



## CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

### Seroprevalencia, factores de riesgo y caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en cerdos domésticos en Villa Clara, Cuba

Julio César Castillo-Cuenca <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1879-266X>

Álvaro Martínez-Moreno <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4298-6894>

Jorge Fraga Nodarse <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9061-2550>

Sonia Almería de la Merced <sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0558-5488>

Ángel Entrena-García <sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2006-9905>

Pedro Casanova Arias <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5216-8591>

José Manuel Díaz Cao <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8119-7057>

Rafael Calero-Bernal <sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2323-0135>

Mercedes Fernández-Escobar <sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0530-544X>

Ignacio García-Bocanegra <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3388-2604>

<sup>1</sup> Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Cuba

<sup>2</sup> Universidad de Córdoba, Córdoba, España

<sup>3</sup> Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba

<sup>4</sup> Oficina de Investigaciones Aplicadas y Evaluación de Seguridad, Centro para la Seguridad de los Alimentos y Nutrición Aplicada, Administración de Alimentos y Drogas. Laurel, Maryland, EE.UU.

<sup>5</sup> Centro Nacional Para La Producción de Animales de Laboratorio. La Habana, Cuba

<sup>6</sup> Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España

Autor para la correspondencia: [juliocc@uclv.edu.cu](mailto:juliocc@uclv.edu.cu)

#### Editor

Lisset González Navarro  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### Traductor

Darwin A. Arduengo García  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### RESUMEN

**Introducción:** Los cerdos domésticos son considerados uno de los principales hospedadores intermediarios en la transmisión zoonótica de *Toxoplasma gondii* en muchos países. A la fecha, la información seroepidemiológica de *T. gondii* en cerdos domésticos en Cuba es muy escasa y no existe información sobre los genotipos de *T. gondii* que circulan en este país.

**Objetivos:** Estimar la seroprevalencia de *T. gondii* y factores de riesgo asociados, así como proporcionar la caracterización genética de las cepas de *T. gondii* que circulan en cerdos domésticos en Villa Clara, Cuba. **Métodos:** Se detectaron anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en 870 cerdos (420 de granjas de cría y 450 de granjas de ceba) usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima comercial (ELISA). Los métodos multilocus PCR-RFLP y tipado multilocus de secuencias permitieron la caracterización genética de muestras de ADN de *T. gondii* detectadas por PCR convencional del marcador 529-pb en muestras de corazón y diafragma de cerdos de ceba positivos al ELISA. **Resultados:** La seroprevalencia individual de *Toxoplasma gondii*: global, en granjas de crías y cerdos de ceba sacrificados fue 17,9 % (156/870); 13,3 % (56/420) y 22,2 % (100/450) respectivamente. Los factores de riesgo asociados a una mayor seropositividad de *T. gondii* en las granjas de cría fueron la altitud y la edad. El análisis molecular reveló 4 perfiles genéticos diferentes que sugieren la circulación de genotipos no clonales de *T. gondii* en cerdos domésticos en Cuba. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos indican una elevada exposición del cerdo doméstico a *T. gondii* así

como una alta diversidad genética de *T. gondii* en la región de estudio. Estos hallazgos son de relevancia para la sanidad animal y salud pública en Cuba.

**Palabras clave:** *Toxoplasma gondii*; seroprevalencia; factores de riesgo; caracterización genética; cerdos domésticos

## Seroprevalence, risk factors and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs in Villa Clara, Cuba

### ABSTRACT

**Introduction:** Domestic pigs are considered as one of the main intermediate hosts in the zoonotic transmission of *Toxoplasma gondii* in many countries. To date, seroepidemiological information on *T. gondii* in domestic pigs in Cuba is very scarce and there are no reports of *T. gondii* genotypes circulating in this country. **Objective:** To estimate the seroprevalence of *T. gondii* and associated risk factors, as well as to provide the genetic characterization of the *T. gondii* strains circulating in domestic pigs in Villa Clara, Cuba. **Methods:** Anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies were detected in 870 pigs (420 from breeding farms and 450 from fattening farms) using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The Multilocus PCR-RFLP and Multilocus Sequence Typing methods allowed the genetic characterization of *T. gondii* DNA samples detected by conventional PCR of the 529-bp marker in heart and diaphragm samples from ELISA positive fattening pigs. **Results:** The individual seroprevalence of *Toxoplasma gondii*: global, in breeding farms and slaughtered fattening pigs was 17.9% (156/870), 13.3% (56/420) and 22.2% (100/450) respectively. The risk factors associated with higher *T. gondii* seropositivity in breeding farms were altitude and age. Molecular analysis revealed four different genetic profiles that suggest the circulation of non-clonal *T. gondii* genotypes in domestic pigs in Cuba. **Conclusions:** The results obtained indicate a high exposure of the domestic pig to *T. gondii* as well as a high genetic diversity of *T. gondii* in the study region. These findings are relevant for animal and public health in Cuba.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; Seroprevalence; Risk factors; Genetic characterization; domestic pigs

## INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una importante enfermedad zoonótica de distribución mundial, causada por el parásito protozooario *Toxoplasma gondii*, que infecta a la mayoría de los animales homeotérmicos, incluidos los humanos. <sup>(1)</sup> Aproximadamente el 30 % de la población humana mundial está infectada con este parásito intracelular obligado. <sup>(2)</sup> Aunque la infección por *T. gondii* es típicamente asintomática en individuos inmunocompetentes, el parásito puede causar enfermedades neurológicas y oftalmológicas cuando se adquiere posnatalmente, y casos graves, incluso fatales, en niños infectados congénitamente. <sup>(2)</sup> Además, la evidencia acumulada sugiere que la infección latente con *T. gondii* podría estar asociada con una variedad de condiciones neuropsiquiátricas y conductuales en los seres humanos. <sup>(3)</sup>

El consumo de carne cruda o poco cocida de animales de granja (principalmente carne de cerdo) infectada con quistes tisulares de *Toxoplasma gondii*, se considera la principal vía de infección por *T. gondii* en humanos en muchos países. <sup>(4,5)</sup> La carne de cerdo es la más consumida en Cuba; sin embargo, los estudios epidemiológicos sobre *T. gondii* son muy escasos en este país, y hasta la fecha no se han realizado encuestas serológicas en cerdos destinados al consumo humano. <sup>(6,7,8)</sup> A pesar de que las fuentes de infección para el ser humano no han sido atribuidas, en este país se han reportado casos clínicos, incluida la toxoplasmosis ocular en personas inmunocompetentes. <sup>(9,10)</sup>

Actualmente, la población de *T. gondii* se considera compleja y diversa, constituida por 16 haplogrupos clasificados en 6 clados principales; de hecho, se han identificado

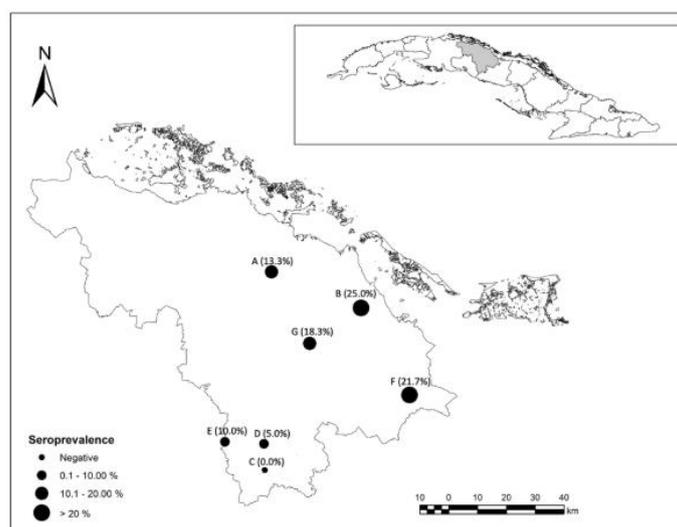
más de 300 genotipos distintos (ToxoDB.org).<sup>(11)</sup> Estudios previos realizados en el área del Caribe reportaron una alta frecuencia de cepas no canónicas y una proporción notable de cepas de *T. gondii* tipo III.<sup>(12)</sup> Si bien se ha reportado toxoplasmosis clínica en humanos en Cuba, hasta la fecha, no existen investigaciones sobre la determinación de factores de riesgo asociados a la seropositividad de *T. gondii* en cerdos domésticos en Cuba; realización de encuestas serológicas sobre *T. gondii* en cerdos de ceba sacrificados y destinados al consumo humano en Cuba; y caracterización genética de *T. gondii* en este país.<sup>(9,10,13)</sup> Por tanto, nuestros objetivos fueron estimar la seroprevalencia de *T. gondii* y factores de riesgo asociados, así como proporcionar la caracterización genética de las cepas de *T. gondii* que circulan en cerdos domésticos en Villa Clara, Cuba.

## MÉTODOS

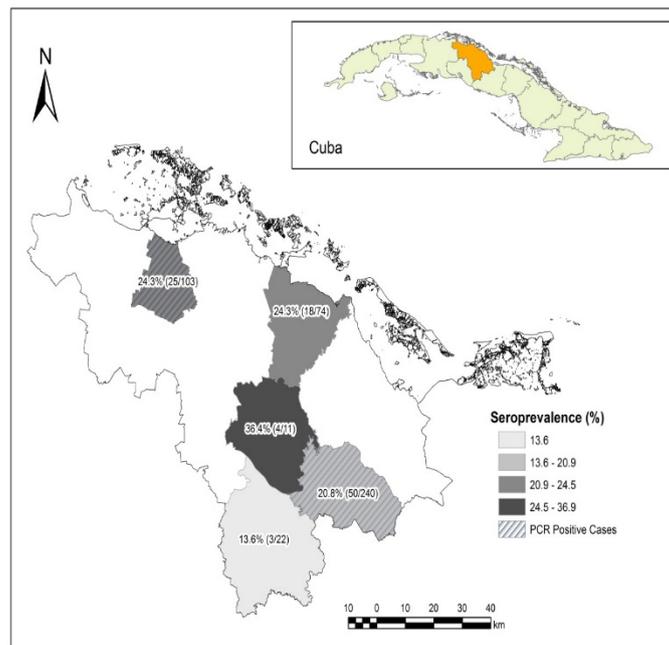
Se diseñó un estudio transversal para determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii* y factores de riesgo asociados en cerdos domésticos de todas las granjas de cría de la provincia de Villa Clara (figura 1), así como la seroprevalencia de *T. gondii* en cerdos de ceba sacrificados destinados al consumo humano (figura 2). La provincia de Villa Clara cuenta con el número más alto de cerdos domésticos y es la mayor productora de carne de cerdo en Cuba, registrando en 2017 un record de producción anual de 49 332 toneladas.<sup>(6)</sup> El sistema de producción porcina en Cuba se caracteriza por un sistema de gestión bajo convenio entre el sector especializado (sector estatal) y el sector no especializado (sector privado). Donde el

sector no especializado se encarga fundamentalmente de la ceba de los híbridos comerciales (Yorkshire/Landrace X CC21 como raza paterna) que produce y expende el sector especializado.<sup>(7)</sup> Debido a lo planteado previamente calculamos el tamaño de muestra individualmente para cada sector asumiendo una prevalencia esperada de 50 %, 95 % de Intervalo de Confianza (IC 95 %) y una precisión absoluta deseada de 5 %. Además, tuvimos en cuenta que la población porcina total de cada sector era superior a 10 000 cerdos,<sup>(14)</sup> resultando en 384 cerdos a ser muestreados en cada sector de producción.

En el sector especializado el tamaño de las granjas o centros de crías muestreados osciló entre 500 y 1600 reproductoras. Fueron aleatoriamente seleccionados en cada granja 60 cerdos, incluyendo 30 reproductoras y 30 precebas, para lo cual se asumió una seroprevalencia dentro de la granja del 6 %. Finalmente, un total de 420 muestras de sangre (10 mL) fueron obtenidas por punción del seno venoso oftálmico de cerdos procedentes de las 7 granjas porcinas de cría (A-G) de Villa Clara. Todas las granjas muestreadas presentaron estándares de bioseguridad muy similares incluyendo sistema de manejo todo dentro todo fuera, cerca perimetral, filtro sanitario, delimitación entre el área sucia y limpia, vado sanitario, ausencia de gatos y de otras especies de animales domésticos, control de roedores, cloración del agua de bebida, entre otros. Las granjas A, B, F y G estaban localizadas a una altitud menor que 250 m sobre el nivel del mar (msnm), mientras que las granjas C, D y E estaban localizadas a altitudes mayor e igual que 250 m snm.



**Fig. 1.** Mapa de la provincia de Villa Clara (Cuba) que muestra la distribución y seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* dentro de las granjas de cría muestreadas



**Fig. 2** Distribución espacial de la seropositividad de *Toxoplasma gondii* en cerdos de ceba sacrificados en Villa Clara, Cuba

En el sector no especializado un total de 450 muestras de sangre pareadas con corazón y diafragma fueron finalmente obtenidas de cerdos sacrificados aleatoriamente seleccionados (animales de 6 meses de edad y 90 kg de peso promedio) en el principal matadero porcino de Villa Clara. Las muestras fueron colectadas de enero a marzo de 2019 durante 9 días de muestreo, tomando 50 muestras por día. Por cada cerdo muestreado, al menos 100 g de diafragma y corazón fueron obtenidas e introducidas en bolsas plásticas individuales que fueron refrigeradas a 4 °C durante su transportación hasta el laboratorio donde fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis. Además, se tomaron aproximadamente 10 mL de sangre en el momento del sangrado en la línea de sacrificio. Asimismo, se registraron datos sobre sexo y municipio de origen para cada cerdo muestreado.

### Análisis serológico

Las muestras de suero fueron centrifugadas a 4800 rpm durante 10 minutos, separadas y almacenadas a -20 °C hasta su posterior análisis. Para determinar la presencia de anticuerpos IgG contra *T. gondii*, las muestras de suero fueron analizadas usando un ELISA comercial indirecto (PrioCHECK® *Toxoplasma* Ab porcine, Thermo Fisher Scientific Prionics Lelystad BV) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. <sup>(15)</sup> La sensibilidad y especificidad de este ELISA de acuerdo con el fabricante fue del 98 % y 99,6 % respectivamente.

### Caracterización genética de *Toxoplasma gondii*

La caracterización genética de *Toxoplasma gondii* se realizó únicamente a las muestras de ADN de *Toxoplasma gondii* obtenidas de muestras de corazón y diafragma de los cerdos de ceba sacrificados procedentes del sector no especializado.

### Extracción de ácido desoxirribonucleico genómico

Se sometió a la extracción de ADN genómico solo las muestras de tejido de corazón y diafragma de los cerdos de ceba positivos al ELISA. El ADN genómico se extrajo de cada muestra de tejido utilizando el kit comercial QIAamp® Fast DNA Tissue (Qiagen®) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 25 mg de cada tejido con proteinasa K a 56 °C durante 10 min en un termomezclador. Las muestras de ADN se obtuvieron después de la purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice y se eluyeron en 100 µl de tampón de elución.

### Detección de ácido desoxirribonucleico

La detección de ADN de *T. gondii* en las muestras de ADN extraídas de tejidos de los cerdos de ceba se llevó a cabo mediante una amplificación por PCR convencional del marcador molecular elemento repetitivo 529-pb. <sup>(16)</sup> En resumen, la reacción de PCR se realizó en 25 µl utilizando ADN polimerasa HotStar Plus y un termociclador Bio-Rad T100. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 2 % en tampón TBE 0,5X, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta.

## Caracterización genética por reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción-multilocus anidado

Las cepas de *Toxoplasma gondii* detectadas fueron caracterizadas por Mn-PCR-RFLP método basado en la detección de 10 marcadores genéticos multilocus SAG1, SAG2 (3'-SAG2 y 5'-SAG2), SAG3, GRA6, C22-8, L358, BTUB, C29-2, PK1 y Apico. <sup>(17)</sup> Básicamente, la reacción de PCR múltiple se realizó en 50  $\mu$ L conteniendo 0,15  $\mu$ M de cada uno de los cebadores externos, 200  $\mu$ M de dNTPs (Eurogentec, Bélgica), 2 mM de  $MgCl_2$ , solución Q 1X, Buffer de PCR 1X, 1 unidad de polimerasa ADN HotStart Plus y 10  $\mu$ L de ADN de la muestra.

Como controles positivos fueron usados 2  $\mu$ L del ADN extraído de cepas RH (tipo I, toxoDB#10), Wil (tipo II, haplogrupo 2), y PRU (tipo II variante, ToxoDB#3). Agua libre de nucleasa fue usada como control negativo. Reacciones de PCR anidadas (nPCR) individuales posteriores fueron realizadas en 25  $\mu$ L conteniendo 0,3  $\mu$ M de cada par de cebadores internos correspondientes, 200  $\mu$ M de dNTPs; 2 mM de  $MgCl_2$ ; 1X de solución Q, 1X de Buffer de PCR, 1 unidad de polimerasa de ADN HotStart Plus y 4  $\mu$ L del producto de PCR múltiple obtenido previamente. Cada producto de nPCR positivo (7  $\mu$ L) fue digerido con endonucleasas de restricción en un volumen de 10  $\mu$ L, luego se analizaron en gel de agarosa al 3 % para revelar los patrones de banda de ADN. Los patrones de restricción de ADN obtenidos fueron comparados con los perfiles depositados en ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>).

## Caracterización genética por tipado multilocus de secuencias

Debido al interés en el genotipado basado en secuencias y con el objetivo de realizar análisis filogenéticos, los amplicones de los marcadores SAG1 y SAG3 se secuenciaron utilizando un secuenciador automático 3730XL de Applied Biosystems (ABI; Microsynth Seqlab, Maschmühlenweg). <sup>(18)</sup> Estas secuencias fueron curadas manualmente cuando fue necesario y se analizaron utilizando el software BioEdit, versión 7.0.5.3. <sup>(19)</sup> Las secuencias SAG1 y SAG3 también se concatenaron y alinearon utilizando el software MEGA X para generar un árbol filogenético y evaluar la estructura de la población de las cepas de *T. gondii* cubanas descritas aquí; se incluyeron cepas de referencia tipo I y II (RH, Tg51, Wil y PRU) para la comparación. <sup>(20)</sup> Por otro lado, las secuencias SAG3 generadas también se alinearon con secuencias similares disponibles originadas en América recuperadas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, siglas en inglés) a través de la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando MEGA X software. <sup>(20)</sup> La historia evolutiva se infirió mediante el método Neighbour-Joining y se llevó a

cabo en el software MEGA X. <sup>(21)</sup> El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas de cada árbol. <sup>(22)</sup> Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta. <sup>(23)</sup> Las secuencias obtenidas en el presente estudio han sido depositadas en GenBank (SAG3: OM836491-OM836494; SAG1: OM648096-OM648099).

## Análisis estadístico

La seroprevalencia individual contra *T. gondii* fue calculada como la razón de animales seropositivos entre el número total de animales examinados, usando un intervalo de confianza de 95 % binomial de 2 colas. Se usó un análisis de medias aplicado a proporciones (ANOM) específicamente en el sector especializado para identificar granjas de cría con valores de seroprevalencia dentro de la granja significativamente diferentes. El análisis fue realizado usando el paquete "ANOM" <sup>(24)</sup> del software estadístico R (R v. 3.5.2). Si diferencias estadísticamente significativas entre granjas eran encontradas por ANOM se creaba una variable *Dummy* ("Granja significativamente diferente" versus "otras granjas") que entonces era incluida en el análisis bivariante.

La determinación de factores de riesgo asociados a la seropositividad de *Toxoplasma gondii* se realizó únicamente en el sector especializado. Para realizar esta determinación se obtuvo información epidemiológica de cada animal muestreado que incluyó edad, sexo, granja (A-G), altitud, y tamaño de la granja. Para las reproductoras también fueron registrado datos tales como: crías por parto, paridad, cerdos destetados y mortinatos. Para determinar la asociación entre las variables independientes con respecto al estatus individual de *T. gondii* (variable dependiente) se realizaron pruebas bivariantes de chi cuadrado y exacta de Fisher. Las variables con valor de  $p < 0,20$  en el análisis bivariado fueron seleccionadas como factores de riesgo potenciales. La colinealidad entre variables se determinó con el coeficiente  $V$  de Cramer. Finalmente, se realizó una ecuación de estimación generalizada (GEE, siglas en inglés) para determinar el efecto de las variables seleccionadas sobre la base de las pruebas bivariantes y de colinealidad. <sup>(14)</sup>

En el sector no especializado solo se estimó la asociación entre los resultados serológicos y las variables independientes (sexo y municipio) mediante las pruebas chi cuadrado de Pearson o prueba exacta de Fisher, según correspondiera. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de  $p < 0,05$ . Además, las pruebas bivariantes recién mencionadas se emplearon para estimar asociación entre la variable explicativa "sector de producción" y la varia-

ble respuesta "seropositividad a *T. gondii*", considerando el sector de producción un factor de riesgo potencial si  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados usando el *software* SPSS v25.0 (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS

Se detectaron anticuerpos IgG anti-Toxoplasma gondii en (156 de 870) cerdos (17,9 %, IC 95 %: 15,4-20,5). Los valores de seroprevalencia individual de *T. gondii* en las granjas de crías (sector especializado) y en los cerdos ceba (sector no especializado) fueron del 13,3 % (56/420; IC 95%: 10,1-16,6) y 22,2 % (100/450; IC 95 %: 18,5-26,2) respectivamente. El análisis bivariente mostró diferencias significativas entre los valores de seroprevalencia de ambos sectores, así como que las granjas de cría constituyen un factor de protección potencial a la infección por *T. gondii* (OR = 0,539; IC 95 %: 0,376-0,771;  $p = 0,0006$ ).

Se encontró seropositividad en 6 de 7 (85,7 %) granjas de crías analizadas, y la seroprevalencia dentro de la granja osciló entre 5,0 % y 25,0 %, con la seroprevalencia más alta observada en cerdos de la granja B y los valores más bajos en cerdos de la granja D. Cabe destacar que no se detectaron anticuerpos contra *T. gondii* en cerdos procedentes de la granja C (ver figura 1). El análisis ANOM mostró una seroprevalencia significativamente más baja en la granja C, que fue negativa a la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, en relación a la media general de las otras granjas analizadas (figura 3).

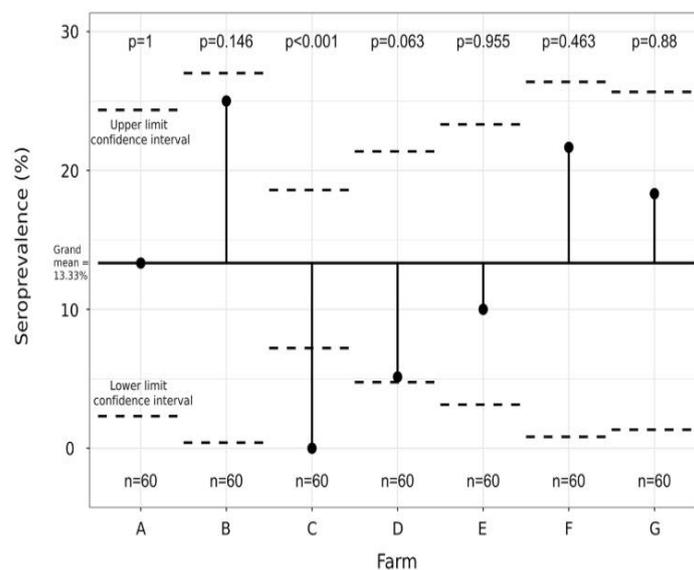
No se encontró asociación entre la seropositividad a *T. gondii* y las variables independientes sexo, cerdos desteta-

dos, y mortinatos en el análisis bivariente. Se seleccionaron para el análisis multivariente las variables independientes granja, altitud, tamaño de la granja, edad, crías por parto y número de partos. El modelo GEE final mostró que los principales factores de riesgo asociados con la seropositividad de *T. gondii* en cerdos del sector especializado en la provincia de Villa Clara, Cuba, fueron la altitud y la edad. La seroprevalencia de anticuerpos de *T. gondii* fue significativamente más alta en las granjas localizadas a menor que 250 m snm (19,6 %; IC 96 %: 14,6-24,6) comparada con las granjas localizadas a una altitud mayor e igual que 250 m snm (5,0 %; IC 95 %: 1,8-8,2) (OR = 5,28;  $p = 0,001$ ; IC 95 %: 1,91-14,57). También se observó una seropositividad significativamente más elevada en reproductoras (21,9 %; IC 95%: 16,3–27,5) comparada con cerdos postdestete (4,8 %; IC 95 %: 1,8-7,6) (OR = 6,05;  $p < 0,001$ ; IC 95 %: 2,53-14,60).

En el sector no especializado se detectaron cerdos de ceba positivos al ELISA en todos los municipios muestreados, y la seroprevalencia dentro del municipio osciló entre 13,6 % y 36,8 %. (ver figura 2). No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre la seroprevalencia y las variables sexo ( $p = 0,545$ ) y municipio ( $p = 0,572$ ).

Se detectó ADN de Toxoplasma gondii en muestras de corazón de 4 de los 100 cerdos de ceba positivos al ELISA (4 %; cerdos 77, 97, 129 y 143) mediante PCR convencional. También se encontró ADN de *T. gondii* en diafragma del cerdo 97 (1 %).

Solo las 4 muestras positivas de ADN de *T. gondii* extraídas de corazón se pudieron caracterizar con éxito para al menos 5 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, c22-8



**Fig. 3.** Resultados del análisis de medias (ANOM) comparando los valores de seroprevalencia de las granjas de cría muestreadas

y L358); la muestra del cerdo 77 también pudo genotiparse para el marcador GRA6. La caracterización genética por Mn-PCR-RFLP reveló 4 perfiles genéticos diferentes que eran combinaciones de alelos tipo I, II, III y u-1. Se demostró que los cerdos 97 y 129 estaban infectados por genotipos potencialmente atípicos no descritos, los otros 2 animales PCR positivos resultaron en combinaciones de alelos que podrían estar relacionadas con ToxoDB #138 (cerdo 143) u otros genotipos recombinantes (cerdo 77) (tabla 1).

En cuanto a los resultados de la secuenciación los datos obtenidos respaldaron un cierto grado de heterogeneidad dentro de la población de *T. gondii* que infecta a los cerdos en Cuba. La concatenación de los marcadores SAG1+SAG3 (figura 4A) nos permitió observar cómo las muestras de cerdos cubanos se dividían en 2 ramas; la muestra 129 se agrupó claramente con la cepa RH, de acuerdo con su perfil RFLP tipo I, mientras que las muestras 77; 97 y 143 se agruparon condicionadas por el alelo u-1 presente en el marcador SAG1. Por otro lado, los polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP, siglas en inglés) detectados G1593T, G1594A y A1614G permitieron la discriminación en una rama separada de la muestra 143. Los SNP G1593T y G1594A provocan un cambio de aminoácido de glicina a tirosina, mientras que A1614G provoca un cambio de serina a glicina.

Los análisis filogenéticos basados en secuencias de marcadores SAG3 obtenidas aquí, además de las recuperadas de NCBI relacionadas con cepas originadas en América (territo-

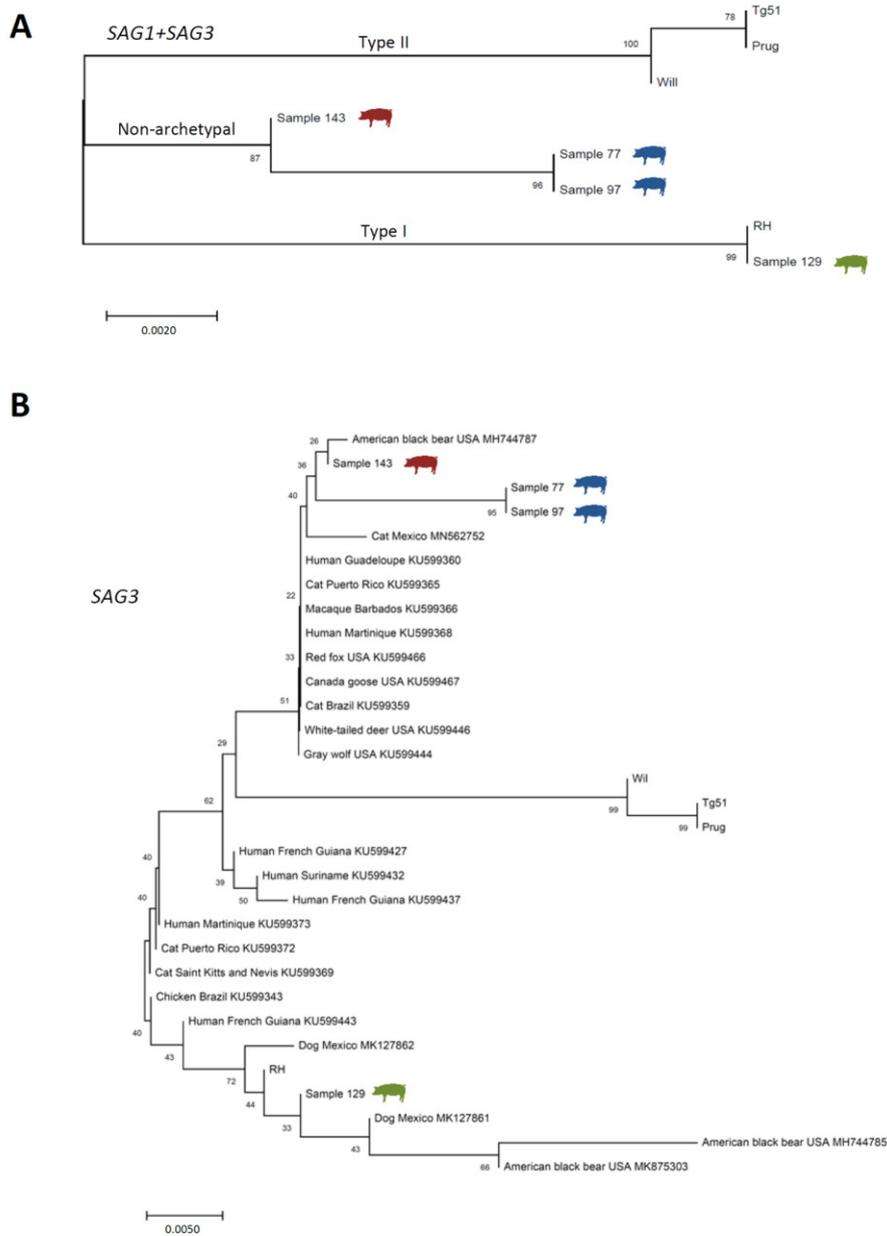
rios de América del Norte, Central y del Sur) se muestran en la figura 4B. El árbol mostró una clara agrupación de muestras de cerdos 77 (número de acceso de GenBank: OM836491) y 97 (OM836492). La muestra del animal 143 (OM836494) mostró 100 % de homología con el aislado MH744787 del oso negro americano (*Ursus americanus*), entre otros. Finalmente, la muestra del cerdo 129 (OM836493) se agrupó con cepas relacionadas con el tipo I. Además, esta muestra se agrupó cerca de las secuencias MK127861, MH744785 y MK875303 de aislados recombinantes que se identificaron como variantes atípicas en la región SAG3.

## DISCUSIÓN

La importancia de *T. gondii* en salud pública asociada al consumo de carne de animales de granja contaminada con quistes tisulares de este protozoo pone de manifiesto la necesidad de realizar investigaciones epidemiológicas en animales destinados al consumo humano. En este sentido, el consumo de carne de cerdo cruda o semicocida es considerado como una de las principales fuentes de infección de *T. gondii* en los seres humanos en muchos países. <sup>(5)</sup> El presente trabajo supone el primer reporte de factores de riesgo asociados a la seropositividad de *T. gondii* en cerdos domésticos procedentes del sector especializado en Cuba; la primera encuesta serológica sobre *T. gondii* conducida en cerdos de ceba destinados al consumo humano (sector no especializado) y el primer estudio de caracterización

**Tabla 1.** Genotipificación Mn-PCR-RFLP del ADN de *Toxoplasma gondii* de cerdos de ceba destinados al consumo humano en Cuba

Cerdo ID	Municipio	SAG1	3'-5'SAG2	SAG3	GRA6	C22-8	L358	Interpretación de genotipos en ToxoDB
77	Placetas	u-1	II	III	II	II	II	6 marcadores se relacionan con ToxoDB # 9, # 20, # 137
97	Placetas	u-1	III	III	na	II	II	No se relacionan (genotipo potencialmente no descrito)
129	Quemado de Güines	I	III	I	na	II	II	No se relacionan (genotipo potencialmente no descrito)
143	Quemado de Güines	u-1	III	III	na	III	III	5 marcadores se relacionan con ToxoDB # 138



**Fig. 4.** Posicionamiento filogenético de las variantes genéticas de *Toxoplasma gondii* detectadas en cerdos domésticos de Cuba con base en A) secuencias SAG1+SAG3 concatenadas generadas en este estudio, y B) secuencias SAG3 de cerdos cubanos junto con secuencias similares disponibles originadas en América (territorios de América del Norte, Central y del Sur) extraídas de la base de datos del NCBI. La historia evolutiva se infirió mediante el método Neighbour-Joining. <sup>(21)</sup> El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas de cada árbol. <sup>(22)</sup> Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta. <sup>(23)</sup>

genética de este parásito en este país. En el presente trabajo proporcionamos información epidemiológica sobre *T. gondii* en cerdos domésticos de granjas de cría y ceba de la provincia de Villa Clara, Cuba.

La seroprevalencia general obtenida (17,9 %) es similar a la reportada globalmente (19 %).<sup>(25)</sup> Se observaron diferencias

estadísticas significativas entre los valores de seroprevalencia individual detectada en cerdos domésticos de granjas de cría (13,3 %) versus cerdos de ceba sacrificados (22,2 %). Estos resultados indican una prevalencia de infección de *T. gondii* moderada en cerdos domésticos en Villa Clara. Las diferencias encontradas entre los valores de seroprevalencia pueden expli-

carse por el mayor estándar de bioseguridad de las granjas de cría (sector especializado) comparado con las granjas de ceba (sector no especializado). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dubey et al., quienes plantean que la seroprevalencia de *T. gondii* varía significativamente entre las clases de cerdos encuestados (cerdos de ceba versus reproductoras, cerdos criados en confinamiento con excelentes estándares de bioseguridad versus cerdos criados en libertad u orgánicos).<sup>(5)</sup>

En nuestro trabajo pudimos confirmar que la seroprevalencia individual detectada en cerdos criados en granjas de cría de la provincia Villa Clara (13,3 %) es de similar magnitud que la encontrada previamente en Cuba (14 %), y en otros países latinoamericanos como Brasil (13 %), Colombia (15 %), y México (13 %-17 %). (8,26,27,28,29) Sin embargo, los valores medios de seroprevalencia fueron superiores en cerdos domésticos criados en traspatio y en extensivo en Argentina (48 %), Brasil (33 %-52 %), Costa Rica (44 %), Hawái (49 %), México (45 %-97 %), Panamá (32 %) y Perú (30 %).<sup>(5,25)</sup>

Se detectó al menos un cerdo seropositivo en 6 de las 7 granjas de cría analizadas (85,7 %), con valores de seroprevalencia dentro de la granja que oscilaron entre 5,0 % y 25,0 %. Aunque una de las granjas estudiadas fue negativa a la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, el número de muestras recogidas en cada granja se calculó asumiendo una prevalencia mínima dentro de cada granja del 6 % y, por tanto, no se puede descartar la posibilidad de que esa granja en particular tuviera una seroprevalencia inferior al 5 %. Los resultados indicaron que la infección por *T. gondii* está muy extendida entre las granjas porcinas de cría de Villa Clara. Dado que todas las granjas muestreadas se manejan bajo un sistema de producción similar, las características ambientales pueden explicar las diferencias entre las seroprevalencias en cerdos dentro de la región de estudio. Al respecto, las granjas ubicadas a menor que 250 m snm mostraron una seropositividad significativamente mayor en comparación con las criadas a mayor altitud. Nuestros resultados concuerdan con los informados por Villari et al., quienes consideraron la mayor altitud (mayor que 200 m snm) de las granjas como un factor protector ante la exposición a *T. gondii*; esta observación probablemente esté asociada a una viabilidad ambiental reducida de los ooquistes con la disminución de la temperatura ambiente y, quizás, también de la humedad.<sup>(30)</sup> También se encontraron niveles de seroprevalencia más altos en jabalíes (*Sus scrofa*) muestreados en cotos de caza ubicados a menor que 600 m snm en comparación con los muestreados a mayor altitud.<sup>(31)</sup> En contraste, otros estudios observaron una mayor seropositividad a *T. gondii* en cerdos criados en regiones montañosas.<sup>(28,32)</sup> La razón de estas diferencias no están claras; sin embargo, las condiciones ambientales y climáticas pueden afectar la supervivencia de los

ooquistes en el suelo, los alimentos y el agua contaminados con heces felinas, que son las fuentes probables de infección para los cerdos.<sup>(33)</sup> En este sentido, consideramos que se necesitan más estudios para abordar este problema.

Estudios previos han demostrado que el análisis serológico de *T. gondii* mediante ELISA es un buen método para la vigilancia del parásito en cerdos.<sup>(34,35)</sup> En el presente estudio, solo 4 (4,0 %) de los 100 cerdos de ceba positivos al ELISA fueron positivos mediante PCR. Este hallazgo concuerda con los observados por Hill et al., quienes reportaron diferencias entre las sensibilidades de las técnicas de diagnóstico en el análisis de la infección por *T. gondii* en muestras de cerdos experimental y naturalmente infectados. Además, este hecho podría estar asociado a la distribución aleatoria de los quistes tisulares, el volumen limitado de muestra analizada, y la baja carga parasitaria habitual observada en los tejidos de animales crónicamente infectados.<sup>(34)</sup> Es de destacar que el ADN de *T. gondii* se detectó con más frecuencia en el corazón que en el diafragma. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Gisbert Algaba et al., y Vergara et al., quienes señalan al corazón como órgano diana para la detección de la infección por *T. gondii* en cerdos.<sup>(36,37)</sup>

La caracterización molecular es crucial ya que el genotipo puede determinar la presentación y severidad de la toxoplasmosis.<sup>(38)</sup> Aquí, caracterizamos molecularmente por primera vez las cepas de *T. gondii* que circulan en los cerdos de ceba destinados al consumo humano en Villa Clara, Cuba. Los resultados preliminares sugieren la existencia de una elevada diversidad genética de *T. gondii* en cerdos sacrificados en Villa Clara (tabla 1; figura 4). Las 4 muestras caracterizadas presentaron perfiles genéticos relacionados con genotipos no canónicos. Hasta la fecha, numerosos estudios han confirmado la alta diversidad genética y genotípica entre las cepas de *T. gondii* que circulan en Centro y Sur América, cuya estructura poblacional ha demostrado no ser homogénea en este subcontinente.<sup>(38,39)</sup>

Los datos moleculares sobre *T. gondii* en Centroamérica y los territorios del Caribe aún son escasos. Estudios previos mostraron que el genotipo clonal tipo III (ToxoDB#2) es común y está generalizado en esta región. Asimismo, este genotipo se ha identificado en diferentes huéspedes domésticos, incluidos perros, gatos y pollos, pero no se observó en el presente estudio.<sup>(12,39,40,41)</sup> Desde nuestro conocimiento, los únicos estudios realizados en cerdos en el área del Caribe se llevaron a cabo en San Cristóbal y Nieves.<sup>(42)</sup> Los autores caracterizaron cepas de *T. gondii* mediante Mn-PCR-RFLP utilizando 4 marcadores moleculares (SAG2, SAG3, BTUB y GRA6) en muestras de tejido, y los patrones resultantes sugirieron la presencia de genotipos clonales tipo I (ToxoDB#10)

y tipo III (ToxoDB#2). La compilación mundial de datos PCR-RFLP identificó ciertos patrones geográficos, pero aún existen muchas brechas en el área del Caribe. <sup>(43)</sup> El análisis mediante herramientas de tipificación de microsatélites podría ayudar en este análisis, ya que se espera una notoria divergencia de los organismos del Caribe en comparación con otros aislamientos/datos europeos o estadounidenses. <sup>(44)</sup>

En cuanto a los resultados de la secuenciación los datos obtenidos sugieren un alto grado de heterogeneidad de la población de *T. gondii* que infecta a los cerdos sacrificados en Cuba. Nuestros resultados proporcionaron evidencia adicional de una rica diversidad genética de *T. gondii* en el área del Caribe. A pesar de su corta longitud, SAG3 se considera un marcador adecuado para análisis filogenéticos. <sup>(18,45)</sup> En la figura 4B, teniendo en cuenta las secuencias SAG3 disponibles en NCBI procedentes de ganado, animales salvajes y humanos en las Américas, se muestra un grupo claro formado por las muestras de 2 de los animales PCR positivos detectados en el presente trabajo (cerdos 77 y 97, ambos se originaron en el mismo municipio), apoyando la hipótesis de una nueva variante genética, presumiblemente un nuevo genotipo que infecta a los cerdos en Cuba. Por otro lado, la muestra del cerdo 143 mostró un 100 % de homología con el aislado MH744787 del oso negro americano (*Ursus americanus*). Las cepas de referencia de agrupamiento de ramas específicas Wil, Tg51 y PRU demostraron la baja ocurrencia de cepas relacionadas con el tipo II en general en las Américas a diferencia de Europa y específicamente en el área de estudio. <sup>(46)</sup> Además, la muestra del animal 129 se agrupó junto con las cepas relacionadas con el tipo I y, por lo tanto, podrían ser presumiblemente un aislado virulento en ratón.

Cada vez hay más pruebas de que algunas cepas atípicas están vinculadas a una mayor probabilidad de toxoplasmosis congénita y ocular, así como a casos raros y graves de toxoplasmosis diseminada aguda en individuos inmunocompetentes. <sup>(38)</sup> En Cuba, desafortunadamente, ningún estudio ha relacionado casos clínicos de toxoplasmosis en humanos con genotipos específicos de *T. gondii*. Sin embargo, planteamos la hipótesis de que la circulación de genotipos atípicos en cerdos domésticos podría explicar la alta incidencia de toxoplasmosis ocular en este país. Al respecto, Bustillo et al., reportaron una tasa de incidencia de toxoplasmosis ocular activa de 58,5 por cada 100 000 habitantes en la vecina provincia de Sancti Spiritus, la tasa de incidencia más alta reportada hasta la fecha en una región tropical de alto riesgo. <sup>(9)</sup> Con base en nuestros resultados, se requieren más estudios moleculares para analizar la población genética de *T. gondii* en cerdos y humanos en Cuba y tratar de desentrañar las interrogantes que aquí han surgido: 1) ¿Hay presencia de tipos canónicos en Cuba, y en qué proporción? 2) ¿Están

circulando nuevos genotipos de *T. gondii* en cerdos en Cuba?, y finalmente, 3) ¿Qué tan divergente es la estructura poblacional de *T. gondii* de Cuba en comparación con otros territorios del Caribe y Centroamérica? Las preguntas anteriores abren una vía importante para formular hipótesis sobre si las cepas no canónicas observadas muestran fenotipos virulentos y en qué medida pueden representar un riesgo para los seres humanos.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos brindan una primera aproximación a los factores de riesgo asociados con la exposición a *T. gondii* en cerdos domésticos criados en granjas de cría en un país donde no había información reciente en esta especie animal. La seropositividad observada indica que este parásito zoonótico está muy extendido en las granjas de cría de cerdos en la provincia de Villa Clara, Cuba. Este hallazgo indica un problema de salud pública porque los cerdos seropositivos pueden albergar quistes tisulares en sus carnes, lo que representa un riesgo zoonótico para los consumidores de carne porcina o sus productos crudos o poco cocidos. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte sobre caracterización genética de *T. gondii* en este país. Los resultados sugieren una alta diversidad genética de *T. gondii* en esta región. Se deben realizar más estudios basados en el aislamiento del parásito para tener una identificación completa de los genotipos circulantes, así como para caracterizar la virulencia de las cepas detectadas en cerdos en Cuba, y de esa manera evaluar el riesgo de transmisión zoonótica de los productos cárnicos porcinos en este país.

El presente estudio contribuye al conocimiento de la epidemiología de *T. gondii* en el ganado porcino manejado en intensivo en Cuba. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de establecer programas de vigilancia a escala nacional que permitan esclarecer la situación epidemiológica de la toxoplasmosis en Cuba, y de esta manera desarrollar programas de lucha frente a este protozoo en el eslabón primario de la cadena alimentaria.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dubey JP. Toxoplasmosis of Animals and Humans [Internet]. Third. CRC Press, editor. Boca Raton: CRC Press; 2022. 564 p. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781003199373>
2. McLeod R, Cohen W, Dovgin S, Finkelstein L, Boyer KM. Human *Toxoplasma* infection. In: Weiss LM, Kim K, editors. *Toxoplasma gondii* [Internet]. third. Elsevier; 2020. 117-227 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00004-9>
3. Milne G, Webster JP, Walker M. *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? Trends Parasitol [Internet]. 2020 Dic;36(12):959-69. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.005>
4. Belluco S, Patuzzi I, Ricci A. Bovine meat versus pork in *Toxoplasma gondii* transmission in Italy: A quantitative risk assessment

- model. Int J Food Microbiol [Internet]. 2018 Mar;269:1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.026>
5. Dubey JP, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA, Kwok OCH, Hill D, Yang Y, *et al.* All about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: 2009-2020. Vet Parasitol [Internet]. 2020 Dec;288:109-85. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401720301655>
  6. ONEI. Anuario Estadístico de la Provincia de Villa Clara [Internet]. Viila Clara; 2017. Disponible en: <http://www.onei.gob.cu/mapa/provincia/villa-clara>
  7. Castillo-Cuenca JC, Martínez-Moreno Á, Díaz-Cao JM, Entrena-García A, Fraga J, Arias P, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba. Parasitol Res [Internet]. 2021 Aug 27;120(8):2897-903. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-021-07245-1>
  8. Suárez-Hernández M, González-Fernández A, Gardón-Quirola BY, Martínez-Sánchez R. Infección y enfermedad por *Toxoplasma gondii* en animales y humanos en 23 años de observación en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. Rev Biomed [Internet]. 2005;16(1):21-7. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=7396>
  9. Bustillo JL, Díaz JD, Pacheco IC, Gritz DC. Cuban ocular toxoplasmosis epidemiology study (COTES): Incidence and prevalence of ocular toxoplasmosis in Central Cuba. Br J Ophthalmol [Internet]. 2015;99(3):382-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305843>
  10. Ginorio Gavito DE, Vilches Lescaille D, Gracial X, Cox Iraola R, Casanova P, Núñez FA, *et al.* Toxoplasmosis ocular: Algunos hallazgos clínicos y seroepidemiológicos. Rev An la Acad Ciencias Cuba [Internet]. 2017;7(3):4-13. Disponible en: <http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/352/352>
  11. Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, *et al.* Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. Nat Commun [Internet]. 2016 Apr 7;7(1):10147. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/ncomms10147>
  12. Dubey JP, Verma SK, Villena I, Aubert D, Geers R, Su C, *et al.* Toxoplasmosis in the Caribbean islands: literature review, seroprevalence in pregnant women in ten countries, isolation of viable *Toxoplasma gondii* from dogs from St. Kitts, West Indies with report of new *T. gondii* genetic types. Parasitol Res [Internet]. 2016 Apr 14;115(4):1627-34. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4900-6>
  13. Amador Morán R, Coutos Ramos MJ, Peña Cedeño A, Alonso Uría RM, Pupo Portal L, Gómez Suárez HJ. Presentación de un caso con toxoplasmosis congénita. Rev Cuba Obstet y Ginecol [Internet]. 2016;42(1). Disponible en: <http://revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/47/31>
  14. Thrusfield M, Christley R, Brown H, Diggle PJ, French N, Howe K, *et al.* Veterinary Epidemiology. Fourth. Thrusfield M, Christley R, Brown H, Diggle PJ, French N, Howe K, *et al.*, editors. Oxford: John Wiley & Sons; 2018. 1-887 p.
  15. Castillo-Cuenca JC, Díaz-Cao JM, Martínez-Moreno Á, Cano-Terriza D, Jiménez-Ruiz S, Almería S, *et al.* Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain. Prev Vet Med [Internet]. 2020 feb;175(febrero 2020):104-854. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104854>
  16. Homan W, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR1Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to GenBankTM database with the accession nu. Int J Parasitol [Internet]. 2000 Jan 1 [citado 2021 oct 8];30(1):69-75. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751999001708>
  17. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology [Internet]. 2010 Jan 21;137(1):1-11. Disponible en: [https://www.cambridge.org/core/product/identfier/S0031182009991065/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identfier/S0031182009991065/type/journal_article)
  18. Fernández-Escobar M, Calero-Bernal R, Benavides J, Regidor-Cerrillo J, Guerrero-Molina MC, Gutiérrez-Expósito D, *et al.* Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Spanish sheep flocks. Parasit Vectors [Internet]. 2020 dic 5;13(1):396. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04275-z>
  19. Hall TA. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. Nucleic Acids Symp. 1999;41:95-8.
  20. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, editor. Mol Biol Evol [Internet]. 2018 jun 1;35(6):1547-9. Disponible en: <https://academic.oup.com/mbe/article/35/6/1547/4990887>
  21. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol [Internet]. 1987 Jul;4(4):406-25. Disponible en: <https://academic.oup.com/mbe/article/4/4/406/1029664>
  22. Felsenstein J. Confidence limits on Phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution (N Y) [Internet]. 1985 Jul 31;39(4):783-91. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
  23. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2004 Jul 27;101(30):11030-5. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0404206101>
  24. Pallmann P, Hothorn LA. Analysis of means: a generalized approach using R. J Appl Stat [Internet]. 2016 Jun 10;43(8):1541-60. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02664763.2015.1117584>
  25. Foroutan M, Fakhri Y, Riahi SM, Ebrahimpour S, Namroodi S, Taghipour A, *et al.* The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: A systematic review and meta-analysis. Vet Parasitol [Internet]. 2019 May;269:42-52. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.012>
  26. Feitosa TF, Vilela VLR, Bezerra de Melo LR, de Almeida Neto JL, de Oliveira Souto DV, de Moraes DF, *et al.* *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. Vet Parasitol [Internet]. 2014 May;202(3-4):305-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.015>
  27. Cañón-Franco W, López-Orozco N, Gómez-Marín J, Dubey JP. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. Parasit Vectors [Internet]. 2014;7(1):427. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-427>

28. Alvarado-Esquivel C, Estrada-Malacón M, Reyes-Hernández SO, Pérez-Ramírez J, Trujillo-López JI, Villena I, *et al*. High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *J Parasitol* [Internet]. 2012;98(6):1248-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1645/GE-3184.1>
29. Alvarado-Esquivel C, Vazquez-Morales R, Colado-Romero E, Guzmán-Sánchez R, Liesenfeld O, Dubey J. Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in landrace and mixed breed pigs slaughtered in Baja California Sur State, Mexico. *Eur J Microbiol Immunol*. 2015;5(1):112-5.
30. Villari S, Vesco G, Petersen E, Crispo A, Buffolano W. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009 Apr;161(1-2):1-8. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S03044401709000302>
31. Calero-Bernal R, Pérez-Martín JE, Reina D, Serrano FJ, Frontera E, Fuentes I, *et al*. Detection of Zoonotic Protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suis hominis* in Wild Boars from Spain. *Zoonoses Public Health* [Internet]. 2016 Aug;63(5):346-50. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/zph.12243>
32. Papatsiros VG, Athanasiou L V, Stougiou D, Papadopoulos E, Margkakis GG, Katsoulos PD, *et al*. Cross-sectional serosurvey and risk factors associated with the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2016;16(1):48-53. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2015.1845>
33. Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D, Cabezón O, Ruiz-Fons F, Vicente J, *et al*. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. *Vet Parasitol* [Internet]. 2006 Mar;136(3-4):193-200. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.013>
34. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP, Lunney JK, Gamble HR. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Vet Parasitol*. 2006;141(1-2):9-17.
35. García JL, Gennari SM, Navarro IT, Machado RZ, Headley SA, Vidotto O, *et al*. Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Res Vet Sci* [Internet]. 2008 Apr;84(2):237-42. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528807001257>
36. Gisbert Algaba I, Verhaegen B, Jennes M, Rahman M, Coucke W, Cox E, *et al*. Pork as a source of transmission of *Toxoplasma gondii* to humans: a parasite burden study in pig tissues after infection with different strains of *Toxoplasma gondii* as a function of time and different parasite stages. *Int J Parasitol* [Internet]. 2018 Jun;48(7):555-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.12.009>
37. Vergara A, Marangi M, Caradonna T, Pennisi L, Paludi D, Papini R, *et al*. *Toxoplasma gondii* Lineages Circulating in Slaughtered Industrial Pigs and Potential Risk for Consumers. *J Food Prot* [Internet]. 2018 Aug 1;81(8):1373-8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0362028X22086604>
38. Dardé M-L, Mercier A, Su C, Khan A, Grigg ME. Molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii* [Internet]. Elsevier; 2020. 63-116 p. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128150412000037>
39. Rajendran C, Su C, Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):359-68.
40. Chikweto A, Sharma RN, Tiwari KP, Verma SK, Calero-Bernal R, Jiang T, *et al*. Isolation and RFLP Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens (*Gallus domesticus*) in Grenada, West Indies, Revealed Widespread and Dominance of Clonal Type III Parasites. *J Parasitol* [Internet]. 2017 Feb 1 [citado 2022 feb 16];103(1):52-5. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/10.1645/15-945>
41. Dubey JP, Moura L, Majumdar D, Sundar N, Velmurugan G V, Kwok OCH, *et al*. Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. *Parasitology* [Internet]. 2009 May 30;136(6):589-94. Disponible en: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182009006015/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182009006015/type/journal_article)
42. Hamilton CM, Kelly PJ, Bartley PM, Burrells A, Porco A, Metzler D, *et al*. *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 Dec 18 [citado 2022 feb 16];8(1):166. Disponible en: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0776-7>
43. Shwab EK, Zhu X-Q, Majumdar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, *et al*. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* [Internet]. 2014 abr 5;141(4):453-61. Disponible en: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182013001844](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182013001844)
44. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2006 Jul 25;103(30):11423-8. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601438103>
45. Bertranpetit E, Jombart T, Paradis E, Pena H, Dubey J, Su C, *et al*. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2017;48:150-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.020>
46. Fernández-Escobar M, Schares G, Maksimov P, Joeres M, Ortega-Mora LM, Calero-Bernal R. *Toxoplasma gondii* Genotyping: A Closer Look Into Europe. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2022 Mar 23;12(March):1-15. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.842595/full>

---

Recibido: 31/10/2024

Aprobado: 15/11/2024

---

#### Agradecimientos

Queremos agradecer a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP) y la Junta de Andalucía, España por financiar la formación doctoral del primer autor de esta investigación.

#### Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses contrapuestos.

#### Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Julio César Castillo Cuenca, Ángel Entrena García, Jorge Fraga Nodarse, Álvaro Martínez Moreno, Ignacio García Bocanegra
- Curación de datos: Julio César Castillo Cuenca, Ignacio García

Bocanegra, Jorge Fraga Nodarse, Sonia Almería de la Merced, José Manuel Díaz Cao, Rafael Calero Bernal, Mercedes Fernández-Escobar

- Análisis formal: Julio César Castillo Cuenca, Álvaro Martínez Moreno, Ignacio García Bocanegra, Sonia Almería de la Merced, Jorge Fraga Nodarse, Pedro Casanova Arias, Ángel Entrena García, Rafael Calero Bernal, Mercedes Fernández-Escobar, José Manuel Díaz Cao
- Adquisición de fondos: Jorge Fraga Nodarse, Álvaro Martínez Moreno
- Investigación: Julio César Castillo Cuenca
- Metodología: Julio César Castillo Cuenca, Jorge Fraga Nodarse, Álvaro Martínez Moreno, Ignacio García Bocanegra
- Administración del Proyecto: Julio César Castillo Cuenca
- Recursos: Álvaro Martínez Moreno, Jorge Fraga Nodarse
- Software: Ignacio García Bocanegra, Rafael Calero Bernal, Mercedes Fernández-Escobar, José Manuel Díaz Cao
- Supervisión: Álvaro Martínez Moreno, Ignacio García Bocanegra, Jorge Fraga Nodarse, Ángel Entrena García
- Validación: Álvaro Martínez Moreno, Ignacio García Bocanegra, Sonia Almería de la Merced, Jorge Fraga Nodarse, Pedro Casanova Arias, Ángel Entrena García, Rafael Calero Bernal, Mercedes Fernández-Escobar, José Manuel Díaz Cao
- Visualización: Julio César Castillo Cuenca, Ignacio García Bocanegra; José Manuel Díaz Cao; Sonia Almería de la Merced, Rafael Calero Bernal, Mercedes Fernández Escobar

- Redacción-borrador original: Julio César Castillo Cuenca
- Redacción-Revisión y Edición: Julio César Castillo Cuenca, Álvaro Martínez Moreno, Ignacio García Bocanegra, Sonia Almería de la Merced, Jorge Fraga Nodarse, Pedro Casanova Arias, Ángel Entrena García, Rafael Calero Bernal, Mercedes Fernández-Escobar, José Manuel Díaz Cao

#### Financiamientos

Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP) y Junta de Andalucía

#### Cómo citar este artículo

Castillo-Cuenca JC, Martínez-Moreno A, Fraga Nodarse J, Almería de la Merced S, Entrena-García A, Casanova Arias P, et al. Seroprevalencia, factores de riesgo y caracterización genética de *Toxoplasma gondii* en cerdos domésticos en Villa Clara, Cuba. An Acad Cienc Cuba [internet] 2024 [citado en día, mes y año];14(3):e2791. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/2791>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2024.

