



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**FRECUENCIA DE *Toxoplasma gondii* EN FÉLIDOS
SILVESTRES EN CAUTIVERIO DE MÉXICO**

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
JOSÉ ANTONIO GÓMEZ RIOS**

DIRECTORES:

Dra. Matilde Jiménez Coello

Dra Karla Acosta Viana



Mérida, Yuc., México, marzo de 2018

POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**FRECUENCIA DE *Toxoplasma gondii* EN
FÉLIDOS SILVESTRES EN CAUTIVERIO DE
MÉXICO**

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
JOSÉ ANTONIO GÓMEZ RIOS**

DIRECTORES:

Dra. Matilde Jiménez Coello

Dra Karla Acosta Viana

Mérida, Yuc., México, marzo de 2018

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**ALUMNO: MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
JOSÉ ANTONIO GÓMEZ RIOS**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DR. ANTONIO ORTEGA PACHECO
CCBA-UADY**

**DR. DAVID OSEGUERA MONTIEL
CCBA-UADY**

**DRA. EUGENIA DEL S. GUZMÁN MARÍN
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

**DR. EDWINGUTIÉRREZ RUIZ
CCBA-UADY**

**DR. CARLOS ACEVEDO ARCIQUE
CCBA-UADY**

MÉRIDA, YUCATÁN, MARZO DEL 2018

KM 15.5 carretera Mérida - Xmatkuil Apdo. Postal 4-116 Itzimmá Mérida, Yucatán.
Tel. (999) 9 42-32-00 Fax 9 42 -32-05

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de tesis las Dras. Karla Acosta Viana y Matilde Jiménez Coello por todo su apoyo, tiempo y paciencia para conmigo durante la realización de este proyecto; sin su enorme trabajo y dirección este trabajo no hubiese sido posible.

Agradezco a mis tutores los Drs. Antonio Ortega Pacheco y David Oseguera Montiel por sus comentarios y orientación durante estos dos años de maestría, los cuales han culminado en este producto académico y de investigación.

A todo el cuerpo académico y personal del laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigaciones Regionales “Dr Hideyo Noguchi”; sin sus enseñanzas y amistad la realización de este trabajo no hubiese sido la misma.

Y por último, pero no menos importantes, a mis padres por su confianza, apoyo y amor incondicional en esta etapa de mi desarrollo profesional.

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito zoonótico mundial del cual se desconoce su carga de ooquistes, período de eliminación y biotipos en félidos silvestres. En estas especies, se han reportado altas seroprevalencias del parásito (54-81%), pudiendo afectar negativamente la conservación, reintroducción y/o translocación de estas y otras especies, dependiendo de la susceptibilidad, virulencia del biotipo involucrado y estatus inmune del hospedero. Asimismo se han asociado estas especies con casos de toxoplasmosis en humanos. El objetivo de esta investigación fue determinar la frecuencia de *T. gondii* en félidos de cuatro zoológicos mexicanos. Se colectaron muestras de sangre de 44 félidos de diez especies en cuatro zoológicos mexicanos, así como 36 muestras de heces de estos mismos ejemplares. El suero fue analizado mediante una ELISA IgG indirecta. Las heces se analizaron por microscopia directa posterior a una flotación (con solución de Seather, densidad 1.27) para determinar ooquistes del parásito. Asimismo, se obtuvo el ADN genómico de sangre completa y heces, y se evaluó la ausencia de inhibidores por amplificación de los genes constitutivos GAPDH Y 18s respectivamente; las muestras positivas se utilizaron para la amplificación del gen SAG1 de *T. gondii*, mediante una PCR anidada (PCRa). Se detectaron anticuerpos anti-*T. gondii* en el 100% de 42 sueros analizados (ya que dos no pudieron ser evaluados), en contraste, no se detectaron al microscopio ooquistes en las muestras de heces. Por otra parte, en el 9% (4/44) y en el 14.3% (5/35) de las muestras de ADN obtenidas de sangre y heces respectivamente, se amplificó un fragmento de 390 pares de bases, correspondiente a SAG1. En conclusión, existe una alta seroprevalencia de *T. gondii* en las poblaciones de félidos silvestres en cautiverio estudiadas, las cuales demuestran evidencia de parasitemia y eliminación de ooquistes aun en ejemplares adultos.

PALABRAS CLAVE

Toxoplasma gondii, félidos silvestres, cautiverio, ooquiste, serología, PCRa

SUMMARY

Toxoplasma gondii is a worldwide zoonotic parasite whose oocyst burden, elimination period and biotypes in wild cats are unknown. In these species, high seroprevalences of the parasite (54-81%) have been reported, being able to negatively affect the conservation, reintroduction and / or translocation of these and other species, depending on the susceptibility, virulence of the biotype involved and host immune status. These species have also been associated with cases of toxoplasmosis in humans. The objective of this investigation was to determine the frequency of *T. gondii* in felids of four Mexican zoos. Blood samples were collected from 44 felids from ten species in four Mexican zoos, as well as 36 stool samples from these same specimens. The serum was analyzed by means of an indirect IgG ELISA. The faeces were analyzed by direct microscopy after flotation (with Seather's solution, density 1.27) to determine oocysts of the parasite. Likewise, the genomic DNA of whole blood and faeces was obtained, and the absence of inhibitors was evaluated by amplification of the constitutive genes GAPDH and 18s respectively; the positive samples were used for the amplification of the SAG1 gene of *T. gondii*, by means of a nested PCR (nPCR). Anti-*T. gondii* antibodies were detected in 100% of 42 sera analyzed (since two could not be evaluated), in contrast, no oocysts were detected in the stool samples under the microscope. On the other hand, in 9% (4/44) and 14.3% (5/35) of the DNA samples obtained from blood and feces respectively, a fragment of 390 base pairs, corresponding to SAG1, was amplified. In conclusion, there is a high seroprevalence of *T. gondii* in the populations of wild felids in captivity studied, which demonstrate evidence of parasitaemia and elimination of oocysts in adult specimens.

KEYWORDS

Toxoplasma gondii, wild felids, captivity, oocyst, serology, nPCR

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I. Marco teórico: <i>Toxoplasma gondii</i> Infection in Wild Felids.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUCTION	5
ROLE OF WILD FELIDS IN THE LIFE CYCLE OF <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	7
TOXOPLASMOSIS IN WILD FELIDS.	8
SEROLOGICAL DIAGNOSIS IN WILD FELIDS.....	8
MOLECULAR DETECTION AND IDENTIFICATION OF BIOTYPES OF <i>TOXOPLASMA GONDII</i> IN WILD FELIDS.....	14
IMPACT OF WILD FELIDS INFECTED WITH <i>T. GONDII</i> ON PUBLIC HEALTH	15
<i>T. GONDII</i> IMPACT ON THE CONSERVATION OF WILD FELIDS.....	18
REFERENCES	18
OBJETIVOS.....	26
CAPITULO II. Frecuencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en félidos en cautiverio de México.....	27
RESUMEN.....	28
PALABRAS CLAVE	29
INTRODUCCIÓN.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	36
BIBLIOGRAFÍA	40
CONCLUSION GENERAL.....	47
SUGERENCIAS.....	47

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPITULO I. Marco teórico: *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Felids.

Table 1. Wild Felidae in which been tested and found elimination of <i>T. gondii</i> oocysts.....	6
Table 2. Serological techniques used to detect anti- <i>T. gondii</i> antibodies in wild felids.....	9
Table 3. <i>Toxoplasma gondii</i> isolates obtained from wild felids.....	16

CAPITULO II. Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en félidos en cautiverio de México.

Cuadro 1. <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras de sangre y heces de felinos en cautiverio.....	35
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio del producto de amplificación con los cebadores para SAG1 de <i>T. gondii</i>	35

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular de distribución mundial, el cual tiene como hospedadores definitivos a los félidos y como hospederos intermediarios a múltiples especies de aves y mamíferos (Dubey, 2009).

A nivel internacional existe información limitada sobre la carga parasitaria, biotipos y el comportamiento del parásito en las especies de félidos silvestres; lo que puede llegar a afectar los proyectos de conservación, reintroducción y/o translocación de estas especies al introducir individuos infectados o con biotipos diferentes en zonas con alto contacto humano y/o con hospederos intermediarios altamente susceptibles de desarrollar cuadros clínicos de toxoplasmosis (por ejemplo marsupiales australianos y primates del nuevo mundo) (Silva *et al.*, 2001 b; Kenny *et al.*, 2002; Ramos Silva *et al.*, 2007; Pasd y Dubey, 2008; Ullmann *et al.*, 2010). Asimismo, pueden representar un problema para la salud pública, ya que se han reportado casos de toxoplasmosis en humanos asociados a félidos silvestres (ya sea por contacto directo o indirecto) (Stephen *et al.*, 1996; Bowie *et al.*, 1997; Aramini *et al.*, 1998; Chacin-Bonilla *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2011; Gómez-Marín *et al.*, 2012).

En México, son pocos los estudios enfocados a la detección de *T. gondii* en félidos de vida libre (Kikuchi *et al.*, 2004; Rendón-Franco *et al.*, 2012; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2013); en cuanto a félidos silvestres en cautiverio, únicamente se ha realizado un estudio el cual reportó una prevalencia de anticuerpos del 81.39% (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2013).

Diversos estudios han utilizado como complemento de las pruebas serológicas, técnicas de biología molecular para la detección de ADN de *T. gondii* para fines diagnósticos, principalmente en muestras de tejidos de félidos silvestres en cautiverio con signología sugerente a toxoplasmosis aguda (Kenny *et al.*, 2002; Lloyd y Stidworthy, 2007; Dubey *et al.*, 2010) y en félidos de vida libre que fallecieron por diversas causas (Dubey *et al.*, 2004, 2013; Demar *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008; Cañón-Franco *et al.*, 2013; Vitaliano *et al.*, 2014).

Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *T. gondii* por medio de técnicas serológicas, copararasitoscópicas y moleculares en félidos silvestres en cuatro zoológicos mexicanos.

CAPITULO I. Como Marco teórico, de adjunta el Capítulo 5
titulado “*Toxoplasma gondii* Infection in Wild Felids”
del libro publicado que lleva por título “*Toxoplasma gondii*:
Dangers, Life Cycle and Research”, por lo que se respetó el
idioma de publicación y formato impreso.

***TOXOPLASMA GONDII* INFECTION IN WILD FELIDS**

J. A. Gomez-Rios^{1,2}, K. Y. Acosta-Viana¹, Eugenia Guzman-Marin¹, A. Ortega-Pacheco² D.M. Guiris-Andrade³ and M. Jimenez-Coello^{1,*}

¹Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi,” Universidad Autonoma de Yucatan, Merida Yucatan, Mexico

²Campus de Ciencias Biologicas y Agropecuarias, Carretera Merida-Xtmatkuilt, Merida Yucatan, Mexico

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autonoma de Chiapas, Carr. Emiliano Zapata Km. 8, Del Frigorífico, 29060 Tuxtla Gutiérrez, Chis. Mexico.

ABSTRACT

The epidemiology of *Toxoplasma gondii* in wild felids is not well known despite all felids are definitive hosts in the transmission and maintenance of this protozoa. Apparently, the shedding period and amount of oocysts in wild felids is similar as observed in domestic cats but variations between species may occur. Infected wild felids are often asymptomatic or have nonspecific signs of infection but some species such as the sand cat (*Felis margarita*) and Pallas cat (*Felis manul*) may have develop an increase susceptibility and develop clinical signs with fatal cases. Epidemiological studies are mostly limited to serological screening to detect previous contact with the agent. The Dye Test (Sabin Feldman), Micro Agglutination Test Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Indirect Immunofluorescence, Latex Agglutination and Direct or Indirect Hemagglutination test are the more commonly serological tests used. The ELISA test may be more suitable because of its high sensitivity, high concordance with the other serological tests and low cost. Serological evidence show high frequencies ranging from 20 to 75% with periods of reinfection depending on the source of food and presence of domestic cats in the area. More recently, molecular studies of *T. gondii* such as the conventional polymerase chain reaction (PCR) and their nested (nPCR) and real-time

* Corresponding author: M. Jimenez-Coello. Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi,” Universidad Autonoma de Yucatan. Ave. Itzaes 490 x 59 Centro, CP. 97000. Merida Yucatan, Mexico. E-mail: mjcoello@correo.uady.mx.

(qPCR) variants, have demonstrated high sensitivity and specificity. Genotypes I and II of *T. gondii* are usually associated with clinical cases of toxoplasmosis in humans, but cases associated with atypical biotypes reported in wild felids. The Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) has identified the three biotypes of *T. gondii* as atypical biotypes in wild felids in a more reliable way.

Seroprevalence of *T. gondii* in wild felids may be high depending on the availability of contaminated sources of food and water. The epidemiology of the disease may vary according to the feline species being some of them more susceptible. More studies are required to establish the role of wild felids on the shedding period and oocytes burden under the different residing conditions.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan of worldwide distribution, which has as host-definitive felines and many species of reptiles, birds and mammals as incidental hosts [1].

Both domestic felines and feral cats (particularly from tropical areas where there is no control on their population) can release large amounts of oocysts during the primary infection, thereby increasing the risk of infecting species highly susceptible (i.e., Australian marsupials, new world primates, lemurs, and Pallas cats and other felidae kept in captivity), so they can get to impact negatively on species conservation projects.

In the case of wild felids, there is scarce information regarding the parasite burden of infection by *T. gondii* and which biotypes are involved. The compartment of the parasite is not known in the different species of wild felids, those free-living (in protected reserves) as well as those living in captivity (zoos). Most studies in these species have been performed in specimens in captivity and have focused on detecting the presence of specific anti-*T. gondii* antibodies. Among the tests that have been used in species of wild felines for serological detection are: Dye Test (Sabin Feldman), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Indirect Immunofluorescence, Indirect Hemagglutination test and Modified Agglutination Test (DT, ELISA, IFAT, HI and MAT respectively), being MAT one of the most widely used tests in both free-living wild felids as those kept in captivity.

Some studies with wild felids in captivity, carried out in Brazil in 2001 and 2010, several species were included, reporting a prevalence of 54.6% (n = 865) and 63.4% (n = 161), respectively. In Mexico, there is available some information in wild felids in captivity reporting a seroprevalence of 81.39%. Moreover, some other studies have used molecular biology techniques to detect the presence of *T. gondii* DNA in felids in captivity, these has been done mainly from tissue samples obtained from animals that died with signs of acute toxoplasmosis; these information could provide interesting data association, i.e., in Brazil, felids (>3 years old), living in captivity and feed with raw meat

or meat frozen for less than seven days, showed a significant association with infection and reinfection of *T. gondii*.

Therefore in this chapter is intended to conduct a review of epidemiological studies to date available on the presence and distribution of *T. gondii* in populations of wild felids, to comprehensively visualize the impact of the parasite on these species, that can significantly threaten over conservation programs of these animal species most often in danger of extinction.

Table 1. Wild Felidae in which been tested and found elimination of *T. gondii* oocysts*

Species	Positive/Tested	Infection	Reference
Pallas cat (<i>Felis manul</i>)	NA	E	[6]
	1/1	N	[7]
	1/6	N	[8]
Wildcat (<i>Felis silvestris</i>)	3/3	N	[12]
African Wildcat (<i>F. s. lybica</i>)	NA	E	[6]
Leopard cat (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	2/2	E	[18]
	2/2	E	[15]
Amur leopard cat (<i>P. b. euphilurus</i>)	2/2	N	[12]
Iriomote cat (<i>P. iriomotensis</i>)	2/45+	N	[10]
Pampas cat (<i>Leopardus colocolo</i>)	NA	N	[5]
Geoffroy's cat (<i>L. geoffroyi</i>)	NA	N	[5]
	1/1	N	[12]
Jaguarundi (<i>Puma yagouarundi</i>)	1/1	E	[13]
Jaguarundi (<i>P. y. eyra</i>)	NA	N	[5]
Ocelot (<i>L. pardalis</i>)	2/2	E	[13]
	2/8	N	[9]
Bobcat (<i>Lynx rufus</i>)	1/7	E	[18]
	3/9	N	[4]
Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	2/2	N	[4]
	NA	E	[6]
Cougar (<i>Puma concolor</i>)	1/1	E	[18]
	1/2	N	[4]
Vancouver Island cougar (<i>P. c. cougar</i>)	1/16	N	[17]
Lion (<i>Panthera leo</i>)	NA	E	[6]
	2/2	N	[11]
Jaguar (<i>P. onca</i>)	1/25	N	[9]
Siberian Tiger (<i>P. tigris altaica</i>)	1/1	N	[16]

* Modified Dubey (2009); + Stool samples; N, Natural, E, Experimental; NA, Not Available.

ROLE OF WILD FELIDS IN THE LIFE CYCLE OF *TOXOPLASMA GONDII*

Like the domestic cats, all felids (grouped in Felinae and Pantherinae subfamilies) are definitive hosts of *T. gondii*. However, shedding period and oocysts amount in wild felids have not been determined in all species, assuming that are similar to the domestic cat [2]. Cats can remove oocysts after ingesting any of the stages of the parasite, however, the start of shedding may vary 3-10 days when cysts are ingested, to 18 or more days when oocysts are ingested [2, 3].

There have been several studies worldwide to confirm the elimination of oocysts in several species of felids, whether natural or experimentally infected (Table 1). Marchiondo et al. (1976) [4] demonstrated oocysts shedding in bobcats (*Lynx rufus*) and cougars (*Puma concolor*) free-living in Montana, as well as cheetahs (*Acinonyx jubatus*) from a zoo in New Mexico, all naturally infected. Pizzi et al. (1978) [5], cited by Dubey (2009) [1] reported oocysts shedding in pampas cat (*Leopardus colocolo*), jaguarundi (*Puma yagouarundi eyra*) and Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) naturally infected from Cordoba, Argentina. Polomoshnov (1979) [6], also cited by Dubey (2009) [1] demonstrated experimentally the oocysts shedding by the African wildcat (*Felis silvestris lybica*), cheetah, lion (*Panthera leo*) and Pallas cat (*Felis manul*). On the other hand, Dubey et al. (1988) [7] and Basso et al. (2005) [8] found non-sporulated oocysts in the gut of Pallas cats that died of toxoplasmosis in zoos in the United States and Austria, respectively.

Patton et al. (1986) [9] conducted a study to determine the parasites in four species of neotropical felids free-living in Belize; 45 animals were captured, one jaguar (*Panthera onca*) and two ocelots (*Leopardus pardalis*) showed oocysts very similar to those of *T. gondii* but they could not be confirmed by bioassay in mice. Akuzawa et al. (1987) [10] found 4.4% (2/45) positive stools in free-living Iriomote cats (*Prionailurus iriomotensis*). Ocholi et al. (1989) [11] reported two cases of acute disseminated toxoplasmosis in two lion cubs from a zoo in Nigeria, *T. gondii* oocysts were detected in the feces of both animals. Lukešová and Literák (1998) [12] monitored the *T. gondii* oocysts shedding in the feces of 19 species of felids in six zoos in Czech Republic finding that positive feces samples in wildcat (*Felis silvestris*), Amur leopard cat (*Prionailurus euptilurus bengalensis*) and Geoffroy's cat with frequencies of 8% (14/175) 4% (5/133) 10% (4/39) respectively. As to the oocyst shedding period by wild felids, Jewell et al. (1972) [13] fed several species of felids in Panama and Costa Rica with *T. gondii* infected mice, finding that the jaguarundi (*Puma yagouarundi*) and ocelot can shed oocysts by day 4-12 and 6-16 post ingestion of cysts respectively. Miller et al. (1972) [14], to know the definitive hosts of the parasite, fed several species of mammals and birds with mice infected with *T. gondii* cysts, showing that the bobcat, cougar and bengal cat (*Prionailurus bengalensis*) can eliminate oocysts (5-10, 5-15 and 3-7 days post feeding cysts, respectively). Janitschke and Werner (1972)

[15] infected two Bengal cats and several feliforms, finding oocysts shedding only in Bengal cats. Basso et al. (2005) [8] monitored the presence of oocysts in a litter of six Pallas cats at a zoo in Austria from day 44 of life, finding that at least one kitten had oocysts shedding for 15 days (day 72-86 of life); this kitten died of toxoplasmosis on day 86 of life.

While there are several felid species in which has been reported oocyst shedding only two studies have reported the number of oocysts eliminated per gram of feces: Dorny and Franssen (1989) [16] reported a concentration of 200,000 oocysts/g of feces in a 4 months Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*); and Aramini et al. (1998) [17], determined a load of oocysts per gram of feces between 1.25×10^6 to 2.5×10^4 in cougars (*Puma concolor vancouverensis*) from Vancouver Island, Canada.

TOXOPLASMOSIS IN WILD FELIDS

The severity of the *T. gondii* infection is related to the virulence and genetic variability of the parasite, the host response [19], and the presence of possible co-infection with immunosuppressive agents (such as leukemia virus and feline immunodeficiency) [20].

Infected wild felids are often asymptomatic or have nonspecific signs of infection [21, 22]. However, the sand cat (*Felis margarita*) and Pallas cat (*Felis manul*) are species that have shown increased susceptibility and in which infection with the parasite is associated with high mortality during the first infection, so they are felid species most signs of toxoplasmosis have been reported [7, 8, 20, 23]. Infected felines may show depression, anorexia, diarrhea, neurological signs (encephalitis, mydriasis, muscular atrophy, ataxia of lower limbs), pneumonia, myocarditis and necrotizing hepatitis; eye injuries as uveitis, retinal degeneration and necrosis of mesenteric lymph nodes are considered atypical [8, 11, 20, 23-28].

SEROLOGICAL DIAGNOSIS IN WILD FELIDS

Due the low or no clinical signs in most infected felids, periods of seemingly erratic oocyst shedding in these species may occur. The low sensitivity that has the direct microscopy and the possibility of confusing the oocysts with other parasites (i.e., *Isospora* spp, *Neospora canis*), the diagnosis is based mainly on serological tests [29], which indicate prior exposure to the agent. Among the serological tests they have been used in wild felids for detecting anti-*T. gondii* antibodies are: Dye Test (Sabin Feldman), Micro Agglutination Test Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Indirect Immunofluorescence,

Latex Agglutination and Direct or Indirect Hemagglutination (DT, MAT, ELISA, IFAT, LAT, HA and HI, for its acronym respectively) (Table 2).

Table 2. Serological techniques used to detect anti-*T. gondii* antibodies in wild felids

Test	Species	Positive/Tested	Titer	Origin	Reference
MAT	Wildcat (<i>Felis silvestris</i>)	3/6	1:100-1:500	WL	[41]
	Gordon's wildcat (<i>F. s. gordonii</i>)	5/5	1:100-1:3200	C	[25]
	Jungle cat (<i>F. chaus</i>)	2/2	1:50	C	[42]
	Pallas cat (<i>F. manul</i>)	1/3	1:4096	C	[7]
		1/5	1:3200	C	[43]
	Sand cat (<i>F. margarita</i>)	18/24	1:200-1:3200	C	[25]
	Fishing cat (<i>Prionailurus viverrinus</i>)	¼	1:25	C	[43]
	Pampas cat (<i>Leopardus colocolo</i>)	1/8	1:500	C	[30]
	Geoffroy's cat (<i>L. geoffroyi</i>)	9/12	1:25-1:50	C	[30]
		1/1	NA	C	[44]
	Oncilla (<i>L. tigrinus</i>)	68/131	1:20-1:50	C	[30]
		15/22	NA	C	[44]
	Margay (<i>L. wiedii</i>)	35/63	1:25-1:50	C	[30]
		1/2	1:2048	C	[45]
		10/17	NA	C	[44]
	Jaguarundi (<i>Puma yagouarundi</i>)	45/99	1:25-1:500	C	[30]
		1/2	NA	C	[31]
		2/3	NA	C	[44]
		1/2	1:50	C	[46]
	Asiatic golden cat (<i>Catopuma temminckii</i>)	5/6	1:40-1:640	C	[47]
	Serval (<i>Leptailurus serval</i>)	2/2	1:50	C	[30]
	Ocelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	97/168	1:20-1:500	C	[30]
		3/3	NA	WL	[48]
		6/8	NA	C	[31]
		10/14	NA	C	[44]
		3/3	1:100-1:800	C	[49]
		2/3	1:100-1:400	C	[46]
	Eurasian lynx (<i>Lynx lynx</i>)	1/1	1:50	C	[42]
	Canada lynx (<i>L. canadensis</i>)	47/106	1:25-1:50	WL	[50]
	Bobcat (<i>L. rufus</i>)	4/10	1:25-1:50	WL	[50]
		5/6	1:100-1:200	WL	[51]
		109/131	1:25-1:500	WL	[52]
		2/2	1:800-1:1600	C	[46]
		29/50	1:25-1:200	WL	[53]
	Iberian lynx (<i>L. pardinus</i>)	22/27	1:25-1:500	WL	[41]
		21/26	NA	WL	[54]
		81/129	1:25-1:500	C/WL	[55]
	Caracal (<i>Caracal caracal</i>)	2/4	1:400-1:3200	C	[43]
	African caracal (<i>C. c. algira</i>)	1/1	1:200	C	[25]
	Asian caracal (<i>C. c. schmitzi</i>)	5/6	1:100-1:3200	C	[25]
	Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	6/22	1:50-1:3200	C	[43]
	South African cheetah (<i>A. j. jubatus</i>)	1/1	1:3200	C	[25]
	Sudan cheetah (<i>A. j. soemmeringii</i>)	31/34	1:50-1:3200	C	[25]
	Clouded leopard (<i>Neofelis nebulosa</i>)	1/7	1:800	C	[43]
	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	1/1	1:160	C	[47]
		83/172	1:20-1:50	C	[30]
		3/6	1:50-1:200	C	[43]

Table 2. (Continued)

Test	Species	Positive/Tested	Titer	Origin	Reference
MAT	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	3/3	1:50-500	C	[56]
		4/4	1:25-1:800	C	[46]
		1/1	1:200	WL	[57]
		1/2	1:40	WL	[58]
	Vancouver Island/Florida cougar (<i>P. c. cougar</i>)	11/12	1:50-1:500	WL	[17]
		2/2	1:200-1:400	C	[43]
	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	1/1	1:320	C	[47]
		3/3	1:50-1:500	C	[42]
		5/5	1:400-1:3200	C	[46]
	Arabian leopard (<i>P. p. nimr</i>)	6/7	1:50-1:800	C	[25]
	Amur leopard (<i>P. p. orientalis</i>)	1/1	1:100	C	[43]
	Persian leopard (<i>P. p. saxicolor</i>)	1/1	1:2560	C	[47]
		1/1	1:3200	C	[43]
	Snow leopard (<i>P. uncia</i>)	5/14	1:200-1:3200	C	[43]
	Jaguar (<i>P. onca</i>)	134/212	1:20-1:500	C	[30]
		7/11	NA	C	[31]
		1/1	1:50	C	[43]
		1/1	1:4000	WL	[59]
		1/1	1:50	C	[56]
		10/13	1:25-1:800	C	[46]
	Lion (<i>P. leo</i>)	14/27	1:20-1:500	C	[42]
		12/22	1:100-1:3200	C	[43]
		7/7	1:50-1:800	C	[46]
	Tiger (<i>P. tigris</i>)	2/2	1:20-1:50	C	[42]
		2/3	1:400-1:800	C	[46]
	Siberian Tiger (<i>P. t. altaica</i>)	1/1	1:128	C	[16]
		5/18	1:50-1:800	C	[43]
	South China tiger (<i>P. t. amoyensis</i>)	6/7	1:20-1:1280	C	[47]
	Sumatran tiger (<i>P. t. sumatrae</i>)	2/2	1:200-1:400	C	[46]
	Bengal tiger (<i>P. t. tigris</i>)	2/2	1:80-1:320	C	[47]
IFAT	Pallas cat (<i>Felis manul</i>)	2/2	1:5120-1:40960	C	[60]
	Pampas cat (<i>Leopardus colocolo</i>)	1/3	NA	C	[37]
	Oncilla (<i>L. tigrinus</i>)	1/1	1:1280	C	[60]
		22/35	NA	C	[37]
	Margay (<i>L. wiedii</i>)	4/4	NA	C	[37]
	Jaguarundi (<i>Puma yagouarundi</i>)	1/1	1:510	C	[60]
		1/1	NA	C	[61]
		10/25	NA	C	[37]
	Serval (<i>Leptailurus serval</i>)	1/1	1:320	C	[60]
		1/1	NA	C	[37]
	Ocelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	1/1	1:200	C	[62]
		1/1	1:320	C	[60]
		4/5	NA	C	[61]
		28/42	NA	C	[37]
	Eurasian lynx (<i>Lynx lynx</i>)	2/2	1:2560-1:20480	C	[60]
	Canada lynx (<i>L. canadensis</i>)	1/1	1:50	C	[62]
	Bobcat (<i>L. rufus</i>)	1/3	1:100	C	[62]
		3/3	1:1280-10240	WL	[63]
	Caracal (<i>Caracal caracal</i>)	1/1	1:100	C	[62]
	Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	2/6	1:50-1:1200	WL	[22]
		8/14	1:50-1:1600	C	[22]
		7/9	1:100-1:300	C	[62]

Table 2. (Continued)

Test	Species	Positive/Tested	Titer	Origin	Reference
IFAT	Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	13/15	1:320-1:5120	C	[60]
	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	10/42	1:50-1:300	WL	[62]
		3/5	1:100-1:200	C	[62]
		5/5	NA	C	[61]
		13/26	1:320-1:2560	WL	[63]
		14/18	NA	C	[37]
	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	3/4	1:800-1:3200	WL	[22]
		1/1	1:100	C	[62]
		1/1	NA	C	[37]
	Amur leopard (<i>P. p. orientalis</i>)	1/1	1:100	C	[62]
		3/3	1:40-1:320	C	[60]
	Jaguar (<i>P. onca</i>)	2/2	1:50	C	[62]
		1/1	1:160	C	[60]
		3/3	NA	C	[61]
		11/13	NA	C	[37]
	Lion (<i>P. leo</i>)	65/66	NA	WL	[64]
		27/27	1:100-1:25600	WL	[22]
		10/14	1:50-1:1600	C	[22]
		8/10	1:50-1:300	C	[62]
		2/2	1:40-1:1280	C	[60]
		3/3	NA	C	[61]
	5/9	NA	C	[37]	
	Indian lion (<i>P. l. persica</i>)	2/2	1:640-1:1280	C	[60]
	Tiger (<i>P. tigris</i>)	7/11	1:50-1:300	C	[62]
		2/2	NA	C	[61]
		4/6	NA	C	[37]
	Siberian Tiger (<i>P. t. altaica</i>)	2/2	1:160-1:1280	C	[60]
Sumatran Tiger (<i>P. t. sumatrae</i>)	6/6	1:160-1:10240	C	[60]	
Bengal tiger (<i>P. t. tigris</i>)	1/1	1:160	C	[60]	
IHA	Pallas cat (<i>Felis manul</i>)	3/3	1:128- 1:16777216	C	[27]
	Jaguarundi (<i>Puma yagouarundi</i>)	1/2	NA	C	[31]
	Serval (<i>Leptailurus serval</i>)	1/2	1:8192	C	[29]
	Geoffroy's cat (<i>L. geoffroyi</i>)	2/8	NA	WL	[65]
	Ocelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	2/4	NA	WL	[66]
		10/10	NA	WL	[65]
		4/8	NA	C	[31]
	Bobcat (<i>Lynx rufus</i>)	15/21	1:64-1:2048	WL	[67]
		60/86	NA	WL	[68]
		63/103	1:64-1:4096	WL	[69]
		2/3	NA	WL	[70]
		27/150	NA	WL	[71]
	19/38	NA	WL	[72]	
	Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	8/8	1:64-1:256	C	[29]
	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	3/9	1:128-1:256	C	[29]
		1/2	1:128	WL	[67]
	Florida panther (<i>P. c. cougar</i>)	1/5	1:256	WL	[73]
	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	2/3	1:128-1:256	C	[29]
	Jaguar (<i>P. onca</i>)	7/11	NA	C	[31]
	Lion (<i>P. leo</i>)	1/2	1:128-1:256	C	[29]
Tigre (<i>P. tigris</i>)	4/6	1:64-256	C	[29]	
LAT	Pallas cat (<i>Felis manul</i>)	13/21	1:32-1:2048	C	[20]

Table 2. (Continued)

Test	Species	Positive/Tested	Titer	Origin	Reference
LAT	Serval (<i>Leptailurus serval</i>)	1/2	1:8192	C	[29]
	Ocelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	18/26	NA	WL	[74]
	Bobcat (<i>Lynx rufus</i>)	26/52	1:32-1:4096	WL	[39]
		4/6	1:32-1:4096	C	[39]
		2/10	NA	WL	[72]
		22/25	NA	WL	[75]
	Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	8/8	1:64-1:1024	C	[29]
	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	4/9	1:128-1:512	C	[29]
		21/36	1:32-1:4096	WL	[76]
		69/346	1:32-1:4096	WL	[39]
		29/92	1:32-1:4096	C	[39]
	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	1/2	1:1024	C	[29]
Lion (<i>P. leo</i>)	1/2	1:512	C	[29]	
Tiger (<i>P. tigris</i>)	4/6	1:64-512	C	[29]	
DT	Leopard cat (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	2/2	1:256-1:1000	C	[15]
		2/2	1:8-1:64	C	[18]
		1/2	1:8	C	[77]
	Flat-headed cat (<i>P. planiceps</i>)	1/2	1:8	C	[77]
	Fishing cat (<i>P. viverrinus</i>)	1/1	1:8	C	[77]
	Oncilla (<i>Leopardus tigrinus pardinoides</i>)	6/9	NA	WL	[78]
	Margay (<i>L. wiedii</i>)	2/3	1:64	C	[13]
	Jaguarundi (<i>Puma yagoarundi</i>)	2/2	1:8-1:128	C	[13]
	Ocelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	3/5	1:4-1:384	C	[13]
		5/6	NA	WL	[78]
	Bobcat (<i>Lynx rufus</i>)	11/15	1:16	WL	[79]
		7/7	1:4-1:128	C	[18]
		12/27	NA	WL	[4]
		1/2	1:8	WL	[80]
	Clouded leopard (<i>Neofelis nebulosa</i>)	2/2	1:4	C	[77]
	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	2/2	1:16-1:64	C	[13]
		1/1	1:128	C	[18]
	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	1/1	1:8	C	[77]
	Jaguar (<i>P. onca</i>)	2/2	1:64	C	[13]
	Tiger (<i>P. tigris</i>)	1/1	1:32	C	[13]
		3/6	1:4-1:16	C	[77]
ELISA	Wildcat (<i>Felis silvestris</i>)	3/3	NA	C	[81]
	Oncilla (<i>Leopardus tigrinus</i>)	1/1	1:74	WL	[82]
	Jaguarundi (<i>Puma yagoarundi</i>)	1:1	1:64	C	[29]
	Asian golden cat (<i>Catopuma temminckii</i>)	5/6	NA	C	[47]
	Serval (<i>Leptailurus serval</i>)	1/2	1:1024	C	[29]
	Canada lynx (<i>L. canadensis</i>)	2/5	NA	WL	[83]
	Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	8/8	1:128-1:1024	C	[29]
	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	3/3	1:64-1:512	C	[29]
		1/15	NA	WL	[83]
	Florida panther (<i>P. c. cougar</i>)	3/32	1:48-1:308	WL	[84]
	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	2/3	1:256-1:1024	C	[29]
		1/1	NA	C	[47]
	Persian leopard (<i>P. p. saxicolor</i>)	1/1	1:2560	C	[47]
	Lion (<i>P. leo</i>)	2/2	1:128-1:1024	C	[29]
		3/3	NA	C	[81]
	Tiger (<i>P. tigris</i>)	3/6	1:128-1:1024	C	[29]
	South China tiger (<i>P. t. amoyensis</i>)	6/7	1:20-1:1280	C	[47]

Table 2. (Continued)

Test	Species	Positive/Tested	Titer	Origin	Reference
ELISA	Bengal tiger (<i>P. t. tigris</i>)	2/2	NA	C	[47]
HA	Gordon's wildcat (<i>Felis silvestris gordonii</i>)	1/4	1:6400	C	[85]
	Sand cat (<i>F. margarita</i>)	1/1	1:12800	C	[85]
	Eurasian lynx (<i>Lynx lynx</i>)	156/207	NA	WL	[86]
		1/2	1:50	C	[85]
	Caracal (<i>Caracal caracal</i>)	1/1	1:25	C	[85]
	Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	2/2	1:10-1:25	C	[85]
	Cougar (<i>Puma concolor</i>)	2/2	1:6-1:10	C	[85]
	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	3/3	1:25-1:200	C	[85]
	Persian leopard (<i>P. p. saxicolor</i>)	1/2	1:50	C	[85]
	Snow leopard (<i>P. uncia</i>)	3/3	1:400-1:12800	C	[85]
	Lion (<i>P. leo</i>)	4/7	1:6-1:200	C	[85]
	Siberian Tiger (<i>P. tigris altaica</i>)	3/4	1:10-1:400	C	[85]
PA	Iriomote cat (<i>P. iriomotensis</i>)	4/16	1:62-1:512	WL	[10]

MAT, Modified Agglutination Test; IFAT, Indirect Immunofluorescent Antibody Test; IHA, Indirect Hemagglutination Test (IHA); LAT, Latex Agglutination Test; DT, Sabin-Feldman Dye Test; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbed Assay; HA, Direct Agglutination Test; PA, Passive Agglutination; NA, No Available; WL, Wildlife; C, Captivity.

Currently, MAT is the most commonly used serological technique for the diagnosis of *T. gondii* in wild animals because is easy to perform and the has te advantage of implementation in various taxa without secondary species-specific antibodies (unlike IFAT and ELISA). However, this technique requires the maintenance of parasite cultures and their results differ depending on the preservation method used to prepare the antigen. MAT also has proven to be more sensitive than other agglutination techniques [30, 31]. Moreover, the ELISA technique has shown a high concordance with DT, MAT and IFAT [29, 32, 33]. Lappin and Powell (1991) [34] compared the commercial kits using LAT, IHA and ELISA with sera from domestic cats (*Felis catus*), concluding that the three techniques are similarly efficient to detect IgG (although ELISA allowed detect higher titers) and that both IHA and LAT are inadequate to detect IgM antibodies. Regarding the use of these three techniques in wild felids, Lappin et al. (1991) [29] determined a seroprevalence of 75.8% (ELISA), 60.6% (LAT) and 57.6% (IHA) in 33 captive felids, proving the superiority of ELISA over LAT and IHA.

In addition to this, the implementation of commercial ELISA kits based on total protein extracts or recombinant proteins have favored its standardization and automation, improved sensitivity (for IgG and IgM antibodies, the latter not detectable MAT), and developed new variants that do not require a secondary species-specific antibody [35, 36]. For the ease and low cost of it, the ELISA technique can become the most viable diagnostic option for wild animals of different species.

In several countries studies have been conducted to detect the presence of anti-*T. gondii* antibodies in captive and free-living felids. In America, the studies by André et al. (2010)

[37] and Silva et al. (2001) [30] in Brazil are highlight; the first included 161 captive felids of 14 species (eight were neotropical) using the IFAT technique, the authors reported a seroprevalence of 63.4%. Meanwhile, Silva et al. (2001) [30] reported a seroprevalence of 54.6% in 865 captive neotropical felids of eight species (including 71 zoos and 15 breeders) using MAT technique.

Studies to detect anti-*T. gondii* antibodies in free-living felids are few due to the difficulties to capture and the time it takes to gather a large number of samples [38]. Kikuchi et al. (2004) [39] collected samples from captured cougars throughout the Americas since 1984 to 1999, determining a seroprevalence of 19.9% (69/346) with the LAT; becoming the cross sectional study that included biggest size sample of one species in the Americas.

High titers of antibodies found in a specimen can be an indicator of reinfection. It has been reported that feeding captive animals with raw meat, meat from roadkill animals or euthanized animals frozen during less than seven days, are risk factor and may be associated with the infection and re-infection with *T. gondii* in captive felids [40]. Also, the presence of feral cats can contribute significantly to the spread and maintenance of the parasite in zoos and peri-urban areas, the latter favoring the exchange of jungle and urban biotypes.

MOLECULAR DETECTION AND IDENTIFICATION OF BIOTYPES OF *TOXOPLASMA GONDII* IN WILD FELIDS

Molecular biology techniques have been very useful to complement the diagnosis of *T. gondii*. The conventional polymerase chain reaction (PCR) and their nested (nPCR) and real-time (qPCR) variants, have demonstrated high sensitivity and specificity. However, isolation is difficult due to low parasite loads in tissues or low probability of finding it in a small tissue sample [63]; is for this reason that many studies involving *T. gondii* genotyping appeal to cell culture isolation or bioassay (most in mice inoculation) to be able of determine the present biotype [19, 51, 59, 87, 88].

Although the differences in their genomic sequence between the three major *T. gondii* genotypes are less than 1%, the three genotypes show different virulence and tropism depending on the studied species [89-91]. Genotypes I and II are usually associated with clinical cases of toxoplasmosis in humans; there have been cases associated with atypical biotypes reported in wild felids [51, 59, 92]. To understand the epidemiology of the disease in these species it is important to identify the *T. gondii* genotype causing the infection. For this, it have been employed molecular methodologies such as microsatellite analysis, *multilocus* sequence typing, analysis of high resolution melting (HRM), and PCR with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [35], the latter being the most currently technique used.

The use of nPCR-RFLP along with genetic markers SAG1, SAG2, SAG2 alt, SAG3, BTub, GRA6, C22-8, C29-2, L358, Pk1 and Apiko, has identified the three biotypes of *T. gondii* as

atypical biotypes in wild felids in a more reliable way [25, 57, 93-95], as their sensitivity increased 10 times compared to conventional PCR [96].

By other hand, *T. gondii* DNA was detected in captive wild felids from tissue samples of a cheetah [24], Pallas cats [20] and sand cats [25] which had fatal toxoplasmosis. In contrast, DNA detection of *T. gondii* has been identified in tissues of various free-living felids (lynx, jaguarundi, geoffroy cat, margay, ocelot, pampas cat, oncilla, jaguar and puma) that died from various causes unrelated to infection by toxoplasma [51, 57, 59, 63, 87, 95]. The type II, atypical and recombinant biotypes were the most reported in these wild felids species (Table 3).

IMPACT OF WILD FELIDS INFECTED WITH *T. GONDII* ON PUBLIC HEALTH

It has been found that in the absence of domestic cats, wild felids may contribute to the maintenance of the parasite cycle. Seroprevalences of *T. gondii* have been reported in isolated indigenous communities in South America, which could have been infected by contamination of water sources or soil, as well as eating infected intermediate hosts or felids meat [66, 99, 100].

In humans, most infections with *T. gondii* are usually asymptomatic and produce tissue cysts, however, there are populations (such pregnant women, newborns congenitally infected and immunocompromised people) at risk of developing a severe infection [101]. In addition to this, the increase in human contact with infected wild felids has been associated with outbreaks of toxoplasmosis with serious clinical implications (i.e., chorioretinitis and respiratory complications) [38, 59, 88, 102, 103].

Consumption of contaminated water with oocysts eliminated by wild felids has been associated as an important source of infection in humans, particularly in military personal during operations in forest areas [104, 105]. It has also been linked to outbreaks in humans, as occurred in 1995 in the City of Victoria, Canada where at least 100 cases of toxoplasmosis were reported with symptoms as retinitis, lymphadenopathy, malaise, fatigue and headache (these cases were associated with contamination of municipal water sources containing cougar feces) [17, 102]. In French Guyana and Surinam in 2004, eleven immunocompetent patients showed clinical features of toxoplasmosis [8] of them a multi visceral clinical form) [103]; in this case an atypical biotype of *T. gondii* which share characteristics with one isolated on a Jaguar in French Guyana was isolated, suggesting that the origin of these cases of toxoplasmosis was sylvatic.

Table 3. *Toxoplasma gondii* isolates obtained from wild felids*

Species	Origin	Positive/ Tested	Type Of Sample	Detection	Genotype	Isolate	Reference
Wildcat (<i>Felis silvestris</i>)	WL	4/12	Brain	PCR (TOX5, TOX8) PCR-RFLP (nSAG1, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico)	Type II Variant II	TgFsGER01 TgFsGER02 TgFsGER03	Herrmann et al. (2013)
Sand cat (<i>F. margarita</i>)	C	4/4	Lung, heart, eye muscle, skeletal muscle, kidney, liver	Bioassay PCR-RFLP (SAG1, SAG2, alt-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico)	Atypical Type II	TgSandcatUAE1 TgSandcatUAE2 TgSandcatUAE3 TgSandcatQA1	Dubey et al. (2010)
Pallas cat (<i>F. manul</i>)	C	5/5	Liver, kidney, spleen, adrenal gland, stomach	PCR (TOX4, TOX5)	NA	NA	Kenny et al. (2002)
Pampas cat (<i>Leopardus colocolo</i>)	WL	1/7	Heart, eye muscle, eyeball, vitreous humor, diaphragm, skeletal muscle, brain, tongue	PCRa (E JS4/CT2c; I JS4b/CT2b) PCR-RFLP (SAG1, 5'3'SAG2, alt-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico, CS3)	NA	NA	Cañón-Franco et al (2013)
Geoffroy's cat (<i>L. geoffroyi</i>)		6/22			Atypical	Lw#31Tn	
Margay (<i>L. wiedii</i>)		6/10			NA	NA	
Ocelot (<i>L. pardalis</i>)		1/1			NA	NA	
Oncilla (<i>L. tigrinus</i>)		8/28			NA	NA	
	C	1/1	Brain, heart	PCRa (18S) Bioassay PCR-RFLP (SAG1, SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico)	Atypical	TgOncBr1	Vitaliano et al. (2014)
Jaguarundi (<i>Puma yagouarundi</i>)	C	1/1	Heart, skeletal muscle, brain	Bioassay PCR (B1) PCR-RFLP (SAG1, SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico)	Atypical	TgJagBr1	Pena et al. (2011)

Table 3. (Continued)

Species	Origin	Positive/ Tested	Type Of Sample	Detection	Genotype	Isolate	Reference
Jaguarundi (<i>Puma yagouaroundi</i>)	WL	9/22	Heart, eye muscle, eyeball, vitreous humor, diaphragm, skeletal muscle, brain, tongue	PCRa (E JS4/CT2c; I JS4b/CT2b) PCR-RFLP (SAG1, 5'3'SAG2, alt-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico, CS3)	Atypical Recombinant II - III	Py#21Sm TgCatBr76 TgDogBr16 TgCpBr33	Cañón-Franco et al (2013)
Bobcat (<i>Lynx rufus</i>)	WL	5/6	Heart	Bioassay PCR-RFLP (SAG2)	Type 2	NA	Dubey et al. (2004)
	WL	2/3	Brain, pectoral muscle, tongue, heart	PCR (B1) PCR-RFLP (SAG1, GRA6)	Atypical X Recombinant II - III	Tipo X	Miller et al. (2008)
	WL	11/27	Brain, tongue	PCRa (B1) PCR-RFLP (B1, SAG1, SAG3, GRA6, L358, Apico)	Atypical X Type II	NA	VanWormer et al. (2014)
Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	C	1/1	Lung	NA	NA	NA	Lloyd and Stidworthy (2007)
Cougar (<i>Puma concolor</i>)	WL	5/26	Brain, pectoral muscle, tongue	PCR (B1) PCR-RFLP (SAG1, GRA6)	Atypical X Type I and II	Type X	Miller et al. (2008)
	WL	10/73	Brain, tongue	PCRa (B1) PCR-RFLP (B1, SAG1, SAG3, GRA6, L358, Apico)	Atypical X Type II	NA	VanWormer et al. (2014)
Vancouver Island cougar (<i>P. c. cougar</i>)	WL	2/2	Feces	Bioassay PCR-RFLP (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, C29-2, L358, PK1, Apico)	Atypical Recombinant Type I - II - III	TgCgCa1 TgCgCa2 (Cougar2, Cougar, COUG)	Dubey et al. (2008)
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	WL	1/1	Heart	Bioassay Microsatellites (GRA6, TUB2, W35, TgM-A, B18, B17)	Atypical X	Type X (Type 12, GUY-2004-JAG)	Demar et al. (2008)
Tiger (<i>Panthera tigris</i>)	C	1/1	Heart	PCR-RFLP (SAG1, SAG2, GRA7)	Type II	NA	Alerte (2008)

* Modified Cañón-Franco et al. (2013) NA, No Available; WL, Wildlife; C, Captivity.

***T. GONDII* IMPACT ON THE CONSERVATION OF WILD FELIDS**

While most wild felids infected with *T. gondii* are asymptomatic, Pallas and sand cat (both species threatened) have proven to be more susceptible species to develop clinical toxoplasmosis. These species tend to show a high mortality, severe nasal mucus and generally have high antibody titers (suggesting an active parasitemia) [8, 23].

Currently, most felids species are threatened in the wild (mainly by habitat destruction and wildlife trade), this has forced the development of programs to preserve them in captivity. The conditions to which captive felids are commonly exposed (small space, stress, inbreeding, disease, presence of feral cats, etc.), the lack of information on the biotypes involved in cases of infection and the behavior of these in wild felids species, can lead to an increased pollution of the environment with oocysts, biotypes exchange between them as well as the development of clinical symptoms of toxoplasmosis in susceptible species.

Also, *T. gondii* can negatively impact over conservation projects, reintroduction and/or translocation of species by contact of healthy individuals and infected ones, or with different biotypes circulating in a given population. This is true for both wild felids and intermediate hosts that are highly susceptible to develop toxoplasmosis (i.e., new world primates and Australian marsupials) [49, 60, 106, 107].

Although it is difficult to accurately estimate *T. gondii* oocysts elimination periods or number of oocysts eliminated in the species of wild felids, they are actively involved in maintaining the parasite in both peri-urban areas and jungle.

In addition to this, the antibody titers reported in captive wild felids suggest a constant reinfection; so more studies are needed to determine the predominant risk factors in the different wild felids collections, in order to implement a monitoring and control potential sources of infection, as they could be drinking water and diet containing viable oocysts (eating raw meat unfrozen at least 7 days). The application of control measures in captivity centers of felids could help to reduce the risk of transmission of the parasite to workers and visitors.

Due to the increasing reports with atypical biotypes present in wild felids species and their association with outbreaks of toxoplasmosis in humans, it is important to continue the study of the biotypes present in these species and their possible pathogenicity in humans with the purpose to establish relevant epidemiological control strategies and better understand the dynamics of *T. gondii*.

REFERENCES

- [1] Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* Australian Society for Parasitology Inc.; 2009 Jul;39(8):877–82.
- [2] Dubey JP. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. Second Edi. Elsevier; 2014. p. 1–17.

- [3] Dubey JP. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Parasitol.* 2002;88(4):713–7.
- [4] Marchiondo AA, Duszynski DW, Maupin GO. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals of New Mexico, Arizona and Colorado. *J. Wildl. Dis.* [Internet]. 1976;12(2):226–32.
- [5] Pizzi HL, Rico CM, Pessat OAN. Hallázgo del ciclo ontogenico selvático del *Toxoplasma gondii* en felidos salvajes (*Oncifelis geofroyi*, *Felis colocolo* y *Felis eirá*) de la Provincia de Cordoba [Finding the jungle ontogenetic cycle *Toxoplasma gondii* in wild felines (*Oncifelis geofroyi*, *Felis colocolo* and *Eira*) of the Province of Cordoba]. *Rev. Mil. Vet.* 1978;25:293–300.
- [6] Polomoshnov AP. Definitive Hosts of *Toxoplasma*. *Probl. Nat. Nidality Dis.* Alma Ata; 1979;10:68–72.
- [7] Dubey JP, Gendron-Fitzpatrick AP, Lenhard AI, Bowman D. Fatal Toxoplasmosis and Enteroepithelial Stages of *Toxoplasma gondii* in a Pallas Cat (*Felis manul*). *J. Protozool.* 1988;35(4):528–30.
- [8] Basso W, Edelhofer R, Zenker W, Möstl K, Kübber-Heiss A, Prosl H. Toxoplasmosis in Pallas' cats (*Otocolobus manul*) raised in captivity. *Parasitology.* 2005;130(3):293–9.
- [9] Patton S, Rabinowitz a, Randolph S, Johnson SS. A coprological survey of parasites of wild neotropical felidae. *J. Parasitol.* 1986;72(4):517–20.
- [10] Akuzawa M, Mochizuki M, Yasuda N. Hematological and parasitological study of the Iriomote cat (*Prionailurus iriomotensis*). *Can. J. Zool.* 1987;65:964–949.
- [11] Ocholi RA, Kalejaiye JO, Okewole PA. Acute disseminated toxoplasmosis in two captive lions (*Panthera leo*) in Nigeria. *Vet. Rec.* 1989;124:515–6.
- [12] Lukešová D, Literák I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 1998 Jan;74(1):1–7.
- [13] Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1972;21(5):512–7.
- [14] Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP. Oral Infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* 1972;58(5):928–37.
- [15] Janitschke K, Werner H. Untersuchungen über die Wirtsspezifität des geschlechtlichen Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii* [Studies on the host specificity of the sexual life cycle of *Toxoplasma gondii*]. *Zeitschrift fur Parasitenkd.* 1972;39(3):247–54.
- [16] Dorny P, Franssen J. Toxoplasmosis in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Vet. Rec.* 1989;125:647.
- [17] Aramini J, Stephen C, Dubey J. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J. Parasitol.* 1998;84(2):438–40.
- [18] Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* 1972;58(5):928–37.
- [19] Pena HFJ, Marvulo MF V, Horta MC, Silva M a, Silva JCR, Siqueira DB et al. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet. Parasitol.* Elsevier B.V.; 2011 Feb. 10;175(3–4):377–81.

- [20] Kenny D, Lappin M, Knightly F. Toxoplasmosis in Pallas' Cats (*Otocolobus felis manul*) at the Denver Zoological Gardens. *J. Zoo Wildl. Med.* 2002;33(2):131–8.
- [21] Lindsay DS, Dubey JP. Toxoplasmosis in Wild and Domestic Animals. In: *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. Second Edi. Elsevier; 2014. p. 193–215.
- [22] Cheadle M, Spencer J, Blagburn B. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. *J. Zoo Wildl. Med.* 1999;30(2):248–51.
- [23] Pas A, Dubey JP. Fatal Toxoplasmosis in Sand Cats (*Felis margarita*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2008;39(3):362–9.
- [24] Lloyd C, Stidworthy M. Acute disseminated toxoplasmosis in a juvenile cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2007;38(3):475–8.
- [25] Dubey JP, Pas A, Rajendran C, Kwok OCH, Ferreira LR, Martins J et al. Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the breeding centre for endangered Arabian wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Vet. Parasitol.* 2010;172(3–4):195–203.
- [26] Dubey JP, Quinn WJ, Weinandy D. Fatal Neonatal Toxoplasmosis in a Bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.* 1987;23(2):324–7.
- [27] Riemann HP, Fowler ME, Schulz T, Lock A, Thilsted J, Pulley LT et al. Toxoplasmosis in Pallas Cat. *J. Wildl. Dis.* 1974;10:471–7.
- [28] Smith KE, Fisher JR, Dubey JP. Toxoplasmosis in a bobcat (*Felis rufus*). *J. Wildl. Dis.* 1995;31(4):555–7.
- [29] Lappin MR, Jacobson ER, Kollias GV, Powell CC, Stover J. Comparison of Serologic Assays for the Diagnosis of Toxoplasmosis in Nondomestic Felids. *J. Zoo Wildl. Med.* 1991;22(2):169–74.
- [30] Silva JC, Ogassawara S, Adania CH, Ferreira F, Gennari SM, Dubey JP et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.* 2001 Dec;102(3):217–24.
- [31] Silva CC. Pesquisa De Anticorpos Anti-*Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) Em Felídeos Selvagens Nos Municípios De Capitão Poço E Belém, Pará [In Wild Felidae in the municipalities of Captain Well And Belém, Pará]. Universidade Federal do Pará; 2008.
- [32] Cortés LJ, Mancera L. Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii* [Concordance between ELISA and IFA type for the determination of IgG antibodies against *Toxoplasma gondii*]. *Infectio.* 2009;13(9):76–82.
- [33] Zhu C, Cui L, Zhang L. Comparison of a Commercial ELISA with the Modified Agglutination Test for Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Sera of Naturally Infected Dogs and Cats. *Iran. J. Parasitol.* 2012;7(3):89–95.
- [34] Lappin MR, Powell CC. Comparison of latex agglutination, indirect hemagglutination, and ELISA techniques for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in the serum of cats. *J. Vet. Intern. Med.* 1991;5(5):299–301.
- [35] Liu Q, Wang Z-D, Huang S-Y, Zhu X-Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors.* 2015;8(1):292.
- [36] Al-Adhami BH, Gajadhar AA. 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* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;200(1–2):66–73.
- [37] André MR, Adania CH, Teixeira RHF, Silva KF, Jusi MMG, Machado STZ et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *J. Parasitol.* 2010;96(5):1007–9.
- [38] Cañon-Franco W, Aeaújo F, Gennari S. *Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2013;50(1):50–67.
- [39] Kikuchi Y, Chomel BB, Kasten RW, Martenson JS, Swift PK, O’Brien SJ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Vet. Parasitol.* 2004 Feb. 26;120(1–2):1–9.
- [40] Ramos Silva JC, Marvulo MFV, Dias RA, Ferreira F, Amaku M, Adania CH et al. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Prev. Vet. Med.* 2007;78(3–4):286–95.
- [41] Sobrino R, Cabezón O, Millán J, Pabón M, Arnal MC, Luco DF et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 2007;148(3–4):187–92.
- [42] Silva J, Ogassawara S, Marvulo M, Ferreira-Neto J, Dubey J. *Toxoplasma gondii* antibodies in exotic wild felids from Brazilian zoos. *J. Zoo Wildl. Med.* 2001;32(3):349–51.
- [43] de Camps S, Dubey JP, Saville WJA. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the midwestern United States. *J. Parasitol.* 2008;94(3):648–53.
- [44] Ullmann LS, da Silva RC, de Moraes W, Cubas ZS, dos Santos LC, Hoffmann JL et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 2010;172(1–2):144–6.
- [45] Lickey ALA, Kennedy M, Patton S, Ramsay EC. Serologic survey of domestic felids in the Petén region of Guatemala. *J. Zoo Wildl. Med.* 2005;36(1):121–3.
- [46] Alvarado-Esquivel C, Gayosso-Dominguez EA, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in three zoos in Mexico City, Mexico. *J. Zoo Wildl. Med.* 2013;44(3):803–6.
- [47] Zhang S, Wei M, Zhou Z, Yu J, Shi X-Q. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sera of rare wildlife in the Shanghai Zoological Garden, People’s Republic of China. *Parasitol. Int.* 2000;49:171–4.
- [48] Whiteman CW. Conservação de carnívoros e a interface homem-fauna doméstica-fauna silvestre numa área fragmentada da Amazônia oriental brasileira [Carnivore conservation and wild fauna domestic-human-wildlife interface in a fragmented area of the eastern Brazilian Amazon]. Universidade de São Paulo; 2007.
- [49] Minervino A, Soares H, Barrêto-Júnior R, Neves K, Pena H, Ortolani E et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Captive Wild Mammals and Birds in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* 2010;41(3):572–4.
- [50] Labelle P, Dubey JP, Mikaelian I, Blanchette N, Lafond R, St-Onge S et al. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) from Québec, Canada. *J. Parasitol.* 2001;87(5):1194–6.

- [51] Dubey JP, Graham DH, De Young RW, Dahl E, Eberhard ML, Nace EK et al. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J. Parasitol.* 2004;90(1):67–71.
- [52] Mucker EM, Dubey JP, Lovallo MJ, Humphreys JG. Seroprevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in the Pennsylvania Bobcat (*Lynx rufus rufus*). *J. Wildl Dis.* 2006;42(1):188–91.
- [53] Verma SK, Minicucci L, Murphy D, Carstensen M, Humpal C, Wolf P et al. Antibody Detection and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* from Bobcats (*Lynx rufus*), Domestic Cats (*Felis catus*), and Wildlife from Minnesota, US. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2016;1–5.
- [54] Millán J, Candela MG, Palomares F, Cubero MJ, Rodríguez A, Barral M et al. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. J.* 2009;182(1):114–24.
- [55] García-Bocanegra I, Dubey JP, Martínez F, Vargas A, Cabezón O, Zorrilla I et al. Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. Parasitol.* 2010 Jan. 20;167(1):36–42.
- [56] Pimentel JS, Gennari SM, Dubey JP, Maria F V, Vasconcellos SA, Morais ZM et al. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe [Serologic survey for leptospirosis and toxoplasmosis in neotropical wild mammals Aracaju Zoo, Sergipe]. *Pesqui Veterinária Bras.* 2009;29(12):1009–14.
- [57] Dubey JP, Alvarado-Esquivel C, Herrera-Valenzuela VH, Ortiz-Diaz JJ, Oliveira S, Verma SK et al. A new atypical genotype mouse virulent strain of *Toxoplasma gondii* isolated from the heart of a wild caught puma (*Felis concolor*) from Durango, Mexico. *Vet. Parasitol.* 2013 Nov. 8;197(3–4):674–7.
- [58] da Silva R, Machado G, Cruvinel TM De, Cruvinel C, Langoni H. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild animals in Brazil. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2014;20(1):41.
- [59] Demar M, Ajzenberg D, Serrurier B, Dardé ML, Carme B. Case Report: Atypical *Toxoplasma gondii* Strain from a Free-living Jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008;78(2):195–7.
- [60] Sedlák K, Bártošová E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Vet. Parasitol.* 2006 Mar. 31;136(3–4):223–31.
- [61] Rivetti A, Caxito F, Resende M, Lobato Z. Avaliação sorológica para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da imunodeficiência felina pela nested PCR em felinos selvagens [serologic evaluation for *Toxoplasma gondii* by indirect immunofluorescence and detection of feline immunodeficiency virus by nested PCR in wild cats]. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 2008;60(5):1281–3.
- [62] Spencer JA, Higginbotham MJ, Blagburn BL. Seroprevalence of *Neospora Caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. *J. Zoo Wildl. Med.* 2003;34(3):246–9.
- [63] Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli AC, Leutenegger CM et al. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 2008 Sep;38(11):1319–28.

- [64] Spencer JA, Morkel P. Serological survey of sera from lions in Etosha National Park. *South African J. Wildl. Res.* 1993;23(2):60–1.
- [65] Fiorello C V., Robbins RG, Maffei L, Wade SE. Parasites of free-ranging small canids and felids in the Bolivian Chaco. *J. Zoo Wildl. Med.* 2006;37(2):130–4.
- [66] Ferraroni J, Reed S, Speer C. Prevalence of Toxoplasma Antibodies in Humans and Various Animals in the Amazon. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 1980;47(1):148–50.
- [67] Riemann HP, Howarth JA, Ruppanner R, Franti CE, Behymer DE. Toxoplasma antibodies among bobcats and other carnivores of Northern California. *J. Wildl. Dis.* 1975;11:272–6.
- [68] Franti CE, Riemann HP, Behymer DE, Suther D, Howarth JA, Ruppanner R. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and domestic animals in northern California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* [Internet]. 1976;169(9):901–6.
- [69] Riemann HP, Thompson RA, Behymer DE, Ruppanner R, Franti CE. Toxoplasmosis and Q Fever Antibodies among Wild Carnivores in California. *J. Wildl. Manage.* 1978;42(1):198–202.
- [70] Burrige MJ, Bigler WJ, Forrester DJ, Hennemann JM. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979;175(9):964–7.
- [71] Oertley KD, Walls KW. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* among bobcats of West Virginia and Georgia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1980;177(9):852–3.
- [72] Roelke ME, Johnson WE, Millán J, Palomares F, Revilla E, Rodríguez A et al. Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 2008;54(2):171–8.
- [73] Forrester DJ, Conti J a, Belden RC. Parasites of the Florida panther (*Felis concolor coryi*). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 1985;52(1):95–7.
- [74] Rendón-Franco E, Caso-Aguilar A, Jiménez-Sánchez NG, Brousset Hernandez-Jauregui DM, Sandoval-Sánchez AL, Zepeda-López HM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in free-ranging ocelots (*Leopardus pardalis*) from Tamaulipas, Mexico. *J. Wildl. Dis.* 2012;48(3):829–31.
- [75] Riley SPD, Foley J, Chomel B. Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. *J. Wildl. Dis.* 2004;40(1):11–22.
- [76] Paul-Murphy J, Work T, Hunter D, McFie E, Fjelline D. Serologic survey and serum biochemical reference ranges of the free-ranging mountain lion (*Felis concolor*) in California. *J. Wildl. Dis.* 1994;30(2):205–15.
- [77] Buddhirongawatr R, Tungsudjai S, Chaichoune K, Sangloun C, Tantawiwattananon N, Phonaknguen R et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2006;37(suppl. 3):15–7.
- [78] Sogorb F, Jamra LF, Guimarães F. Toxoplasmosis em Animais de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1977;19(3):191–4.
- [79] Walton BC, Walls KW. Prevalence of Toxoplasmosis in Wild Animals From Fort Stewart, Georgia, As Indicated By Serological Tests and Mouse Inoculation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1964;13:530–3.
- [80] Smith DD, Frenkel JK. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. *J. Wildl. Dis.* 1995;31(1):15–21.

- [81] Dărăbuș G, Afrenie M, Hotea I, Imre M, Morariu S. Endoparasites in mammals from seven zoological gardens in Romania. *J. Zoo Wildl. Med.* 2014;45(2):239–46.
- [82] Deem SL, Davis R, Pacheco LF. Serologic evidence of nonfatal rabies exposure in a free-ranging oncilla (*Leopardus tigrinus*) in Cotapata National Park, Bolivia. *J. Wildl. Dis.* 2004;40(4):811–5.
- [83] Philippa JDW, Leighton FA, Daoust PY, Nielsen O, Pagliarulo M, Schwantje H et al. Antibodies to selected pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada. *Vet. Rec.* 2004;155(5):135–40.
- [84] Roelke ME, Forrester DJ, Jacobson ER, Kollias V, Scott FW, Barr C et al. Seroprevalence of infectious disease agents in free-ranging Florida panthers (*Felis concolor coryi*). *J. Wildl. Dis.* 1993;29(1):36–49.
- [85] Alerte M. Prevalence de *Toxoplasma gondii* sur les animaux D'un parc zoologique (Amneville) : seroprevalence et isolement du parasite [Prevalence of *Toxoplasma gondii* in animals From a zoological park (Amneville): seroprevalence and parasite isolation]. [Versailles (Yvelines), France]: l'Université Paul-Sabatier de Toulouse; 2008.
- [86] Ryser-Degiorgis MP, Jakubek EB, af Segerstad CH, Brojer C, Morner T, Jansson DS et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Sweden. *J. Wildl. Dis.* 2006;42(1):182–7.
- [87] Vitaliano SN, Soares HS, Minervino AHH, Santos ALQ, Werther K, Marvulo MF V et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2014;3(3):276–83.
- [88] Dubey JP, Quirk T, Pittt JA, Sundar N, Velmurugan G V, Kwok OCH et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*), and cougar (*Puma concolor*) from Canada. *J. Parasitol.* 2008;94(1):42–5.
- [89] Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 2006;36(7):841–8.
- [90] Ferreira IMR, Vidal JE, de Mattos CDCB, de Mattos LC, Qu D, Su C et al. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp. Parasitol.* Elsevier Inc.; 2011;129(2):190–5.
- [91] Zhou Y, Zhang H, Cao J, Gong H, Zhou J. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from domestic rabbits in China to reveal the prevalence of type III strains. *Vet. Parasitol.* Elsevier B.V.; 2013;193(1–3):270–6.
- [92] Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of geotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(6):1411–4.
- [93] Dubey JP, Prowell M. Ante-mortem diagnosis, diarrhea, oocyst shedding, treatment, isolation, and genetic typing of *Toxoplasma gondii* associated with clinical toxoplasmosis in a naturally infected cat. *J. Parasitol.* 2013;99(1):158–60.
- [94] Dubey JP, Velmurugan G V, Rajendran C, Yabsley MJ, Thomas NJ, Beckmen KB et al. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int. J. Parasitol.* 2011;41(11):1139–47.

- [95] Cañón-Franco WA, Araújo FAP, López-Orozco N, Jardim MMA, Keid LB, Dalla-Rosa C et al. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. *Vet. Parasitol.* 2013;197(3–4):462–9.
- [96] Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 2010;137(1):1–11.
- [97] Herrmann DC, Wibbelt G, Götz M, Conraths FJ, Schares G. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from European beavers (*Castor fiber*) and European wildcats (*Felis silvestris silvestris*). *Vet. Parasitol.* 2013;191(1–2):108–11.
- [98] VanWormer E, Miller MA, Conrad PA, Grigg ME, Rejmanek D, Carpenter TE et al. Using Molecular Epidemiology to Track *Toxoplasma gondii* from Terrestrial Carnivores to Marine Hosts: Implications for Public Health and Conservation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014;8(5).
- [99] Wallace GD, Zigas V, Gajdusek DC. Toxoplasmosis and cats in New Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1974;23(1):8–14.
- [100] Chacin-Bonilla L, Sanchez-Chavez Y, Monsalve F, Estevez J. Seroepidemiology of toxoplasmosis in amerindians from western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65(2):131–5.
- [101] Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* Australian Society for Parasitology Inc.; 2009;39(8):895–901.
- [102] Bowie W, King A, Werker D, Isaac-Renton J, Bell A, Eng S et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet.* 1997;350:173–7.
- [103] Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W et al. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin. Infect. Dis.* 2007;45(7):e88–95.
- [104] Gómez-Marín JE, De-la-Torre A, Barrios P, Cardona N, Álvarez C, Herrera C. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. *Acta Trop.* Elsevier B.V.; 2012;122(1):46–51.
- [105] Benenson MW, Takafugi ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.* 1982;307:666–9.
- [106] Portas TJ, Sc B V, Sc MAC V. Toxoplasmosis in Macropodids: A Review. *J. Zoo Wildl. Med.* 2010;41(1):1–6.
- [107] Thoisy B De, Demar M, Aznar C, Carme B, Mycologie P. Ecologic Correlates of *Toxoplasma gondii* Exposure in Free-ranging Neotropical Mammals. 2003;39(2):456–9.

N.G.

OBJETIVOS

General:

Determinar la frecuencia de *Toxoplasma gondii* en los félidos de cuatro zoológicos mexicanos.

Particulares:

1. Determinar la frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en muestras de suero de félidos silvestres en cautiverio.
2. Establecer la frecuencia de ooquistes de *T. gondii* en heces de félidos silvestres en cautiverio.
3. Establecer la frecuencia de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre y heces de félidos silvestres en cautiverio.

CAPITULO II. Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en félidos en
cautiverio de México.

El presente documento se realizó siguiendo los lineamientos del
Journal of Veterinary Parasitology

**FRECUENCIA DE *TOXOPLASMA GONDII* EN FÉLIDOS SILVESTRES EN
CAUTIVERIO DE MÉXICO.**

**FREQUENCY OF *TOXOPLASMA GONDII* IN CAPTIVE WILD FELIDS OF
MEXICO.**

A. Gomez-Rios¹, K.Y. Acosta-Viana¹, E. Guzman-Marin¹, A. Ortega-Pacheco², E. Gutierrez-Blanco², Guiris-Andrade D.M., M. Jiménez-Coello¹

¹Laboratorio de Biología Celular, CA Biomedicina de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. C.I.R. ‘Dr. Hideyo Noguchi’, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Correspondencia: Dr. M. Jiménez-Coello, Avenida Itzáes, No. 490 x Calle 59, Col. Centro, C.P. 97000. Tels:(999) 9245809,9245755, Ext. 1142 E-mail: mjcoello@correo.uady.mx

RESUMEN

A nivel internacional existe poca información sobre *Toxoplasma gondii* y félidos silvestres, a pesar de que se han asociado estas especies con casos de toxoplasmosis en humanos. En el presente estudio se colectaron 44 muestras de suero y sangre completa de 44 félidos, de diez especies distintas, originarios de cuatro zoológicos mexicanos. También se colectaron 36 muestras de heces correspondientes al 82% de los félidos incluidos en el estudio, las cuales fueron utilizadas para la búsqueda de ooquistes por microscopia de campo claro y para la purificación de ADN. Las muestras de suero fueron analizadas mediante una ELISA IgG indirecta; por otro lado, las muestras de ADN purificadas a partir de sangre completa y heces fueron utilizadas para la amplificación de un fragmento del gen SAG1 de *T. gondii* mediante

una PCR anidada (PCRa). El análisis serológico demostró la presencia de anticuerpos específicos anti-*T. gondii* en el 100% de las muestras evaluadas. En el 9% de las muestras de sangre, se detectó el ADN del parásito mediante PCRa. No se observaron ooquistes en las muestras de heces analizadas por microscopia de campo claro, sin embargo se identificó el ADN del parásito en el 14.3% de las muestras de heces evaluadas. Los resultados obtenidos sugieren que existe una alta seroprevalencia de *T. gondii* en las poblaciones estudiadas de félidos silvestres en cautiverio, las cuales demuestran evidencia de parasitemia y eliminación de ooquistes aun en ejemplares adultos.

PALABRAS CLAVE

Toxoplasma gondii, félidos silvestres, cautiverio, ooquiste, serología, PCRa

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un protozooario intracelular de distribución mundial, el cual tiene como hospedadores definitivos a los félidos y como hospederos intermediarios a múltiples especies de aves y mamíferos (Dubey, 2009). A nivel internacional existe poca información sobre la carga parasitaria, biotipos y el comportamiento del parásito en las especies de félidos silvestres; lo que puede llegar a afectar negativamente los proyectos de conservación, reintroducción y/o translocación de estas especies (Ullmann *et al.*, 2010). Asimismo, se han reportado casos de toxoplasmosis en humanos asociados a félidos silvestres (ya sea por contacto directo o indirecto) (Gómez-Marín *et al.*, 2012).

En México, son pocos los estudios que describen la presencia de *T. gondii* en félidos silvestres (Dubey *et al.*, 2013; Kikuchi *et al.*, 2004; Rendón-Franco *et al.*, 2012); destacando

un reporte en animales en cautiverio que describió una prevalencia de anticuerpos del 81.39% (n=43 félidos) (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2013) en tres zoológicos de la ciudad de México.

Por otra parte, la detección de ADN de *T. gondii* se ha realizado principalmente en muestras de tejidos de félidos silvestres en cautiverio con signología sugerente a toxoplasmosis aguda (Kenny *et al.*, 2002; Lloyd y Stidworthy, 2007; Dubey *et al.*, 2010) y en félidos de vida libre que fallecieron por diversas causas (Dubey *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2008; Vitaliano *et al.*, 2014).

El objetivo de esta investigación fue determinar la frecuencia de *T. gondii* en los félidos de cuatro zoológicos mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y colecta de muestras

Entre julio de 2015 y noviembre de 2016 se colectaron muestras de sangre periférica y de heces de los félidos pertenecientes a cuatro zoológicos mexicanos (denominados 1, 2, 3 y 4), ubicados en los estados de Quintana Roo, Yucatán, Chiapas y Morelos respectivamente. Las especies que se incluyeron en el estudio fueron: jaguarundi (*Puma yagouarundi*), puma (*Puma concolor*), tigrillo (*Leopardus tigrinus*), ocelote (*Leopardus pardalis*), caracal (*Caracal caracal*), lince (*Lynx rufus*), jaguar (*Panthera onca*), leopardo (*Panthera pardus*), tigre (*Panthera tigris*) y león (*Panthera leo*). Las muestras de sangre (con anticoagulante EDTA para obtener sangre total y sin anticoagulante para obtener suero) fueron obtenidas por venopunción de las venas cefálica, safena, femoral, yugular, o caudal de los animales químicamente inmovilizados durante revisiones de rutina o aquellas realizadas con fines terapéuticos. Asimismo, se colectaron dos gramos de heces, de preferencia el mismo día del

manejo anestésico de los ejemplares o durante las 24 horas antes o después del manejo; estas se colocaron en tubos (cónicos de 50 mL) con etanol al 70% (3 mL/g de heces), manteniéndose en refrigeración hasta su procesamiento (Jongwutiwes *et al.*, 2002; Piggott y Taylor, 2003).

Detección serológica de *T. gondii*

Las muestras de suero fueron analizadas mediante una ELISA IgG indirecta (Human-GmbH, Wiesbaden, GER, número de catálogo ab108776) siguiendo las modificaciones descritas por Figueroa-Castillo *et al.* (2006) y utilizando como segundo anticuerpo un anti-IgG de gato acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Inc., Ca, EUA).

Detección de ooquistes de *T. gondii*

Las muestras de heces colectadas y preservadas se utilizaron, por una parte, para determinar mediante microscopia de campo claro, la presencia de ooquistes y por otra, para la obtención de ADN según el protocolo descrito por Salant *et al.* (2010). Primero, se realizó una flotación con solución de Sheather (106 g de glucosa, 100 mL de agua doble destilada y 0.8 mL de fenol líquido; densidad de 1.27), y posteriormente se examinaron las muestras con un microscopio de luz a una magnificación de 40x.

Purificación y detección de ADN de *T. gondii* en sangre y heces

A partir, de las muestras de sangre completa, se tomó 1 mL para purificar ADN genómico, siguiendo la metodología descrita por Jalal *et al.* (2004) y utilizando el estuche comercial DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, número de catálogo 69506). Posteriormente para demostrar la ausencia de inhibidores en las muestras de sangre purificadas, así como la viabilidad de las mismas, se realizó la amplificación del gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), los cebadores utilizados fueron el

sentido 5'AGCGCGCGTCTAAGACTTACA3' y el antisentido 5'TGGAGCTGCGGTTGTCAATT3'. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min seguida de 39 ciclos a 95°C por 10s y 55°C por 30 s (Dzib-Paredes *et al.*, 2016).

En el caso de las muestras de heces, el sobrenadante de la flotación con solución de Sheather fue utilizado para la purificación de ADN, el cual posteriormente se utilizó para los ensayos de PCR (copro-PCR). Para esto se utilizó el estuche comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, número de catálogo 51504) siguiendo el protocolo de extracción descrito por Salant *et al.* (2010). Las muestras de ADN purificadas se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su análisis.

Para evaluar la ausencia de inhibidores en las muestras de heces purificadas, se amplificó el gen constitutivo 18S (ARN ribosomal), con los cebadores sentido 5'ACCGCAGCTAGGAATAATGGA3' y antisentido 5'GCCTCAGTTCCGAAAACCA3' (Shi *et al.*, 2013). Las condiciones fueron: desnaturalización inicial de 95°C, 3 min, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 30 s y 55°C por 30 s (Getachew *et al.*, 2008). Las amplificaciones para ambos genes constitutivos se realizaron en un termociclador de tiempo real CFX 96TM C1000 (BIO-RAD).

Las muestras de sangre y heces que amplificaron a GAPDH y 18S respectivamente, fueron analizadas para determinar la presencia de ADN de *T. gondii* mediante una PCRa a fin de amplificar un fragmento de 390pb del gen SAG1 que codifica para la principal proteína de superficie de *T. gondii* (Su *et al.* 2010). La amplificación se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems), utilizando los cebadores externos sentido 5'GTTCTAACCACGCACCCTGAG3' y antisentido

5'AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA3'; en la segunda amplificación los cebadores internos fueron sentido 5'CAATGTGCACCTGTAGGAAGC3' y antisentido 5'GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG3'. La primera reacción de amplificación se llevó a cabo con el amortiguador de la PCR IX (PROMEGA), MgCl₂ de 2 mM; 0.8 mM de dNTPs; 0.5 μM para ambos cebadores; 1.5 U de la *Taq* polimerasa; y 4 μL de ADN de las muestras en un volumen final de 25 μL por reacción. La segunda corrida tuvo las mismas concentraciones que la primera reacción, pero la concentración de los cebadores internos fue de 0.3 μM y como templado se empleó 2 μL del producto de la PCR de la primera corrida. Las condiciones de la PCRa en la primera corrida fueron: 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 1 min y 72°C por 2 min; y en la segunda corrida: 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min y 72°C por 1:30 min. Se incluyeron controles positivos (ADN de *T. gondii*) y negativos (reacción de amplificación sin templado) en cada corrida de la PCRa. Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Población de estudio

Se colectaron 44 muestras de suero y sangre completa provenientes de diez especies de félidos silvestres (Cuadro 1); de las cuales dos muestras pertenecen al zoológico 1, 11 al zoológico 2, 10 al zoológico 3 y 21 al zoológico 4.

En cuanto a las muestras de heces se colectaron 36 muestras (82% de los félidos incluidos en el estudio); sin embargo, en tres ocasiones fue necesario combinar las muestras ya que se encontraban en exhibidores compartidos por dos animales al mismo tiempo y no fue posible

separarlos para coleccionar muestras individuales. En cinco ocasiones no fue posible coleccionar las muestras de heces en las 24 horas siguientes al muestreo de sangre por lo que estas muestras de heces se descartaron del estudio. Asimismo, se descartó una muestra perteneciente a un jaguarundi ya que no amplificó al gen constitutivo 18S (Cuadro 1).

Detección serológica de *T. gondii*

De las 44 muestras de suero coleccionadas, solo 42 fueron analizadas por medio de la técnica de ELISA, ya que dos de estas muestras fueron coleccionadas posterior a la realización de esta técnica. Como resultado, se determinó una seroprevalencia de anticuerpos IgG anti *T. gondii* en el 100% de las 42 muestras analizadas (Cuadro 1).

Detección de ooquistes de *T. gondii*

No se encontraron ooquistes de *T. gondii* en ninguna de las muestras de heces analizadas por microscopía de campo claro.

Detección de ADN de *T. gondii* en sangre y heces

Las 44 muestras de sangre analizadas para el gen constitutivo GAPDH fueron positivas por lo que fueron utilizadas en una PCRa para el gen SAG1. Se observó un amplicón del tamaño esperado (390pb) en el 9% (4/44) de las muestras de sangre completa (Figura 1). En el caso de las heces, de 36 muestras, 35 fueron positivas al gen constitutivo 18S, estas últimas también fueron analizadas mediante PCRa de SAG1 en donde el 14.3% (5/35) de las muestras fueron positivas. Las muestras PCRa positivas corresponden a nueve animales de seis especies (Cuadro 1).

Cuadro 1. *Toxoplasma gondii* en muestras de sangre y heces de felinos en cautiverio.

Especie	POSITIVOS		
	Anti-IgG <i>T. gondii</i> (ELISA)	PCRa SAG1	
		Sangre	Heces
<i>Leopardus tigrinus</i>	3/3	1/3	0/3
<i>Puma yagouarundi</i>	2/2	0/2	0/1
<i>Lynx rufus</i>	2/2	0/2	0/1*
<i>Caracal caracal</i>	1/1	0/1	0/1
<i>Leopardus pardalis</i>	2/2	0/2	1 / 2
<i>Puma concolor</i>	2/2	1/3	1/3
<i>Panthera pardus</i>	1/1	0/1	1/1
<i>Panthera onca</i>	13/13	0/13	1/9*
<i>Panthera tigris</i>	9/9	1/10	1/8*
<i>Panthera leo</i>	7/7	1/7	0/6
Total	42/42 (100%)	4/44 (9%)	5/35 (14.3%)

* Contemplando una muestra combinada. Las muestras positivas se colectaron de manera individual.

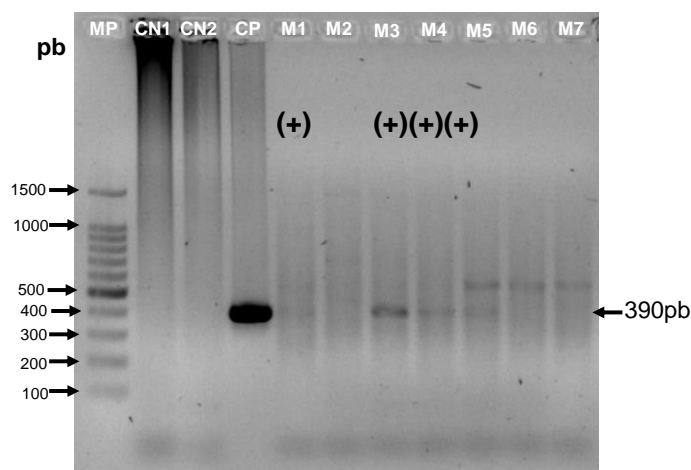


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio del producto de amplificación con los cebadores para SAG1 de *T. gondii*. Carriles: MP) marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder, referencia: G210A, Promega); CN1) control negativo primera reacción (Master mix sin templado); CN2) control negativo segunda reacción (Master mix sin templado); CP) control positivo 390pb (ADN de taquizoitos de *T. gondii* de cultivo axénico); M1) muestra de león; M2-4 muestra de tigrillos; M5 y M6 muestras de jaguares; M7 muestra de ocelote.

DISCUSIÓN

La seroprevalencia encontrada en el presente estudio ha sido una de las más altas descritas hasta el momento en félidos silvestres en cautiverio en el mundo (100%); además, es el que incluye un importante número de ejemplares y de especies evaluados con una prueba de ELISA indirecta.

Los hallazgos del presente estudio difieren con las prevalencias descritas previamente en félidos silvestres en cautiverio por Alvarado-Esquivel *et al.* (2013) donde reportaron una prevalencia de anticuerpos anti *T. gondii* de 81.39% en 43 félidos de tres zoológicos de la Ciudad de México utilizando la técnica de aglutinación modificada (MAT, por sus siglas en inglés), la cual ha demostrado una alta concordancia con la técnica de ELISA (Lappin and Powell, 1991; Zhu *et al.*, 2012). Igualmente, nuestros resultados difieren con los de otros estudios, como los reportados por André *et al.* (2010) y Silva *et al.* (2001) en Brasil. André *et al.* (2010) analizaron a 161 félidos silvestres en cautiverio de 14 especies (ocho neotropicales) y reportó una seroprevalencia de 63.4%. utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFAT, por sus siglas en inglés); y por su parte Silva *et al.* (2001) reportaron una seroprevalencia con la técnica MAT de 54.6% en 865 de ocho especies de félidos neotropicales en cautiverio (incluyendo 71 zoológicos y 15 criadores).

Si bien, en términos generales, se esperan seroprevalencias altas en los félidos, es importante determinar si la seroprevalencia del 100% aquí reportada pudo deberse a condiciones particulares (climáticas, recintos, manejo de los animales, desinfección, etc.) de los zoológicos incluidos y/o a factores de riesgo como la alimentación con carne cruda que se congeló por menos de siete días (Ramos Silva *et al.*, 2007) o la presencia de gatos ferales en

los zoológicos estudiados; ya que dichos elementos podrían estar favoreciendo la infección y reinfección de los ejemplares estudiados, lo que impactaría en las pruebas serológicas. Los felinos incluidos en este estudio eran alimentados con carne de pollo, caballo y ocasionalmente conejo, especies en las cuales se han identificado anticuerpos anti-*T. gondii* en México (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012a, 2012b; Figueroa-Castillo *et al.*, 2006); asimismo la carne con que alimentaban únicamente era congelada (por un máximo de dos días) en uno de los zoológicos estudiados. Por otra parte, en México se han realizado estudios para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* en gatos domésticos reportando prevalencias que van del 21 al 91.8% (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2007; Besné-Mérida *et al.*, 2008; Castillo-Morales *et al.*, 2012; García-Márquez *et al.*, 2007).

Si bien los factores de riesgo previamente mencionados pueden favorecer la primo infección y reinfección de los animales en cautiverio, se requiere de la titulación de los anticuerpos y al menos dos muestreos con intervalo de dos a cuatro semanas para poder determinar si se trata de una reinfección o infección activa (Lappin and Powell, 1991).

La técnica de microscopia directa es una técnica sencilla y económica, pero con una baja sensibilidad (dependiendo de la experiencia del observador, la forma y tiempo de colecta de la muestra y la carga parasitaria); por lo que requiere del monitoreo de las heces por más de tres semanas y complementarse con la técnica de bioensayo para confirmar la presencia del parásito (Aramini *et al.*, 1998; Jewell *et al.*, 1972; Miller *et al.*, 1972).

Salant *et al.* (2010) concluyeron que la copro-PCR se correlaciona con el bioensayo y que es mucho más sensible que la microscopia (e incluso que el bioensayo); por lo que fue posible detectar en 14.3% de las muestras de heces el ADN del parásito; lo anterior podría sugerir que los animales PCR positivos en heces tuvieron cargas de ooquistes muy bajas (razón por

la cual no fueron detectables por microscopia) y que posiblemente más ejemplares eliminaran ooquistes antes o después del muestreo. Este hallazgo requiere de un diseño experimental diferente al aquí utilizado para poder determinar las causas y el tiempo de eliminación, así como la carga de los ooquistes; esto debido al potencial riesgo zoonótico que representan dichas especies para los trabajadores y visitantes de los zoológicos, así como para el mantenimiento del ciclo de vida del parásito y la transmisión a otras especies en cautiverio. En cuanto a los ejemplares PCR positivos en sangre pudieron ser casos de reactivación de la parasitemia o reinfecciones con un biotipo distinto, ya que este puede establecerse y circular en torrente sanguíneo hasta que se desarrolle inmunidad específica en contra de él; por lo que es importante determinar si eliminaron ooquistes en algún momento o si presentaron algún cambio en los títulos de anticuerpos.

Si bien, el periodo de eliminación y la cantidad de ooquistes eliminados por los félidos silvestres no han sido determinados para todas las especies, se asume que son similares al del gato doméstico (Dubey, 2014) y que después de la primo infección podrían tener periodos de eliminación más cortos y con cargas parasitarias significativamente menores; sin embargo esto no ha sido confirmado completamente, por lo que no se puede asumir que no existan variaciones propias de cada especie. Asimismo, al igual que el gato doméstico, los félidos silvestres pueden verse afectados por agentes inmunosupresores, los cuales pueden favorecer la recirculación y eliminación del parásito; en estudios previos en félidos silvestres se ha reportado la co-infección de *T. gondii* y virus de leucemia, inmunodeficiencia, calicivirus y panleucopenia felinos, así como distemper canino (Bevins *et al.*, 2012; Buddhirongawatr *et al.*, 2006; Fiorello *et al.*, 2006, 2007; Ketz-Riley *et al.*, 2003) los cuales pueden favorecer una reactivación de la parasitemia y/o eliminación de ooquistes. Particularmente en México

no existen reportes sobre la prevalencia de estos virus en félidos en cautiverio, sin embargo las prevalencias de leucemia viral felina en gatos domésticos varían del 7.5% (ELISA) (Ortega-Pacheco *et al.*, 2013) al 75% (PCR) (Ramírez *et al.*, 2016), en el caso del virus de inmunodeficiencia felina se ha reportado una seroprevalencia de 2.5% (ELISA) (Ortega-Pacheco *et al.*, 2013), y se ha reportado un 52% (prueba de neutralización del virus) de seroprevalencia del virus de distemper canino en perros (Ortiz-Amador, 2015). Debido a lo anterior, es recomendable determinar la presencia de estos virus en las poblaciones incluidas en este estudio, ya que en 9 ejemplares (7 de ellos adultos sanos) pudo detectarse la presencia del genoma del parásito.

El 60% (n= 3/5) de los ejemplares copro-PCR positivos se encontraban clínicamente sanos al momento del muestreo; sin embargo en el 40% restante fueron félidos silvestres en donde se registró la presencia de diarrea (un ocelote de siete meses de edad) y una gastroenteritis hemorrágica con desenlace fatal (un puma adulto). Ambos ejemplares pertenecían a zoológicos diferentes con entornos ambientales y manejos nutricionales distintos. Previamente se ha reportado la presencia de ooquistes de *T. gondii* en heces diarreicas en félidos silvestres (chita y tigre siberiano) en cautiverio (Dorny y Fransen, 1989; Lloyd y Stidworthy, 2007); por lo que los dos ejemplares enfermos en este estudio pudieron eliminar ooquistes sin necesariamente tratarse de una reinfección con un biotipo diferente.

En conclusión, existe una alta seroprevalencia de *T. gondii* en las poblaciones de félidos silvestres en cautiverio estudiadas con parasitemia y eliminación de ooquistes. Se requiere de estudios prospectivos titulando los anticuerpos con la finalidad de discernir tipo de infección identificada, así como orientados a determinar la carga parasitaria y tiempo de

eliminación del parásito en estas poblaciones contemplando las estrategias necesarias para la identificación de los biotipos involucrados.

A partir de los hallazgos aquí descritos, se destaca la necesidad de diseñar, implementar y promover programas formales para el control y la prevención de la infección por *T. gondii* en los zoológicos mexicanos (particularmente en zonas neotropicales) a fin de reducir las tasas de infección y reinfección, tanto en las poblaciones de félidos en cautiverio como en otros animales en cautiverio.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarado-Esquivel, C., Gayosso-Dominguez, E.A., Villena, I., Dubey, J.P., 2013.

Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in three zoos in Mexico City, Mexico. *J. Zoo Wildl. Med.* 44, 803–806.

Alvarado-Esquivel, C., González-Salazar, A.M., Alvarado-Esquivel, D., Ontiveros-Vázquez,

F., Vitela-Corrales, J., Villena, I., Dubey, J.P., 2012a. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Chickens in Durango State, Mexico. *J. Parasitol.* 98, 431–432.

Alvarado-Esquivel, C., Liesenfeld, O., Herrera-Flores, R.G., Ramírez-Sánchez, B.E.,

González-Herrera, A., Martínez-García, S. a, Dubey, J.P., 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Durango City, Mexico. *J. Parasitol.* 93, 1214–1216.

Alvarado-Esquivel, C., Rodríguez-Peña, S., Villena, I., Dubey, J.P., 2012b. Seroprevalence

of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Horses in Durango State, Mexico. *J. Parasitol.* 98, 944–945.

André, M.R., Adania, C.H., Teixeira, R.H.F., Silva, K.F., Jusi, M.M.G., Machado, S.T.Z., de

- Bortolli, C.P., Falcade, M., Sousa, L., Alegretti, S.M., Felipe, P. a N., Machado, R.Z., 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *J. Parasitol.* 96, 1007–9.
- Aramini, J., Stephen, C., Dubey, J., 1998. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J. Parasitol.* 84, 438–440.
- Besné-Mérida, A., Figueroa-Castillo, J.A., Martínez-Maya, J.J., Luna-Pastén, H., Calderón-Segura, E., Correa, D., 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Vet. Parasitol.* 157, 310–313.
- Bevins, S.N., Carver, S., Boydston, E.E., Lyren, L.M., Alldredge, M., Logan, K. a, Riley, S.P.D., Fisher, R.N., Vickers, T.W., Boyce, W., Salman, M., Lappin, M.R., Crooks, K.R., VandeWoude, S., 2012. Three pathogens in sympatric populations of pumas, bobcats, and domestic cats: implications for infectious disease transmission. *PLoS One* 7, e31403. doi:10.1371/journal.pone.0031403
- Buddhirongawatr, R., Tungstudjai, S., Chaichoune, K., Sangloun, C., Tantawiwattananon, N., Phonaknguen, R., Sukthana, Y., Animals, E., Pathom, N., 2006. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 37, 15–17.
- Cañón-Franco, W.A., Araújo, F.A.P., López-Orozco, N., Jardim, M.M.A., Keid, L.B., Dalla-Rosa, C., Cabral, A.D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., 2013. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. *Vet. Parasitol.* 197, 462–9.
- Castillo-Morales, V.J., Acosta Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E.D.S., Jiménez-Coello, M.,

- Segura-Correa, J.C., Aguilar-Caballero, a J., Ortega-Pacheco, A., 2012. Prevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Cats from the Tropics of Mexico Using Serological and Molecular Tests. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012, 529108.
- Dorny, P., Fransen, J., 1989. Toxoplasmosis in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Vet. Rec.* 125, 647.
- Dubey, J.P., 2014. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*, in: *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. Elsevier, pp. 1–17.
- Dubey, J.P., 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39, 877–882.
- Dubey, J.P., Alvarado-Esquivel, C., Herrera-Valenzuela, V.H., Ortiz-Diaz, J.J., Oliveira, S., Verma, S.K., Choudhary, S., Kwok, O.C.H., Su, C., 2013. A new atypical genotype mouse virulent strain of *Toxoplasma gondii* isolated from the heart of a wild caught puma (*Felis concolor*) from Durango, Mexico. *Vet. Parasitol.* 197, 674–7.
- Dubey, J.P., Graham, D.H., De Young, R.W., Dahl, E., Eberhard, M.L., Nace, E.K., Won, K., Bishop, H., Punkosdy, G., Sreekumar, C., Vianna, M.C.B., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Sumners, J. a, Demarais, S., Humphreys, J.G., Lehmann, T., 2004. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J. Parasitol.* 90, 67–71. doi:10.1645/GE-110R
- Dubey, J.P., Pas, A., Rajendran, C., Kwok, O.C.H., Ferreira, L.R., Martins, J., Hebel, C., Hammer, S., Su, C., 2010. Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Vet. Parasitol.* 172,

195–203.

- Dzib-Paredes, G.F., Rosado-Aguilar, J.A., Acosta-Viana, K.Y., Ortega-Pacheco, A., Hernández-Cortázar, I.B., Guzman-Marín, E., Jiménez-Coello, M., 2016. Seroprevalence and parasite load of *Toxoplasma gondii* in Mexican hairless pig (*Sus scrofa*) tissues from the Southeast of Mexico. *Vet. Parasitol.* 229, 45–49. doi:10.1016/j.vetpar.2016.09.016
- Figuroa-Castillo, J., Duarte-Rosas, V., Juárez-Acevedo, M., Luna-Pastén, H., Correa, D., 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *J. Parasitol.* 92, 394–395.
- Fiorello, C. V., Robbins, R.G., Maffei, L., Wade, S.E., 2006. Parasites of free-ranging small canids and felids in the Bolivian Chaco. *J. Zoo Wildl. Med.* 37, 130–134. doi:10.1638/05-075.1
- Fiorello, C. V, Noss, A.J., Deem, S.L., Maffei, L., Dubovi, E.J., 2007. Serosurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco. *J. Wildl. Dis.* 43, 551–557. doi:10.7589/0090-3558-43.3.551
- García-Márquez, L.J., Gutiérrez-Díaz, M.A., Correa, D., Luna-Pastén, H., Palma, J.M., 2007. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, Mexico. *J. Parasitol.* 93, 1527–1528.
- Gómez-Marín, J.E., De-la-Torre, A., Barrios, P., Cardona, N., Álvarez, C., Herrera, C., 2012. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. *Acta Trop.* 122, 46–51.
- Jalal, S., Nord, C., Lappalainen, M., Evengard, B., 2004. Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 937–939.

- Jewell, M.L., Frenkel, J.K., Johnson, K.M., Reed, V., Ruiz, A., 1972. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21, 512–517.
- Jongwutiwes, S., Tiangtip, R., Yentakarm, S., Chantachum, N., 2002. Simple method for long-term copro-preservation of *Cryptosporidium* oocysts for morphometric and molecular analysis. *Trop. Med. Int. Heal.* 7, 257–264.
- Kenny, D., Lappin, M., Knightly, F., 2002. Toxoplasmosis in Pallas' Cats (*Otocolobus felis manul*) at the Denver Zoological Gardens. *J. Zoo Wildl. Med.* 33, 131–138.
- Ketz-Riley, C.J., Ritchey, J.W., Hoover, J.P., Johnson, C.M., Barrie, M.T., 2003. Immunodeficiency associated with multiple concurrent infections in captive Pallas' cats (*Otocolobus manul*). *J. Zoo Wildl. Med.* 34, 239–245. doi:10.1638/01-112
- Kikuchi, Y., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Martenson, J.S., Swift, P.K., O'Brien, S.J., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Vet. Parasitol.* 120, 1–9.
- Lappin, M.R., Powell, C.C., 1991. Comparison of latex agglutination, indirect hemagglutination, and ELISA techniques for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in the serum of cats. *J Vet Intern Med* 5, 299–301.
- Lloyd, C., Stidworthy, M., 2007. Acute disseminated toxoplasmosis in a juvenile cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 38, 475–478.
- Miller, M.A., Miller, W.A., Conrad, P.A., James, E.R., Melli, A.C., Leutenegger, C.M., Dabritz, H.A., Packham, A.E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D.A., Worcester, K., Grigg, M.E., 2008. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 38, 1319–28.

- Miller, N.L., Frenkel, J.K., Dubey, J.P., 1972. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* 58, 928–37.
- Ortega-Pacheco, a, Aguilar-Caballero, a J., Colin-Flores, R.F., Acosta-Viana, K.Y., Guzman-Marin, E., Jimenez-Coello, M., 2013. Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. *J. Feline Med. Surg.* 3–7. doi:10.1177/1098612X13509995
- Ortiz-Amador, S., 2015. Investigación epidemiológica del virus del distemper canino en perros domésticos, jaguares y pumas en los alrededores de la reserva de la biosfera Calakmul en el sur de México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Piggott, M.P., Taylor, a C., 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australain native and in troduced species. *Aust. J. Zool.* 51, 341–355.
- Ramírez, H., Autran, M., García, M.M., Carmona, M.Á., Rodríguez, C., Martínez, H.A., 2016. Genotyping of feline leukemia virus in Mexican housecats. *Arch. Virol.* 161, 1039–1045. doi:10.1007/s00705-015-2740-4
- Ramos Silva, J.C., Marvulo, M.F.V., Dias, R.A., Ferreira, F., Amaku, M., Adania, C.H., Ferreira Neto, J.S., 2007. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Prev. Vet. Med.* 78, 286–95.
- Rendón-Franco, E., Caso-Aguilar, A., Jiménez-Sánchez, N.G., Brousset Hernandez-Jauregui, D.M., Sandoval-Sánchez, A.L., Zepeda-López, H.M., 2012. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in free-ranging ocelots (*Leopardus pardalis*) from Tamaulipas, Mexico. *J. Wildl. Dis.* 48, 829–831.
- Salant, H., Spira, D.T., Hamburger, J., 2010. A comparative analysis of coprologic diagnostic

- methods for detection of *Toxoplasma gondii* in cats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 865–70.
- Shi, L., Cui, S., Engel, J.D., Tanabe, O., 2013. Lysine-specific demethylase 1 is a therapeutic target for fetal hemoglobin induction. *Nat. Med.* 19, 291–294. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240.Microglia
- Silva, J.C., Ogassawara, S., Adania, C.H., Ferreira, F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Ferreira-Neto, J.S., 2001. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.* 102, 217–224.
- Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1–11.
- Ullmann, L.S., da Silva, R.C., de Moraes, W., Cubas, Z.S., dos Santos, L.C., Hoffmann, J.L., Moreira, N., Guimaraes, A.M.S., Montañó, P., Langoni, H., Biondo, A.W., 2010. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 172, 144–6.
- Vitaliano, S.N., Soares, H.S., Minervino, A.H.H., Santos, A.L.Q., Werther, K., Marvulo, M.F. V, Siqueira, D.B., Pena, H.F.J., Soares, R.M., Su, C., Gennari, S.M., 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 276–83.
- Zhu, C., Cui, L., Zhang, L., 2012. Comparison of a Commercial ELISA with the Modified Agglutination Test for Detection of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Sera of Naturally Infected Dogs and Cats. *Iran. J. Parasitol.* 7, 89–95.

CONCLUSION GENERAL

En conclusión, existe una alta seroprevalencia de *T. gondii* en las poblaciones de félidos silvestres en cautiverio estudiadas con parasitemia y eliminación de ooquistes.

SUGERENCIAS

Se requiere de estudios prospectivos titulando los anticuerpos con la finalidad de discernir tipo de infección identificada, así como orientados a determinar la carga parasitaria y tiempo de eliminación del parásito en estas poblaciones contemplando las estrategias necesarias para la identificación de los biotipos involucrados.

A partir de los hallazgos aquí descritos, se destaca la necesidad de diseñar, implementar y promover programas formales para el control y la prevención de la infección por *T. gondii* en los zoológicos mexicanos (particularmente en zonas neotropicales) a fin de reducir las tasas de infección y reinfección, tanto en las poblaciones de félidos en cautiverio como en otros animales en cautiverio.