosis, whose zoonotic disease represents a significant concern for human and animal health. Domestic cats (*Felis catus domesticus*) play a crucial role in the transmission of the infection, being the only definitive hosts with the capacity for sexual replication. The present study aimed to detect anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in possibly infected felines, for which a total of 85 blood samples were collected from cats - residing in the city of Cuenca. These were analyzed using the diagnostic techniques Dot-blot and indirect ELISA, with the use of the recombinant surface protein TgSAG2 in both assays. The results of the analyzed sera showed the presence of antibodies for Dot-blot in 6/85 (7,06 %) and indirect ELISA in 10/85 (11,76 %) of the total number of samples collected, respectively. The results obtained with the McNemar test indicate that there is no statistically significant difference when comparing the two serodiagnostic assays, suggesting that both methods are equally useful in identifying antibodies generated against *Toxoplasma gondii*.

Author Keywords: toxoplasmosis, cats, antigen, TgSAG2, antibodies

The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: https://dspace.ucuenca.edu.ec/

Índice de contenido

Resumen……2
Abstract…… 3
Índice de contenido……4
Índice de figuras…… 6
Índice de tablas……7
Dedicatorias……8
Agradecimientos……10
Listado de abreviaturas…… 12
1. Introducción……13
2. Objetivos……14
2.1. Objetivo general……14
2.2. Objetivos específicos……14
2.3. Pregunta de investigación……14
3. Revisión de literatura…… 15
3.1. Toxoplasmosis……15
3.2. Agente zoonótico……15
3.3. Datos mundiales……15
3.4. Datos de seroprevalencia en el Ecuador……16
3.5. Agente etiológico……16
3.5.1. Taxonomía……17
3.5.2. Morfología…… 17
3.5.3. Ooquiste……17
3.5.4. Taquizoíto ……18
3.5.5. Bradizoítos y quistes tisulares…… 19
3.5.6. Ciclo biológico…… 19
3.5.6.1. Ciclo de vida en el hospedero definitivo…… 20
3.5.6.2. Ciclo biológico de *T. gondii* en el hospedero intermediario……21
3.5.6.3. Diversidad genética y epidemiologia de la Toxoplasmosis…… 22
3.5.6.3.1 Signos clínicos 23
3.6. Modos de infección…… 24
3.6.1. Transmisión oral…… 24
3.7. Transmisión fecal…… 24
3.8. Transmisión hacia humanos……25
3.9. Diagnóstico de la Toxoplasmosis…… 26
3.9.1. Inmunoensayo ELISA……27
3.9.2. ELISA directo……27
3.9.3. ELISA indirecto…… 27
3.9.4. ELISA sandwich…… 27
3.9.5. Inmunoensayo Dot-blot…… 28
3.10. Antígenos recombinantes…… 28
3.10.1. Proteína TgSAG2…… 29
4. Materiales y métodos…… 30
4.1. Descripción del estudio…… 30
4.2. Actividad 1. Colecta de muestras serológicas de felinos domésticos *(Felis catus domesticus)* …… 30
4.2.1. Materiales…… 30
4.2.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio…… 30
4.2.1.1.2. Materiales biológicos…… 31
4.2.1.1.3. Reactivos y soluciones…… 31
4.2.1.2. Colecta de muestras serológicas de felinos (*Felis catus domesticus*)……31

4.3. Actividad 2. Ensayos de Dot-blot para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos…… 31
4.3.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio…… 31
4.3.1.1.2. Materiales biológicos…… 31
4.3.1.1.3. Reactivos y soluciones…… 32
4.3.1.2. Procedimiento de Dot-blot para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos…… 32
4.4. Actividad 3. Ensayos de ELISA indirecto para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos…… 33
4.4.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio…… 33
4.4.1.1.2. Materiales biológicos…… 33
4.4.1.1.3. Reactivos y soluciones…… 34
4.4.2. Procedimiento de ensayos de ELISA indirecto para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos…… 34
4.5. Actividad 4. Presentación y análisis de los datos *(Felis catus domesticus)*…… 35
4.5.1. Materiales 35
4.5.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio……..35
4.5.1.2. Procedimiento para la presentación y análisis de los datos…… 35
5. Resultados…… 36
5.1. Identificación en muestras de sueros de felinos anticuerpos anti-TgSAG2 de *T. gondii* de ensayo Dot-blot…… 36
5.2. Identificación en muestras de sueros de felinos anticuerpos anti-TgSAG2 de *T. gondii* de ensayo ELISA indirecto…… 37
5.3. Contraste de resultados entre Dot-blot y ELISA indirecto…… 38
6. Discusión…… 40
7. Conclusiones…… 42
8. Recomendaciones…… 43
9. Bibliografía…… 44
10. Anexos…… 49

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de ooquiste de T. gondii..... 18
Figura 2. Micrografía electrónica de taquizoíto intracelular..... 18
Figura 3. Quiste tisular de T. gondii..... 19
Figura 4. Ciclo biológico de T. gondii..... 21
Figura 5. Fases infectantes del parásito T. gondii y su modo de transmisión en diferentes hospederos..... 22
Figura 6. Manifestaciones clínicas en los humanos causados por la infección por T. gondii y su repercusión en varios órganos..... 25
Figura 7. Ensayo Dot-blot in house empleado para la evaluación de la presencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii..... 36
Figura 8 Diagrama de caja del ensayo Dot-blot..... 37
Figura 9 Diagrama de caja del ensayo ELISA indirecto..... 38

Índice de tablas

Tabla 1. Tabla de valores positivos y negativos de ensayos ELISA indirecto y Dot-blot.……..…….… 39

Dedicatorias

Dedico este proyecto de titulación a Dios y a mis seres queridos, a todos quienes formaron parte de este maravilloso viaje universitario.

A mi mami Jenny, por ser uno de los pilares fundamentales en la consecución de mi carrera, muchas gracias por todos tus consejos constantes y por acompañarme en cada etapa de mi vida, siempre has sido un ejemplo de lucha y dedicación, todo lo que podría llegar a ser algún día te lo debo a ti, gracias por guiarme y nunca soltar mi mano, me esforzare mucho para hacerte sentir orgullosa mamita.

A mi abuelito Carlos, por ser mi padre y por criarme con mucho cariño desde que nací, solo tengo palabras de gratitud por tus enseñanzas, por darme la fuerza y el ejemplo de constancia en todos los aspectos de la vida, gracias por enseñarme que todo es posible cuando las cosas se realizan con trabajo duro, paciencia y amor, gracias por ser mi amigo más sincero, te quiero mucho abuelito.

A mi abuelita Angelina, por compartir conmigo hermosos momentos y valiosas enseñanzas en mi niñez que han repercutido en mi espíritu y alma, te llevare siempre en el corazón.

A Cristina por apoyarme siempre y aconsejarme de la mejor manera en cada paso de este maravilloso viaje, por demostrarme su inmenso amor y paciencia, te agradezco como mi fuente constante de inspiración para lograr ser mejor.

A todos mis familiares maternos que me apoyaron siempre en este camino de lucha y conocimiento en especial a mi tía Leo que siempre me apoyo desde el inicio de mi carrera.

A todos mis compañeros, colegas de trabajo y amigos con los que he compartido muchas experiencias a los cuales las llevare siempre en el corazón.

Sebastián Andres Estevez Bustos

Dedicatorias

Esta tesis de grado se la dedico a mi madre María Morocho por siempre darme su apoyo y todo su amor para seguir adelante.
Con mucho cariño se lo dedico a mi familia Nicole y Samir por estar conmigo desde principio a fin, aunque hemos pasado por muchas adversidades, en todo momento han estado presentes para no darme por vencido, este logro es nuestro, en equipo, los amo.
A mis hermanos, en especial a Cristian y Carlos por enseñarme el valor de la hermandad, a pesar de la distancia, siempre estaré agradecido por sus palabras de motivación, por compartir momentos de risas y secretos, les debo una parte importante de este logro.
A mis abuelos, Antonio y María Concepción por las experiencias y la sabiduría que me han transmitido, han sido un pilar en mi vida, ya que me han otorgado una familia con buenos valores.
A mis tíos, Carlos, Griselda y Marco por la responsabilidad de habernos criado. Siempre han estado guiándome y animándome para continuar. Han sido un ejemplo, enseñándome lo que significa formar una familia que se apoya a pesar de cualquier circunstancia, sus valores y humildad están arraigados en mi forma de ser y disfrutar el día a día.
A mí persona por tener la mentalidad y la capacidad de seguir intentando, sin rendirme a pesar de los obstáculos personales y académicos.

¡A todos, muchas gracias!

Jonatan Fernando Tenezaca Morocho

Agradecimientos

Le debo mi eterna gratitud a Dios quien guía mi camino e ilumina el mismo con su sabiduría y gracia, le debo toda la fuerza y paciencia que me ha brindado durante este maravilloso viaje universitario.

Agradezco a mis padres Jenny y Carlos por su gran cariño durante toda mi vida, gracias por las enseñanzas y buenos consejos que siempre me han dado, los quiero mucho.

Un profundo y sincero agradecimiento para nuestro tutor Dr. Antonio Vallecillo por su apoyo, paciencia y consejos que nos impartió durante el desarrollo de este proyecto y por las experiencias vividas a lo largo del mismo.

Un especial agradecimiento a la Universidad de Cuenca y a todos sus docentes con los que tuve el agrado de compartir y por la formación académica impartida durante los años de carrera, gracias por fomentar en los estudiantes el espíritu de lucha y superación.

A todos mis amigos y compañero de tesis por su amistad sincera, su apoyo incondicional y por todos aquellos momentos buenos y malos vividos durante esta maravillosa etapa de mi vida a todos les guardo un gran cariño.

Sebastián Andres Estevez Bustos

Agradecimientos

Al contemplar el resultado alcanzado con este trabajo de tesis, simplemente puedo expresar palabras de gratitud total por el esfuerzo realizado.

Primeramente, quiero demostrar mi más profundo agradecimiento a la vida y a Dios por permitirme haber vivido esta extraordinaria experiencia académica.

Un especial agradecimiento a toda mi familia, a mis padres que me otorgaron la vida y me brindaron su apoyo incondicional en las decisiones tomadas durante este periodo universitario, ya que sin su apoyo no hubiera sido posible. En especial, estoy muy agradecido con mi madre María Morocho y mi esposa Nicole Lema quienes me impulsaron y me apoyaron en los momentos que más lo necesitaba, siempre creyeron en mis capacidades y por eso estoy donde estoy, sin antes mencionar agradezco a mi hijo Cristopher Samir por los momentos de sacrificio para cumplir este objetivo, ha sido mi fuente de inspiración y alegría para nunca desistir en el camino.

Sin duda, el estímulo para realizar esta investigación fue gracias a nuestro director de tesis, el Dr. Antonio Vallecillo y nuestros revisores cuya experiencia, conocimientos, y consejos nos supieron orientar correctamente para llevar a cabo nuestra tesis.

A mis amigos, compañeros de la universidad y mi compañero de tesis por la amistad y compañía en los momentos de alegría y estrés, han sido una pieza esencial en este camino de esfuerzo colectivo.

Así mismo, a mis docentes con los cuales tuve la oportunidad de aprender, me llevo lo positivo de cada sesión de clase, ya que me han dado la posibilidad de adquirir conocimientos para mi formación académica y profesional.

Finalmente agradezco a la Universidad de Cuenca y a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por brindarme la oportunidad de crecer a nivel académico y profesional, por haberme dejado una huella imborrable en esta etapa de mi vida.

Jonatan Fernando Tenezaca Morocho

Listado de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
SAG	Antígenos de superficie
IFI	Prueba de inmunofluorescencia Indirecta
D6D	Delta-6-desaturasa
µm	Micrómetro / micras
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IFL	Inmunoensayos de flujo lateral rápidos
Na_2CO_3	Carbonato de calcio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sodio
PBS	Solución buferada de fosfatos
NaCl	Cloruro de Sodio
KH_2PO_4	Fosfato monoácido de potasio
Tween 20	Monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano
BSA	Albúmina sérica bovina
A-HRP	Peroxidasa de rábano (horseradish Peroxidase)
TMB	Tetrametilbenzidina
H_2O_2	Peróxido de hidrogeno
µg/ m	Microgramo por mililitro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
ml	Mililitros
nm	Nanómetros
DO	Densidad óptica
NaH_2PO_4	Fosfato monosódico
KH_2PO_4	Fosfato monopotásico

1. Introducción

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito protozoario de distribución mundial y el agente causal de la Toxoplasmosis, una patología de carácter asintomático en individuos sanos, aunque puede causar ocasionar complicaciones en pacientes inmunodeprimidos. Este patógeno zoonótico puede infectar a una amplia gama de animales terrestres de sangre caliente y se considera al gato (*Felis catus domesticus*) su hospedero definitivo (Grandía et al., 2013). Generalmente, los gatos domésticos son el principal reservorio de infección, por lo cual se asume que juegan un papel importante en la propagación de la Toxoplasmosis causando graves complicaciones en la salud pública.

T. gondii puede transmitirse principalmente de forma horizontal por vía oral mediante la ingestión de alimentos y agua contaminados; por contacto directo con heces de gatos domésticos con quistes del parásito o de manera vertical desde la madre al feto (Rivera-Fernández, 2022).

El desarrollo de pruebas de diagnóstico precisas es de vital importancia para un adecuado manejo y control de la infección por *T. gondii*. El diagnóstico ha sido un desafío, debido a que las manifestaciones clínicas son variables e inespecíficas en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, puede incluso ser grave o mortal en pacientes inmunodeprimidos. Existen diversos métodos serológicos y *kits* comerciales para la detección de Toxoplasmosis, pero es fundamental considerar la variabilidad en los resultados, los cuales pueden cambiar de acuerdo con el ensayo en aplicación, impidiendo un diagnóstico exacto (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

Gracias al avance de la tecnología y al desarrollo de nuevos métodos y técnicas se ha logrado generar proteínas recombinantes con la finalidad de mejorar propiedades investigativas y diagnósticas, así como la capacidad de unión con su anticuerpo, con el propósito de optimizar la detección de enfermedades zoonóticas como la Toxoplasmosis (Kotresha & Noordin, 2010). Varias proteínas recombinantes tienen gran potencial como reactivo diagnóstico, entre estas, los antígenos de superficie 2 (TgSAG2) han demostrado su relevancia adicional para el desarrollo diagnóstico de la infección en gatos (Huang et al., 2002).

En nuestro país, la mayoría de las pruebas comerciales disponibles son importadas, provocando un incremento en los costos; además, se han llevado a cabo escasas investigaciones, por lo cual resulta viable evaluar la aplicación de un ensayo de Dot-blot y ELISA indirecto casero (*in house*) con el uso de una proteína recombinante TgSAG2 para detectar anticuerpos de *T. gondii* en sueros de gatos expuestos a la enfermedad.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Identificar en felinos *(Felis catus domesticus)* la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* mediante Dot-blot y ELISA indirecto con el uso de la proteína recombinante TgSAG2.

2.2. Objetivos específicos

Identificar la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en felinos probablemente infectados mediante Dot-blot con el uso de la proteína recombinante TgSAG2.

Evaluar la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en felinos con un ensayo de ELISA indirecto casero *(in house)* con base en la proteína recombinante TgSAG2.

Contrastar la capacidad de los ensayos de Dot-blot y ELISA indirecto para detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en felinos probablemente infectados.

2.3. Pregunta de investigación

¿La aplicación del ensayo Dot-blot y ELISA indirecto casero con el uso de la proteína recombinante TgSAG2 permite identificar de mejor manera la presencia de anticuerpos anti–*Toxoplasma gondii* en gatos?

3. Revisión de literatura

3.1 Toxoplasmosis

La Toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica causada por el parásito protozoo intracelular *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) que tiene la capacidad de infectar a casi todos los animales de sangre caliente y a seres humanos. La especie felina (*Felis catus domesticus*) es el hospedero definitivo de mayor importancia en la transmisión de la enfermedad, debido a la estrecha relación con el hombre y con especies de animales domésticos; los gatos son los únicos que pueden liberar mediante las heces, ooquistes infectantes que se encuentran en la fase sexual del parásito contaminando el ambiente (Rivera & García, 2017).

3.2. Agente zoonótico

Esta enfermedad parasitaria causada por *T. gondii* se considera de carácter zoonótica, es una de las infecciones crónicas que se estima afecta a un tercio de la población humana, esto representa una importante repercusión negativa para la salud pública. Este patógeno ha desarrollado varias rutas potenciales de transmisión, en la que se destacan la adquisición por la ingesta de carne cruda, poco cocida, o mediante la transmisión vertical de madre a hijo durante el embarazo, ocasionando complicaciones graves en el producto en gestación (Mahendra et al., 2021).

3.3. Datos mundiales

En el estudio a nivel mundial realizado por Elmore et al. (2010), se estimó que la seroprevalencia de la Toxoplasmosis en gatos oscila entre un 30 a 50 %. Sin embargo, esto puede cambiar dependiendo las diversas zonas geográficas, la dieta nutricional, grado de higiene, así como también el clima, debido a que en países con un clima húmedo y tropical tienen los gatos mayor prevalencia de anticuerpos contra *T. gondii*.

En un estudio de metaanálisis se determinó una alta frecuencia de Toxoplasmosis latente en mujeres embarazadas, con una prevalencia global estimada de 33,8 %. Es importante resaltar, especialmente que, en países de ingresos medios y bajos de África, así como en América del sur obtuvieron las prevalencias más altas, de 56,2 % de la infección presente, mientras que en la región del Pacífico occidental se encontró en un nivel más bajo, con un 11,8 %. Las tasas de prevalencia de Toxoplasmosis en mujeres embarazadas en otras zonas como la región del Mediterráneo oriental fueron de 35,1 %, en Europa del 31,2 %, en Norte América 28,2 y, el 23,4 % en el Sudeste Asiático (Rostami et al., 2020).

3.4. Datos de seroprevalencia en el Ecuador

En un estudio realizado en la ciudad de Cuenca en gatos, se reportó resultados de la frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, a partir de una muestra serológica representativa de 300 felinos. De estos, se identificaron 48 seropositivos mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, que corresponde al 16,0 % del total. En otras palabras, quiere decir que de cada 100 gatos domésticos que fueron muestreados es posible encontrar alrededor de 16 gatos seropositivos a la enfermedad (Bojorque, 2016).

Según Villa, en su trabajo de investigación realizado en un barrio del cantón Latacunga, donde se determinó la seroprevalencia de Toxoplasmosis mediante un ELISA indirecto y en el cual se recolectaron muestras sanguíneas de 50 gatos, se obtuvieron resultados de un 28 % de la prevalencia absoluta. Además, se estudió distintas variables como la edad: 0 – 12 meses un 16 %, con 8 positivos; de 1 – 5 años un 12 % con 6 animales positivos; según el sexo en gatos: machos un 14 % con 7 animales positivos; hembras un 14 % con 7 animales positivos y según la raza: mestizo de pelo largo 1 caso positivo con el 2 % de seroprevalencia (Villa, 2018) .

En un estudio de Torres y Zambrano, reportaron resultados que se obtuvieron a partir de una investigación en la zona urbana de la ciudad de Manabí. Con la técnica de inmunocromatografía, se estimó una seroprevalencia de *T. gondii* del 15,2 % de un total de 125 muestras de suero sanguíneo de gatos domésticos (Torres & Zambrano, 2022). Cabe recalcar, que también se analizaron variables de estudio como el sexo, edad y alimentación. En cuanto a la variable edad: el intervalo entre 1-6 meses obtuvieron 3,2 %; de 6 meses – 1 año el 4,8 y el 7,2 % en gatos mayores de 1año.

En la ciudad de Quito, se realizó un estudio en cual se identificaron anticuerpos contra *T. gondii* mediante la prueba de ELISA indirecto, 150 sueros sanguíneos fueron extraídos de gatos domésticos alojados en 30 gatiles provenientes de un total de 22 parroquias de la ciudad. En los resultados se presenció una seroprevalencia de 14 % en gatos, lo que correspondió a 21 felinos seropositivos del total muestreados (Quisilema, 2017).

3.5. Agente etiológico

El agente causal de la Toxoplasmosis en humanos y animales se denomina *T. gondii*, se describe como un parásito intracelular apicomplejo, perteneciente al orden Coccidia, que tiene amplia extensión en mayor parte del mundo, se caracteriza por su amplia gama de hospederos, de manera que puede infectar prácticamente a todos los animales homeotermos y el hombre, aunque solamente una fracción desarrolla la enfermedad (Grandía et al., 2013). *T. gondii* fue identificado por primera vez en Túnez por Nicolle y Manceauxe en 1908, descubrieron taquizoítos en los tejidos de un roedor *(Ctenodactylus gundi)* y en los tejidos

de un conejo por Splendore en el mismo año (Ferguson, 2009). El nombre de genero se dio como referencia a la forma que adoptaba el parasito, deriva del griego *tóxon* que significa arco y plasma = forma. El conocimiento del ciclo de vida no se completó hasta 1970, cuando se determinó la fase sexual en el intestino del gato, demostrando la presencia de ooquistes en sus heces, caracterizándolos biológica y morfológicamente (Petersen & Dubey, 2001).

3.5.1. Taxonomía

Inicialmente del género *Toxoplasma* se basó en el tipo de hospedador; así se enuncio nueve especies: *T. alencari*, *T. bahiensis*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. gondii*, *T. hammondi*, *T. pardalis*, *T. ranae* y *T. serpai*. Posteriormente, en el transcurso de varios años se presentó que los ciclos biológicos y las características inmunológicas de todas las especies eran similares, por tal razón se congregó bajo una misma especie: *T. gondii*. *T. gondii* se incluye dentro del *Phylum* Apicomplexa, Clase Sporozoea, Subclase Coccidia, Orden Eucoccidida, Suborden Eimeriina, Familia Sarcocystidae y Subfamilia Toxoplasmatinae (Petersen & Dubey, 2001).

3.5.2. Morfología

En la revisión literaria realizada por Attias et al. (2020), mencionan que el contagio en los felinos puede ocurrir por medio de tres etapas de desarrollo: taquizoíto (forma de multiplicación rápida característico de infecciones agudas); bradizoíto (una forma de multiplicación lenta que se encuentra en la infección crónica y por ende origina quistes tisulares) y esporozoito que se reproduce de forma sexual, únicamente en el hospedero definitivo.

3.5.3. Ooquiste

La forma de ooquiste de tipo esporulado tienen una morfología ovoide y tienen un tamaño que regularmente varia de 10 X 12 µm, esta forma infectiva aparece liberada en las heces de los hospedadores como el gato, en esta etapa se liberan al medio ambiente como un ooquiste no esporulado, este solo evolucionará cuando se da el proceso de esporulación, para que este proceso sea consumado necesita de la ayuda del medio ambiente el cual juega un papel importante ya que las condiciones de temperatura y humedad deben ser idóneas para que se de este proceso (Galván, 2014).

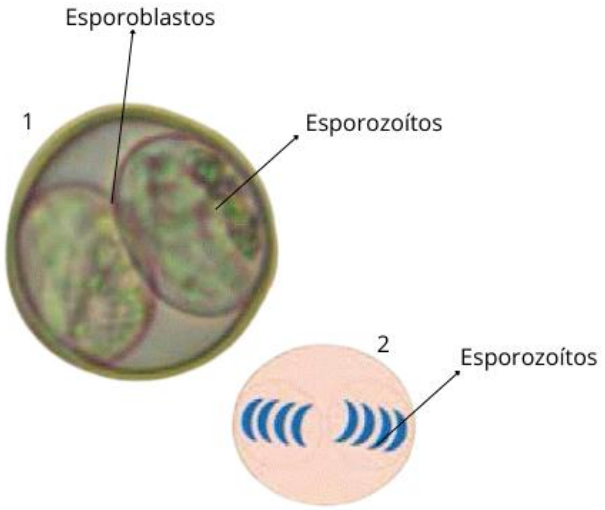


Figura 1: (1) Morfología de ooquiste de *T. gondii* conformado por 2 esporoblastos y 4 esporozoítos; (2) Representación de los esporozoítos contenidos. **Modificado de: (Rivera & García, 2017)**.

3.5.4. Taquizoíto

También conocido como la forma proliferativa, forma de alimentación o simplemente trofozoíto, en esta fase el parásito posee una forma de medialuna, su estructura interna es compleja ya que se encuentra formado de diferentes organelos y se divide mediante un proceso especial conocido comúnmente como endodiogenia (Dubey, 2008). A esta etapa se le conoce comúnmente como la fase infectante asexual, es de poca motilidad ya que carece de órganos de locomoción sin embargo puede desplazarse empleando un motor de Actina-Miosina. Son de una baja virulencia y poseen una forma lenta de proliferación (Rivera & García, 2017).

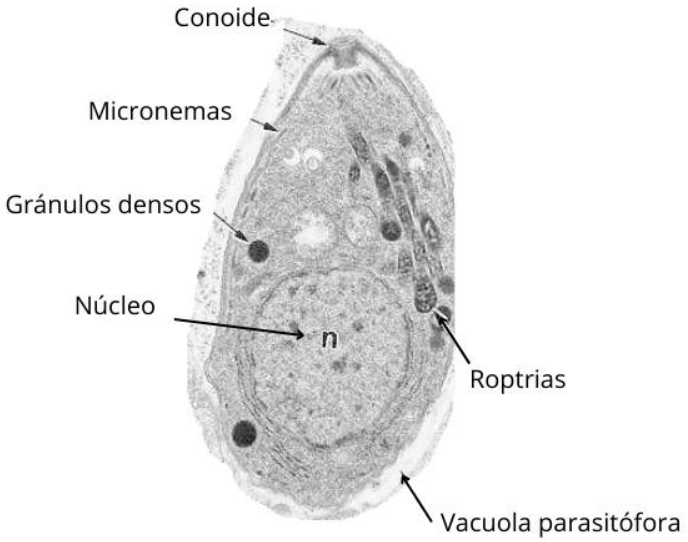


Figura 2: Micrografía electrónica de taquizoíto intracelular**.**
Modificado de: (Dubey, 1996).

3.5.5. Bradizoítos y quistes tisulares

Los bradizoítos son formas parasitarias que se localizan en el interior de los quistes tisulares, en esta forma es característico su baja virulencia, proliferación y poca movilidad, su estructura es muy similar a la de los taquizoítos, sin embargo, disponen de gran cantidad de gránulos de amilopectina (Rivera & García, 2017).

Su forma característica se asemeja a una medialuna y su tamaño es de 7 x 1.5 µm. pueden ser diferenciados de las demás formas por la configuración de su estructura siendo estos más delgados y mucho más resistentes al ataque de enzimas proteolíticas disminuyendo la probabilidad de ser destruidos por ellas (Grandía et al., 2013).

Por otro lado, los quistes tisulares pueden crecer y permanecer de manera intracelular mientras los bradizoítos se dividen por endodiogenia. Estos quistes pueden variar de tamaño ya que los más jóvenes pueden llegar a poseer un diámetro de 5 micras y contener en su estructura interna un bajo número de bradizoítos, comúnmente 2 de ellos, mientras que, en un quiste más antiguo es capaz de contener a cientos de organismos (Jerome, 1998).

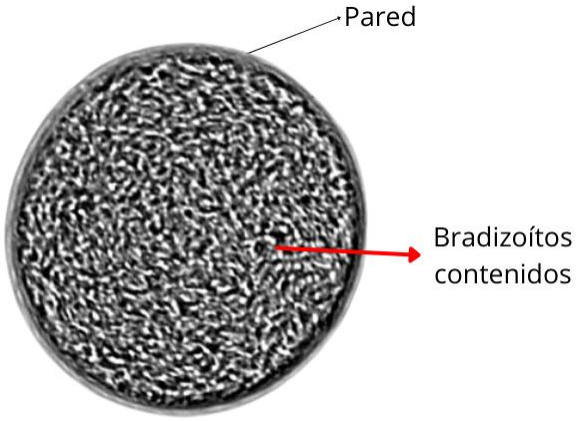


Figura 3: Quiste tisular de *T. gondii,* en su interior contiene múltiples bradizoítos.
Modificado de: (Galván Ramírez, 2001).

3.5.6. Ciclo biológico

T. gondii presenta un ciclo de vida heteroxeno facultativo, conformado por fases principales de desarrollo que infectan las células: en el hospedero definitivo (entero epitelial), en el medio ambiente (esporogonia) y en el hospedero intermediario (extraintestinal); (Grandía et al., 2013).

Por lo tanto, se menciona que los hospederos definitivos como los félidos son la única especie capaz de llevar a cabo la etapa de reproducción sexual; no obstante, los animales de sangre caliente, como mamíferos acuáticos, terrestres y aves, son más bien considerados hospederos intermedios, en el cual se desarrolla la fase asexual del parásito (Delgado et al., 2022).

3.5.6.1. Ciclo de vida en el hospedero definitivo

En los gatos, el ciclo biológico del parásito comienza a través de la ingestión de carne cruda o presas como la de ratones o aves infectadas con *T. gondii* que albergan la forma infecciosa denominada quistes tisulares.

Una vez ingeridos los quistes tisulares u ooquistes, en el tracto gastrointestinal del gato se libera los bradizoítos y esporozoitos, debido a que se desintegra la pared de los ooquistes por acción de las enzimas proteolíticas y bajo pH durante la digestión (Rivera & García, 2017). Cabe mencionar también, que solamente en el epitelio intestinal de los felinos, los bradizoítos pueden iniciar la vía de desarrollo sexual, dado que el contenido de Ácido linoleico es alto debido a una deficiencia natural de Delta-6-desaturasa (D6D), una enzima responsable de catalizar la reacción del Ácido linoleico al Ácido linolénico (Warschkau & Seeber, 2023). Posteriormente, los bradizoítos invaden y proliferan dentro de las células epiteliales intestinales generando una vacuola parasitófora intracelular (VP); dentro de los enterocitos mediante la esquizogonia; los bradizoítos se dividen en células hijas llamadas merozoitos.

La ruptura de los enterocitos libera muchos merozoítos que también pueden infectar nuevos enterocitos aumentando así rápidamente la población; esto supone el progreso de nuevas generaciones. Se describen cinco tipos de esquizontes (A, B, C, D y E) que se consideran diferentes en cuantos, a su morfología, con varias generaciones por tipo (Delgado et al., 2022).

De tres a quince días después de la infección primaria, los esquizontes y merozoítos originan gametocitos que se liberan preferentemente a nivel de Íleon; por lo cual se diferencian en macrogametos (célula femenina) y microgametos (célula masculina); iniciando de esta manera la fase sexual, dos días después de la ingestión de los quistes (Attias et al., 2020). La fusión de un microgameto con un macrogameto produce un ooquiste inmaduro no infectante que será excretado a través de las heces del gato; de este modo el ambiente aireado desencadenará la esporulación de los ooquistes. El proceso de esporulación se completa en el medio ambiente en un plazo de 1 a 7 días. Además, se menciona que los ooquistes esporulados tienen un alto grado de resistencia a las condiciones ambientales extremas como a sustancias empleadas en la desinfección, por tal razón permanecen infecciosos durante varios meses y años (Freppel & Ferguson, 2019).

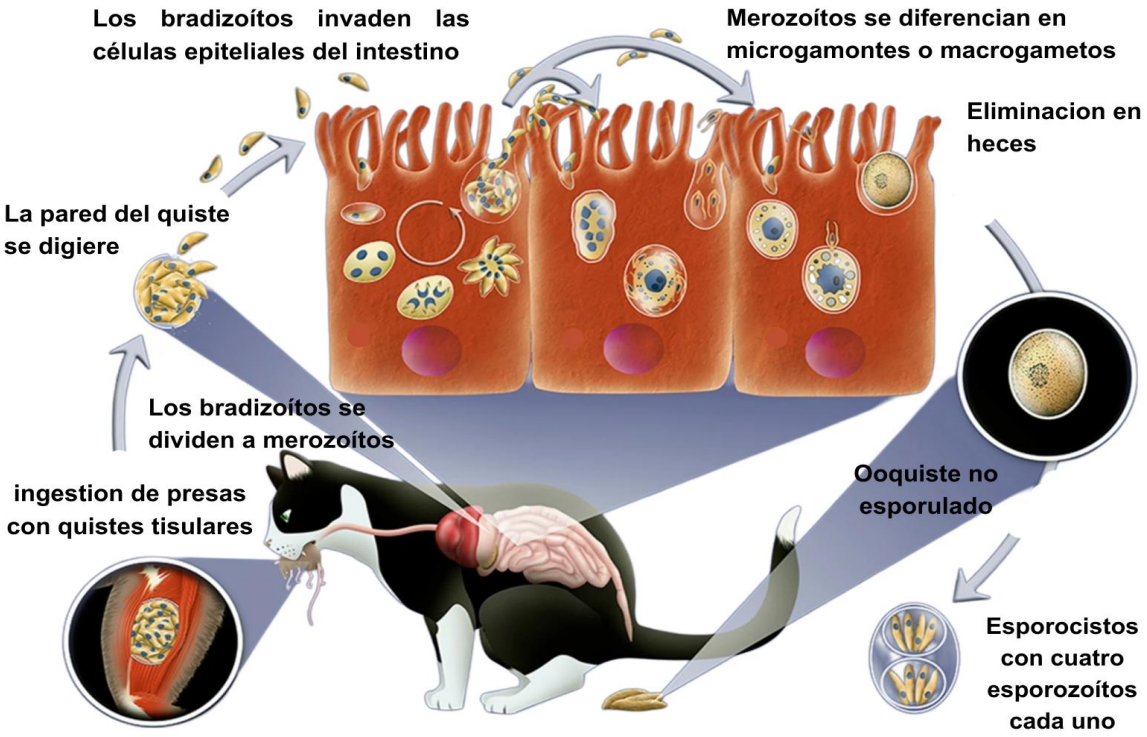


Figura 4: Ciclo biológico de *T. gondii* en el hospedero definitivo, el gato doméstico *(Felis catus domesticus*). **Fuente**: Modificado de Attias et al. (2020).

3.5.6.2. Ciclo biológico de *T. gondii* en el hospedero intermediario

Existe una amplia variación de hospederos intermediarios (incluido el hombre) que se contaminan de *T. gondii*; de igual modo en los félidos se puede producir la fase asexual, es decir puede actuar también como hospedero intermedio. Este tipo de hospedero se infecta al consumir ooquistes esporulados mediante el agua, verduras, frutas, también puede adquirir la infección por la ingesta de carne cruda o poco cocida contaminados con quistes tisulares; en esta parte del ciclo asexual, los esporozoitos y bradizoítos se diferencian en taquizoítos ; estos se replican dentro de cualquier célula nucleada, específicamente macrófagos, células epiteliales, células musculares y neuronas, por el que proliferan en el interior de una vacuola parasitófora (Rivera & García, 2017). Este proceso es conocido como endodiogenia, puesto que se forman dos células hijas de una célula madre. Al salir los taquizoítos se mueven hacia el espacio extracelular, rompiendo a la célula hospedero, e iniciando la diseminación de la enfermedad en los tejidos por el sistema circulatorio o linfática (Attias et al., 2020).

Los taquizoítos tiene un papel clave en la diseminación del parásito y de la infección aguda, sin embargo, la rápida proliferación se controla por su eliminación en gran parte de los hospederos inmunocompetentes. Aquellos que no se eliminen, sufrirán una interconversión taquizoíto -bradizoíto permitiendo la resistencia en órganos y tejidos del hospedero por varios

meses, años o incluso toda su vida, siendo responsables de una infección crónica cuando el sistema inmune ya no sea capaz de controlar la proliferación (Delgado et al., 2022).

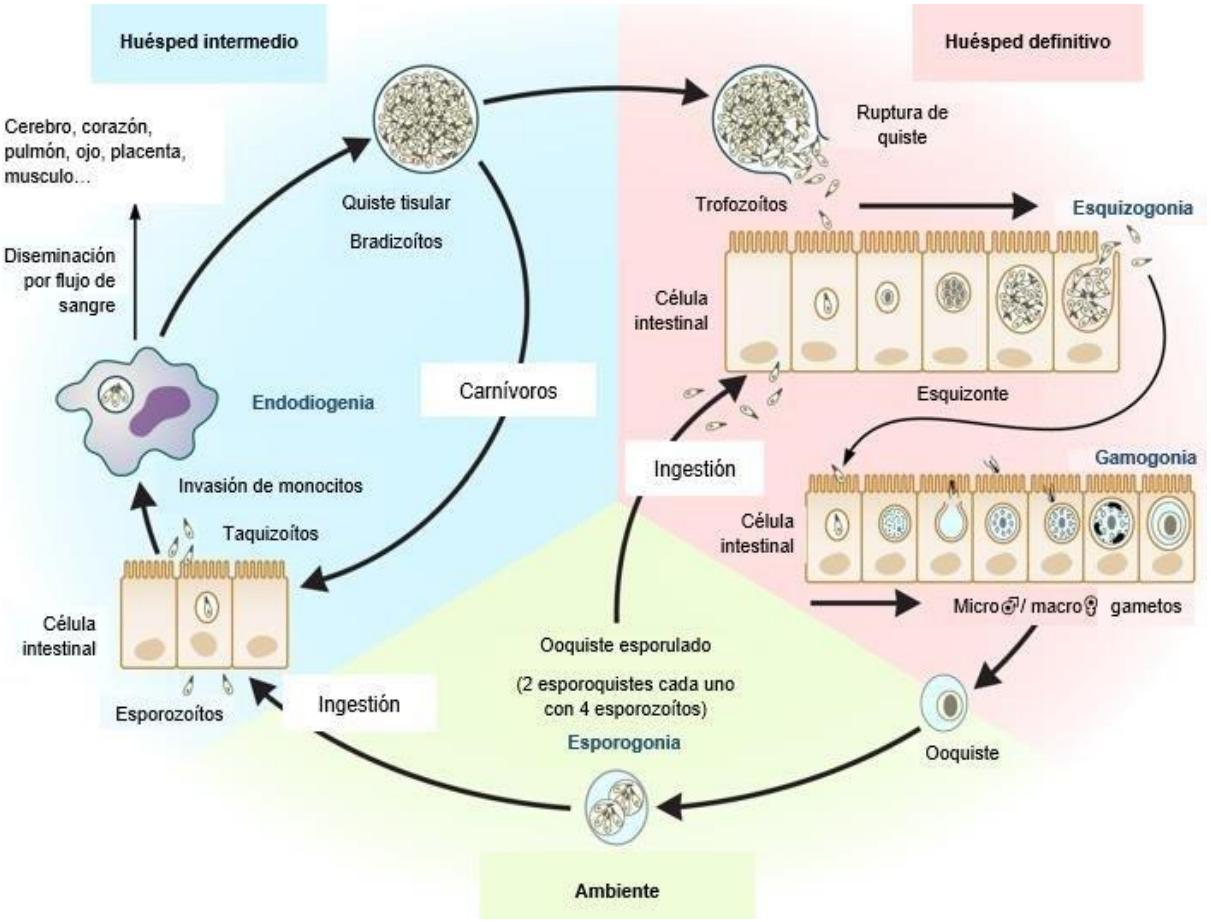


Figura 5. Fases infectantes del parásito *T. gondii* y su modo de transmisión en diferentes hospederos. **Fuente:** Adaptado de **Robert-Gangneux & Dardé (2012)**.

3.5.6.3. Diversidad genética y epidemiologia de la Toxoplasmosis

T. gondii es responsable de una infección zoonótica que el humano adquiere a partir de animales domésticos, salvajes o de compañía; esta contaminación ambiental por ooquistes de *T. gondii* supone una gran preocupación tanto desde la perspectiva de salud pública como de su biodiversidad (Hatam-Nahavandi et al., 2021).

Los felinos son esenciales para la transmisión de *T. gondii* en hospederos como animales de pastoreo (ovejas y ciervos), ya que sirven como una fuente de infección para que ooquistes infecciosos contaminen el medio ambiente. Así mismo la multiplicación sexual tiene lugar exclusivamente en el hospedero felino, por tal razón estos sirven como único sitio donde puede ocurrir la recombinación genética y la diversificación de este parásito (Elmore et al., 2010). Durante algún tiempo, se ha considerado que, a pesar de la recombinación sexual, existe una diversidad genética mínima entre los diferentes aislados a nivel mundial. Sin

embargo, recientemente se ha comprobado mediante distintas técnicas de biología molecular que existe una diversidad genética significativamente mayor en aislados de diferentes regiones del mundo.

La caracterización inicial de la población de *T. gondii* se basó en muestras de Europa y América del Norte, donde se identificaron una estructura de población altamente clonal formada por tres tipos de cepas, denominadas tipo I, II y III con muy baja diversidad genética, proveniente de humanos y animales (Dardé, 2008).

Por otro lado, en aislados del parásito se encontró más variación genética en América del Sur y en menor medida en África y Asia; estos "nuevos" genotipos fueron designados como genotipos atípicos, exóticos, recombinantes o no arquetípicos (Ajzenberg & Bañuls, 2004).

Las cepas de tipo II se asocia con la Toxoplasmosis en humanos y animales domésticos en Europa y América del Norte, mientras que las cepas de tipo III son menos frecuentes y tienen mayor distribución en todo el mundo. Las cepas de tipo I son menos abundantes de los linajes clonales. Con relación al grado de virulencia de las cepas, pueden variar significativamente utilizando el método de ratón; es importante mencionar que las cepas de tipo I (ejemplo, RH y GT1) se asocian con una infección letal, mientras que los de tipo II (Ejemplo, ME49 y Prugniaud) son medianamente virulentos y los de tipo III (ejemplo, CTG y VEG) tienen una baja carga de virulencia, presentando baja morbilidad y altas tasas de infección crónica con formación de quiste tisulares (Delgado et al., 2022).

En contraste, con lo observado anteriormente en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa) la composición genotípica de las cepas de vida silvestre difiere de las cepas comúnmente aisladas en el ambiente doméstico. Estas poblaciones que son aisladas de animales salvajes o de humano en contacto con la vida silvestre están asociadas con ambientes donde la presencia de felinos silvestres se ha establecido, por consiguiente, esta idea apoya la concepción que se han producido coadaptaciones entre cepas de *T. gondii* y diferentes especies felinas (Galal et al., 2022).

En definitiva, el ciclo biológico de *T. gondii* presenta diversas formas de transmisión sexual y asexual, la definición de la estructura poblacional puede cambiar drásticamente a partir de nuevas regiones; no obstante, su contribución a la propagación de rasgos como la inmunogenicidad, transmisión y patogénesis es de gran relevancia para la salud humana (Sibley et al., 2009).

3.5.6.3.1. Signos clínicos

Entre los hallazgos clínicos más comunes en gatos infectados con *T. gondii* incluyen la falta de apetito, fiebre, letargo, diarrea, pérdida de peso, ictericia, dificultad respiratoria, signos neurológicos, uveítis. Sin embargo, se debe considerar que la sinología puede cambiar según la gravedad de la infección y el sistema inmune del paciente (Nelson & Couto, 2010).

3.6. Modos de infección

Entre las formas de infección más comunes para la especie felina se encuentra la vía oral, esto se produce cuando los parásitos se encuentran en la etapa asexual del ciclo de vida de *T. gondii* y es resultante de la ingestión del parásito en fase de ooquiste maduro los cuales proceden de las excretas de los felinos o en su caso de las formas quísticas que se encuentren en los tejidos de otros animales, los mismos que al ser ingeridos de manera indirecta por humanos y animales los convierte en hospedadores intermediarios (Hernández & García , 2003).

En el estudio de (Jerome, 1998), resalta al lector que el gato también puede actuar como un hospedero intermediario con un ciclo parasitario tisular, extraentérico y asexual, lo cual puede ocurrir de una manera simultánea con la fase enteroepitelial del intestino del gato, generalmente esto se da en el intestino delgado del felino.

3.6.1. Transmisión oral

Un punto importante en el que se debe hacer hincapié al hablar de los factores para que se concrete la infección es la diferencia del consumo de carnes cocidas y conservadas ahumadas o en refrigeración, estas últimas si se mantienen en congelación estable no son infectantes, otros productos como el grupo de los lácteos como la leche de cabras y vacas pueden encontrarse infectadas por mala manipulación y contener el parásito en fase de taquizoíto , sin embargo estos pueden ser destruidos por los potentes jugos gástricos al llegar al estómago (Hernández & García , 2003).

3.7. Transmisión fecal

Los gatos pueden producir ooquistes que se eliminan a través de las heces, estos tendrán una concentración muy grande alrededor de los sitios donde los felinos realicen la excreta, (Afonso, 2007). Por otro lado, al momento que el gato defeca y las heces caen al suelo los ooquistes también se pueden infiltrar dentro del suelo, o pueden migrar gracias a las características ambientales ayudados por el viento, cantidad de lluvia, adicionalmente son ayudados por factores animales que se encuentran en la naturaleza como en el caso de los artrópodos y las lombrices (Dumètre & Dardé, 2003).

La exposición al suelo contaminado con los ooquistes del parásito es un factor importante para la infección en la especie humana, por otro lado, es muy probable tomar a esta como la principal vía de contaminación para las especies domesticas felinas y demás hospederos intermediarios incluyéndose en estos al grupo de las aves y roedores (Shapiro, 2019).

Todas las especies animales de sangre caliente son susceptibles a la infección por *T. gondii*, la misma también se puede dar por la vía de la ingestión de los ooquistes de *T. gondii* al beber

agua que puede estar contaminada con heces procedentes de felinos infectados. Los oocistos pueden ser capaces de sobrevivir a un sinnúmero de procesos de inactivación y pueden permanecer viables en agua hasta después de la exposición a detergentes o soluciones desinfectantes (Dubey, 2004).

3.8. Transmisión hacia humanos

En los humanos y en todos los animales excepto en el gato se produce un ciclo de transmisión incompleto en el intestino, los esporozoitos penetraran la pared intestinal posteriormente siguen la vía linfática y llegan a los tejidos. Inicialmente los esporozoitos infectaran a los macrófagos y se multiplicaran de gran manera convirtiéndose en taquizoítos, en los macrófagos esta multiplicación es muy rápida por lo que toma el nombre de ciclo proliferativo. La multiplicación rápida se da por endodiogenia, en el transcurso de esta fase se induce la respuesta inmune y el hospedero desarrolla un tipo de inmunidad lo que provoca la evolución de la infección a una etapa crónica en donde los parásitos intracelulares formaran paredes quísticas, posteriormente se reproducirán lentamente donde toman el nombre de bradizoítos, estos permanecerán indefinidamente en los tejidos sin provocar alteraciones o inflamación lo cual se referirá a una etapa de latencia o un ciclo quístico (Isaza, 2007).

Puede existir una transmisión de tipo congénito o transplacentaria desde la madre con infección aguda al feto. De igual manera entre otros tipos de formas de transmisión existe la posibilidad de adquirir la enfermedad mediante el trasplante de órganos infectados previamente y en ocasiones menos comunes también es posible adquirir la infección por medio de transfusiones sanguíneas o accidentes de laboratorio (Maldonado & Read, 2017).

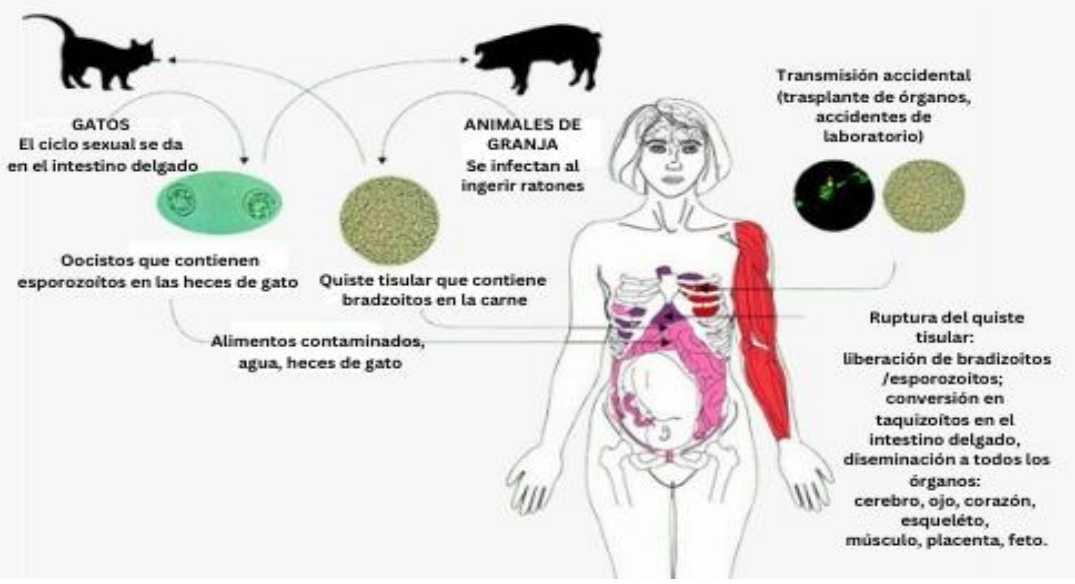


Figura 6: Manifestaciones clínicas en los humanos causados por la infección por *T. gondii* y su repercusión en varios órganos. **Fuente:** Modificado de **(Montoya JG, 2004)**.

Existen rutas de transmisión de ooquistes de *T. gondii* pocas veces descritas, en las que no están involucrados los gatos y constituyentes del ambiente, este es el caso de ciertas clases de invertebrados como las cucarachas, moscas y las lombrices de tierra, los mismos pueden actuar como vectores paraténicos por medio de los cuales los ooquistes de *T. gondii* pueden pasar de manera inerte. Adicionalmente gracias a estudios recientes se ha podido descubrir que la especie canina también puede diseminar en sus heces los ooquistes de *T. gondii*, esto puede deberse a una manera de transporte gastrointestinal pasivo del parásito dentro del animal producido por malos hábitos alimenticios de los perros provocado por la acción de coprofagia al alimentarse de heces de los gatos potencialmente infectados (Lindsay, 1997).
Existen otras rutas de transmisión las cuales pueden ser un tanto curiosas como la transmisión de tipo mecánico por medio del pelaje de los animales, esto se da más comúnmente en el perro posterior a revolcarse sobre un suelo contaminado con heces de gatos parasitados, esta vía también se ha propuesto como una forma para que los ooquistes de *T. gondii* se diseminen a la especie humana particularmente a los niños (Shapiro, 2019).

3.9. Diagnóstico de la Toxoplasmosis

En la actualidad existen herramientas para el diagnóstico de la Toxoplasmosis, estas consisten en pruebas serológicas, que permiten la detección de anticuerpos contra *T. gondii* en los pacientes. Entre los procedimientos serológicos disponibles para la detección de anticuerpos, se encuentran la prueba de tinción de Sabin-Feldman, pruebas de aglutinación modificada y ensayos de inmunofluorescencia indirecta (Hill et al., 2005). Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta y la prueba de aglutinación modificada son un tipo de pruebas serológicas, las cuales basan su funcionamiento en el reconocimiento de antígenos de superficie del parásito y los cuales son muy usadas para el diagnóstico de Toxoplasmosis para estimar la prevalencia de la enfermedad a nivel regional y en otros casos de rebaño (Oliveira, 2019).
Existen otros más específicos como las pruebas de ELISA indirecto y la prueba de ensayo de aglutinación inmunoabsorbente. Todas estas técnicas son capaces de detectar inmunoglobulinas del tipo IgG e IgM en suero o en líquido tisular. La técnica de ELISA indirecto es visiblemente más sensible y eficaz que la prueba de aglutinación modificada para la detección de anticuerpos contra *T. gondii*. Estos métodos son mayoritariamente usados ya que estas pruebas son mucho más rápidas de realizar y brindan una forma fácil y muy eficaz al momento de usarlas, sin embargo, también tienen algunas limitaciones ya que la sensibilidad y la especificidad que estas brindan pueden ser muy variables por ende los resultados en muchas ocasiones no se correlacionan con los resultados del bioensayo (Marín-García, 2022).

3.9.1. Inmunoensayo ELISA

Los ensayos de ELISA pueden ser directos, de captura o sándwich, para la detección de antígenos; o indirectos, para la detección de anticuerpos, pero todos estos utilizan un tipo de técnica colorimétrica que se emplea para cuantificar los analitos que se desean identificar, basado en una reacción de antígeno-anticuerpo con el complejo antígeno/anticuerpo en una fase inmovilizada (Liyanage, 2021).

3.9.2. ELISA directo

Los inmunoensayos ELISA directos muestran gran eficacia para detectar la presencia y cantidad de antígenos en una determinada muestra y adicional a esto es útil en la identificación de anticuerpos y mapeo de epítopos, este ensayo emplea únicamente un anticuerpo con lo que evita la reactividad cruzada con anticuerpos secundarios esto permite que este ensayo sea mucho más rápido en comparación a otros métodos ELISA (Lin, 2015).

3.9.3. ELISA indirecto

Es particularmente usado como ayuda para un posible diagnóstico de enfermedades de tipo viral ya que ayuda a detectar la presencia de anticuerpos específicos y medir su concentración en la muestra analizada (Kohl & Ascoli, 2017).

El inmunoensayo de ELISA indirecto es comúnmente empleado en los laboratorios, es una herramienta de serodiagnóstico muy útil y eficiente para analizar muestras de suero sanguíneo al momento que se desea realizar la búsqueda de anticuerpos anti-*T. gondii*, este inmunoensayo brinda algunas ventajas como la posibilidad de poder ser semiautomatizado cuando se desea realizar pruebas a gran escala, sumado a esto la lectura de los datos que ofrece es menos subjetiva que la de otros tipos de ensayos (Al-Adhami, 2014).

Adicionalmente a estas ventajas también se puede argumentar que este inmunoensayo es mayoritariamente utilizado gracias a que esta prueba parece ser mucho más fiable, practica, económica y muy utilizada a nivel mundial para la detección de la exposición al *T. gondii*, además entre otras de las ventajas que esta prueba ofrece se encuentra que este ensayo puede ser capaz de diferenciar entre algunas clases de inmunoglobulinas lo cual es muy útil, ya que, ayuda en gran medida a poder determinar la fase de la infección en la cual se encuentre un animal o humano (Lind, 1997).

3.9.4. ELISA sándwich

El ELISA tipo sándwich en principio inicia con la colocación de un anticuerpo de captura el cual recubre los pocillos de la placa utilizada, este inmunoensayo toma el nombre de sándwich debido a que los antígenos se encuentran recubiertos entre 2 capas de anticuerpos, siendo uno de captura y el otro de detección. Este método serológico tiene la ventaja de

poseer una mayor sensibilidad que los otros tipos de ELISA, sin embargo, la principal desventaja de este procedimiento es el gran margen de tiempo y los costos elevados que conlleva (Alhajj et al., 2023).

3.9.5. Inmunoensayo Dot-blot

En la actualidad existen inmunoensayos de tipo heterogéneos los cuales brindan la posibilidad de realizarlos en fases solidas como placas de microtitulación, micropartículas magnéticas, membranas, y otras como perlas de poliestireno (Wang, 2016). Los ensayos que emplean este tipo de superficie de membrana como fase solida pueden categorizarse como de pruebas en base a papel (Lin et al., 2022).

La técnica de inmunoensayo Dot-blot es un procedimiento sencillo en donde las proteínas se depositan de una manera directa sobre la membrana, en donde las mismas se absorben por medio de interacciones de tipo no covalentes (Rupprecht, 2010). Este método es muy fácil de replicar ya que no exige ninguna clase de instrumental costoso y su aplicación es útil en análisis de agentes infecciosos, biomarcadores y anticuerpos (Safarpour, 2021).

Las membranas de Nitrocelulosa generalmente son empleadas como lienzo de transferencia para la visualización de proteínas en ensayos de tipo Western blot (Xiang, 2021), además también es utilizado como componente principal de la variedad de tiras reactivas de otro tipo de ensayos, como los inmunoensayos de flujo lateral rápidos (LFIA) y en inmunoensayos Dot-blot (Sukumaran, 2020).

Para la manufactura de las membranas se emplean diversos materiales, como Fluoruro de polivinilideno o Naylon, sin embargo, el predilecto es la Nitrocelulosa (Yahaya, 2019). Las membranas de Nitrocelulosa brindan ventajas, como poseer una estructura porosa con una gran cantidad de sitios de unión para la captación de biomoléculas, adicional a esto el proceso de nitrilación de la celulosa también ayuda a la unión afín de las proteínas (Zhang, 2023).

3.10. Antígenos recombinantes

Gracias al avance de las nuevas tecnologías es posible que el uso de antígenos recombinantes mejoren el serodiagnóstico para *T. gondii*, sin embargo, estos antígenos también permiten mejorar la eficiencia al momento de poder identificar las diferentes etapas en la que se encuentre la infección, este es un punto de vital importancia el cual puede ser beneficiosos al momento del diagnóstico en una mujer gestante, ya que el diagnóstico certero de la etapa aguda de la enfermedad podría asegurar una atención optima y temprana, tanto para la madre como al feto y prevenir problemas futuros (Petersen, 2007).

Con el transcurso del tiempo se ha podido realizar procesos de clonación y expresión de genes que codifican proteínas de *T. gondii,* llegando a usar múltiples sistemas de expresión para llegar a producir antígenos recombinantes, entre algunos de los antígenos optimizados

para mejorar el diagnóstico de la enfermedad son las proteínas o antígenos de superficie de tipo SAG1 (p30), SAG2, SAG3, ROP1, GRA1, GRA2, GRA5 y GRA7 (Ybañez, 2020).

3.10.1. Proteína TgSAG2

En la superficie, en la fase de taquizoíto del parásito *T. gondii* se encuentra dominada por algunos tipos de proteínas que actúan como ligandos, mediante los cuales se realiza el proceso de reconocimiento celular y la posterior adhesión del parásito a la célula hospedadora, entre algunas de estas proteínas de importancia se encuentran la SAG1 y SAG2, las mismas se encuentran en gran abundancia. Se cree que la proteína SAG2 actúa de una manera muy importante ligando al parásito para que este pueda acoplarse posteriormente con los receptores de la célula hospedadora, y la cual se encuentra realizando procedimientos de invasión celular, siendo estos los procesos de reorientación apical del parásito (Castaño et al., 2001).

El tipo de antígenos SAG de *T. gondii* se encuentran en una gran proporción en la superficie de taquizoítos tanto los intra y extracelulares. Los antígenos SAG1 son en su mayoría empleados para detectar la enfermedad cuando esta se encuentra en etapa de taquizoíto más sin embargo no es de mucha especificidad para detectar las etapas de bradizoíto y esporozoito, adicional a esto gracias a una serie de estudios a través de los años se ha podido postular que SAG1 es más útil en el inmunodiagnóstico de la Toxoplasmosis crónica. Por otro lado, otros estudios postulan a la proteína SAG2 como un buen antígeno, y se ha revelado que las inmunoglobulinas IgG de pacientes que se encontraban cursando la fase aguda de la enfermedad, reaccionaban de mayor manera que los pacientes que cursaban la fase crónica de la Toxoplasmosis, esto confirma el potencial que posee esta proteína para utilizarse como marcador para el diagnóstico final de la Toxoplasmosis aguda humana (Béla, 2008).

4. Materiales y métodos

4.1. Descripción del estudio

El procedimiento experimental, que incluyó el test de Dot-blot y ELISA indirecto casero para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* se realizó en el Laboratorio de Biología molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias. En el estudio se utilizaron 85 muestras de suero sanguíneo de gatos (*Felis catus domesticus*) posiblemente expuestos a la enfermedad, mismos que fueron recolectados en campañas de esterilización de la Universidad de Cuenca, procedentes del banco de sueros del laboratorio y sueros adicionales de la Fundación Arca.

En esa misma línea la investigación se basa en estudios desarrollados previamente por estudiantes de la Universidad de Cuenca en donde se han reunido óptimos resultados, los cuales fueron obtenidos mediante la implementación de la proteína recombinante TGSAG2 con soluciones específicas para el bloqueo y dilución de los sueros en las placas de tipo MaxiSorp, usando como referencia los sueros con mejor densidad óptica.

4.2. Actividad 1. Colecta de muestras serológicas de felinos domésticos (*Felis catus domesticus*)

4.2.1. Materiales

4.2.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Guantes
- Torniquetes
- Gasas
- Tubos vacutainer de 3 ml
- Jeringas de 5 ml
- Aguja hipodérmica 22G
- Cooler
- Gel refrigerante
- Porta tubos
- Algodón
- Bolígrafos
- Cuadernos
- Computadora
- Centrífuga
- Micropipetas de 5 ml
- Refrigerador graduado a 4 °C

4.2.1.1.2. Materiales biológicos

- Muestras de sangre periférica

4.2.1.1.3. Reactivos y soluciones

- Alcohol etílico al 70 %
- Clorhexidina

4.2.1.2. Colecta de muestras serológicas de felinos (*Felis catus domesticus*)

Pasos a seguir:

Paso 1. Se inicia con la preparación de todos los implementos para la extracción de muestras sanguíneas procurando mantener la asepsia para la toma correcta, posteriormente se realiza la preparación del paciente colocándolo en decúbito esternal **(Anexo a).**

Paso 2. La colecta de las muestras se realiza de 2 partes anatómicas de los pacientes, se seleccionan el brazo y el cuello siendo utilizadas las venas cefálicas y yugular. Al tomar la muestra se recogieron 3 cm de sangre de cada paciente en los tubos vacutainer los cuales fueron rotulados inmediatamente, repitiendo este proceso para cada uno de los gatos muestreados. Posteriormente los tubos fueron almacenados en *coolers* de refrigeración para evitar hemólisis **(Anexo b).**

Paso 3. Se procede al envío de las muestras al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias donde se centrifugan para obtener el suero que posteriormente se mantendrá en refrigeración a 4 ºC **(Anexo c).**

4.3. Actividad 2. Ensayo de Dot-blot para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos

4.3.1. Materiales

4.3.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Porciones de membranas de PVDF (6 X 60 mm) (Thermo scientific, No. cat.: 88520).
- Agitador orbital (Marca: unico).
- Micropipetas de distintos rangos de volumen y sus respectivas puntas (Marca: Corning).
- Potenciómetro (Marca: Labnet).
- Balanza (Marca: Boeco).
- Computadora (Marca: Lenovo).
- Cronómetro (Marca: Qsonica).

4.3.1.1.2. Materiales biológicos

- Proteína recombinante TgSAG2 de *T. gondii* proporcionados por el Dr. Antonio J. Vallecillo, del Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC. AA de la Universidad de Cuenca.
- Muestras de suero sanguíneo de los pacientes felinos.

4.3.1.1.3. Reactivos y soluciones

- Solución para la sensibilización de las membranas, consiste en Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7,4, (137 mM de NaCl (Sigma, No. cat.: S3014); 2,7 mM KCl (Sigma, No. cat.: 746436); 10 mM NaH_2PO_4 (Fisher, No. cat.: S369-1); 1.8 mM KH_2PO_4 (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4) con 250 µg/ml de la proteína recombinante TgSAG2
- Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7,4, (137mM de NaCl (Sigma, No. cat S3014); 2,7 mM KCl (Sigma, No. cat 746436); 10 mM NaH_2PO_4 (Fisher, No. cat S369-1); 1,8 mM KH_2PO_4 (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4)
- Solución para el lavado de las membranas (PBS-T0.05) (PBS, pH 7.4 y 0,05% de Tween 20 (Sigma, No. cat.: P1379))
- Solución para el bloqueo de las membranas (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3 % de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001))
- Solución para la dilución de los sueros (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3% de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001))
- Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 100 ng/ml de Proteína AHRP-(Horseradish peroxidase) (MP Biomedical, No. cat.: 0855901)
- Solución del sustrato para la peroxidasa [Solución 2,5 µg/ml de DAB (3,3′- Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (Sigma, No. cat.: D5637)) en 100 mM de Imidazol (Acris organic, No. cat.: 12202-1000), pH 7,0; 10 mM de $NiCl_2$ y 1:1.000 (v/v) de una solución de H_2O_2 al 30 % (Fisher, No. cat H325-4)]

4.3.1.2. Procedimiento de Dot-blot para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos

Pasos a seguir:

Paso 1: Se inicia con el proceso de preparación de las membranas de PVDF para su posterior corte **(Anexo d).** Subsecuentemente se inicia con la sensibilización de las porciones de membranas, sumergiéndolas en Metanol para su activación **(Anexo e).**

Paso 2: Posteriormente se colocaron por triplicado, 5 µl de solución con la proteína recombinante TgSAG2 (250 µg/ml), la cual se dejó secar a temperatura ambiente, desde la tarde hasta la mañana siguiente. Después de la sensibilización de las membranas con la proteína recombinante, se continuó con el bloqueo de éstas, para lo cual las membranas de PVDF se colocaron en un recipiente con la Solución de bloqueo (BSA), para posteriormente ser incubadas por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente (± 23 °C). En ese mismo momento, se descongelaron las muestras de los sueros sanguíneos y se diluyeron 1:100 en 1 ml de la Solución de dilución de los sueros sanguíneos **(Anexo f).**

Paso 3: Una vez concluido el bloqueo de las membranas, fueron sumergidas en la solución de disolución de los sueros; cada porción de membrana se colocó con un suero.

Posteriormente, las membranas expuestas a los sueros se incubaron por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente.

Paso 4: Una vez concluida la incubación, se retiró la solución de los sueros diluidos de los recipientes para posteriormente realizar 3 lavados con la Solución respectiva, por 5 min cada lavado, en agitación constante.

Paso 5: Después las tiras fueron incubadas en la Solución con la proteína A-HRP, en agitación constante a temperatura ambiente por 1 h. **(Anexo g).** Una vez concluida la incubación se procedió a realizar 3 lavados por 5 min, en agitación constante **(Anexo h).**

Paso 6: Una vez finalizados los lavados, se prepararon las respectivas soluciones para el sustrato, cuidadosamente se colocaron las membranas para mantenerlas en incubación y agitación hasta observarse la presencia de reacción **(Anexo i).**

Paso 7: Después, se retiraron las membranas de la solución del sustrato, y se realizó el lavado dos veces por 5 min en agua destilada estéril. Las membranas lavadas se dejaron secando a temperatura ambiente, se ordenaron y fijaron a un soporte de papel, para proceder con el escaneo **(Anexo j).**

Paso 8: Finalmente, en este ensayo se evaluaron las características cualitativas, comparando la coloración de cada spot de manera subjetiva a la presencia e intensidad de las señales obtenidas en cada membrana **(Anexo k).**

4.4. Actividad 3. Ensayo de ELISA indirecto para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos

4.4.1. Materiales

4.4.1.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Placas de 96 pozos (Maxisorp, Nunc, No. cat.: 442404).
- Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas (Marca: Corning).
- Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones (Marca: Marienfeld).
- Agitador orbital (Marca: unico).
- Potenciómetro (pH metro). (Marca: Labnet).
- Balanza analítica (Marca: Boeco).
- Lector de placas de ELISA (Marca: BioTek).
- Computadora (Marca: Lenovo).

4.4.1.1.2. Materiales biológicos

- Muestras de suero sanguíneo.
- Proteína recombinante TgSAG2 de *T. gondii*.

4.4.1.1.3. Reactivos y soluciones

- Solución para la sensibilización de las placas, consiste en Buffer de carbonatos (100 mM de Na_2CO_3 (Merck, No. cat.: 106393); 100 mM de $NaHCO_3$. (Merck , No. cat.: 144558),) 50 mM, pH 9,6 con 100 ng (0.1 ug) de la proteína TgSAG2 por pozo (1 µg/ml).
- Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7,4, (137 mM de NaCl (Sigma, No. cat.: S369-1); 1,8 mM KH_2PO_4 (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4).
- Solución para el lavado de las placas (PBS-T0.05) (PBS, pH 7,4 y 0,05 %de Tween 20 (Sigma, No.cat.:P1379)).
- Solución para el bloqueo de las placas (PBS – T0.05-M3) (PBS-T0.05; 3% de leche descremada (Ahold ® Instant Nonfat Dry Milk, Foodhold U.S.A.)).
- Solución para la dilución de los sueros (PBS-T0.5 BSA3) (PBS-T0.05; 3 % de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001)).
- Solución para la detección de anticuerpos (PBS- T0.05-BSA3; 100 ng/ml de Proteína A-HRP-(Horseradish peroxidase) (MP Biomedical, No. cat.: 0855901).
- Solución del sustrato para la peroxidasa (Solución de TMB (3,3” ,5,5º -tetramethylbenzidine)) (100 mM de Ácido cítrico (Sigma, No. cat.: 791725), 100 mM Acetato de sodio (Sigma , No. cat.: S2889) pH 5,0; 0,1 mg/ml de TMB (Sigma , No. cat 860336) y 1:1.000 (v/v) de una solución de H_2O_2 al 30 % (Fisher, No. cat H325-4).
- Solución de paro para la solución de sustrato (2 M de Ácido sulfúrico (Pharmaco-Aaper, No. cat.: 290000ACS)).

4.4.2. Procedimiento de ensayo de ELISA indirecto para la identificación de anticuerpos anti-*T. gondii* en sueros sanguíneos de felinos

Pasos a seguir:

Paso 1: Para el ensayo ELISA indirecto se inicia con la sensibilización de placas (MaxiSorp). Para realizar la solución sensibilizadora se prepara un total de 10 ml de solución para la proteína TgSAG2 a una concentración de 1 µg/ ml. A la placa se le adiciona 100 µg en cada pozo **(Anexo l).**

Paso 2: Luego incubarla por toda la noche (14 a 16 h) a una temperatura de 4 °C **(Anexo m).**

Paso 3: Al finalizar la incubación se retira la solución sensibilizadora de las placas, continuando así con el bloqueo de estas, para ello se colocará 125 µl de la solución de bloqueo en cada pozo, para después ser incubada por 1 hora a una temperatura de 23 a 25 °C en estático **(Anexo n).**

Paso 4: Una vez concluido el bloqueo de las placas, se realiza el primer lavado de las placas con su respectiva solución de lavado repitiendo tres veces durante 5 min en agitación a temperatura ambiente. Luego del lavado se colocó 100 µl de la solución con cada uno de los sueros, a una dilución de 1:50 en la solución para la dilución **(Anexo o).**

Paso 5: Las placas con las muestras de sueros se incubaron por 1 hora, en agitación constante a temperatura ambiente **(Anexo p).**

Paso 6: Finalizada la incubación se realizó tres lavados, de 5 min con la solución de lavado para posteriormente adicionar 100 µl de la solución con la proteína A-HRP, y se las incubó por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante **(Anexo q).**

Paso 7: Posteriormente se procede a lavar con la solución de lavado, 3 lavados de 5 min por cada lavado y a continuación, se adicionó 100 µl de la solución de sustratos TMB en la placa, para incubarlas por unos 15 minutos a temperatura ambiente, en estático y protegido de la luz **(Anexo r).**

Paso 9: Finalizado el periodo de la incubación se procede a realizar la lectura en el lector de placas de ELISA. Para el caso de sustrato 2 (TMB) antes de realizar su lectura a una onda de 450 nm, se adicionó 50 µl de la solución de paro **(Anexo s).**

4.5. Actividad 4. Presentación y análisis de los datos (*Felis catus domesticus*)

4.5.1. Materiales

4.5.1.1. Materiales físicos y equipos de laboratorio

- Base de datos Excel (Microsoft., Office 16)
- Programa de procesamiento de datos Infostat (Grupo Infostat.)
- Computadora personal

4.5.1.2. Procedimiento para la presentación y análisis de los datos

Pasos a seguir:

Paso 1. Con los resultados obtenidos se procederá a realizar un contraste de la capacidad del ensayo Dot-blot y ELISA indirecto para identificar las muestras seropositivas a la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, para ello ambos ensayos se interpretaran de una manera binomial (seropositivo o seronegativo), las muestras que se analizaran en estos ensayos proceden del mismo paciente, es decir se emplearan muestras pareadas, por esta razón se realizó un contraste estadístico mediante la prueba de McNemar.

5. Resultados

5.1. Identificación en muestras de sueros de felinos de anticuerpos anti-TgSAG2 de *T. gondii* mediante un ensayo Dot-blot

En virtud de los datos obtenidos en el inmunoensayo Dot-blot mediante el uso de la proteína recombinante TgSAG2, se realizó un análisis de carácter subjetivo a través de la observación el cual evidenció que, de las 85 muestras de suero sanguíneo, 6 resultaron positivas a la presencia de anticuerpos anti- *T. gondii.* (Pixels).

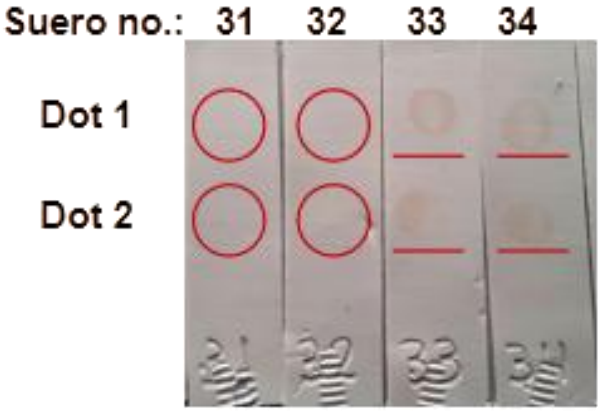


Figura 7: Ensayo Dot-blot in house empleado para la evaluación de la presencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii. Como ilustra el gráfico, las membranas PVDF correspondientes a los pacientes 33 y 34 muestran resultados positivos. Esto es demostrado a través de la formación de manchas de tonalidad marrón en los dos spots de la membrana, esta coloración sugiere la unión de anticuerpos presentes en el suero de estos pacientes con los antígenos fijados en la membrana, por lo tanto, sugiere que han sido expuestos en algún momento a la infección, y sus anticuerpos son detectables en el suero **(Estevez & Tenezaca, 2025).**

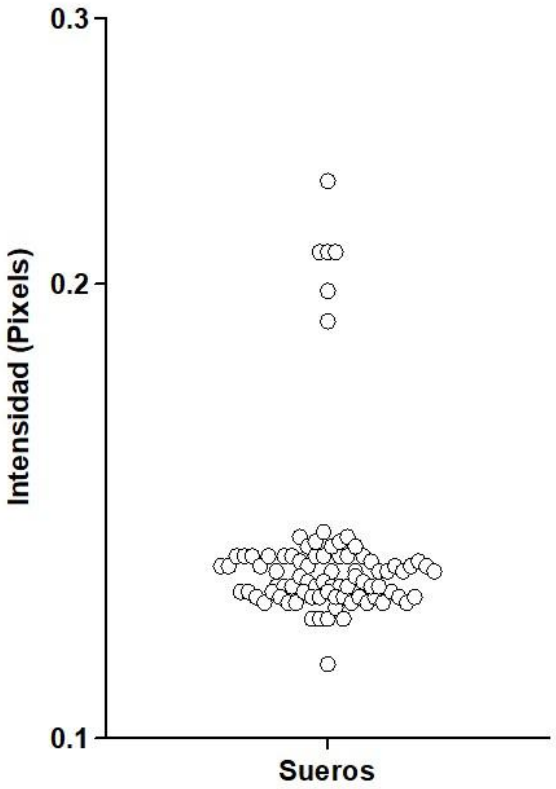


Figura 8: Diagrama de caja que ilustra la distribución de los valores mediante la intensidad de la señal en pixels, obtenidos en el ensayo de Dot-blot. **Modificado de:** Estevez-Tenezaca, (2025).

Los resultados que se lograron al implementar el ensayo de Dot-blot de manera casera reflejaron la presencia de anticuerpos en una parte reducida de la muestra total de los sueros empleados usando como potenciador a la proteína de superficie TgSAG2. El análisis de los resultados obtenidos conjuntamente complementado con el gráfico estadístico Boxplot contribuye un mapeado gráfico más eficiente en cuanto a la distribución de los niveles de anticuerpos de los pacientes muestreados, así como de la intensidad de respuesta inmune de cada paciente al momento de realizado el experimento.

5.2. Identificación en muestras de sueros de felinos de anticuerpos anti-TgSAG2 de *T. gondii* mediante un de ensayo ELISA indirecto

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el potencial serodiagnóstico de ELISA indirecto en las muestras de suero recolectadas de gatos posiblemente infectados, se utilizó la proteína recombinante TgSAG2, en el que se obtuvieron datos del ensayo y se puede evidenciar en el gráfico de dispersión valores de DO (Densidad óptica) con respecto a las muestras. Se utilizaron 11 controles negativos sin el antígeno para evitar errores en el cálculo de los puntos de corte.

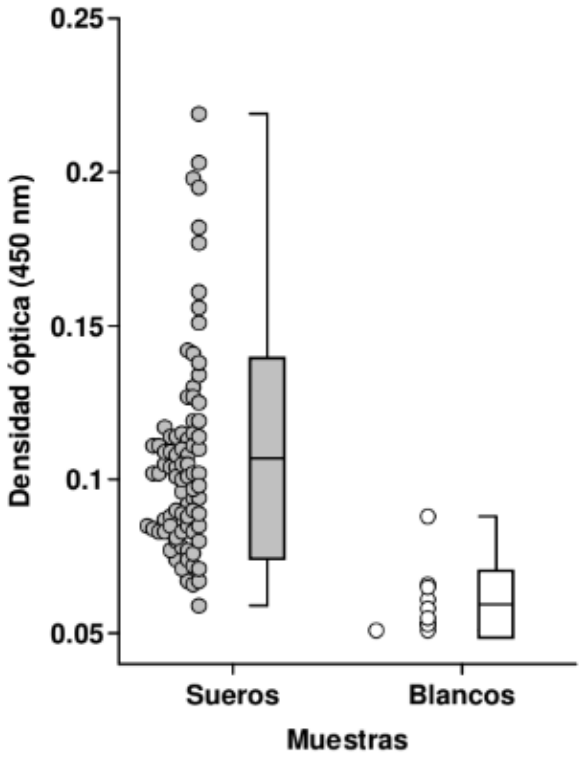


Figura 9: Diagrama de caja en el cual se observa la distribución de los valores de densidad óptica (450nm) obtenidos de un ELISA indirecto realizado en una placa MaxiSorp (eje Y). Por otro lado, en el eje X se distingue los grupos experimentales denominados como "sueros" a las muestras de los 85 animales adicionadas con el antígeno TgSAG2 y como "blancos" a 11 pocillos vacíos que carecen tanto de suero como de proteína TgSAG2 **Modificado de:** Estevez-Tenezaca, (2025).

En los resultados obtenidos con respecto al ensayo de ELISA indirecto (*in house*) se logró determinar la presencia de anticuerpos anti-*T.gondii* en las placas Maxisorp, tomando en cuenta la densidad óptica en las 85 muestras, donde se evidencia el reconocimiento de anticuerpos en 10 muestras, representando así el 11,76% de la población estudiada, estos resultados nos indican que una parte de los pacientes estuvieron posiblemente expuestos a la enfermedad.

5.3. Contraste de resultados entre Dot-blot y ELISA indirecto

En el análisis de los resultados se observó en 84,71 % del total de muestras analizadas un valor negativo (0) tanto para ELISA indirecto como para Dot-blot, señalando que no tienen anticuerpos anti-T. gondii. Por otro lado, en 3,53 % de las muestras séricas que se obtuvieron fueron considerados positivos (1) para la detección de anticuerpos contra T. gondii en ambos métodos serodiagnósticos.

En contraste, 8,24 % de las muestras de suero recolectadas se estimaron resultados con valores negativos (0) para Dot-blot, mientras que para ELISA indirecto se presentaron valores

positivos (1), lo que sugiere la presencia de falsos positivos por parte del método ELISA indirecto, **(Anexo D).**

También, en el 3,53 % restante de las muestras se observó una situación inversa con valores negativos (0) para ELISA indirecto y positivo (1) para Dot-blot, estos casos pueden considerarse como falsos negativos para ELISA indirecto, **(Anexo E).**

Para el estudio estadístico se empleó la prueba de McNemar (McNemar = 1,60; p = 0,3438), debido a que el valor de p es superior al nivel de significancia (p>0,05), no se rechaza la hipótesis nula, lo cual indica que no existe evidencia estadística significativa para afirmar que hay diferencia entre los dos métodos diagnósticos evaluados en el presente estudio. Por lo tanto, se concluye con un 95% de confianza que ambos métodos presentan un desempeño en el diagnostico similar, **(Anexo F).**

Tabla 1. Resultados obtenidos al aplicar los ensayos Dot- Blot y ELISA indirecto mediante la proteína recombinante TgSAG2 para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* en 85 muestras de suero sanguíneo en felinos domésticos (McNemar, p = 0,3438)

Ensayo	Resultado		Total
	Positivo	Negativo	
Dot-blot	6 (7,06 %)	79 (92,94 %)	85 (100 %)
ELISA indirecto	10 (11,76 %)	75 (88,24 %)	85 (100 %)

6. Discusión

En este estudio se evaluó la respuesta diagnostica de dos técnicas inmunológicas Dot- blot y ELISA indirecto *(in house)* con el uso de la proteína recombinante TgSAG2 como antígeno, en la detección de anticuerpos contra *T. gondii* en gatos.

En contexto, la aplicación de la proteína antigénica de superficie como TgSAG2 en ambos ensayos ha sido validada como una opción prometedora, dado que es altamente accesible para el sistema inmunológico del huésped al ofrecer mayor especificidad y sensibilidad, especialmente durante la fase crónica de la infección (Ferra et al., 2020). En esta investigación, la baja seropositividad podría estar relacionada con la limitada exposición al parásito en la población analizada, posiblemente asociada a un entorno más controlado; sin embargo, en resultados reportados por Huang et al. (2002) destacaron que el empleo de TgSAG2 recombinante en ELISA indirecto tuvieron una tasa de positividad de 21,9 % en 192 gatos analizados, demostrando que es un método útil para el diagnóstico serológico.

En el análisis de muestras de suero mediante ELISA indirecto se obtuvieron una mayor proporción de resultados seropositivos, con respecto al ensayo de Dot-blot; esta discrepancia entre ambos ensayos puede ser por las características y la sensibilidad de cada técnica como indicaron Yadav et al. (2021) en el cual ELISA al ser un método cuantitativo presenta mayor capacidad de detección a niveles bajos de anticuerpos, mientras que Dot-blot, de carácter más cualitativo es menos sensible, el cual se reflejó en casos positivos más bajos.

Es importante destacar, la evaluación de los resultados obtenidos entre ambas pruebas serológicas, demostrando su utilidad en la identificación de anticuerpos anti- *T.gondii* en este estudio. A pesar de que se evidenció repuestas distintas en la proporción de muestras positivas, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad diagnóstica entre ambos ensayos ($p > 0,05$); esto sugiere que a pesar de la variación, ambos métodos ofrecen rendimientos equivalentes; hallazgos que coinciden con lo demostrado por Montalván & Castro (2023) en protocolos optimizados tanto en ELISA indirecto como Dot-blot realizado en gatos, mostraron una alta eficiencia para detectar anticuerpos contra T.*gondii* al utilizar el antígeno SAG2; en consecuencia se demuestra que los dos métodos son idóneos para el diagnóstico de la toxoplasmosis.

En conjunto, ambas pruebas detectaron eficazmente gatos seropositivos a T.gondii. No obstante, el ELISA demostró mejor capacidad diagnóstica, por lo que la convierte una opción importante en estudios epidemiológicos, control de salud pública o en contextos clínicos

(Sabukunze y otros, 2024) . Por su parte el Dot-blot, aunque es menos sensible, podría ser una técnica complementaria o de confirmación por su simplicidad y bajo costo operativo, permitiendo su aplicación en entornos con recursos limitados (Safarpour y otros, 2021).

7. Conclusiones

En el presente estudio, se determinó, que la adición del antígeno de superficie TgSAG2 como medio potenciador en los métodos serodiagnósticos ELISA indirecto y Dot-blot, resultó eficiente para la detección de anticuerpos anti-T. gondii. Su aplicación demostró un buen desempeño bajo condiciones de laboratorio *(in house),* atribuida a la alta sensibilidad del antígeno y a la capacidad de estandarizar su producción para aplicaciones a gran escala, siempre que se ajusten adecuadamente las condiciones técnicas y económicas.

Aunque los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la efectividad diagnóstica entre ambos inmunoensayos. No obstante, existen factores prácticos y contextuales que nos ayudan a elegir la idoneidad entre una técnica u otra. En términos generales es recomendable la técnica Dot-blot por la facilidad de replicación no siendo necesario un equipo especializado, sin embargo, cuando se considera la confiabilidad, nivel de tecnificación y procedimiento la técnica de ELISA indirecto resulta ser la opción preferente.

8. Recomendaciones

Es conveniente contar con muestras provenientes de pacientes diagnosticados como positivos a la enfermedad, ya que, esto asegura una mayor precisión y eficiencia en los estudios realizados. Es de gran importancia disponer de un banco de muestras conservadas correctamente, esto contribuye enormemente a la fiabilidad de los resultados y facilita el proceso experimental.

Es imperativo recomendar la estandarización y ajuste de las variables en los protocolos de ensayo, tales como la concentración del antígeno utilizado, mejores técnicas de muestreo sanguíneo en campo y tiempos de ensayo en laboratorio con la finalidad de mejorar el desempeño de los ensayos en el futuro.

El estudio, que tenía como objetivo evaluar la viabilidad de ensayos in-house desarrollado en el laboratorio presento algunas limitaciones. La principal dificultad fue el proceso del muestreo sanguíneo en pacientes posiblemente expuestos a la enfermedad y la calidad de las muestras recolectadas en el proceso, las mismas fueron recolectadas en condiciones ambientales y logísticas complicadas.

9. Referencias

Afonso, E. T.-F. (2007). Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitol, 134*(14), 1963-1971. doi:10.1017/s0031182007003320

Ajzenberg, D., & Bañuls, A. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol, 34*(10), 1185-1196. doi:10.1016/j.ijpara.2004.06.007

Al-Adhami, B. H. (2014). A new multi-host species indirect ELISA using protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies with comparison to ELISA-IgG, agglutination assay and Western blot. *Vet.Parasitol, 200*(1-2), 66-73. doi:10.1016/j.vetpar.2013.11.004

Alhajj M, Z. M. (25 de Enero de 2023). StatPearls. *nzyme Linked Immunosorbent Assay*. Obtenido de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/

Attias, M., Teixeira, D. E., & Benchimol, M. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors, 13*(588), 2-13. doi:10.1186/s13071-020-04445-z

Béla, S. R.-J.-B. (2008). Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis, 62*(3), 245-254. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.017

Bojorque, M. (2016). Actualización de la seroepidemiología de *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Cuenca. *Tesis de Maestria.* Universidad de Cuenca, Cuenca.

Castaño, C., Marcet, R., & Cox, R. (2001). Inhibición de la invasión y multiplicación de *Toxoplasma gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2. *Rev. cuban. med. trop, 53*(3), 161-169.

Dardé, M. (2008). *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite, 15*(3), 366-71. doi:10.1051/parasite/2008153366

Delgado, I. L., Zúquete, S., & Santos, D. (2022). The Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Encycl, 2*(1), 189-211. doi:https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010012

Dubey, J. (1996). *Med. Microbiol.* (B. S, Ed.) EEUU: University of Texas Medical Branch at Galveston.

Dubey, J. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol., 126*(1-2), 57-72. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.005

Dubey, J. (2008). The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*, 467–475. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x

Dumètre, A., & Dardé, M. (2003). How to detect *Toxoplasma* gondiioocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev., 27(5)*((5)), 651-661. doi:10.1016/s0168-6445(03)00071-8

Elmore, S., Jones, J., Conrad, P., Patton, S., Lindsay, D., & Dubey, J. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol., 26*(4), 190-196. doi:10.1016/j.pt.2010.01.009

Ferra, B., Holec-Gąsior, L., & Grąźlewska, W. (2020). Toxoplasma gondii recombinant antigens in the serodiagnosis of toxoplasmosis in domestic and farm animals. *Animals, 10*(8), 1245. doi:https://doi.org/10.3390/ani10081245

Ferguson, D. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz, 104*(2), 133-148. doi:10.1590/S0074-02762009000200003

Freppel, W., & Ferguson. (2019). Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. *Cell Surf., 5*(100016). doi:10.1016/j.tcsw.2018.100016.

Galal, L., Ariey, F., & Gouilh. (2022). A unique *Toxoplasma gondii* haplotype accompanied the global expansion of cats. *Nat. Commun., 13*(5778). doi:10.1038/s41467-022-33556-7

Galván Ramírez, M. d. (2001). *Toxoplasmosis humana.* Mexico: ECORFAN.

Galván, M. (2014). *Toxoplasmosis Animal.* (A. Ediciones, Ed.) Mexico: Universidad de Guadalajara.

García, R. L. (2014). Comparación entre un ELISA indirecto y la técnica de aglutinación microscópica para la detección de anticuerpos antileptospirales. *Rev. salud anim., 36*(2), 118-123.

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

Hatam-Nahavandi, K., Calero-Bernal, R., Taghi Rahimi, M., Sattar Pagheh, A., Zarean, M., Dezhkam, A., & Ahmadpour, E. (2021). *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as public health concerns: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep., 11*(1), 9509. doi:10.1038/s41598-021-89031-8

Hill, D., Chirukandoth, S., & Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Health Res. Rev., 6*(1), 41-61. doi:10.1079/ahr2005100

Huang, X., Xuan, X., Kimbita, E., & Battur. (2002). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant SAG2 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. *J. Parasitol., 88*(4), 804-807. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0804:DAEOAE]2.0.CO;2

Isaza, M. (2007). Toxoplasmosis: zoonosis parasitaria. *CES Medicina, 21*(1), 41–48.

Jerome, M. E. (1998). *Toxoplasma Gondii*Bradyzoites Form Spontaneously during Sporozoite-Initiated Development. *Infect. Immun., 66(10)*, 4838-4844. doi:10.1128/iai.66.10.4838-4844.1998

Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017). Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb. Protoc.*, 569-573. doi:10.1101/pdb.prot093757

Kotresha, D., & Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS, 118*(8), 529-542. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02629.x

Lin, A. (2015). Direct ELISA. *Methods Mol Biol*, 61-67. doi:10.1007/978-1-4939-2742-5_6

Lin, D., Li, B., Fu, L., Qi, J., & Xia, C. (2022). A novel polymer-based nitrocellulose platform for implementing a multiplexed microfluidic paper-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Microsyst. Nanoeng., 8*(1). doi:10.1038/s41378-022-00385-z

Lind, P. H. (1997). The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol., 71*(1), 1-15. doi:10.1016/s0304-4017(97)00010-1

Lindsay, D. D. (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol., 73*(1-2), 27-33. doi:10.1016/s0304-4017(97)00048-4

Liyanage, K. L. (2021). Descriptive Comparison of ELISAs for the Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Animals: A Systematic Review. *Pathog., 10*(5), 605. doi:10.3390/pathogens10050605

Mahendra, P., Berhanu, G., Steinmetz, C., & Durglishvili, N. (2021). Toxoplasmosis: An Emerging and Re-emerging Zoonosis of Global Public Health Concern. *Am. J. Infect. Dis., 9*(2), 32-38. doi:10.12691/ajidm-9-2-1

Maldonado, Y. A., & Read, J. S. (2017). Diagnosis, Treatment, and Prevention of Congenital Toxoplasmosis in the United States. *Peds, 139*(2), e20163860. doi:10.1542/peds.2016-3860

Marín-García, P. P. (2022). *Toxoplasma gondii* in Foods: Prevalence, Control, and Safety. *Foods, 11*(16), 2542. doi:10.3390/foods11162542

Montalván, S., & Castro, J. (2023). *Optimización de ensayos de ELISA indirecto y Dot Blot para la detección de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en felinos (Felis catus domesticus) con las proteínas recombinantes TgSAG2 y TgGRA7.* Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca.

Martín-Hernández, I., & García-Izquierdo, S. M. (2003). Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquimia, 28*(3), 19-27.

Montoya JG, L. O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet, 363*(9425), 1965-1976. doi:10.1016/s0140-6736(04)16412-x

Nelson, R., & Couto, G. (2010). *Medicina Interna de pequeños animales* (4 ed.). Elsevier Mosby.

Oliveira, G. C. (2019). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infections in swine of non-tecnified rearing farms of the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil and associated risk factors. *Parasite Epidemiol Control, 4*, e00080. doi:10.1016/j.parepi.2018.e00080

Petersen, E. (2007). Toxoplasmosis. *Semin. Medicina Neonatal Fetal., 12*(3), 214-223. doi:10.1016/j.siny.2007.01.011

Petersen, E., & Dubey, J. (2001). Biology of toxoplasmosis. En D. Joynson, & T. Wreghitt (Edits.). Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511527005.003

Quisilema, T. (2017). Determinación de anticuerpos dirigidos contra *toxoplasma gondii* en felinos domésticos que viven en gatiles en 6 administraciones zonales del Distrito Metropolitano de Quito. *Tesis de pregrado.* Universidad Central, Quito.

Rivera, N., & García, P. (2017). El papel de los gatos en la toxoplasmosis. Realidades y responsabilidades. *Rev Fac Med Univ Nac Auton Mex, 60*(6), 7-18.

Rivera-Fernández, A.-S. J.-R.-P. (2022). Gatos y toxoplasmosis: una visión general. *Clínica Veterinaria Abordaje Diagnóstico y Terapéutico, 8*. doi:10.22201/fmvz.23958766e.2022.8.84

Robert-Gangneux, F., & Dardé, L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews, 25*(2), 264-296. doi:10.1128/cmr.05013-11

Rostami, A., Riahi, S., Gamble, H., Fakhri, Y., Shiadeh, M., Danesh, M., . . . Gasser, R. (2020). Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect, 26*(6), 673-683. doi:10.1016/j.cmi.2020.01.008

Rupprecht, K. R. (2010). Development of a dot-blot assay for screening monoclonal antibodies to low-molecular-mass drugs. *Anal Biochem, 407*(2), 160-164. doi:10.1016/j.ab.2010.08.003

Sabukunze, S., Gu, H., Zhao, L., Jia, H., & Guo, H. (2024). Comparison of the performance of SAG2, GRA6, and GRA7 for serological diagnosis of Toxoplasma gondii infection in cats. *Front. Vet. Sci, 11*, 1423581. doi:https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1423581

Safarpour, H. P.-M. (2021). A novel enhanced dot blot immunoassay using colorimetric biosensor for detection of *Toxoplasma gondii* infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis, 79*, 101708. doi:10.1016/j.cimid.2021.101708

Shapiro, K. B.-O. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food Waterborne Parasitol., 15*, e00049. doi:10.1016/j.fawpar.2019.e00049

Sibley, L., Khan, A., Ajioka, J., & Rosenthal, B. (2009). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc London, Ser B, 364*(1530), 2749-2761. doi:10.1098/rstb.2009.0087

Sukumaran, A. T. (2020). Development and Troubleshooting in Lateral Flow Immunochromatography Assays. *Indian J Clin Biochem, 36*(2), 208-212. doi:10.1007/s12291-020-00887-5

Torres , Á. A., & Zambrano, G. S. (2022). Prevalencia de *toxoplasma gondii* en gatos domésticos (felis catus) en la zona urbana de Calceta. *Tesis de pregrado.* ESPAM MFL, Calceta.

Villa, T. (2018). "PREVALENCIA DE TOXOPLASMOSIS EN GATOS DOMÉSTICOS (felis catus) EN EL BARRIO SAN FELIPE CANTON LATACUNGA. *Tesis de pregrado.* Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga.

Wang, X. N. (2016). Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins. *Anal Chim Acta, 912*, 10-23. doi:10.1016/j.aca.2016.01.048

Warschkau , D., & Seeber, F. (2023). Advances towards the complete in vitro life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Fac. Rev., 12*(1). doi:10.12703/r/12-1

Xiang, Y. Z. (2021). Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Sci. Rep., 11*(1). doi:10.1038/s41598-021-91521-8

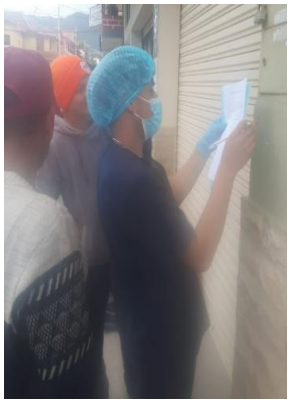
Yadav, J., Kanisht, B., Yarvendra, S., & Mahavir, S. (2021). Comparative evaluation of indirect-ELISA and DOT blot assay for serodetection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae antibodies in poultry. *J. Microbiol. Methods, 189*, 106317. doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106317

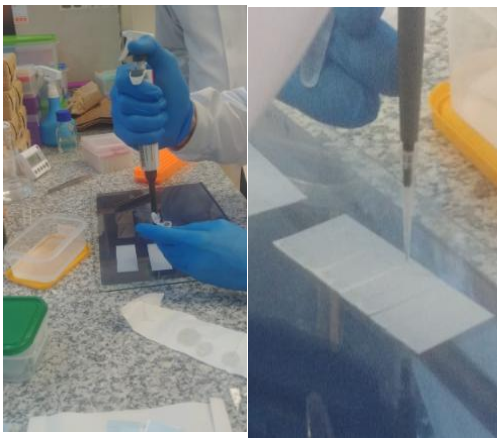
Yahaya, M. Z. (2019). The Effect of Nitrocellulose Membrane Pore Size of Lateral Flow Immunoassay on Sensitivity for Detection of Shigella sp. in Milk Sample. *Mater. Today Proc., 17*, 878-883. doi:10.1016/j.matpr.2019.06.384

Ybañez, R. H. (2020). Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 10*. doi:10.3389/fcimb.2020.00204

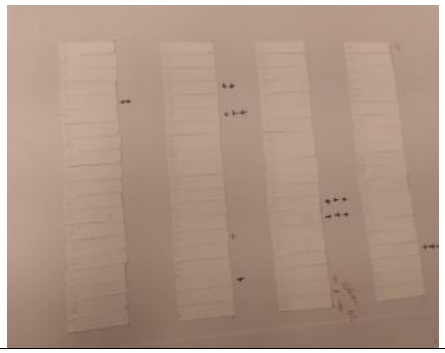
Zhang, Y. K. (2023). Enhancing Protein Adsorption for Improved Lateral Flow Assay on Cellulose Paper by Depleting Inert Additive Films Using Reactive Plasma. *ACS Appl. Mater. Interfaces. , 15*(5), 6561-6571. doi:10.1021/acsami.2c21501

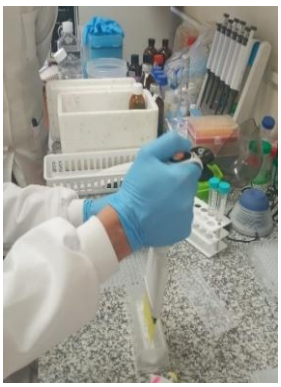
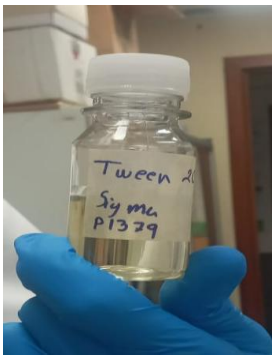
10. Anexos

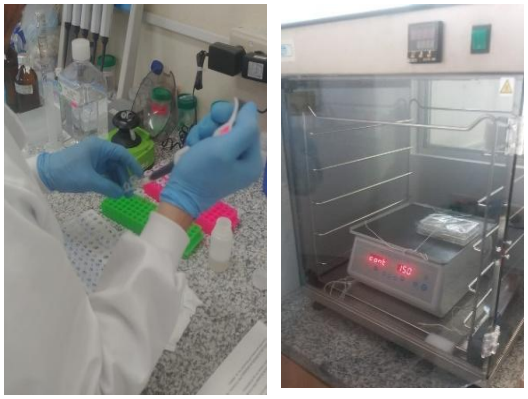
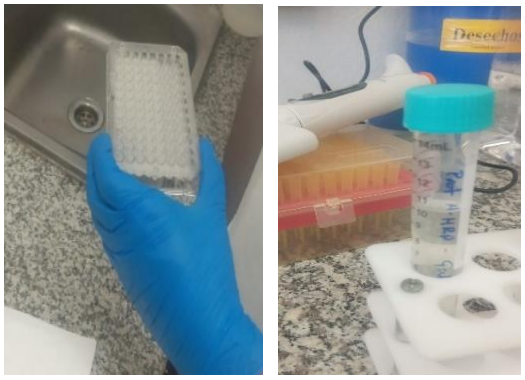
Anexo A. Muestreo sanguíneo.	
	**Anexo a:** Preparación de implementos para el proceso de muestreo.
	Anexo b: Toma de muestras sanguíneas de la vena yugular de uno de los pacientes utilizados para el estudio.
	Anexo c: Manejo de las muestras, centrifugado y refrigeración.

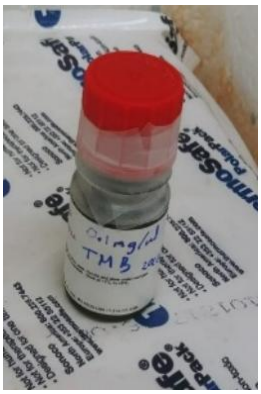
Anexo B. Procedimiento de ensayo Dot-blot.	
	Anexo d: Preparación y corte de membranas
	Anexo e: Sensibilización de las membranas PVDF en Metanol
	**Anexo f:** Sensibilización de las membranas con TgSAG2 y bloqueo.

	Anexo g: Incubación con la proteína A-HRP
	Anexo h: Lavado de las membranas.
	Anexo i: Incubación y agitación
	Anexo j: Secado y fijación de las muestras

	**Anexo k:** Análisis de las muestras

Anexo C. Procedimiento de ensayo ELISA Indirecto.	
	**Anexo l:** Desarrollo de la solución de antígenos para sensibilizar las placas MaxiSorp, mediante buffer de carbonatos con la proteína TgSAG2.
	Anexo m: Incubación durante la noche a temperatura de 4 °C.
	**Anexo n:** Bloqueo de las placas mediante la solución preparada (PBS, Tween 20 y leche descremada).

	Anexo o: Proceso de la solución de lavado en agitación a temperatura ambiente y su posterior incubación.
	**Anexo p:** Colocación de la solución de dilución con cada suero etiquetado y su posterior incubación de las placas con las muestras de suero y solución de dilución.
	**Anexo q:** Lavado de las placas con la solución de lavado y adición de la Proteína A-HRP

	**Anexo r:** Aplicación de la solución de sustrato TMB en la placa y posterior incubación.
	Anexo s: Proceso de interpretación en el equipo lector de placas de ELISA.

Anexo D. Tabla de frecuencias relativas al total (expresadas como porcentajes) en columnas: ELISA indirecto.

DBLOT	***0***	***1***	***Total***
0	84.71	8.24	*92.94*
1	3.53	3.53	*7.06*
Total	*88.24*	*11.76*	*100.00*

Anexo E. Tabla de Frecuencias Absoluta en columnas: ELISA

DBLOT	***0***	***1***	***Total***
0	72	7	*79*
1	3	3	*6*
Total	*75*	*10*	*85*

Anexo F. Análisis estadístico/ Análisis McNemar

ESTADISTICO	***VALOR***	***p***
Mc Nemar	1.60	*0.3438*
Coef. Conting. Cramer	0.23	
Kappa (Cohen)	0.31	
Coef. Conting. Pearson	*0.31*	