

Capítulo 3

Estudio piloto *Toxoplasma gondii* en heces de gatos de la ciudad de Ibagué

Los gatos son los huéspedes más importantes en el ciclo epidemiológico de *T. gondii*, puesto que, al ser su hospedador definitivo, este parásito necesita de los felinos para completar su ciclo biológico (Dubey, 2009a). Sin lugar a duda, los felinos son trascendentales como fuente de infección para los seres humanos, debido a que los gatos domésticos coexisten en una estrecha asociación con la mayoría de los asentamientos humanos en todo el mundo a través del tiempo (Liberg et al., 2000).

Por lo anterior, en el presente capítulo, se pretendió, mediante un estudio piloto, detectar la presencia del parásito en las heces de los gatos, con el fin de concientizar sobre *T. gondii* en factores de salud pública, ambiental y animal.

3.1. Metodología

Como vimos en el capítulo anterior, los métodos de detección *T. gondii* son variados y todos llegan a ser indispensables para hacer diagnósticos clínicos, descriptivos, poblacionales, compresiones biológicas, entre otros. Así, mediante metodologías estandarizadas en las instalaciones del LIPT, se diseñó un método que permitió hacer la detección molecular de este protozooario en heces de felinos domésticos por técnicas de PCR-anidado del gen *B1*, como veremos a continuación:

3.1.1. La muestra

El muestreo coprológico se realizó de forma aleatoria entre el año 2019 y 2020, sin discriminar la característica del donador, las muestras fueron donadas bajo el consentimiento informado del dueño, teniendo

en cuenta la emergencia sanitaria global del covid-19, se recolectó en total 40 muestras de heces que fueron tomadas directamente del lugar de deposición, o llevadas por el responsable del gato; en ambos casos se utilizaron recipientes estériles, además se tomó nota de los datos que nos proporcionó información que caracteriza al donador.

3.1.2. Obtención de ADN a partir de muestras de heces de gato

3.1.2.1. Procesamiento de la muestra. Se depositaron 2 g de cada muestra en un frasco estéril, para su posterior transporte en neveras refrigeradas al LIPT, donde se colocaron en bolsas estériles de cierre hermético (Vignau et al., 2005), las cuales fueron rotuladas con datos, tales como fecha y lugar de procedimiento. Continuamente se realizó agitación manual en recipientes de un solo uso, después se agregó 150 ml de agua desionizada, estas fueron agitadas manualmente por 10 min, asegurándose de impregnar toda la muestra con el agua estéril. Posteriormente, se rescatan los 150 ml de agua producto del lavado, pasándola a tubos falcón de 50 ml, a través de una gasa sencilla estéril para filtrar la muestra de suciedad y partículas grandes, para proceder a la concentración de los ooquistes por el método de flotación de Faust y ruptura de estos por choque térmico (**Tabla 7**).

Tabla 7. Ruptura de ooquistes por choque térmico.

	Procedimiento	Temperatura C°
1	Resuspender en 100 μ de buffer de lisis (H ₂ O milli Q, EDTA 50mM, NaCl 5M y SDS 1%)	
2	Congelamiento en nitrógeno líquido	-195,8
3	Descongelamiento en baño de María	65
	Repetir por 3 veces	

Fuente: Los autores.

3.1.2.2. Extracción y purificación de ADN a partir de la muestra. La metodología empleada para la extracción y purificación de ácidos nucleicos en muestras coprológicas de gatos domésticos se realizó de la forma mencionada anteriormente, mediante pruebas de extracción a partir de 300 μ L de muestra con el método de Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamilico (**Anexo A**) y digestión con RNasa A (Concentración de trabajo de 50 μ g/mL) (Sambrook et al., 1989).

3.1.3. Cuantificación de ADN

Posterior a la extracción y purificación de ADN, la muestra fue cuantificada por espectrofotometría con NanoDrop 2000 para determinar cuál es la mejor opción para el tratamiento de las muestras, siendo la que permita mayor concentración de ADN (ng/ μ L) y pureza (Relación 260/280), además de realizar pruebas de sensibilidad con el fin de identificar la cantidad mínima de ADN detectable con el método.

3.1.4. Detección molecular de *T. gondii* en heces de gato doméstico

La detección se realizó mediante el procedimiento de PCR-*nested* (anidado) estandarizado en el LIPT; y visualización a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, estipulado en el capítulo anterior (**Ver capítulo 2**); que demuestra eficacia en la detección.

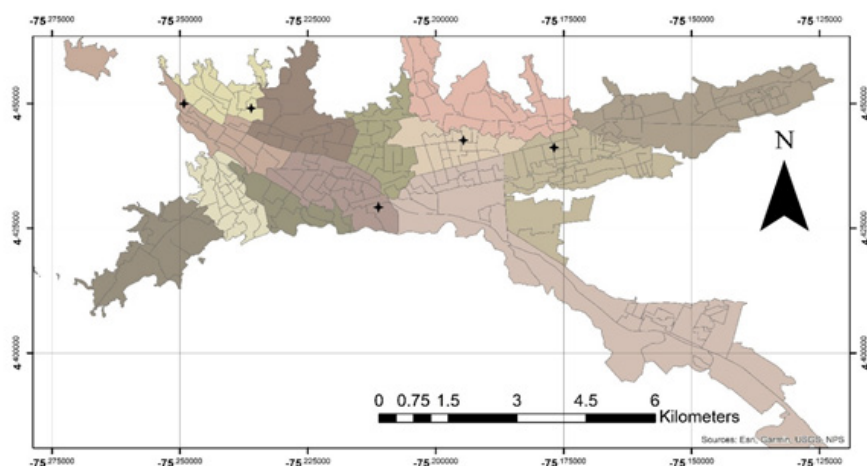
3.1.5. Análisis estadístico

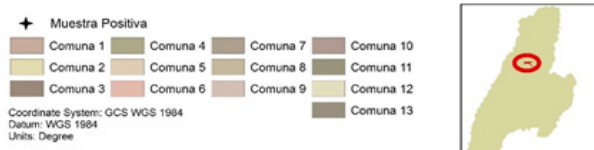
Los resultados obtenidos se ubicaron en una base de datos de Microsoft Excel y se categorización como negativos o positivos según el caso.

3.2. Resultados

3.2.1. Obtención de muestras de estudio

Figura 7. Ubicación puntos de muestro para heces felinas en el casco urbano de la ciudad de Ibagué – Tolima.





Fuente: Los autores.

En este estudio piloto, se establecieron puntos de muestreo de forma aleatoria en la ciudad de Ibagué (**Figura 7**), haciendo colecta en todas las comunas a excepción de la comuna número 3, las muestras recibidas bajo consentimiento informado proporcionaron información del donador, tal como: sexo, edad y ubicación.

3.2.2. Muestras de heces de gatos domésticos

En este estudio piloto, se lograron recolectar 40 muestras coprológicas de felinos; teniendo en cuenta el número anterior no se establecieron parámetros para determinar la prevalencia del organismo; sin embargo, el estudio reveló la presencia del parásito y la eficacia de la metodología para su detección (**Tabla 8**).

Tabla 8. Puntos de muestreo coprológico – casco urbano, ciudad de Ibagué.

Nº	Fecha	Barrio	Comuna
1	13/08/2019	Ambala	Comuna 6
2	14/08/2019	Las palmas	Comuna 10
3	14/08/2019	Boyacá	Comuna 10
4	15/08/2019	Picaleña	Comuna 9
5	15/08/2019	Villa Café	Comuna 10
6	15/08/2019	Jardín	Comuna 8
7	17/08/2019	Belén	Comuna 2
8	18/08/2019	Departamental	Comuna 10
9	18/08/2019	Jardín Palermo	Comuna 8
10	18/08/2019	Las palmas	Comuna 10
11	18/08/2019	Santa Helena/U. del Tolima	Comuna 10
12	5/08/2020	Plaza la 21	Comuna 5
13	6/08/2020	Santa Ana	Comuna 7
14	7/08/2020	Boquerón	Comuna 13

N°	Fecha	Barrio	Comuna
15	7/08/2020	Estación	Comuna 1
16	7/08/2020	Jordán	Comuna 5
17	7/08/2020	Salado	Comuna 7
18	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
19	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
20	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
21	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
22	19/08/2020	La Pola	Comuna 1
23	19/08/2020	Galán	Comuna 12
24	25/08/2020	Pirámides	Comuna 7
25	25/08/2020	Pirámides	Comuna 7
26	31/08/2020	Rosa Badillo	Comuna 12
27	1/09/2020	Ricaurte	Comuna 12
28	1/09/2020	Galarza	Comuna 12
29	12/09/2020	Los Mártires	Comuna 11
30	12/09/2020	Jordán I	Comuna 9
31	26/09/2020	Juan Pablo II	Comuna 6
32	28/09/2020	Varsovia	Comuna 9
33	28/09/2020	La Pola	Comuna 1
34	29/09/2020	Ambala	Comuna 12
35	30/09/2020	Ricaurte	Comuna 6
36	2/10/2020	Centro	Comuna 1
37	3/10/2020	Salado	Comuna 7
38	3/10/2020	El Carmen	Comuna 3
39	5/10/2020	Plazas del Bosque	Comuna 6
40	5/10/2020	Clarita Botero	Comuna 2

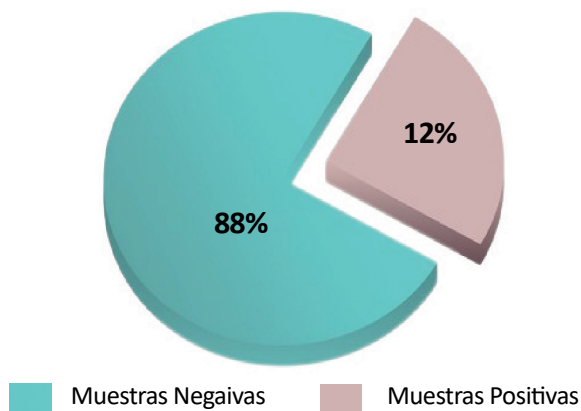
Fuente: Los autores.

3.2.3. Detección molecular de *T. gondii* en heces de gato doméstico

De 40 muestras coprológicas analizadas en el LIPT, 5 (12,5%) presentaron positividad del gen *B1* para *T. gondii* mediante técnicas de PCR-*nested* (anidado) después de ser sometidas a extracción y purificación de ácidos nucleicos, y 35 fueron negativas por el método ya mencionado (**Figura 8**). Representando así, la presencia del organismo en un 12 % de las muestras de ADN extraído en el estudio piloto.

Figura 8. Diagrama representativo de la presencia de *T. gondii* en heces de gato doméstico en la ciudad de Ibagué - Tolima.

Presencia de *T. gondii* en heces de gato doméstico

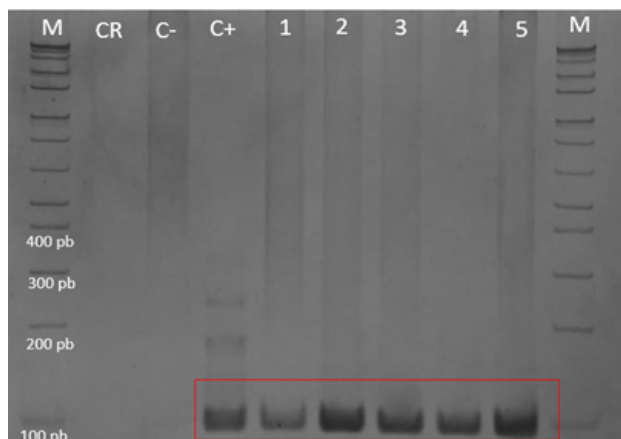


Fuente: Los autores.

3.2.4. Visualización producto de amplificación del gen B1 para la detección de *T. gondii* en heces de gato doméstico

Se logró detectar el producto de amplificación de la segunda ronda de PCR-nested (anidado) para la detección *T. gondii* en cinco muestras coprológicas de gato doméstico de un total de 40 colectadas en gel de poliacrilamida al 6%, mediante la detección del gen B1 (**Figura 9, Tabla 9**).

Figura 9. Visualización del producto de amplificación de la segunda ronda de PCR-nested para la detección *T. gondii* en muestras de heces felinas en gel de poliacrilamida al 6%.



**En rojo, banda de 97pb obtenida usando los cebadores Toxo N2 - Toxo C2. M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; C-) Control negativo (Agua estéril) C+) Control positivo; canaletas 5-9: muestras positivas para *T. gondii* en heces de gato*

Fuente: Los autores.

Tabla 9. Resultados PCR anidada y características del felino donador.

N° de muestra	Fecha de colecta	Barrio	N° Comuna	Sexo	Edad meses	Resultado n-PCR
6	15/08/2019	Jardín	8	Hembra	18	positivo
11	18/08/2019	Santa Helena	10	Hembra	24	positivo
30	12/09/2020	Jordán I	9	Hembra	6	positivo
33	28/09/2020	La Pola	1	Hembra	48	positivo
38	3/10/2020	El Carmen	3	Macho	10	positivo

Fuente: Los autores.

3.3. Discusión

3.3.1. Obtención de ADN

Estudios previos permitieron escoger la metodología más adecuada para hacer la concentración de los ooquistes en muestras biológicas, como se describe en **anexos** y en el **capítulo 4**; demostrando que el método de flotación por sulfato de zinc (Faust) generó resultados factibles para hacer la detección de *T. gondii* en heces de gato doméstico, además de ser una metodología de bajo costo y fácil realización, permitiendo detectar cantidades pequeñas de ADN.

3.3.2. Detección molecular

Mediante este estudio se pudo hacer la identificación de *T. gondii* en heces de gato por medio de técnicas moleculares, demostrando que los gatos domésticos son un foco de infección para los seres humanos; a pesar de no obtener un muestreo significativo, con el número de muestras procesadas analizadas, se logró medir la eficacia del método

para hacer identificación de este parásito en diferentes muestras biológicas como veremos más adelante en los dos capítulos siguientes.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que detecta directamente el ADN del parásito y ha sido evaluada por diferentes autores, empleando diferentes metodologías y muestras (Ponce & Gómez-Marín, 2003). Además, la detección del gen *B1* por PCR-*nested* (anidada) parece ser el protocolo más sensible en comparación a otros siendo capaz de detectar 50 fg, aproximadamente un solo taquizoíto y es una técnica que ha tenido éxito en la identificación del ADN de *T. gondii* en tejidos y fluidos (Jones et al., 2000) y se confirma con las investigaciones realizadas en el LITP.

3.3.3. Prevalencia de *T. gondii* en heces de gatos domésticos

En el mundo existen 36 especies de felinos silvestres; el continente americano es hogar de una tercera parte de ellos; y solo el puma se encuentra en todo tipo de ambientes (Ceballos et al., 2010). Estos felinos salvajes y los domésticos se consideran fuente de excreción de ooquistes contaminantes al medio (Halonen & Weiss, 2013). Varios autores concluyen que la transmisión de *T. gondii* a los seres humanos, es dependiente de la contaminación del ambiente, asociada también a la edad del felino, los hábitos, pero no el sexo del mismo (Afonso et al., 2007; Dubey, 2009a). Por ejemplo, en Beijing (China) se ha evidenciado que el 57,8% (37/64) de los gatos callejeros fueron seropositivos con anticuerpos de *T. gondii*, datos significativamente más altos que en gatos domésticos (14,9%) (Qian et al., 2012). Cabe resaltar que características como raza y el sexo que no muestran mayor significancia (Grandía et al., 2013; López et al., 2008). Sin embargo, en nuestro estudio observamos mayor presencia del parásito en hembras que en machos, posiblemente debido al número de muestras procesadas.

En Colombia, en la ciudad de Armenia, Quindío, aunque por microscopía óptica, no se logró detectar *T. gondii*; a través de PCR se encontró un 17,8% (25/140) de muestras positivas para el gen B1, llegando a la conclusión de que la presencia de este parásito en las heces de felinos de compañía es un factor importante que contribuye a la alta prevalencia de *T. gondii* en la población humana (Zamora-Vélez et al., 2020).

3.4. Conclusiones

La metodología de PCR anidada para el gen *B1* empleada en el presente estudio demuestra ser muy eficaz en la detección de *T. gondii* en heces de gato doméstico; además de ser una metodología de fácil realización.

Se estandarizó una metodología para la concentración de ooquistes a partir de muestras coprológicas de felinos domésticos, obteniendo ADN viable que garantizó la amplificación de la PCR-*nested* (anidada).

La presencia de *T. gondii* en muestras coprológicas de gato fue del 12 %, demostrando ser una fuente de transmisión del organismo al ser humano, haciendo necesario diseñar planes de mitigación de esta zoonosis silenciosa. Según lo reportado, se puede establecer que las heces de gato son un material biológico que necesita de medidas rigurosas de manejo a causa de ser fuente de contaminación al ser humano de parásitos como *T. gondii*.

Se recomienda en futuros estudios hacer un muestreo más amplio que permita dar una predicción del comportamiento del organismo en relación con este animal de compañía y el ser humano, además de evaluar factores como los hábitos del felino, mostrando los datos epidemiológicos relativos a la población de felinos de la ciudad de Ibagué.

