



TESIS DOCTORAL

“*Toxoplasma gondii* en cerdos domésticos: estudios epidemiológicos comparados en España y Cuba”

“*Toxoplasma gondii* in domestic pigs: comparative epidemiological study in Spain and Cuba”

MEMORIA PRESENTADA POR: Julio César Castillo-Cuenca

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

Programa de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

DIRECTORES:

Dr. Álvaro Martínez Moreno

Dr. Ignacio García-Bocanegra

Córdoba, Noviembre 2022

TITULO: *Toxoplasma gondii* en cerdos domésticos: estudios epidemiológicos comparados en España y Cuba

AUTOR: *Julio Cesar Castillo-Cuenca*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



**TÍTULO DE LA TESIS: *TOXOPLASMA GONDII* EN CERDOS DOMÉSTICOS:
ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS COMPARADOS EN ESPAÑA Y CUBA**

DOCTORANDO: Julio César Castillo Cuenca

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis Doctoral titulada *Toxoplasma gondii* en cerdos domésticos: estudios epidemiológicos comparados en España y Cuba que ha realizado el doctorando D. Julio César Castillo Cuenca dio comienzo en el curso académico 2016/2017. El objetivo general de esta Tesis es incrementar el conocimiento sobre la epidemiología de *Toxoplasma gondii* en el ganado porcino criado en diferentes sistemas de producción en España y Cuba. Para la consecución de este objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos específicos: 1) Determinar la seroprevalencia, factores de riesgo, y distribución espacial de *Toxoplasma gondii* en rebaños de cerdos ibéricos criados en extensivo en España. 2) Determinar la seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por *T. gondii* en cerdos domésticos de la provincia de Villa Clara, Cuba. 3) Caracterizar genéticamente las cepas de *T. gondii* que infectan a cerdos domésticos destinados al consumo humano en la provincia de Villa Clara, Cuba.

El desarrollo de esta Tesis ha permitido la elaboración de tres trabajos de investigación (uno en España y dos en Cuba) que han sido publicados en revistas en JCR, y posibilitan la presentación de la presente Tesis en formato de compendio por artículos (Art. 24. Tesis como compendio de publicaciones, Propuesta por la Comisión de Másteres y Doctorado de 14 de diciembre de 2011 y aprobada por Consejo de Gobierno de 21 de diciembre de 2011 de la Universidad de Córdoba):

Castillo-Cuenca, J. C., Díaz-Cao, J. M., Martínez-Moreno, Á., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Almería, S., García-Bocanegra, I. (2020). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain. *Preventive Veterinary*

Medicine, 175, pp. 104–854. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104854>.
Factor de impacto (JCR 2020): 2,933. Posición de la revista (Categoría): Q1 (27/146)
(Veterinary Sciences).

Castillo-Cuenca, J. C., Martínez-Moreno, Á., Diaz-Cao, J. M., Entrena-García, A., Fraga, J., Arias, P., Almería, S García-Bocanegra, I. (2021). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba. *Parasitology Research*, 120(8), pp. 2897–2903. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07245-1>. Factor de impacto (JCR 2021): 2,403. Posición de la revista (Categoría): Q2 (19/38) (Parasitology).

Castillo-Cuenca, J. C., Almería, S., Calero-Bernal, R., Fernández-Escobar, M., Fraga, J., Entrena-García, A., Arias, P., Martínez-Moreno, Á., García-Bocanegra, I. (2022) ‘Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs intended for human consumption in Cuba’, *Zoonoses and Public Health* (Aceptado). DOI: 10.1111/zph.13010. Factor de impacto (JCR 2022): 2,904. Posición de la revista (Categoría): Q1 (19/145) (Veterinary Sciences).

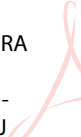
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 10 de noviembre de 2022

Firma de los directores


Firmado digitalmente por
MARTINEZ MORENO
ALVARO - 30484909L
Fecha: 2022.11.11
08:36:31 +01'00'

Fdo.: Álvaro Martínez Moreno

GARCIA
BOCANEGRA
IGNACIO
ANTONIO -
74930057J

Firmado digitalmente
por GARCIA
BOCANEGRA IGNACIO
ANTONIO - 74930057J
Fecha: 2022.11.10
20:30:13 +01'00'

Fdo.: Ignacio García Bocanegra

DEDICATORIA

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar esta tesis para optar al título de doctor en la Universidad de Córdoba, España, a mi amada familia. Sin su amabilidad, generosidad, ánimos, paciencia, y comprensión no hubiera sido posible emprender tan ardua y laboriosa empresa.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer (1) a la Asociación Universitaria de Posgrado y a la Junta de Andalucía por contribuir con sus fondos a mi formación científica; (2) a mis compañeros de trabajo en la Dirección de Relaciones Internacionales de la Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas por su colaboración, paciencia, tolerancia y comprensión durante la realización de tan arduo y laborioso trabajo; (3) a los epizootiólogos de la Empresa Porcina y a la Dirección del Departamento de Sanidad Animal de la provincia de Villa Clara por autorizar la realización del muestreo que formó parte de los últimos dos estudios de este proyecto de tesis doctoral. Cuyos estudios fueron realizados en Cuba; (4) a Lilibeth Acosta Trelles, Jessica Rodríguez Reinoso, Yoan Cruz Alvarez, e Isbel Rodríguez Seijo la ayuda brindada durante el muestreo en el Matadero Porcino de Salamina, sin cuya colaboración no hubiera sido posible el muestreo; (5) tanto al personal del Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) como al del Departamento de Calidad de Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) por haberme acogido en su seno como miembro del equipo de sus respectivos equipos de trabajo durante mi estancia en dichas instituciones; (6) a Mario Pablo Estrada García, Gerardo Enrique Guillén Nieto, Eduardo Canales López y Yamina Muñoz Pérez, quienes como personas de ciencia del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) hicieron posible la secuenciación de las muestras que son reflejadas como resultados en el tercer estudio de esta propuesta de tesis doctoral; (7) a Luis Enrique Pérez-Borroto Vega por su colaboración en una mejor visualización de los datos en los estudios dos y tres de este proyecto de tesis doctoral; (8) al Dr. Chunlei Su por contribuir a una correcta interpretación de los resultados del tercer estudio de este reporte de investigación; (9) tanto a los miembros de la Unidad de Parasitología como al equipo que integra el Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Zoonosis (GISAZ) de la Universidad de Córdoba por hacerme sentir miembro de su equipo de trabajo.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Me gustaría agradecer (1) a Ángel Entrena García, por haber confiado en mí desde el primer momento en que lo contacté con la intención de que asesorara mi proyecto de tesis doctoral inicial; (2) a Jorge Fraga Nodarse por su asesoría y entrenamiento en Biología Molecular durante mi estancia en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”; (3) a Pedro Casanova Arias por su apoyo en la realización de los ELISAS durante mi estancia en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”; (4) al doctorando Javier Caballero Gómez por su asesoría y colaboración en tareas muy puntuales de este proyecto de tesis doctoral; (5) a Sonia Almería por la excelente contribución intelectual realizada a los artículos que forman parte de esta tesis doctoral; (6) a Rafael Calero Bernal y Mercedes Fernández Escobar por la genial colaboración intelectual realizada al tercer artículo de este proyecto de tesis; (7) a Paqui García Luna y a Covadonga Canga Muñoz (Covy) por hacer que cada una de mis estancias en la Universidad de Córdoba fueran en extremo agradables; (8) y por último y no menos importante a mis excelentísimos directores de tesis: Álvaro Martínez Moreno e Ignacio García Bocanegra quienes con sus enseñanzas, paciencia, tolerancia, laboriosidad, profesionalidad y ánimos contribuyeron de manera significativa a mi formación científica.

EXERGO

EXERGO

Si tu intención es describir la verdad, hazlo con sencillez y la elegancia déjasela al sastre.

Albert Einstein

RESUMEN

RESUMEN

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica de distribución e importancia mundial. Dicha enfermedad es causada por el parásito protozooario *Toxoplasma gondii*, única especie del género *Toxoplasma*. Este parásito puede infectar a la mayoría de los animales de sangre caliente, incluidos los seres humanos y el ganado. Alrededor de un tercio de los seres humanos están infectados crónicamente con *T. gondii*. La mayoría de las infecciones parecen ser asintomáticas en personas inmunocompetentes, pero la toxoplasmosis puede ser mortal para el feto y adultos inmunocomprometidos. Además, se ha sugerido una asociación entre la toxoplasmosis y los trastornos neuropsiquiátricos, incluida la esquizofrenia. *Toxoplasma gondii* es un importante patógeno transmitido por los alimentos. El consumo de productos cárnicos crudos o poco cocidos que contienen quistes tisulares se considera una de las principales vías de transmisión de *T. gondii* a nivel mundial. En este sentido, la carne de cerdo es una de las principales fuentes de toxoplasmosis humana en algunos países, porque rara vez se han aislado parásitos viables de la carne de res o de pollos criados en interiores. Las preocupaciones públicas asociadas con *T. gondii* indican claramente la necesidad de realizar investigaciones epidemiológicas en animales que puedan utilizarse como fuente de alimento. Además, la caracterización genética de *T. gondii* que infecta a los animales destinados a la producción de alimentos es importante para comprender la epidemiología, los patrones de transmisión y los mecanismos de la enfermedad.

Los cerdos son importantes para la economía de muchos países. España es el segundo productor de carne de cerdo de la Unión Europea (UE) y el cuarto a nivel mundial. El cerdo ibérico es una raza autóctona de la Península Ibérica derivada del *Sus mediterraneus* con un hábitat

característico denominado “dehesa” formado por dehesas mediterráneas de encinas y alcornoques. Los cerdos ibéricos representan alrededor del 11 % de la producción porcina española y, según los registros nacionales de 2019, aproximadamente el 80 % de la población porcina ibérica española se encuentra en el suroeste de España. El cerdo ibérico se cría de forma extensiva hasta el final de la ceba (normalmente más de 14 meses de edad) y comparte su hábitat y recursos naturales con especies domésticas y salvajes simpátricas.

Este proyecto de tesis doctoral está compuesto por tres estudios. El primero de ellos fue diseñado y ejecutado en España, y el resto de los estudios fueron diseñados y realizados en Cuba. El objetivo del primer estudio fue determinar la seroprevalencia, los factores de riesgo y la distribución espacial de *T. gondii* en piaras extensivas de cerdo ibérico en España. Se colectaron sueros de 2245 cerdos ibéricos procedentes de 114 piaras entre 2015 y 2017, y se analizaron mediante un kit de ELISA comercial. La prevalencia individual aparente de anticuerpos contra *T. gondii* fue del 24,1 % (542/2245) y la seroprevalencia real estimada fue del 24,3 % (IC95 %: 22,5 – 26,1). Se detectó seropositividad en el 86,0 % (98/114; IC95 %: 77,4–91,1) de 114 hatos analizados. Un modelo de regresión logística multinivel mostró que la infección por *T. gondii* era significativamente más frecuente en cerdas que en cerdos de engorde (OR: 2,6; IC95 %: 1,5–4,8) y en rebaños con más de tres gatos en comparación con los que no tenían gatos (OR: 2,9; IC95 %: 1,1-8,7). Nuestros resultados indican una distribución generalizada pero heterogénea de *T. gondii* en piaras de cerdo ibérico de cría extensiva, lo que puede tener importantes implicaciones para la salud pública a través del consumo de productos poco cocidos o mal curados derivados del cerdo.

En Cuba, anticuerpos anti-*T. gondii* se han encontrado en pacientes humanos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida y retinocoroiditis en mujeres embarazadas, también, en recién nacidos y donantes de sangre. Asimismo, se ha informado seropositividad en animales domésticos, incluidos gatos y perros en este país. Sin embargo, la información sobre *T. gondii* en cerdos domésticos en Cuba es muy escasa. El único estudio previo en esta especie se realizó en la provincia de Ciego de Ávila (Centro de Cuba) entre 1980 y 2002. Por lo tanto, el objetivo del segundo estudio fue estimar la seroprevalencia actual y factores de riesgo asociados a *T. gondii* en cerdos en la región mayor productora de carne de cerdo en Cuba. Se analizaron muestras de suero de 420 cerdos, incluidas 210 cerdas y 210 lechones posdestetados, para detectar anticuerpos contra *T. gondii* utilizando un kit comercial de ELISA. Se detectaron anticuerpos anti-*T. gondii* en 56 animales (13,3 %, IC del 95 %: 10,1–16,6). Un modelo generalizado de estimación de ecuaciones reveló que los factores de riesgo asociados con una mayor seropositividad en los cerdos fueron la altitud (mayor en la ubicación de la granja a < 250 m sobre el nivel del mar (msnm) *versus* \geq 250 msnm) y la edad (mayor en las cerdas en comparación con los lechones después del destete). Los resultados indicaron que este parásito protozoario se encuentra ampliamente distribuido en las granjas porcinas del área de estudio, lo cual es un problema de salud pública ya que el consumo de productos cárnicos de cerdo crudos o poco cocidos que contienen quistes tisulares se considera una de las principales vías de transmisión de *T. gondii* a nivel mundial. Además, se deben implementar medidas de control para reducir el riesgo de exposición a *T. gondii* de los cerdos en Cuba.

La carne de cerdo es la más consumida en Cuba, y hasta donde sabemos, no existen investigaciones previas sobre caracterización genética

de *T. gondii* en Cuba. Los principales objetivos de nuestro tercer estudio fueron determinar la seroprevalencia de *T. gondii* en cerdos sacrificados destinados al consumo humano y caracterizar genéticamente las cepas de *T. gondii* que infectan a dichas especies hospedadoras en Cuba. Se determinó la seroprevalencia en 450 muestras de suero de cerdos sacrificados en la provincia de Villa Clara mediante un kit comercial de ELISA. Se detectaron anticuerpos anti-*T. gondii* en 100 animales (22,2 %, IC 95 %: 18,5–26,2). Se realizó una PCR convencional del marcador 529RE de *T. gondii* en corazones y tejidos diafragmáticos de todos los cerdos seropositivos por ELISA. Se detectó ADN de *Toxoplasma gondii* en cuatro individuos. Además, se realizó una caracterización genética de las muestras de ADN positivas mediante herramientas de tipificación multilocus PCR-RFLP y multilocus de secuencias. El análisis molecular reveló cuatro perfiles genéticos diferentes que eran combinaciones de alelos tipo I, II, III y u-1, lo que sugiere la circulación de genotipos no clonales de *T. gondii* en cerdos domésticos en Cuba. Nuestros resultados indican que *T. gondii* está ampliamente distribuido en cerdos sacrificados en este país, lo que podría tener implicaciones importantes para la salud pública. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de caracterización genética de *T. gondii* en Cuba. Aunque preliminares, los resultados sugieren una alta diversidad genética de *T. gondii* en la región de estudio. Se necesitan más estudios basados en el aislamiento del parásito para identificar definitivamente los genotipos circulantes y caracterizar la virulencia de las cepas detectadas en cerdos en Cuba, y evaluar el riesgo de transmisión zoonótica de los productos porcinos en este país.

ABSTRACT

ABSTRACT

Toxoplasmosis, a zoonotic disease of global distribution and importance, is caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, the only species in the *Toxoplasma* genus. This parasite can infect most warm-blooded animals, including humans and livestock. Around one-third of humans are chronically infected with *T. gondii*. Most infections are usually asymptomatic in immunocompetent individuals, but toxoplasmosis can be fatal to the fetus and immunocompromised adults. An association between toxoplasmosis and neuropsychiatric disorders, including schizophrenia, has also been suggested. *Toxoplasma gondii* is an important foodborne pathogen, with the consumption of raw or undercooked meat products containing tissue cysts considered to be one of the main routes of *T. gondii* transmission worldwide. In some countries, pork is one of the major sources of human toxoplasmosis, as viable parasites have rarely been isolated from beef or chickens raised indoors. The public health concerns associated with *T. gondii* clearly indicate the need to carry out epidemiological investigations in animals that can be used as a source of food. In addition, genetic characterization of *T. gondii* infecting food-producing animals is important for understanding the epidemiology, transmission patterns, and mechanisms of the disease.

Pigs are important to the economy of many countries. Spain is the second largest pork producer in the European Union (EU) and the fourth in the world. The Iberian pig is a native breed of the Iberian Peninsula derived from the *Sus mediterraneus*; its natural habitat is the *dehesa*, which is characterized by Mediterranean holm-oak and cork-oak pastures. Iberian pigs represent about 11 % of Spanish pork production and according to 2019 national records, approximately 80 % of the Spanish Iberian pig population is located in southwestern Spain. Iberian pigs are raised extensively until the end of the fattening period (usually over 14 months of age) and share their habitat and natural resources with sympatric domestic and wild species.

This doctoral thesis project comprises three studies. The first was designed and carried out in Spain, and the other two were designed and carried out in Cuba. The aim of the first study was to determine the seroprevalence, risk factors and spatial distribution of *T. gondii* in extensively managed Iberian pig herds in Spain. Sera from 2245 Iberian pigs in 114 herds were collected between 2015 and 2017 and analyzed using a commercial ELISA. The apparent individual prevalence of antibodies against *T.*

gondii was 24.1 % (542/2245) and the estimated true seroprevalence was 24.3 % (95 %CI: 22.5 – 26.1). Seropositivity was detected in 86.0 % (98/114; 95%CI: 77.4–91.1) of 114 herds analyzed. A multi-level logistic regression model showed that *T. gondii* infection was significantly more frequent in sows than in fattening pigs (OR: 2.6; 95 %CI: 1.5–4.8) and in herds with more than three cats compared with those with no cats (OR: 2.9; 95 %CI: 1.1–8.7). Our results indicate widespread but heterogenous distribution of *T. gondii* in extensively reared Iberian pig herds, which may have important public health implications through the consumption of undercooked or improperly cured pork products.

In Cuba, anti-*T. gondii* antibodies have been found in human patients with acquired immunodeficiency syndrome and retinochoroiditis in pregnant women, as well as in neonates and blood donors. Seropositivity has also been reported in domestic animals, including cats and dogs. Nevertheless, information on *T. gondii* in domestic pigs in Cuba is very scarce. The only previous survey in this species was carried out in Ciego de Ávila province (Central Cuba) between 1980 and 2002. The aim of the second study therefore was to assess the current seroprevalence and risk factors associated with *T. gondii* in pigs in the largest pork-producing region in Cuba. Serum samples from 420 pigs, including 210 sows and 210 post-weaning pigs, were tested for antibodies against *T. gondii* using a commercial ELISA kit. Anti-*T. gondii* antibodies were detected in 56 animals (13.3%, 95% CI: 10.1–16.6). A generalized estimating equation model revealed that the risk factors associated with higher seropositivity in pigs were altitude (higher in farms located < 250 m above sea level (masl) versus \geq 250 masl) and age (higher in sows compared to post-weaning pigs). The results indicated that this protozoan parasite was widely distributed on pig farms in the study area. This is a public health concern since the consumption of raw or undercooked pork meat products containing tissue cysts is considered to be one of the main transmission routes of *T. gondii* worldwide. Control measures should be implemented to reduce the risk of exposure to *T. gondii* in pigs in Cuba.

Pork is the most consumed meat in Cuba. To our knowledge, there is no previous research on the genetic characterization of *T. gondii* in Cuba. The main aims of our third study were to determine the seroprevalence of *T. gondii* in slaughtered pigs destined for human consumption and to genetically characterize *T. gondii* strains infecting this host species in Cuba. Seroprevalence was determined in 450 serum

samples from slaughtered pigs in Villa Clara province using a commercial ELISA kit. Anti-*T. gondii* antibodies were detected in 100 animals (22.2%, 95%CI: 18.5–26.2). Conventional PCR of the 529RE marker of *T. gondii* was performed on heart and diaphragm tissues of all ELISA-seropositive pigs. *Toxoplasma gondii* DNA was detected in four individuals. Further genetic characterization of the positive DNA samples was performed by multilocus PCR-RFLP and PCR-sequencing typing. Molecular analysis revealed four different genetic profiles that were combinations of type I, II, III and u-1 alleles, suggesting the circulation of non-clonal genotypes of *T. gondii* in domestic pigs in Cuba. Our results indicated that *T. gondii* was widely distributed in slaughtered pigs in this country, which could have major public health implications. To the best of our knowledge, this is the first report on the genetic characterization of *T. gondii* in Cuba. Although preliminary, the results suggest a high genetic diversity of *T. gondii* in the study region. Further studies based on isolation of the parasite are needed to definitively identify the circulating genotypes and characterize the virulence of strains detected in pigs in Cuba, and to assess the risk of zoonotic transmission from pork products in this country.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El agente etiológico.....	1
1.2. Ciclo de vida	3
1.3. Clasificación taxonómica.....	6
1.4. Caracterización genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
1.5. Estructura poblacional y distribución geográfica de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.5.1. Europa	11
1.5.2. Norte América	12
1.5.3. Centro y Sur América	12
1.5.4. África	14
1.5.5. Asia	14
1.5.6. Australia.....	15
1.6. Epidemiología de <i>Toxoplasma gondii</i> en cerdos domésticos.....	15
1.6.1. Contagio y transmisión de <i>T. gondii</i> en cerdos domésticos	15
1.6.2. Seroprevalencia	15
1.6.3. Demostración de <i>T. gondii</i> en tejidos de cerdos naturalmente infectados.....	17
1.6.4. Prevalencia de ADN de <i>T. gondii</i> en cerdos domésticos	17
1.6.5. <i>Toxoplasmosis</i> clínica en cerdos domésticos	18
1.7. Epidemiología de <i>Toxoplasma gondii</i> en jabalíes.....	21
1.7.1. Seroprevalencia	21
1.7.2. Demostración de <i>T. gondii</i> en tejidos de jabalíes.....	21
1.7.3. Prevalencia de ADN de <i>T. gondii</i> en tejidos de jabalíes.....	22
1.7.4. <i>Toxoplasmosis</i> clínica en jabalíes	22
1.8. Epidemiología de <i>Toxoplasma gondii</i> en los seres humanos.....	22
1.8.1. Contagio y transmisión de <i>T. gondii</i> en los seres humanos	22
1.8.2. Seroprevalencia.....	27
1.8.3. <i>Toxoplasmosis</i> clínica en los seres humanos	28
1.9. Diagnóstico de <i>Toxoplasma gondii</i>	29
1.9.1. Diagnóstico de <i>T. gondii</i> en animales de granjas	29
1.9.2. Diagnóstico en los seres humanos.....	32
1.10. Prevención y control de <i>Toxoplasma gondii</i>	34
1.10.1. Educación sanitaria	35
1.10.2. Seguridad alimentaria.....	36

1.10.3. <i>Inmunoprofilaxis en humanos y animales de abasto</i>	37
1.10.4. <i>Inmunoprofilaxis en gatos</i>	38
2. OBJETIVOS	40
3. PRIMER ESTUDIO (FIRST STUDY)	44
Seroepidemiology of <i>Toxoplasma gondii</i> in extensively raised Iberian pigs in Spain.....	44
Abstract	45
Introduction	46
Material and methods.....	47
<i>Study design</i>	47
<i>Sample collection and serological analysis</i>	48
<i>Statistical analysis</i>	48
Results.....	49
Discussion	52
References	55
4. SEGUNDO ESTUDIO (SECOND STUDY)	61
Seroprevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba	61
Abstract	62
Introduction	63
Material and methods.....	64
<i>Study design</i>	64
<i>Sample collection and serological analysis</i>	64
<i>Statistical analysis</i>	65
Results.....	66
Discussion	68
References	72
5. TERCER ESTUDIO (THIRD STUDY)	78
Seroprevalence and genetic characterization of <i>Toxoplasma gondii</i> in domestic pigs intended for human consumption in Cuba.....	78
Abstract	80
Impacts	81
Introduction	82
Material and methods.....	83
<i>Study area and sampling</i>	83
<i>Serological analysis</i>	83
<i>Genomic DNA extraction</i>	84

<i>DNA detection</i>	84
<i>Genetic characterization by multilocus nested-PCR-RFLP</i>	84
<i>Genetic characterization by PCR-sequencing</i>	85
<i>Statistical analyses</i>	85
Results	86
Discussion	89
References	94
6. DISCUSIÓN	101
7. CONCLUSIONES	114
8. CONCLUSIONS.....	117
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
10. ANEXOS.....	159

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El agente etiológico

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado del filum *Apicomplexa* (Behnke *et al.*, 2016), que puede infectar a todos los animales de sangre caliente, incluyendo a los seres humanos y el ganado como huéspedes intermediarios (Dubey, 2020; McLeod *et al.*, 2020). *T. gondii* está considerado uno de los patógenos eucarióticos más exitosos dada su importancia médica y veterinaria (Almeria & Dubey, 2021). Desde su primera descripción en el gundi, *Ctenodactylus gundi* (Nicolle & Manceaux, 1908), el parásito fue progresivamente reconocido como el agente de una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial: la toxoplasmosis (McLeod *et al.*, 2020). Sin embargo, su ciclo de vida completo fue definitivamente entendido a finales de la década de 1960, con el descubrimiento del rol central de los gatos como huéspedes definitivos que abrigan el ciclo parasítico sexual y dispersión de los ooquistes a través de las heces (Dubey, 2020; Lindsay & Dubey, 2020).

Hay cuatro formas invasivas de *T. gondii*: el taquizoíto, el bradizoíto, el merozoíto y el esporozoíto. Los taquizoítos y bradizoítos se asocian con los huéspedes intermediarios, y los merozoítos y esporozoítos con los huéspedes definitivos. Los taquizoítos y los merozoítos son responsables de la expansión de la población dentro del huésped, mientras que los bradizoítos y los esporozoítos son capaces de transmitirse a nuevos huéspedes (Ferguson & Dubremetz, 2020). Todas las etapas infecciosas tienen la misma morfología básica con tan sólo variaciones menores. Estas etapas invasivas son células en forma de media luna, de aproximadamente 5 μm de largo y 2 μm de ancho, con un extremo apical puntiagudo y un extremo posterior redondeado (Dubey *et al.*, 1998). Ellas están limitadas por una membrana compleja, llamada película, estrechamente asociada con un citoesqueleto involucrado en la integridad estructural y la motilidad de la célula (Morrissette & Gubbels, 2020). Asimismo, poseen un núcleo, una mitocondria, un complejo de Golgi, ribosomas, un retículo endoplásmico y un orgánulo parecido a un plástido unido a múltiples membranas denominado apicoplasto, resultado de una posible adquisición por parte del parásito a través de una endosimbiosis secundaria con un alga roja de vida libre (Ferguson & Dubremetz, 2020). Como otros miembros del filum *Apicomplexa*, ellas concentran en su parte apical, una estructura citoesquelética especializada, el Conoide o Complejo apical, involucrado en

la invasión de la célula, y numerosos orgánulos secretorios (Roptrias, Gránulos densos, y Micronemas) (Zhang *et al.*, 2019; Boothroyd & Hakimi, 2020).

Los Taquizoítos (Figura 1A) – también denominados Trofozoítos, Forma Proliferativa, Forma de Alimentación y Endozoítos – fueron denominados así por Frenkel (Frenkel, 1973), que describe la etapa de crecimiento rápido en la vida de *T. gondii*. Los taquizoítos pueden infectar prácticamente todos los tipos de células del cuerpo, donde se multiplican en una vacuola parasitófora a través de un proceso especializado denominado endodiogenia (Dubey, 2020).

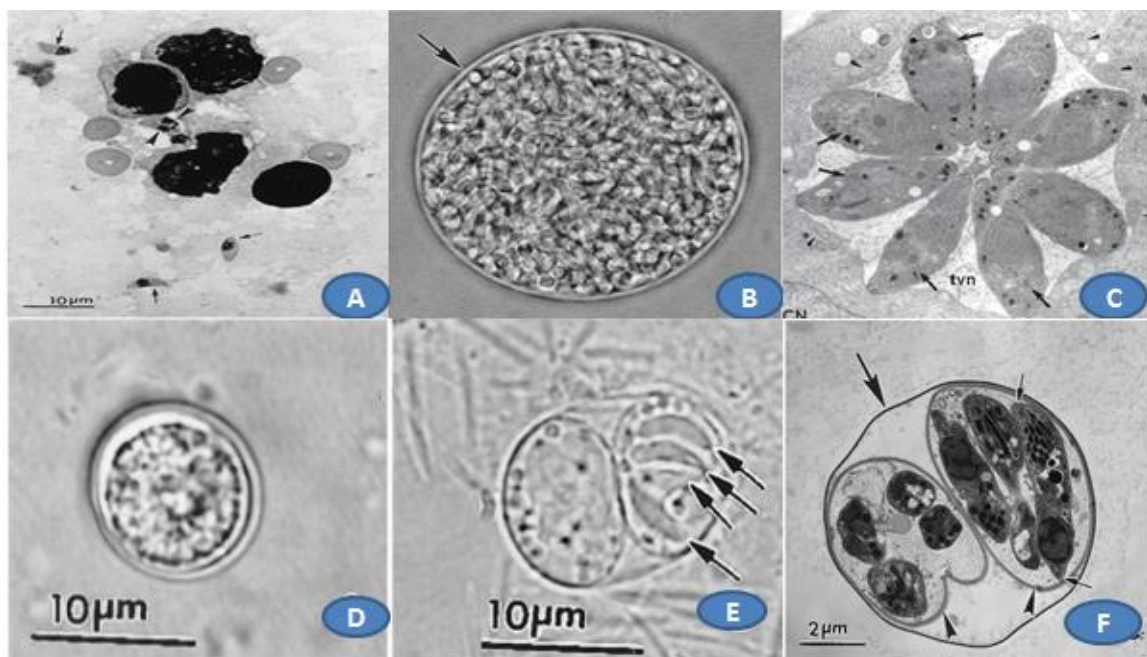


Figura 1. Formas invasivas de *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoítos en división (puntas de flechas) y Taquizoítos individuales (flechas). (B) Quiste de tejido que encierra cientos de Bradizoítos. [fuente: (Dubey, Lindsay, & Speer *et al.*, 1998) (C) Merozoítos (forma típica de ventilador) [fuente: (Ferguson & Dubremetz, 2020)]. (D) Ooquiste no esporulado. (E; F) Ooquistes esporulados [fuente: (Dubey, Lindsay, & Speer *et al.*, 1998)].

Los Bradizoítos (Figura 1B) –también denominados cistozoítos - término propuesto también por Frenkel (Frenkel, 1973), resultan de la conversión de los taquizoítos en una etapa de división lenta que forman quistes tisulares (Dubey, 2020). El tamaño de un quiste tisular es variable, pero en promedio un quiste maduro en el

cerebro es esférico de 50-70 μm de diámetro y contiene aproximadamente 1000 bradizoítos en forma de media luna de 7 por 1,5 μm de diámetro. En el músculo, estos quistes tisulares son más alargados y pueden tener hasta 100 μm de longitud (Sinai *et al.*, 2020). Si bien los quistes tisulares pueden desarrollarse en cualquier órgano visceral (pulmones, hígado y riñones), son más comunes en el tejido neural (cerebro y ojos) o muscular (esquelético y cardíaco) (Dubey, 1998). Tradicionalmente, los bradizoítos han sido vistos como organismos diferenciados no replicativos (Sinai *et al.*, 2016). Sin embargo, la evidencia definitiva de la replicación de los bradizoítos dentro de los quistes tisulares y la heterogeneidad general de éstos revela que el quiste tisular probablemente representa un continuo de estados fisiológicos que cubre el espectro desde bradizoítos en transición (con alto potencial de replicación) y bradizoítos intermedios (capaces de entrar en ciclo replicativo) a bradizoítos terminales (estado en que el parásito está preparado únicamente para la transmisión) (Watts *et al.*, 2017).

Los merozoítos son formas invasivas de *T. gondii* localizadas en los esquizontes tipo D y E (Dubey *et al.*, 1998). Los merozoítos se multiplican asexualmente a través de un proceso denominado endopoligenia (Ferguson & Dubremetz, 2020). A menudo, permanecen unidos por cantidades pequeñas de citoplasma residual en la parte posterior y pueden ser vistos formando estructuras en forma de ventilador (Figura 1C). Los merozoítos son liberados al lumen del intestino desde los esquizontes mencionados con anterioridad donde ellos pueden invadir nuevos enterocitos e iniciar la formación de gametos (Dubey *et al.*, 1998; Ferguson & Dubremetz, 2020).

Los esporozoítos (Figura 1D-F) se encuentran en ooquistes maduros. Los ooquistes son estructuras ovoides de 12 a 13 μm que después de la esporulación contienen dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos (Dubey *et al.*, 1998). La pared del ooquiste es una estructura multicapa extremadamente robusta que protege al parásito de daños mecánicos y químicos (Mai *et al.*, 2009). Como tal, es fundamental para la supervivencia del parásito. Sin esta pared, el parásito no podría sobrevivir en el ambiente externo durante los largos períodos de tiempo (Ferguson & Dubremetz, 2020).

1.2. Ciclo de vida

Toxoplasma gondii es un coccidio formador de quistes tisulares que funciona en un sistema de presa-predador que alterna entre los huéspedes definitivos (reproducción sexual) e intermediarios (replicación asexual) (Dubey, 2020). Es único dentro de este

grupo porque puede transmitirse no solo entre huéspedes intermediarios y definitivos (ciclo sexual), sino también entre huéspedes intermediarios a través del carnivorismo (ciclo asexual) (Sinai *et al.*, 2020). Las partes de los ciclos sexual y asexual, y la dinámica de transmisión en un entorno dado varían según las características físicas y según las estructuras de las poblaciones de huéspedes intermediarios y definitivos (Afonso *et al.*, 2006).

El ciclo sexual ocurre solo en félidos domésticos y salvajes. Después de la ingestión de quistes presentes en los tejidos de un huésped intermediario, las enzimas gástricas destruyen la pared del quiste. Los bradizoítos se asientan dentro de los enterocitos, donde experimentan un número autolimitado de multiplicaciones asexuales, caracterizadas por el desarrollo de merozoítos dentro de los esquizontes (Dubey, 1998). A este primer paso le sigue el desarrollo sexual, con la formación de gametos masculinos y femeninos (gametogonia) (Dubey, 2020; Ferguson & Dubremetz, 2020). Después de la fertilización, los ooquistes formados dentro de los enterocitos son liberados por la ruptura de la célula y excretados como formas no esporuladas en las heces del gato.

Los ooquistes son excretados, por tanto, únicamente por félidos domésticos y salvajes (Dubey *et al.*, 2020b). La eliminación de los ooquistes comienza de 3 a 7 días después de la ingestión de los quistes tisulares y puede continuar hasta por 20 días, periodo en él se desarrolla una respuesta inmunitaria eficaz, que normalmente protege a los animales contra la eliminación de más ooquistes debido a una nueva infección (Dubey, 2020). Los gatos infectados pueden eliminar más de 100 millones de ooquistes en sus heces.

El proceso de esporogonia ocurre después de algunos días en el ambiente externo (entre 1 y 5 días, según la aireación y la temperatura). Implica una reducción meiótica y cambios morfológicos que conducen a la formación de un ooquiste esporulado con dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos haploides, que permanecen viables en el medio ambiente durante varios meses (Dubey, 2020).

Estos ooquistes pueden infectar una amplia gama de huéspedes intermediarios, prácticamente todos los animales de sangre caliente, desde mamíferos hasta aves, cuando se ingieren con alimentos o agua contaminados (Shapiro *et al.*, 2019). Los

ooquistes también son infecciosos para los gatos, aunque de manera menos eficiente (Dubey & Frenkel, 1972; Jones & Dubey, 2010; Dubey, 2020).

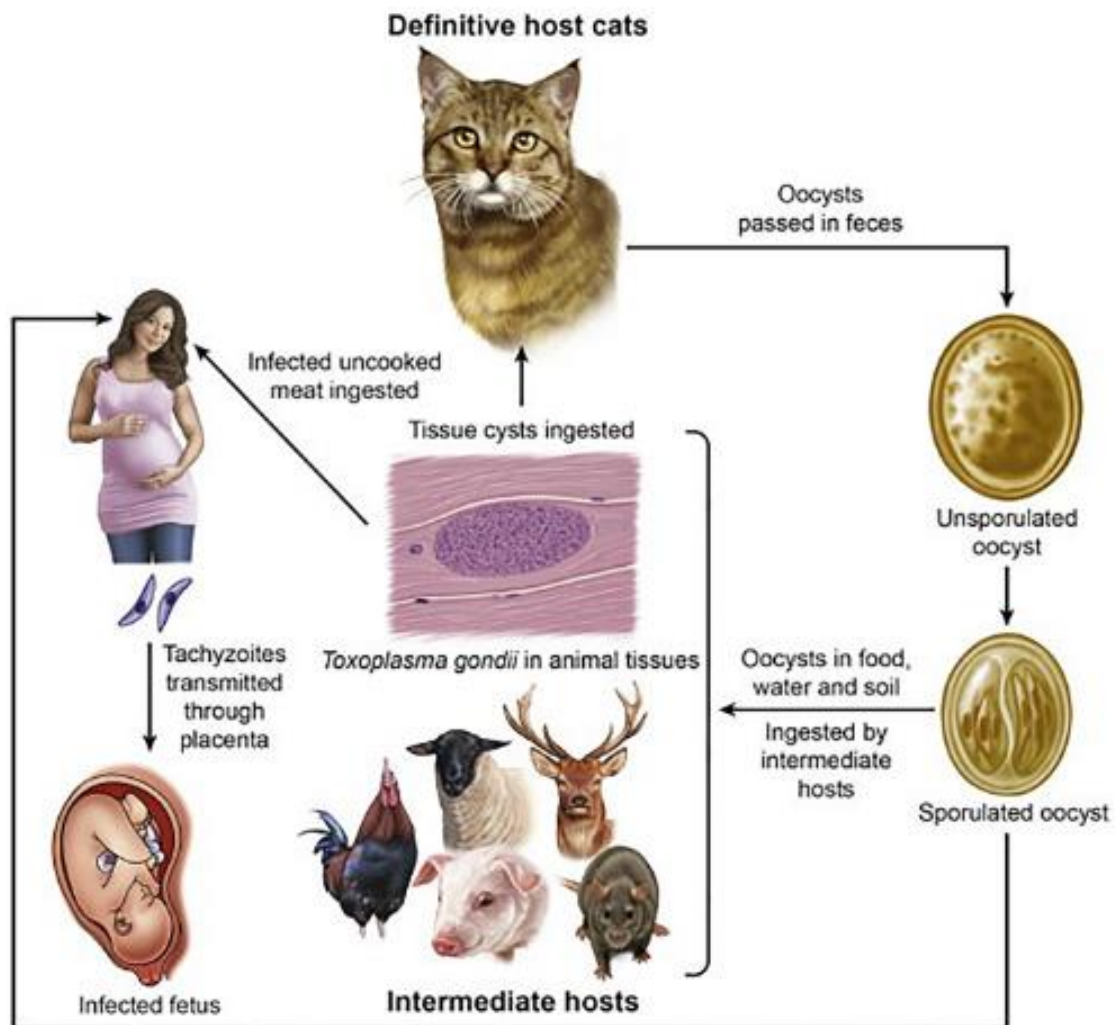


Figura 2. Ciclo de vida *Toxoplasma gondii* [Fuente:(Almeria & Dubey, 2021)]

El parásito solo experimenta un desarrollo asexual dentro de los huéspedes intermediarios. Después de la ingestión de ooquistes, se liberan los esporozoítos que penetran en el epitelio intestinal, donde se diferencian en taquizoítos. Los taquizoítos se replican rápidamente por endodiogenia dentro de cualquier tipo de célula y se diseminan por todo el organismo. Como resultado de la conversión de taquizoíto a bradizoíto, los quistes tisulares surgen entre 7 y 10 días después de la infección y pueden permanecer durante toda la vida en la mayoría de los huéspedes, predominantemente en el cerebro o la musculatura. Tras la ingestión de estos quistes de tejido por un huésped intermediario a través de carne cruda o poco cocida, los quistes se rompen a medida que pasan por el tracto digestivo, lo que provoca la liberación de bradizoítos. Los bradizoítos infectarán

el epitelio intestinal del nuevo huésped y se diferenciarán nuevamente en la etapa de taquizoítos que se divide rápidamente para diseminarse por todo el cuerpo (Dubey, 2020; Ferguson & Dubremetz, 2020; Sinai *et al.*, 2020).

1.3. Clasificación taxonómica

Se han propuesto diversos esquemas de clasificación taxonómica para los protozoos, incluyendo los coccidios durante el siglo XX (Tenter *et al.*, 2002). En el pasado, tales clasificaciones se basaban únicamente en caracteres fenotípicos como la morfología, la ultraestructura, los ciclos de vida y la especificidad del huésped. En las últimas décadas la realización de estudios filogenéticos moleculares han permitido que se propongan nuevos esquemas de clasificación taxonómica de los organismos eucarióticos, incluyendo *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2002). La tabla 1 muestra el esquema de clasificación taxonómica actual de este protozoo intracelular obligado (Adl *et al.*, 2012; NCBI, 2022).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Toxoplasma gondii*

Super Reino	<i>Eucariota</i>
Clado	<i>Alveolata</i>
Filum	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Conoidasida</i>
Subclase	<i>Coccidia</i>
Orden	<i>Eucoccidiorida</i>
Suborden	<i>Eimeriorina</i>
Familia	<i>Sarcocystidae</i>
Género	<i>Toxoplasma</i>

1.4. Caracterización genética de *Toxoplasma gondii*

El análisis genético de *Toxoplasma gondii* que infecta a humanos y animales es importante para comprender la epidemiología, patrones de transmisión y mecanismos de la enfermedad (Carneiro *et al.*, 2013). Los primeros estudios sobre la diversidad genética de *T. gondii* se publicaron hace casi 30 años utilizando las herramientas genéticas entonces disponibles, es decir, la electroforesis enzimática multilocus (MLEE, siglas en inglés) (Dardé *et al.*, 1992; Dardé *et al.*, 1988) y Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-RFLP) en

algunos marcadores genéticos (Sibley & Boothroyd, 1992). Las cepas disponibles también eran limitadas, tanto en número como en origen geográfico lo que condujo al establecimiento de una visión simple de la estructura poblacional de *T. gondii*, limitada esencialmente a tres linajes clonales, a saber, los tipos I, II y III (Howe & Sibley, 1995). Durante un tiempo, se aceptó y se trabajó sobre la existencia exclusiva de estos tres genotipos de *T. gondii* y se realizaron diversos estudios sobre sus diferencias biopatológicas, fundamentalmente en base a la virulencia en las infecciones experimentales en el modelo murino. El linaje tipo I es uniformemente letal en ratones en menos de 10 días, luego de la inoculación de menos de 10 taquizoítos (Sibley & Boothroyd, 1992). Aunque los tipos II y III generalmente se consideran no virulentos en ratones, el deterioro progresivo y la muerte de los ratones, especialmente con síntomas neurológicos, pueden ocurrir algunas semanas o meses después de la inoculación (Dardé *et al.*, 1988). La infección oral, que es la ruta natural de infección, también mostró diferencias específicas de cada cepa del parásito de la patogenicidad en ratón. La infección oral con cepas de tipo II produjo en ratón una ileítis más grave que las cepas tipo III (Liesenfeld, 2002). La mayor virulencia del tipo I en ratones en comparación con el tipo II o III se ha correlacionado con propiedades biológicas *in vitro*: el tipo I en comparación con los tipos II y III muestra una mejor migración y transmigración en placas de agarosa blanda y epitelios polarizados o matriz extracelular respectivamente. También muestran una mayor tasa de penetración *ex vivo* de la lámina propia y la submucosa (Barragan & Sibley, 2002, 2003). Esta capacidad de cruzar rápidamente las barreras epiteliales y llegar al torrente sanguíneo a las pocas horas de la infección podría ser un factor determinante en la diseminación del parásito *in vivo* en especies hospedadoras susceptibles. En cultivo celular, la cepa tipo I crece más rápido que los tipos II o III y se convierte de taquizoíto a bradizoíto a un ritmo mucho más lento que las cepas tipo II (Soete *et al.*, 1993). La mayor tasa de crecimiento de los parásitos tipo I, ya sea debido a una mayor tasa de reinvasión, una mayor distancia de migración o a un tiempo de duplicación más corto, también puede explicar la mayor carga tisular observada en ratones infectados con cepas virulentas (Saeij *et al.*, 2005).

Conforme esos estudios iniciales, se sugirió de manera inadecuada que el análisis genético de un solo locus era suficiente para determinar la afiliación de la cepa a uno de los tres linajes. Sin embargo, incluso en estos primeros estudios, algunas cepas exhibieron perfiles genéticos que no encajaban en los tres linajes clonales principales.

Dichas cepas se originaron principalmente en áreas silvestres de América del Norte (Howe & Sibley, 1995) o en América del Sur (Dardé *et al.*, 1992), lo que sugiere la existencia de una estructura de población diferente fuera del entorno doméstico de Europa y los EE. UU. . Algunas de estas cepas “exóticas” fueron aisladas de pacientes humanos con formas graves de infecciones por *Toxoplasma*, lo que refuerza la hipótesis de un papel de la cepa infectante en la expresión clínica de la toxoplasmosis (Dardé, 1996). Desde entonces, el genotipado multilocus, ha experimentado un progreso continuo en el desarrollo de nuevas herramientas de caracterización genética, así como ha realizado un esfuerzo considerable en aislar cepas en diferentes continentes, originarias de varios biotopos (salvajes, domésticos o antropizados) y de una variedad de especies hospedadoras que le han permitido describir una estructura poblacional para *T. gondii* mucho más compleja. Incluso, la secuenciación del genoma completo (WGS, siglas en inglés) agregó una nueva dimensión a nuestra comprensión de la arquitectura genética y la estructura genética de la población mundial (Dardé *et al.*, 2020).

Actualmente, los métodos de caracterización genética más utilizados en los estudios de diversidad genética de *T. gondii* son el genotipado multilocus PCR-RFLP, Microsatélite (MS) y, con menos frecuencia, la tipificación multilocus de secuencias (MLST, siglas en inglés) (Dardé *et al.*, 2020). En cualquier caso, los métodos de genotipado deben basarse imperativamente en marcadores multilocus, ya que pueden capturar la diversidad y la recombinación genética con buena resolución. Ya no se admiten métodos de genotipado basados en el análisis de un único locus. Aunque el número de locus es un tema de debate, se puede considerar aceptable un mínimo de cinco marcadores procedentes de cromosomas diferentes (Dardé *et al.*, 2020). Las técnicas mencionadas con anterioridad aplicadas a una gran población de aislamientos de *T. gondii* han permitido la definición de grupos genéticos que han sido refinados aún más por WGS (Lorenzi *et al.*, 2016).

Las secuencias MS son repeticiones en tándem de nucleótidos cortos de dos a seis nucleótidos que producen acumulación de polimorfismos de longitud de 2 a 20 veces. Las mismas son hipervariables debido al deslizamiento rápido de la polimerasa intraalélica durante la replicación. Diversos grupos de marcadores MS se han utilizado en diferentes estudios, empleando para ello de 5-15 marcadores moleculares (Lehmann *et al.*, 2006; Ajzenberg *et al.*, 2010). Actualmente, una PCR multiplex para 15 marcadores MS que permite el análisis multilocus de aislamientos después de una sola

amplificación por PCR proporciona un método simple con alta resolución en el genotipado de cepas de *T. gondii* (Ajzenberg *et al.*, 2010).

La tipificación multilocus PCR-RFLP de *T. gondii* se ha utilizado ampliamente para estudios de genética de poblaciones debido a su facilidad de uso y rentabilidad (Su *et al.*, 2010; Shwab *et al.*, 2014). Este método se basa en endonucleasas de restricción que al reconocer polimorfismos en un único nucleótido (SNPs, siglas en inglés) entre secuencias de ADN, permiten digerir productos de PCR y revelar distintos patrones de bandas de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (Dardé *et al.*, 2020). Se desconoce la tasa de mutación de SNP en *T. gondii*, pero se espera que esté cerca de 10^{-9} - 10^{-10} por posición de nucleótido por replicación para organismos eucariotas en general (Goldstein & Schlotterer, 1999), lo que la convierte en una excelente herramienta para estudiar cepas de parásitos lejanamente relacionadas. La principal limitación del método de tipificación multilocus PCR-RFLP es su resolución relativamente baja para identificar cepas individuales de *T. gondii*. Además, los marcadores PCR-RFLP desarrollados inicialmente para el genotipo *T. gondii* se basaron en SNP que diferencian las cepas clonales arquetípicas norteamericanas y europeas tipos I-III (Su *et al.*, 2006). Si bien estos marcadores PCR-RFLP diferenciarán genotipos atípicos que contienen combinaciones únicas de alelos de tipo I-III, no detectan los polimorfismos únicos presentes dentro de cada locus que poseen las cepas atípicas de *T. gondii* (Khan *et al.*, 2007).

Aunque los métodos de tipificación multilocus MS y PCR-RFLP son formas sencillas, rápidas y rentables para genotipificar patógenos, no capturan la verdadera extensión del polimorfismo presente en cada locus. Debido a las limitaciones de la tipificación de MS y PCR-RFLP, así como a la alta resolución y a la disminución del costo de la secuenciación, la tipificación multilocus de secuencias de ADN se ha aplicado cada vez más para estudiar la diversidad genética de las cepas de *T. gondii*, particularmente aquellas que son atípicas (Frazão-Teixeira *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2012). Los marcadores de tipificación de secuencias más utilizados y que proporcionan una genotipificación altamente sensible son: SAG1, SAG2, SAG3, SAG4, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico, GRA6, GRA7 y B1 (Grigg & Boothroyd, 2001; Su *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2008). Estos marcadores de secuencia se desarrollaron como PCR anidadas que pueden detectar de 5 a 10 parásitos en el líquido cefalorraquídeo o en los líquidos oculares (Grigg *et al.*, 2001a; Grigg *et al.*, 2001b; Khan *et al.*, 2005). Sin

embargo, la mayoría de los estudios actuales usan solo un número limitado de locus para investigar una pequeña colección de cepas, lo que limita la información de estos estudios de modo que no se puede evaluar la relación genética entre diferentes genotipos de *T. gondii* (Dardé *et al.*, 2020). Para superar esta limitación, Su *et al.* (2012) genotipificaron 138 cepas atípicas mediante la secuenciación del ADN de cuatro intrones que se suponía estaban bajo selección neutral de tres genes diferentes, incluidos UPRT, EF y HP, que comprendían 1 775 pb . El análisis de estos resultados organizó los 138 genotipos únicos de PCR-RFLP en 15 haplogrupos distintos, que constituyeron los seis clados principales de *T. gondii*.

1.5. Estructura poblacional y distribución geográfica de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es la única especie reconocida del género *Toxoplasma* (Almeria & Dubey, 2021). Sin embargo, poblaciones genéticamente diversas de *T. gondii* han evolucionado en diferentes regiones geográficas (Hou, Zhou, *et al.*, 2018). Los estudios de epidemiología molecular sugieren que *T. gondii* tiene una estructura poblacional clonal (tipos I, II y III) en Europa, África, Asia y América del Norte, y una estructura epidémica (genotipos no clonales) en América Central y del Sur (Dardé *et al.*, 2020). Aunque el muestreo ha sido incompleto en muchas regiones, la estructura poblacional actual de *T. gondii* consta de 138 genotipos únicos agrupados en ~16 haplotipos que definen colectivamente seis clados principales (Figura 3) (Su *et al.*, 2012; Behnke *et al.*, 2016; Dardé *et al.*, 2020). Cepas no clonales de *T. gondii* se han involucrado con casos raros y graves de toxoplasmosis diseminada, así como con casos de toxoplasmosis ocular y congénita en personas sanas (Dardé *et al.*, 2020).

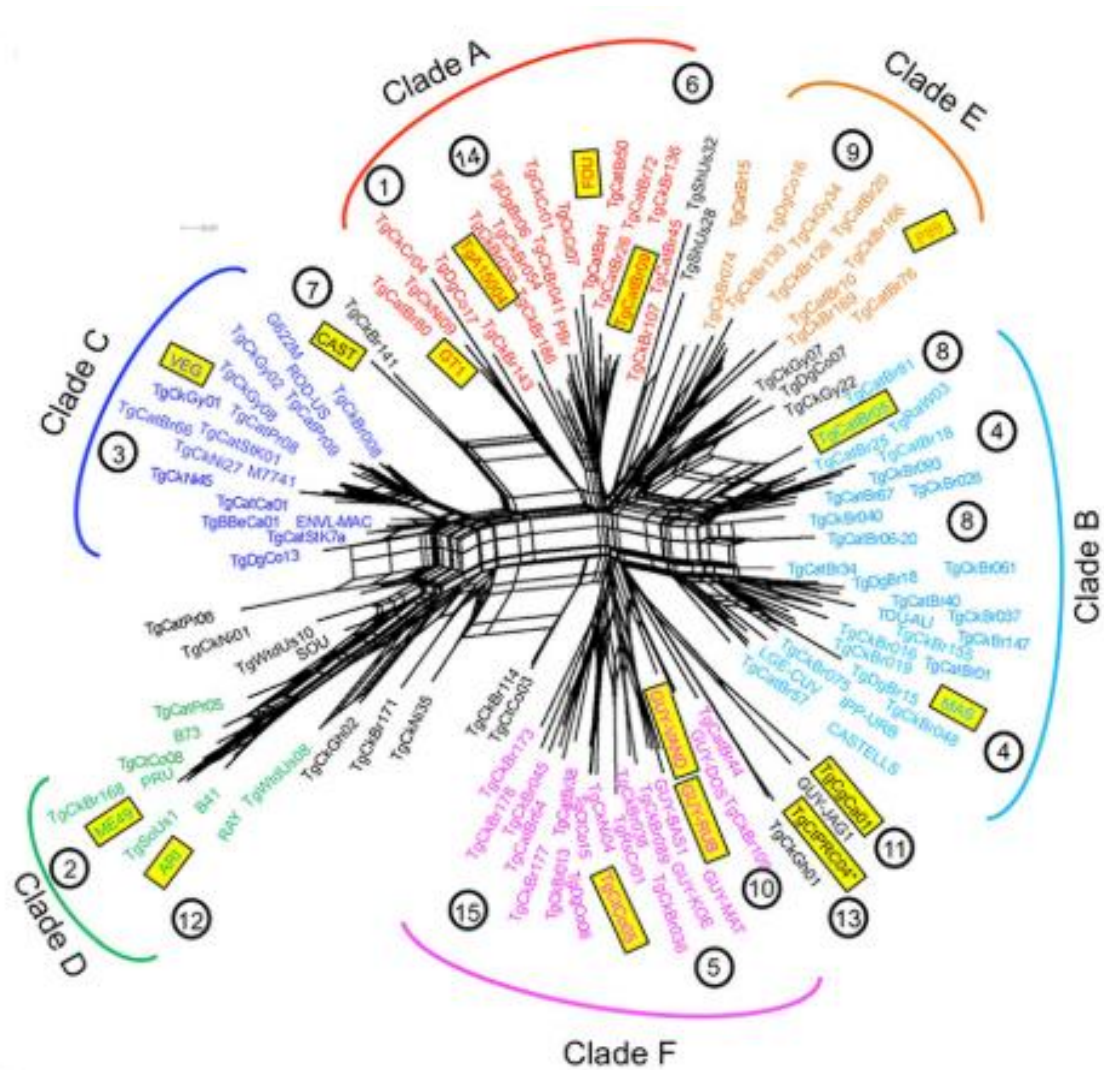


Figura 3. Estructura poblacional de *Toxoplasma gondii* a nivel global [Fuente: (Su *et al.*, 2012)]

1.5.1. Europa

En el noroeste de Europa el linaje tipo II de *T. gondii* es ampliamente predominante (Jokelainen *et al.*, 2011). En Francia, por ejemplo, se encuentra en más del 90% de las toxoplasmosis congénitas humanas, pero también en casi todos los aislamientos obtenidos de una gran variedad de animales (Ajzenberg *et al.*, 2002). En los países del Sur de Europa, aunque el tipo II todavía está presente, el tipo III parece ser aislado con mayor frecuencia (Herrmann *et al.*, 2012a; Herrmann *et al.*, 2012b; Marković *et al.*, 2014; Calero-Bernal *et al.*, 2015).

En España, los datos disponibles sobre genotipado de *T. gondii* en cerdos domésticos son muy escasos. El único estudio del que se tiene referencia en la literatura científica identificó dos genotipos, ToxoDB#3 (Tipo II variante PRU) y ToxoDB#2

(Tipo III clonal), ambos genotipos predominantemente identificados en el ganado doméstico europeo (Fernández-Escobar *et al.*, 2020a).

1.5.2. Norte América

Los estudios genéticos de *T. gondii* en América del Norte revelaron una mayor diversidad que en Europa, África y Asia (Shwab *et al.*, 2014). Sin embargo, los genotipos ToxoDB#1, ToxoDB#3 (Tipo II variante PRU); y los genotipos ToxoDB#4 y ToxoDB#5 (colectivamente tipo 12, Haplogrupo (HG) 12) y el genotipo ToxoDB#2 (tipo III clonal) son dominantes en esta región. Asimismo, debemos resaltar que el genotipo ToxoDB#10 (tipo I clonal) rara vez se encuentra, y el genotipo ToxoDB#5 (tipo 12, HG 12) se identifica como el principal genotipo en la vida silvestre de América del Norte (Dubey *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2018). La comparación de aislamientos de *T. gondii* de animales domésticos y de vida silvestre indican una menor diversidad genética en los primeros, con predominio de los genotipos ToxoDB#1, ToxoDB#2 y ToxoDB#3 en animales domésticos (Jiang *et al.*, 2018). Esto sugiere la división de rutas de transmisión domésticas *versus* selváticas para *T. gondii*. Un estudio reciente de 67 muestras de ADN de toxoplasmosis humana reveló el predominio de los parásitos tipo II, seguidos de una proporción significativa de parásitos con genotipos atípicos de origen sur americano, indicando de esta manera que las cepas de *T. gondii* en la toxoplasmosis humana de los Estados Unidos son más diversas que las de Europa (Pomares *et al.*, 2018).

1.5.3. Centro y Sur América

Varios estudios sobre caracterización genética de *T. gondii* en América del Sur encontraron genotipos distintos y una diversidad genética superior a la esperada (de Melo Ferreira *et al.*, 2006; Khan, 2006; Lehmann *et al.*, 2006). Estos hallazgos desafiaron el dogma de la estructura de población clonal de *T. gondii* y estimularon la realización de una ola de estudios sobre genética de poblaciones de este protozoo intracelular obligado. Hasta la fecha, numerosos estudios han confirmado la alta diversidad genética y genotípica que existe entre las cepas de *T. gondii* que circulan tanto en América Central como en América del Sur. Sin embargo, la diversidad genética y la estructura poblacional no son homogéneas en esta región (Dardé *et al.*, 2020).

Los estudios de caracterización genética de *T. gondii* en América Central (Guatemala, Nicaragua, Costa Rica), el Caribe (Granada, y San Cristóbal y Nieves) y la

parte norte y oeste de América del Sur (Venezuela, Colombia, Perú y Chile) mostraron una diversidad moderada, con la presencia del linaje tipo II, la alta frecuencia del tipo III (genotipo ToxoDB#2), y genotipos relacionados pertenecientes al haplogrupo 3 (Rajendran *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 2016; Chikweto *et al.*, 2017; Hamilton *et al.*, 2017). Estos genotipos relacionados con el haplogrupo 3 se designaron como genotipos caribeños en el sistema de nomenclatura de Microsatélite (Mercier *et al.*, 2011).

En México, un estudio de caracterización genética de *T. gondii* en cerdos realizado por Tipificación de Secuencias Multilocus (*MLST*, siglas en inglés) reveló la existencia de una alta diversidad genética de este protozoo. De los 33 genotipos secuenciados exitosamente con tres o más locis, 31 fueron únicos. Solo un genotipo tenía alelos Tipo I en los tres locis secuenciados (SAG1, SAG2 y SAG3) y se observó que los genotipos restantes eran tipos mixtos con combinaciones alélicas I/II/III/u-(n) (Cubas-Atienzar *et al.*, 2018).

En Brasil, se estudió intensamente un gran número de aislamientos de una variedad de animales de diferentes áreas, lo que reveló una alta diversidad genética. Pena *et al.* (2008) caracterizaron genéticamente 125 aislamientos de *T. gondii* procedentes de pollos, perros y gatos en Brasil e identificaron 48 genotipos, siendo únicos, 26 de estos aislamientos. Cuatro de los 48 genotipos con aislamientos múltiples de diferentes huéspedes y localizaciones se designaron como tipos BrI, BrII, BrIII y BrIV, y se consideraron linajes relativamente comunes en Brasil. En un estudio más reciente de 385 muestras de *T. gondii* en Brasil, se identificaron 106 genotipos, pero no hay una dominancia clara de ninguno de ellos (Shwab *et al.*, 2014). En una comparación global, se encontraron aislamientos brasileños en diferentes haplogrupos: 6; 14; 4; 8; 9 y 15, lo que indica la alta diversidad de *T. gondii* en Brasil (Su *et al.*, 2012). Sin embargo, aislamientos de los tipos II y III se encuentran con poca frecuencia en esta parte del continente (Moré *et al.*, 2012).

En un informe reciente, 37 muestras procedentes de Argentina se dividieron en 21 genotipos por PCR-RFLP, lo que indica una alta diversidad genética también en Argentina. Entre las 37 muestras, se identificaron cinco nuevos genotipos. La mayoría de las muestras se agruparon en el genotipo ToxoDB#2 (tipo III). Además, también se identificaron los genotipos ToxoDB#1 (Tipo II) y ToxoDB#3 (tipo II variante PRU).

Estos resultados sugieren una estructura poblacional única con una combinación de genotipos atípicos y los linajes tipos II y III comunes en Argentina (Bernstein *et al.*, 2018).

En Cuba se desconocen los genotipos de *Toxoplasma gondii* que circulan tanto en la población animal como humana. Este proyecto de tesis doctoral constituye el primer reporte de caracterización genética de *T. gondii* que circulan en cerdos domésticos destinados al consumo humano en Cuba.

1.5.4. África

Varios estudios genéticos sobre *T. gondii* en África también sugieren una estructura de población clonal con unos pocos linajes dominantes. De 381 cepas, aproximadamente el 94 % pertenecieron a cinco linajes clonales predominantes: tipo II, tipo III, África 1 (haplogrupo 6), África 3 (haplogrupo 14) y un grupo de cepas genéticamente muy cercano a las cepas pertenecientes al haplogrupo 13. Esto muestra claramente la estructura clonal de la diversidad genética de *T. gondii* en ambientes domésticos africanos (Galal *et al.*, 2018; Lukášová *et al.*, 2018; Shwab *et al.*, 2018).

1.5.5. Asia

Una revisión reciente de la distribución geográfica de los genotipos de *T. gondii* de 390 aislamientos o muestras de ADN extraídos de tejidos en Asia identificó 36 genotipos diferentes (Chaichan *et al.*, 2017). Existe una clara asociación de genotipos con áreas geográficas. En general, el genotipo ToxoDB#9 (chino 1, HG 13) es el linaje identificado con mayor frecuencia en el sudeste asiático, seguido del genotipo ToxoDB#10 (tipo I, HG 1) en la misma región. Hacia el noroeste de Asia, los genotipos ToxoDB#1 y ToxoDB#3 (colectivamente tipo II, HG 2) y ToxoDB#2 (tipo III, HG 3) se convierten en los linajes dominantes. A lo largo de la costa sur de Asia hasta el este de África, el genotipo ToxoDB#20 se identifica con mayor frecuencia (Chaichan *et al.*, 2017). De gran interés es el hallazgo del genotipo ToxoDB#9 (chino 1) de *T. gondii* en cerdos y otros huéspedes en China. Se encontró ToxoDB#9 en 20 de 27 (74 %) de aislamientos viables y 57 de 86 (78,6 %) muestras del ADN extraído de cerdos infectados en China. También es de interés el hallazgo de la cepa ToxoDB#10 (Tipo I clonal) en 18 de 76 (12,1 %) muestras del ADN extraído de tejidos de cerdos (Dubey *et al.*, 2020a). En general, los datos disponibles indican una diversidad genética relativamente baja de *T. gondii* en Asia (Chaichan *et al.*, 2017; Shwab *et al.*, 2018).

1.5.6. Australia

Los datos sobre diversidad genética de *T. gondii* en Australia son limitados. Los datos disponibles sugieren que el linaje tipo II es común en Australia tanto en animales domésticos como silvestres (Cooper *et al.*, 2015; Donahoe *et al.*, 2015; Brennan *et al.*, 2016).

1.6. Epidemiología de *Toxoplasma gondii* en cerdos domésticos

1.6.1. Contagio y transmisión de *T. gondii* en cerdos domésticos

La mayoría de las infecciones por *T. gondii* en cerdos se adquieren después del nacimiento, ya sea por ingestión de ooquistes esporulados en suelo, alimento y agua contaminados, o por ingestión de quistes en los tejidos de huéspedes intermediarios infectados (roedores, aves y canibalismo) (Dubey, 2009a). También, se ha reportado la transmisión galactógena de *T. gondii*, pero podría ser un evento raro (Basso *et al.*, 2017). Los cerdos también pueden infectarse prenatalmente por transmisión transplacentaria del parásito (Dubey, 2009a). Se supone que la infección a través de ooquistes es responsable de la mayoría de las infecciones en los sistemas convencionales de cría de cerdos y especialmente en los brotes de toxoplasmosis clínica que afectan a varios animales (Kim *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

1.6.2. Seroprevalencia

Las encuestas seroepidemiológicas han proporcionado evidencia de una distribución mundial de *T. gondii* en cerdos, con prevalencias que varían según la edad, las categorías de cerdos, la geografía y el sistema de crianza (Foroutan *et al.*, 2019; Dubey *et al.*, 2020a). En general, se observa una baja prevalencia de infección por *T. gondii* (<1 %) en cerdos criados en confinamiento y en condiciones de manejo controladas que impiden el acceso de roedores y gatos a las granjas, mientras que valores de seroprevalencia más altos (>60 %) se pueden encontrar tanto en granjas con condiciones de manejo extensivas como en crianzas de cerdos de traspasío (Dubey *et al.*, 2020a).

Una revisión sistemática y meta-análisis de la seroprevalencia en cerdos a nivel mundial concluyó que la seroprevalencia global combinada en cerdos es alrededor del 19 %, mostrando ciertas diferencias regionales (Foroutan *et al.*, 2019). Este estudio mostró que los valores de seroprevalencias combinados más altos para *T. gondii* en cerdos se obtuvieron en África (25 %; IC 95 %: 17-34 %), seguido de Norteamérica (25

%; IC 95 %: 19-33 %), Suramérica (23 %; IC 95 %: 17-30 %), Asia (21 %; IC 95 %: 16-26 %), y Europa (13 %; IC 95 %: 10-15 %) (Foroutan *et al.*, 2019).

La edad es un factor importante que afecta la seroprevalencia en cerdos porque la mayoría de los cerdos adquieren la infección después del nacimiento. Por tanto, la seroprevalencia de *T. gondii* ha sido consistentemente más alta en las reproductoras que en los cerdos de engorde (Dubey *et al.*, 2020a).

La edad fue identificada como un factor de riesgo por diversos autores en Brasil (de Sousa *et al.*, 2014; Minetto *et al.*, 2019), China (Wu *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014), Francia (Djokic *et al.*, 2016a; Djokic *et al.*, 2016b), Irlanda (Halová *et al.*, 2013), Italia (Papini *et al.*, 2017), España (García-Bocanegra *et al.*, 2010b; Castillo-Cuenca *et al.*, 2020), México (Cubas-Atienzar *et al.*, 2019), Cuba (Castillo-Cuenca *et al.*, 2021), Nigeria (Onyiche & Ademola, 2015), y Suiza (Berger-Schoch *et al.*, 2011a).

Otros factores de riesgo incluyen el acceso de gatos a instalaciones porcinas en Brasil (de Sousa *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2019), China (Tao *et al.*, 2011), México (Ortega-Pacheco *et al.*, 2013), Sur África (Tagwireyi *et al.*, 2019), y España (García-Bocanegra *et al.*, 2010b; García-Bocanegra *et al.*, 2010c; Castillo-Cuenca *et al.*, 2020), control de roedores (García-Bocanegra *et al.*, 2010a; Hill *et al.*, 2010; Marques-Santos *et al.*, 2017; Castillo-Cuenca *et al.*, 2020), clima, estación, geografía, sistema de manejo, tamaño de la granja y altitud a la que está ubicada la granja (Gauss *et al.*, 2006; Villari *et al.*, 2009; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012; Calero-Bernal *et al.*, 2016; Papatsiros *et al.*, 2016).

Solo se dispone de información limitada sobre las infecciones por *T. gondii* en cerdos criados orgánicamente en los Estados Unidos (EE. UU.), y otros pocos países. Es probable que la tendencia reciente de criar cerdos al aire libre (agricultura orgánica) aumente la seroprevalencia en los cerdos. En una pequeña muestra, 30 de 33 cerdos procedentes de dos granjas en Michigan, EE. UU., fueron seropositivos y se aisló *T. gondii* viable de los corazones de 17 de estos cerdos (Dubey *et al.*, 2012). Hay dos reportes de Europa sobre infecciones de *T. gondii* en cerdos criados orgánicamente. Se detectó una prevalencia muy alta de *T. gondii* en 21 cerdos de tres granjas orgánicas en Italia (Bacci *et al.*, 2015). Se encontraron anticuerpos contra *T. gondii* en 20 de 21 (95,2 %) muestras de jugo de carne, así como ADN de *T. gondii* en 12 de 21 (57 %) muestras utilizando 50 g de miocardio. En un estudio realizado en la República Checa, se

detectaron anticuerpos contra *T. gondii* en 9 de 48 (18,8 %), y ADN de *T. gondii* en 14 de 48 (29,2 %) muestras de diafragma de cerdos criados orgánicamente (Slany *et al.*, 2016).

La seroprevalencia de *T. gondii* en cerdos criados en traspatio es generalmente muy alta. Valores de seroprevalencias de 32-37 % se han reportado en Brasil (Magalhães *et al.*, 2017; Samico-Fernandes *et al.*, 2017; Minetto *et al.*, 2019), y de 16-45 % en México (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011, 2012, 2015).

1.6.3. Demostración de *T. gondii* en tejidos de cerdos naturalmente infectados

Toxoplasma gondii viables han sido aislados de tejidos de cerdos destinados al consumo humano en Brasil (Frazão-Teixeira *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2012; Feitosa *et al.*, 2014, 2017; Samico-Fernandes *et al.*, 2015; Miura *et al.*, 2019; Ribeiro-Andrade *et al.*, 2019; Melo *et al.*, 2020), Bélgica (Gisbert Algaba *et al.*, 2020), Francia (Djokic *et al.*, 2016a), Serbia (Kuruca *et al.*, 2016, 2017, 2019), EE.UU. (Velmurugan *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2012, 2020a) y China (Zhou *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012, 2013, 2016; Hou *et al.*, 2018a). La efectividad del aislamiento varió grandemente entre estos estudios probablemente debido a los procedimientos de ensayos biológicos empleados. Aunque las encuestas serológicas o parasitológicas basadas en muestras de matadero no proveen una estimación real del riesgo para los seres humanos, porque el almacenaje y otros tratamientos poscosecha pueden reducir o destruir a *T. gondii* (Hill *et al.*, 2004, 2006), se ha observado que la realización de encuestas serológicas para determinar el estatus de anticuerpos contra *T. gondii* en los cerdos muestreados antes de realizar el ensayo biológico ha incrementado la eficiencia de aislamiento de *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2020a).

1.6.4. Prevalencia de ADN de *T. gondii* en cerdos domésticos

La eficacia de detección de ADN depende de la cantidad de muestra usada para extraer ADN, método de concentración, tipo de PCR y los genes empleados en el PCR (Dubey *et al.*, 2020d). Por ejemplo, ADN de *T. gondii* fue detectado en 150 de 498 muestras de diafragma usando el elemento repetitivo 529 pb *versus* 134 muestras detectadas usando el gen B1 (Veronesi *et al.*, 2017). En un pequeño estudio, seis cerdos que fueron positivos a la Inmunofluorescencia con títulos de anticuerpos contra *T. gondii* >1:160 y negativos al PCR, fueron encontrados positivos por el método de

amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, siglas en inglés) (Triscioglio *et al.*, 2015).

1.6.5. Toxoplasmosis clínica en cerdos domésticos

Las infecciones por *Toxoplasma gondii* en cerdos suelen ser subclínicas; sin embargo, se han registrado varios casos de enfermedad clínica en todo el mundo después de una infección natural (Dubey *et al.*, 2020a). Las manifestaciones clínicas parecen ocurrir con mayor frecuencia en lechones recién nacidos y destetados, pero también se han descrito casos de toxoplasmosis clínica en cerdas. Los signos comunes observados en cerdos clínicamente infectados incluyen anorexia, apatía, fiebre, secreción ocular y nasal, disnea, cianosis, diarrea, debilidad en las extremidades, signos neurológicos y, en ocasiones, la muerte (Dubey, 2009a). Ninguno de estos signos es patognomónico de toxoplasmosis. Además, las infecciones por *T. gondii* pueden estar asociadas con fallas reproductivas en cerdas caracterizadas por aborto, momificación fetal, muerte fetal y mortalidad neonatal (Dubey, 2009b; Basso *et al.*, 2015; Lindsay & Dubey, 2020). Se cree que la enfermedad clínica ocurre sólo durante la fase aguda de la infección como resultado de procesos necróticos e inflamatorios durante la multiplicación de taquizoítos en varios tejidos.

Los animales infectados crónicamente no presentan signos clínicos, pero representan una importante fuente de infección para los humanos, en particular, si se consume carne de cerdo mal cocida o productos cárnicos insuficientemente tratados que contienen quistes tisulares (Almeria & Dubey, 2021). Se cree que diferentes factores influyen en la presentación clínica de la infección por *T. gondii* en cerdos, como la edad y el estado inmunitario del huésped, la coinfección con otros agentes, el estadio parasitario de *T. gondii* (es decir, ooquiste, quiste tisular), la dosis de infección, y la cepa o los antecedentes genéticos de *T. gondii* (Dubey, 2009a). En algunos casos, las infecciones virales como el Circovirus Porcino tipo 2 (Klein *et al.*, 2010) y el Parvovirus Porcino (Basso *et al.*, 2015) también se asociaron con manifestaciones clínicas de toxoplasmosis en cerdos.

Reportes anteriores a 2009 fueron resumidos previamente (Dubey, 2009a). Desde entonces, se han confirmado más casos de toxoplasmosis clínica en lechones lactantes en Brasil (Olinda *et al.*, 2016), en cerdos de engorde en China (Li *et al.*, 2010),

Alemania (Klein *et al.*, 2010) y Brasil (Olinda *et al.*, 2016) y en cerdas reproductoras con fallos reproductivos en Suiza (Basso *et al.*, 2015).

En China, las infecciones por *T. gondii* en cerdos son muy comunes y en varias ocasiones se han notificado brotes de toxoplasmosis clínica con muerte de numerosos cerdos (Li *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2017). Se notificó un brote grave de toxoplasmosis en cerdos de engorde en la provincia de Gansu, China, con una morbilidad que afectó al 57 % de los animales. Los cerdos presentaron fiebre, anorexia y depresión, y 19 cerdos afectados murieron. El análisis serológico mediante ELISA mostró resultados positivos para IgG e IgM contra *T. gondii* en el 92,2 % y 95,4 % de los animales, respectivamente. Se supuso que la fuente de infección era el alimento contaminado con heces de gato (Li *et al.*, 2010). El genotipo chino 1 (ToxoDB#9) se ha identificado en varios de los casos de toxoplasmosis clínica en China. Así, en 16 de 17 muestras de cerdos con sospecha de toxoplasmosis clínica que presentaron fiebre alta, disnea, hemorragia subcutánea, aborto, agrandamiento y necrosis del hígado y el bazo (Jiang *et al.*, 2013). Además, hay informes de brotes repetidos durante 5 años en una granja porcina individual en la provincia de Shandong (Li *et al.*, 2010). Desafortunadamente, no se realizó una caracterización molecular de los aislamientos involucrados en estos brotes. Los estudios en la provincia de Jiangsu, en el este de China, revelaron altas tasas positivas de infección por *T. gondii* en cerdos enfermos (que mostraron mal estado mental, fiebre y/o disnea) con un 46,8 % (66/141) de animales con PCR positivos en varios tejidos. En 58 cerdos se observó coinfección con otros patógenos, pero en siete animales *T. gondii* fue el único agente detectado. El análisis molecular de *T. gondii* de 17 cerdos enfermos mostró que *T. gondii* Chino 1 (ToxoDB#9) fue el genotipo detectado con mayor frecuencia (11/17) (Hou *et al.*, 2018b).

Curiosamente, muchos de estos casos de toxoplasmosis clínica en cerdos se han registrado en Asia (Japón, Taiwán, China, Corea, Tailandia), aunque existen reportes de toxoplasmosis clínica en cerdos de varios países del mundo (Dubey, 2009a). No se sabe si los genotipos específicos de *T. gondii* que circulan en Asia pueden ser más propensos a causar infecciones clínicas en cerdos (Basso *et al.*, 2017).

En otro estudio (Klein *et al.*, 2010), se diagnosticó toxoplasmosis sistémica en un cerdo de engorde de 3,5 meses de edad que padecía síndrome de emaciación multisistémica posdestete asociado con infección por PCV-2 en Alemania. El cerdo

tenía síntomas respiratorios severos y murió repentinamente. Inmunohistoquímicamente, se detectó *T. gondii* asociado a neumonía intersticial y necrosante, linfadenitis y necrosis suprarrenal. Se asumió que la inmunosupresión causada por la infección primaria por PCV-2 podría haber desencadenado una toxoplasmosis sistémica secundaria (Klein *et al.*, 2010).

Recientemente, *T. gondii* perteneciente al genotipo chino 1 (ToxoDB#9) se ha detectado en casos fatales aparentemente independientes de toxoplasmosis clínica en cerdos en Brasil (Olinda *et al.*, 2016). Los animales presentaron apatía, disnea, mal estado general y fallecieron a los pocos días. Las principales lesiones en los cerdos consistieron en neumonía broncointersticial necrotizante difusa grave asociada con numerosos taquizoítos de *T. gondii* presentes en las lesiones (Olinda *et al.*, 2016).

Contrariamente al vasto conocimiento sobre la importancia de la transmisión vertical de *T. gondii* en pequeños rumiantes y humanos, el papel de *T. gondii* como causante de trastornos reproductivos en las cerdas y el significado epidemiológico de las infecciones intrauterinas y galactogénicas en lechones sin signos clínicos son menos entendidos (Basso *et al.*, 2017). Los reportes de fallas reproductivas debido a toxoplasmosis e infección congénita en lechones están bien documentados, pero la reproducción experimental de transmisión vertical en cerdas gestantes a menudo no ha tenido éxito (Basso *et al.*, 2017). En general, las cerdas que abortan o paren crías infectadas no suelen mostrar más signos clínicos, pero en algunas ocasiones se observa fiebre, anorexia, signos neurológicos e incluso la muerte en cerdas que abortan y transmiten la infección a los fetos (Kim *et al.*, 2009). En China, los abortos causados por *T. gondii* en las cerdas se consideran comunes y se plantea que causan pérdidas económicas (Pan *et al.*, 2017). En Europa, los informes de problemas reproductivos debido a la infección por *T. gondii* en cerdos son escasos. Un gran estudio epidemiológico en 94 granjas de cría de cerdos en Alemania sugirió una asociación de *T. gondii* con fallas reproductivas en las cerdas. La seroprevalencia de *T. gondii* dentro de la granja fue significativamente mayor en las granjas que experimentaron trastornos reproductivos que en las granjas sin tales problemas, pero el papel de *T. gondii* en la causa de estos problemas reproductivos no fue significativo (Damriyasa *et al.*, 2004). Recientemente, se detectó *T. gondii* en placenta y fetos de 34 de 113 cerdas que habían abortado o dado a luz a una gran cantidad de lechones nacidos muertos o débiles en Suiza (Basso *et al.*, 2015).

1.7. Epidemiología de *Toxoplasma gondii* en jabalíes

1.7.1. Seroprevalencia

La seroprevalencia varía mucho y depende de varios factores, incluidos la edad, la geografía, el manejo y el método de muestreo. La mayoría de los datos proceden de jabalíes cazados. La seroprevalencia generalmente es baja en algunas muestras de verracos de granjas en China (9,9 %) (Bai *et al.*, 2017), Dinamarca (28,0 %) (Laforet *et al.*, 2019), Finlandia (33,0 %) (Jokelainen *et al.*, 2012), Letonia (20,3 %), (Deksne & Kirjušina, 2013) y Ucrania (6,6 %) (Galat *et al.*, 2018). En los EE.UU. hay millones de jabalíes. Dos encuestas nacionales revelaron una seroprevalencia de alrededor del 27 % (Hill *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2020a). La edad y la geografía fueron factores determinantes para la seroprevalencia de *T. gondii*. La prevalencia fue mayor en adultos que en juveniles, lo que indica transmisión posnatal de *T. gondii*. Las seroprevalencias fueron más altas en los estados del sur que en los estados del oeste; lo que refleja que el clima cálido y seco en los estados del oeste podría afectar negativamente la supervivencia de los ooquistes de *T. gondii* (Hill *et al.*, 2014). Las seroprevalencias y el aislamiento de *T. gondii* viables fueron mayor en los cerdos de Hawái, donde el genotipo de *T. gondii* fue diferente al de los cerdos de otras áreas (Dubey *et al.*, 2020a).

Una revisión sistemática y metaanálisis acerca de la seroprevalencia global de *T. gondii* entre los jabalíes constató que la seroprevalencia a nivel mundial fue del 23 %. Asimismo, reflejó que los valores de seroprevalencia fueron del 32 % en Norteamérica, 26 % en Europa, 13 % en Asia y 5 % en Suramérica. Además, mostró que la edad y la geografía fueron factores determinantes para la seroprevalencia de *T. gondii* en jabalíes (Rostami *et al.*, 2017).

1.7.2. Demostración de *T. gondii* en tejidos de jabalíes

Toxoplasma gondii viables han sido aislados de tejidos de jabalíes en Francia (Richomme *et al.*, 2009), Malasia (Puvanesuaran *et al.*, 2013) y Estados Unidos (Dubey *et al.*, 2020a). En una encuesta nacional en EE. UU., se aisló *T. gondii* viable de 78 de 1 517 jabalíes muestreados entre 2012 y 2017 en 21 estados. La caracterización genética realizada en este estudio reveló 15 genotipos toxoDB diferentes, siendo el genotipo toxoDB#5 (HG 12) el más frecuentemente aislado, representando el 55 % (43/78) de los aislados, seguido por el genotipo toxoDB#24 que representó el 14 % (11/78). Los autores concluyeron que *T. gondii* muestra una diversidad genética moderada en jabalíes

en los EE.UU., con el genotipo toxoDB#5 (HG 12) dominante en los EE.UU. continentales, mientras que el genotipo toxoDB#24 (10/14) fue dominante en Hawái, sugiriendo estructuras de población de *T. gondii* diferentes para dos localizaciones geográficas distintas (Dubey *et al.*, 2020a).

1.7.3. Prevalencia de ADN de *T. gondii* en tejidos de jabalíes

Se ha detectado ADN de *T. gondii* en diferentes tejidos de jabalíes en algunos países de Europa (Dubey *et al.*, 2020a). La prevalencia de ADN en los tejidos fue de 8,8 % (35/396) en la República Checa (Slany *et al.*, 2016), 15 % (5/61) en España (Calero-Bernal *et al.*, 2015), y entre 0,7 % - 16,2 % en Suiza (Berger-Schoch *et al.*, 2011a; Ferroglio *et al.*, 2014; Battisti *et al.*, 2018).

1.7.4. Toxoplasmosis clínica en jabalíes

No existen muchos datos de la relevancia clínica de la toxoplasmosis en jabalíes. Se ha documentado un caso de transmisión congénita con alteraciones reproductivas en España (Calero-Bernal *et al.*, 2013). Se produjeron malformaciones fetales y se comprobó, mediante PCR anidada con el gen B1, la presencia de ADN de *T. gondii* en muestras de corazón y diafragma de la cerda y en el sistema nervioso central, corazón, pulmón, lengua y diafragma fetal. La caracterización genética utilizando 5 marcadores moleculares reveló que la cerda tenía una infección mixta de *T. gondii* tipos I y III (Calero-Bernal *et al.*, 2013).

1.8. Epidemiología de *Toxoplasma gondii* en los seres humanos

1.8.1. Contagio y transmisión de *T. gondii* en los seres humanos

La transmisión de *T. gondii* en los seres humanos, puede resultar de la ingestión de quistes tisulares en carne cruda o poco cocida de animales infectados, ingestión de vegetales crudos o agua contaminada con ooquistes de *T. gondii*, y por transmisión vertical o transplacentaria (Figura 2) (Almeria & Dubey, 2021). La transmisión transplacentaria o vertical de la madre al feto ocurre cuando los taquizoítos atraviesan la placenta durante el embarazo y pueden causar infección fetal (toxoplasmosis congénita). El riesgo de transmisión vertical aumenta con la edad gestacional durante el embarazo (Rostami *et al.*, 2020).

La mayoría de las transmisiones horizontales a los seres humanos se deben a la ingestión de quistes tisulares en la carne infectada o a la ingestión de suelo, agua o

alimentos contaminados con ooquistes esporulados derivados del medio ambiente (Shapiro *et al.*, 2019; Almeria & Dubey, 2021). Se desconoce la importancia relativa de las transmisiones a través de quistes tisulares *versus* ooquistes en una población dada, excepto en el caso de brotes con una fuente de infección bien definida (Shapiro *et al.*, 2019). El descubrimiento de una proteína específica de esporozoítos u ooquistes, que provocó la producción de anticuerpos y diferenció la infección experimental inducida por ooquistes *versus* quistes tisulares en cerdos y ratones, puede ayudar a resolver ese problema (Hill *et al.*, 2011). Los anticuerpos séricos contra la proteína del esporozoíto se detectaron en humanos dentro de los 6 a 8 meses posteriores a una infección inicial adquirida por ooquistes. Por lo tanto, este ensayo serológico podría ser útil para conducir estudios epidemiológicos que permitan diferenciar la infección por ooquistes *versus* quistes en los tejidos de los huéspedes intermediarios (Milne *et al.*, 2020a).

El consumo de carne cruda o poco cocida contaminada con quistes de *T. gondii* procedente de animales de granja, es un factor de riesgo importante para la infección por *T. gondii* en humanos (Dubey *et al.*, 2020a, 2020b, 2020c, 2020d, 2020e, 2020f, 2020g, 2020h, 2020i; Almeria & Dubey, 2021). Un estudio multicéntrico europeo de caso-control de más de dos décadas de realizado, reportó que del 30-63 % de las infecciones en mujeres embarazadas se atribuyeron al consumo de carne con quistes en los tejidos, mientras que del 6-17 % probablemente se transmitieron por el suelo (Cook *et al.*, 2000). Recientemente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, siglas en Inglés) sugirió que la transmisión a través de la carne representa alrededor del 60 % de las infecciones por *T. gondii* y que las principales fuentes contribuyentes son las carnes contaminadas de vacuno, cerdo y pequeños rumiantes (Koutsoumanis *et al.*, 2018).

Las infecciones por *T. gondii* son más prevalentes en carne de cordero y cerdo que en carne de res y pollo. Dentro de las carnes, la carne de oveja presenta el mayor riesgo de infección por *T. gondii* para los seres humanos (Belluco *et al.*, 2016, 2018; Boughattas, 2017; Lafrance-Girard *et al.*, 2018). En una revisión sistemática de la prevalencia de *T. gondii* en animales de carne en todo el mundo, los resultados mostraron una prevalencia combinada para bovinos, porcinos y ovinos de 2,6 %, 12,3 % y 14,7 % (Belluco *et al.*, 2016). Un estudio reciente realizado en carnes que se expenden en tiendas minoristas de Escocia encontró ADN de *T. gondii* en 1/21 (4,8 %) muestras de pollo, 3/71 (4,2 %) muestras de cerdo, 6/87 (6,9 %) muestras de cordero, pero no en

39 muestras de carne de res (Plaza *et al.*, 2020). Los resultados de la detección de *T. gondii* en productos cárnicos en tiendas minoristas son interesantes, ya que los productos infectados están disponibles directamente para el consumo humano en comparación con las muestras de los mataderos (Almeria & Dubey, 2021).

Como se indicó con anterioridad, la carne de cerdo contaminada se considera una fuente importante de infección por *T. gondii* (Cook *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2020a, 2020i; Almeria & Dubey, 2021). Un estudio en los Estados Unidos estimó que el 41 % de los casos de toxoplasmosis transmitida por los alimentos eran atribuibles al consumo de carne de cerdo, lo que la convierte en una fuente importante de infección (Batz *et al.*, 2012). Los cerdos, al ser omnívoros, pueden infectarse con *T. gondii* al ingerir agua, comida y suelo contaminados con ooquistes esporulados, pero también al ingerir animales que albergan quistes tisulares de *T. gondii*, como aves y roedores; los cerdos criados al aire libre tienen más probabilidades de infectarse que los criados en intensivo (Kijlstra *et al.*, 2004; van der Giessen *et al.*, 2007). La contaminación de la carne de cerdo con quistes de *T. gondii* ha disminuido a lo largo de los años, pero la producción de cerdos orgánicos podría cambiar esa tendencia (Kijlstra & Jongert, 2009; Limon *et al.*, 2017). *T. gondii* viables se han aislado en tejidos de cerdos orgánicos destinados al consumo humano. Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa de Captura Magnética (MC-qPCR, siglas en inglés) se analizaron 914 corazones procedentes de cerdos orgánicos de los cuales 92 fueron positivos. Asimismo, 9 de 14 corazones fueron positivos mediante bioensayo en ratón (Gisbert Algaba *et al.*, 2020).

La carne de res puede contribuir a los casos humanos debido a la mayor probabilidad de consumirse cruda o poco cocida en comparación con la carne de cerdo (Belluco *et al.*, 2018; Koutsoumanis *et al.*, 2018). El riesgo de adquirir *T. gondii* por la ingestión de carne de res se ha debatido durante décadas, puede variar según los países y necesita más investigación (Opsteegh *et al.*, 2011, 2019; Burrells *et al.*, 2018; Blaga *et al.*, 2019). La prevalencia de *T. gondii* en carne vacuna es baja. *Toxoplasma gondii* viables se han aislado mediante ensayo biológico en ratón de solo 2 corazones de 200 bovinos adultos seropositivos en Francia (Blaga *et al.*, 2019). En otro estudio, 6 de 385 hígados fueron positivos al ensayo biológico en ratón (Opsteegh *et al.*, 2019). Hasta la fecha no se ha aislado *T. gondii* viable en búfalos de agua considerándose mínimo el riesgo de infección humana por consumo de carne de búfalo (Bãrburaș *et al.*, 2019).

Sin embargo, la prevalencia de *T. gondii* en pollos vivos no es directamente proporcional al riesgo de transmisión de la carne de pollo infectada, porque la carne de pollo generalmente se cocina bien y se compra congelada. Ambos modos de actuación pueden reducir el riesgo de infección en los seres humanos (Guo *et al.*, 2015). Los pollos criados en extensivo se usan como centinelas porque son buenos indicadores de contaminación y distribución ambiental de ooquistes de *T. gondii*, pues bajo este sistema de crianza los pollos se alimentan del suelo (Dubey *et al.*, 2020c).

La carne de otras especies animales (cabras, caballos y burros) también pueden ser fuente de infección humana (Dubey *et al.*, 2020e, 2020g, 2020h), así como la carne de caza, especialmente la carne de venado (Dubey *et al.*, 2020i). Muestras de tejidos de jabalíes del sur de Italia mostraron una alta prevalencia y carga parasitaria (Santoro *et al.*, 2019). En Irlanda, el parásito se ha detectado en la carne de venado (Halová *et al.*, 2013) y la alta presencia de ADN del parásito observada en estas carnes en tiendas minoristas de Escocia, reveló que esta carne es potencialmente de alto riesgo para los seres humanos (Plaza *et al.*, 2020). De hecho, los brotes más recientes de toxoplasmosis clínica se han relacionado con la ingestión de carne semicocida de venado (Gaulin *et al.*, 2020; Schumacher *et al.*, 2021).

La leche de cabra sin pasteurizar, las verduras, las plantas y el agua contaminadas con ooquistes también se han relacionado con la transmisión de *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000; Jones & Dubey, 2010, 2012; Hill & Dubey, 2016; Koutsoumanis *et al.*, 2018). En el pasado se reportaron brotes de toxoplasmosis relacionados con el consumo de leche de cabra no pasteurizada (Sacks, 1982; Chiari & Neves, 1984). Sobre la base de infecciones experimentales, se han aislado *T. gondii* viables en leche y queso fresco de cabra (Dubey *et al.*, 2014). Por otro lado, cuando se utilizó leche cruda de ovejas naturalmente infectadas para elaborar queso de manera artesanal, no se encontró *T. gondii* viable (Ranucci *et al.*, 2020). Recientemente se vinculó un brote de toxoplasmosis a la ingestión de queso fresco artesanal elaborado con leche de vaca. Sin embargo, el agua contaminada pudo haber sido la fuente probable del parásito (Costa *et al.*, 2020). Hasta la fecha la leche bovina no se ha relacionado con la toxoplasmosis transmitida por la leche (Boughattas, 2017).

El consumo de vegetales crudos es un factor de riesgo importante para la infección por *T. gondii* (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011; Ekman *et al.*, 2012). Varias

encuestas realizadas a vegetales encontraron contaminación por ooquistes de *T. gondii* (revisado por Almeria & Dubey, 2021).

La contaminación por ooquistes también puede ocurrir debido al consumo de mariscos. Los bivalvos, como los mejillones y las ostras, como filtradores, acumulan y concentran ooquistes de *T. gondii* y podrían usarse para el biomonitorio de la contaminación de los ecosistemas acuáticos (Marquis *et al.*, 2019; Rousseau *et al.*, 2019; Géba *et al.*, 2020). Es importante destacar que se ha informado la detección de *T. gondii* en mejillones y ostras comerciales (Cong *et al.*, 2017; Coupe *et al.*, 2018; Tedde *et al.*, 2019). Estos resultados son de interés ya que algunos moluscos son consumidos generalmente crudos por humanos y mamíferos marinos, todos sensibles a la infección por *T. gondii* como se indicó con anterioridad.

Los trasplantes de órganos y las inyecciones accidentales a nivel de laboratorio, también son importantes vías potenciales de transmisión de la infección por *T. gondii* (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Varios estudios han reportado casos de toxoplasmosis adquirida varios días después de haberse realizado el trasplante de órgano. Asimismo, estos estudios plantean que la tasa de incidencia de toxoplasmosis adquirida postrasplante es mayor en las personas que reciben trasplantes del corazón que aquellas que han recibido trasplantes de hígado o riñón (Campbell *et al.*, 2006; Fernandez-Sabe *et al.*, 2012). Hasta la fecha se han descrito catorce casos de toxoplasmosis de origen parenteral por contaminación de laboratorio (Herwaldt, 2001). La mayoría de los casos se atribuyeron a lesiones por pinchazo con agujas al manipular taquizoítos de la cepa RH. El riesgo de transmitir la infección a través de una transfusión de sangre es teóricamente posible si el donante ha adquirido recientemente una infección por *Toxoplasma* y está parasitémico en el momento de la extracción de sangre. De manera similar, es posible un riesgo asociado con la médula ósea si el donante es parasitémico en el momento de la recolección (Schwenk *et al.*, 2021). Sin embargo, la duración máxima de la diseminación de taquizoítos a través del flujo sanguíneo apenas se conoce en humanos; puede depender de la cepa del parásito y de la respuesta inmunitaria del huésped. Se detectó ADN del parásito en nueve de 17 pacientes durante cinco semanas después de una toxoplasmosis aguda con linfadenopatía (Guy & Joynton, 1995). En un modelo de ratón, también se demostró parasitemia por PCR durante tres semanas después de la infección oral (Paugam *et al.*, 1995).

1.8.2. Seroprevalencia

En general, se asume que aproximadamente el 30 % de la población mundial está infectada por *Toxoplasma* (Almeria & Dubey, 2021). En realidad, las prevalencias varían mucho entre países de diferentes regiones (0,7 % - 92 %) y, a menudo, en países de una misma región e incluso en diferentes regiones dentro de un mismo país (Dubey, 2009a; Rostami *et al.*, 2020). Las prevalencias más altas fueron observadas en Suramérica (56,2 %) y en países tropicales de África (48,7 %), y las más bajas en la región del pacífico occidental (11,8 %). Sin embargo, valores de seroprevalencia moderados se han reportado en Europa (31,2 %), Norteamérica (28,2 %), y el Sudeste Asiático (23,4 %) (Rostami *et al.*, 2020).

Muchos factores pueden afectar la seroprevalencia de *T. gondii* en humanos. Se considera que los factores climáticos juegan un rol importante pues éstos afectan la supervivencia de los ooquistes en el medio ambiente y, por lo tanto, las tasas de infección en los animales productores de carne. Aunque los países tropicales con clima cálido y húmedo muestran prevalencias más altas que los países de clima árido, templado y frío, los factores antropogénicos explican gran parte de las variaciones en la seroprevalencia en los seres humanos (Rostami *et al.*, 2020).

Entre esos factores se incluyen los niveles de los servicios sanitarios y de salud pública, estatus económico (nivel de ingresos e índice de desarrollo humano), culturales (hábitos alimentarios: método de cocción de las carnes, lavado de las manos, tipos de carnes o vegetales consumidos, limpieza de vegetales, etc.) y sociales. La seroprevalencia aumenta con la edad, pero la tasa de adquisición de la infección en relación con la edad varía según el país y el nivel socioeconómico. Se puede alcanzar una seroprevalencia casi máxima en la infancia en poblaciones que viven en malas condiciones higiénicas, probablemente vinculadas a la ingestión de ooquistes procedentes de suelos y aguas contaminadas (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; Jones & Dubey, 2010; Rostami *et al.*, 2020). Por ejemplo, algunos países africanos donde las tasas de prevalencia fueron más altas, incluidos Madagascar, Ghana, Camerún y el Congo, muestran pobreza extrema, bajos niveles de ingresos y bajo índice de desarrollo humano, que están asociados con servicios sanitarios y sistemas de salud pública inadecuados (Rostami *et al.*, 2020). En una ciudad ubicada en el norte del estado de Río de Janeiro, Brasil, la seroprevalencia ajustada por edad fue del 84 % para el grupo de nivel socioeconómico bajo, frente a seroprevalencias del 62 % y 23 % para los niveles

socioeconómicos medio y alto, respectivamente (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). La mayoría de las personas en la población del nivel socioeconómico más bajo se infectaron a la edad de 15 años, mientras que la infección se adquirió mayoritariamente después de los 20 años en la población del nivel socioeconómico más alto. En un análisis multivariado de factores de riesgo, esto se atribuyó a diferencias en el suministro de agua, con las poblaciones más pobres viviendo en áreas abastecidas con agua sin filtrar. Estos diferentes patrones de adquisición de *Toxoplasma* según los niveles socioeconómicos pueden ser más relevantes en los países tropicales subdesarrollados (Shapiro *et al.*, 2019; Rostami *et al.*, 2020). Las razones específicas de las altas tasas de prevalencia de toxoplasmosis latente en algunos países africanos y sudamericanos podrían incluir (1) un número relativamente grande de gatos y diversos genotipos de *T. gondii* en estas áreas; (2) la falta de medidas de control para los gatos callejeros que viven en áreas urbanas y periurbanas; y (3) altos niveles de contaminación del medio ambiente (suelo y agua) y/o alimentos con ooquistes de *T. gondii* (Ferreira *et al.*, 2018; Shapiro *et al.*, 2019).

1.8.3. *Toxoplasmosis clínica en los seres humanos*

La infección por *T. gondii* en humanos presenta varias entidades clínicas, que incluyen a saber: la toxoplasmosis adquirida durante el embarazo o congénita en el feto, la toxoplasmosis adquirida o reactivada en pacientes inmunodeficientes, la toxoplasmosis ocular y las adquiridas por pacientes inmunocompetentes. *Toxoplasma gondii* es particularmente importante en personas inmunodeprimidas y mujeres embarazadas. En mujeres seronegativas, las infecciones primarias durante el embarazo pueden provocar abortos espontáneos, muerte fetal, mortinatos y descendencia infectada congénitamente. Los bebés con infección congénita pueden sufrir problemas neurológicos, retraso mental, sordera y/o lesiones oculares (Dubey 2009a; Weiss & Dubey, 2009; McLeod *et al.*, 2020). En personas inmunocomprometidas, particularmente en pacientes con VIH (siglas en Inglés) e inmunodeprimidos, el parásito puede causar toxoplasmosis potencialmente mortal, que generalmente se presenta como encefalitis, miocarditis, neumonitis y oftalmítis graves (Gomez-Marin & De-la-Torre, 2020; McLeod *et al.*, 2020). En la mayoría de los pacientes con VIH, la toxoplasmosis es el resultado de la reactivación de una infección asintomática crónica, pero también se han notificado casos de toxoplasmosis graves en pacientes con VIH que adquirieron la infección por *T. gondii* recientemente (McLeod *et al.*, 2020). La infección por *T. gondii*

también parece ser un problema en los pacientes con cáncer inmunocomprometidos, particularmente en aquellos con leucemia (Abdollahi *et al.*, 2022) y en personas inmunodeprimidas debido a tratamientos prolongados con corticosteroides u otra terapia inmunosupresora, como los pacientes trasplantados, que podrían provocar la reactivación de quistes tisulares contenidos en el órgano trasplantado (Schwenk *et al.*, 2021). Otra entidad clínica importante es la toxoplasmosis ocular, la etiología más común de la uveítis posterior, que puede resultar de una infección congénita durante el embarazo o de una infección adquirida posnatalmente (Murat *et al.*, 2013a). De hecho, las infecciones adquiridas después del nacimiento representan la mayor parte de las afecciones oculares (Ozgonul & Besirli, 2017; Gomez-Marin & De-la-Torre, 2020; McLeod *et al.*, 2020).

Aunque la infección con *T. gondii* es usualmente asintomática en personas inmunocompetentes, también se han reportado casos severos y agudos en estas personas (Leroy *et al.*, 2020; Martinot *et al.*, 2020). Hay diversas publicaciones que asocian epidemiológicamente la infección por *T. gondii* con enfermedades psiquiátricas tales como: esquizofrenia, trastorno bipolar, trastornos obsesivos-compulsivos, intentos suicidas y Alzheimer (Flegr & Horáček, 2017; McLeod *et al.*, 2020; Nayeri *et al.*, 2021). Sin embargo, aún se requiere valorar si los resultados hasta ahora disponibles brindan suficiente apoyo para explicar una relación causal o si se pueden dar explicaciones alternativas a estas asociaciones (Fuglewicz *et al.*, 2017; Sutterland *et al.*, 2019; McLeod *et al.*, 2020).

1.9. Diagnóstico de *Toxoplasma gondii*

*1.9.1. Diagnóstico de *T. gondii* en animales de granjas*

En los animales de granja, las pruebas serológicas son la estrategia de primera línea para llegar a un diagnóstico, mientras que los métodos de PCR son muy específicos, sensibles y útiles para el diagnóstico en tejidos de animales. El bioensayo o ensayo biológico es el método de referencia utilizado para confirmar la viabilidad del parásito. Sin embargo, aunque el bioensayo es un método preciso y confiable para detectar *T. gondii* viable, requiere mucho tiempo y recursos (Guo *et al.*, 2015). Debido a esto, se alienta el empleo de métodos de cultivo celular para probar la viabilidad de *T. gondii* (Rousseau *et al.*, 2019; Opsteegh *et al.*, 2020).

En los animales destinados a la producción de alimentos, la detección serológica ayuda a identificar granjas y animales positivos a *Toxoplasma* (Koutsoumanis *et al.*, 2018). La detección de anticuerpos indicaría que el animal tuvo contacto con el parásito, pero no necesariamente implica que el parásito esté presente y sea viable en ese animal. Muchos ensayos serológicos están disponibles para la detección de anticuerpos contra *T. gondii* tanto en suero como en jugo de carne procedentes de animales destinados a la producción de alimentos. Estos ensayos serológicos que se utilizan comúnmente en estudios epidemiológicos incluyen pruebas de determinación directa e indirecta de anticuerpos contra *T. gondii*. Dentro de las primeras podemos relacionar las que siguen: prueba de aglutinación en látex (LAT, siglas en inglés), y la prueba de aglutinación modificada (MAT, siglas en inglés). Dentro de las segundas encontramos la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT, siglas en inglés), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA, siglas en inglés). Algunas pruebas, incluidas IFAT, ELISA y LAT, están disponibles comercialmente. IFAT es una técnica bien establecida para detectar anticuerpos anti-*T. gondii* en diferentes especies animales, pero requiere conjugado y no está automatizada. Los conjugados y anticuerpos secundarios específicos de la especie a menudo no están disponibles para muchas especies y, por esa razón, muchos estudios, particularmente en especies de vida silvestre, se basan en técnicas de ELISA competitivas (cELISA, siglas en inglés) y MAT que no necesitan anticuerpos secundarios específicos de la especie. Para los cELISA, el principio de competencia hace que esta prueba pueda ser utilizada en cualquier otra especie; sin embargo, los datos de validación aún no están disponibles para muchas especies.

Recientemente se estableció un ensayo multiplex basado en perlas que utiliza tecnología Luminex de alta sensibilidad y especificidad (Fabian *et al.*, 2020), así como un ensayo de captura de anticuerpos ligados a luciferasa (LACA) para la detección de *T. gondii* en pollos (Duong *et al.*, 2020). La serotipificación basada en el reconocimiento específico de anticuerpos y antígenos utilizando péptidos polimórficos también se ha descrito como un método de tipificación para las cepas de *T. gondii* en animales (Holec-Gaşior *et al.*, 2019). Los microarrays de proteínas podrían ser útiles en procesar para el análisis de anticuerpos en jugo de carne y suero para un alto rendimiento de muestras para animales sacrificados (Loreck *et al.*, 2020).

La especificidad, la sensibilidad y el valor de corte de las pruebas serológicas no se han evaluado en muchas especies animales. Un proyecto de investigación europeo centrado en la detección de *T. gondii* en animales de granja concluyó que los métodos serológicos actualmente disponibles para cerdos, aves de corral y pequeños rumiantes, son útiles para identificar rebaños o animales de alto riesgo (Opsteegh *et al.*, 2016). Sin embargo, un resultado negativo en una prueba indirecta no puede usarse para declarar que la carne es segura. Por otro lado, en bovinos y equinos, la detección de anticuerpos basada en MAT y, posiblemente, el cribado serológico en general, no se recomiendan como indicador de la presencia de *T. gondii* viable y se prefieren los métodos de detección directa (Opsteegh *et al.*, 2016, 2019). Por lo tanto, se debe implementar la confirmación de los resultados serológicos, incluyendo técnicas moleculares y ensayos biológicos (Almeria & Dubey, 2021).

La infección por *T. gondii* debería ser incluida en el diagnóstico diferencial de rebaños con historial de trastornos reproductivos. Un resultado serológico positivo en fluidos de fetos abortados en rumiantes confirmaría la infección por el parásito, ya que los anticuerpos no atraviesan la placenta. La ausencia de anticuerpos en la madre que aborta excluye la toxoplasmosis, pero un resultado positivo no confirma que *T. gondii* sea la causa del aborto; otros agentes causales de abortos tendrán que ser excluidos de la etiología. Para llegar a un diagnóstico, se debe incluir el estado serológico de los animales del rebaño para identificar rebaños o animales de alto riesgo.

La detección en tejidos se puede realizar por histología y demostración microscópica de parásitos en tejidos teñidos, incluida inmunohistoquímica, pero con baja sensibilidad. Por otra parte, esa confirmación también podría realizarse mediante técnicas biomoleculares. Un resultado positivo en tejidos fetales mediante PCR podría confirmar la infección por *T. gondii*, pero la presencia de ADN del parásito deberá relacionarse con el estado epidemiológico de la infección por *T. gondii* de todo el rebaño. Las técnicas moleculares incluyen PCR convencional, PCR anidado y PCR en tiempo real, para las regiones repetitivas del gen B1 de 35 copias (Burg *et al.*, 1989) y el elemento repetitivo de 529 pb de 300 copias de *T. gondii* siendo los genes dianas utilizados con mayor frecuencia para PCR en humanos y animales (Homan *et al.*, 2000; Reischl *et al.*, 2003). La tecnología de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) también se ha aplicado para la detección rápida de *T. gondii* en carne de cerdo (Zhang *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2013; Zhuo *et al.*, 2015) y es importante destacar que

existe un ensayo LAMP comercial. Para la confirmación de la presencia de *T. gondii* viable en tejidos de un animal seropositivo, el ensayo biológico es el método de referencia (Opsteegh *et al.*, 2016), pero debemos tener en cuenta las desventajas citadas con anterioridad.

La detección del parásito en carne de especies para consumo humano es de interés y se han evaluado algunos métodos alternativos que utilizan fluido cardíaco para estudios de toxoplasmosis en carnes (Halos *et al.*, 2010; Villena *et al.*, 2012). Se desarrolló un método MC-qPCR para la detección y cuantificación de *T. gondii* en muestras de carne dirigido al elemento repetitivo 529 pb (Opsteegh *et al.*, 2010). El límite de detección de este ensayo fue aproximadamente de 230 taquizoítos/bradizoítos por cada 100 g de muestra de carne. Los resultados obtenidos con el método PCR fueron comparables a los resultados de los ensayos biológicos de cerdos infectados experimentalmente y a los hallazgos serológicos obtenidos en ovejas (Opsteegh *et al.*, 2010). Este método fue modificado por Gisbert Algaba *et al.* (2017) quienes agregaron un control de inhibición no competitivo a la PCR e hicieron que la liberación del ADN diana de las perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina dependiera de los rayos ultravioletas (UV). Los autores recién citados validaron este método en cerdos (Gisbert Algaba *et al.*, 2017). Los métodos LAMP también se han utilizado para detectar *T. gondii* en otros animales productores de carne. Zhang *et al.* (2009) encontraron una mayor sensibilidad para LAMP (85,7 %) comparada con la sensibilidad mostrada por la PCR convencional (76,9 %); ambas técnicas estaban diseñadas para detectar el elemento repetitivo 529 pb en muestras de ganglios linfáticos de cerdos. Qu *et al.* (2013) informaron un método LAMP de transcripción inversa para 18S rRNA en muestras de carne de cerdo con un límite de detección de un taquizoíto en un gramo de carne de cerdo. Zhuo *et al.* (2015) desarrollaron otro método LAMP basado en la detección de ITS-1 para cerdo con un límite de detección de 0,9 fg de ADN genómico de *T. gondii*, mostrando de esa manera una sensibilidad 10 veces mayor que la PCR convencional. Sin embargo, la prevención de la contaminación mientras se realiza LAMP podría ser un problema importante (Guo *et al.*, 2015).

1.9.2. Diagnóstico en los seres humanos

El diagnóstico biológico de la toxoplasmosis suele ser difícil y de suma importancia porque las características clínicas no son suficientes para discriminar entre la toxoplasmosis y otras enfermedades (Dard *et al.*, 2016). Asimismo, el diagnóstico de

la toxoplasmosis es crucial en la instauración exitosa de estrategias de tratamiento, prevención y control de la enfermedad (McLeod *et al.*, 2020). Aunque el diagnóstico de la infección aguda activa se puede hacer sobre la base de pruebas serológicas, histopatología, aislamiento de *T. gondii* o PCR de una variedad de muestras (p. ej., líquido céfalo raquídeo, placenta, tejidos fetales o sangre periférica) (McLeod *et al.*, 2020), las pruebas serológicas son las herramientas biológicas más utilizadas para el diagnóstico de la toxoplasmosis en todo el mundo (Dard *et al.*, 2016).

En la actualidad se dispone de una amplia gama de técnicas serológicas para la detección de inmunoglobulinas específicas de *T. gondii*. Estas técnicas varían según la metodología, antígenos utilizados e isotipo de inmunoglobulina detectado (Weiss & Dubey, 2009). Las principales metodologías son la prueba de tinción Sabin-Feldman (DT, siglas en inglés), ELISA, el ensayo de aglutinación inmunoabsorbente (ISAGA, siglas en inglés), los ensayos de hemaglutinación indirecta (IHA, siglas en inglés), IFAT, MAT, Western Blot (WB, siglas en inglés) y prueba de avididad de la IgG (Liu *et al.*, 2015).

La automatización de numerosas técnicas combinadas con kits disponibles comercialmente ha facilitado la realización de ensayos serológicos, haciéndolos accesibles en muchos países del mundo. Los laboratorios locales generalmente realizan exámenes serológicos utilizando métodos automatizados. La interpretación de los resultados serológicos a veces es compleja y puede requerir pruebas complementarias en laboratorios de referencia (Villard *et al.*, 2016). Estas técnicas requieren mucho tiempo, capacitación personal y técnicas adicionales, pero a menudo brindan resultados cruciales en situaciones clínicas críticas. La detección temprana de inmunoglobulinas se logra con técnicas que utilizan parásitos completos y antígenos de superficie porque la respuesta inmunitaria se dirige primero contra los antígenos de superficie del parásito. Los métodos que usan parásitos completos son DT (Sabin & Feldman, 1948), ISAGA (Duffy *et al.*, 1989) e IFAT, mientras que los antígenos de superficie recombinantes como P30 (rSAG-1) se usan ampliamente en varios kits comerciales para detectar IgG e IgM; por ejemplo, ARCHITECT (Abbott) y ELECSYS (Roche) (Sickinger *et al.*, 2008; Murat *et al.*, 2012). Las pruebas que utilizan mezclas de antígenos citosólicos o metabólicos basadas en numerosas técnicas de ELISA detectan IgG (Robert-Gangneux & Darde, 2012). La detección temprana de IgM e IgG es importante para el diagnóstico precoz y el seguimiento específico de la enfermedad. Por ejemplo, la prueba ISAGA

permite la detección temprana de IgM en el suero de bebés con toxoplasmosis congénita, mientras que WB IgG II proporciona una detección rápida de IgG para confirmar la seroconversión en mujeres embarazadas (Jost *et al.*, 2011). Sin embargo, la detección de IgM natural o de larga duración dificulta la exclusión de una infección reciente y puede conducir a una mala interpretación serológica (Murat *et al.*, 2013b). Por ello se han desarrollado algunas pruebas para ayudar a estimar la fecha de infección sin analizar sueros secuenciales. La prueba más utilizada para este propósito es la prueba de avididad de IgG (Pelloux *et al.*, 1998), que mide la afinidad de los anticuerpos IgG por los antígenos del parásito, es decir, P30 (rSAG1) y P35 (rGRA8) recombinantes para las pruebas de avididad de ELECSYS y ARCHITECT respectivamente (Sickinger *et al.*, 2008; Murat *et al.*, 2012). Un resultado de avididad alta excluye una infección reciente (3 a 5 meses) porque los anticuerpos maduros tienen una mayor afinidad por los antígenos. Sin embargo, un resultado de avididad débil no es prueba de una infección reciente. Por ello algunos centros de referencia utilizan otra técnica denominada aglutinación diferencial (Montoya *et al.*, 2007). Recientemente, Villard *et al.* (2013) compararon cuatro ensayos de avididad disponibles comercialmente y encontraron una sensibilidad superior al 95 % . La prueba bioMérieux tuvo la mayor sensibilidad y eficacia (99 %). Los estudios recientes para desarrollar ensayos mejorados incluyen péptidos, proteínas recombinantes y PCR (Murat *et al.*, 2012).

Aunque la mayoría de los casos de toxoplasmosis aguda en individuos inmunocompetentes se establece mediante pruebas serológicas; las pruebas diagnósticas moleculares (PCR) han demostrado ser útiles en el diagnóstico de la infección en el útero, así como en personas inmunocomprometidas (McLeod *et al.*, 2020). La detección de ADN de taquizoítos de *T. gondii* en fluidos y tejidos corporales mediante aislamiento y amplificación por PCR es eficaz para diagnosticar la toxoplasmosis congénita (Loveridge-Easther *et al.*, 2018; Brenier-Pinchart *et al.*, 2021, 2022), ocular y cerebral (Brenier-Pinchart *et al.*, 2021).

1.10. Prevención y control de *Toxoplasma gondii*

La prevención y control de la toxoplasmosis abarcan una serie de medidas que se dirigen a diferentes componentes del ciclo vital del parásito y que se sustentan en planteamientos de actuación muy diversos, desde biosanitarios a socioeducativos. Entre ellas se encuentran: programas de educación sobre el parásito para evitar el contacto con las fases infecciosas; bioseguridad y saneamiento para garantizar la seguridad de los

alimentos y el agua; quimioterapia e inmunoterapia para controlar las infecciones activas y la enfermedad; opciones profilácticas para prevenir la adquisición de la infección por parte del ganado y la formación de quistes en la carne; y vacunas para evitar la excreción de ooquistes por parte de los huéspedes definitivos de los felinos (Smith *et al.*, 2021).

1.10.1. Educación sanitaria

La educación pública sobre la inocuidad de los alimentos y el agua para controlar la toxoplasmosis es críticamente importante, a pesar de no poder considerarse como una medida de control exclusiva y excluyente (Smith *et al.*, 2021). Los gobiernos de muchas naciones (incluidos España y Cuba) a través de sus ministerios de salud y/o agricultura, establecen políticas claras y precisas para que las personas puedan acceder a alimentos y fuentes de abasto de agua seguras e inocuas. Asimismo, mantienen sitios web educativos que explican cómo las personas pueden prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos, incluida la toxoplasmosis (Fariñas Acosta, 2019; Consejos de Estado y de Ministros de Cuba, 2020; EFSA, 2020; AESAN, 2022). Dentro de los principales consejos que podemos encontrar en los sitios mencionados con anterioridad para prevenir y controlar la toxoplasmosis están los que siguen:

- En relación con los gatos: alimente su gato únicamente con alimentos comerciales enlatados o deshidratados, nunca con carne cruda o poco cocida; entrene su gato para que use arena para gatos; cambie la arena para gatos diariamente (usando guantes desechables mientras lo hace); mantenga su gato en el interior, especialmente durante la noche, para minimizar sus actividades de caza y defecación al aire libre;
- En relación con la higiene doméstica: use guantes durante las labores de jardinería o cualquier otro contacto con el suelo; lávese bien las manos después del contacto con tierra o arena, la preparación de alimentos o el contacto con alimentos crudos y el contacto con mascotas o heces de mascotas (incluida la arena para gatos); refuerce con los niños la importancia de lavarse las manos.
- En relación con la alimentación: lave bien las frutas y verduras antes de comerlas; congele la carne (a -12 °C o menos) durante al menos 2 días antes de cocerla; no comer moluscos poco cocidos o crudos; cocine la carne a las temperaturas que siguen (74 °C para aves, 71 °C para carne

picada o molida y 63 °C para otros cortes de carne, seguido de un período de descanso mínimo de 3 minutos antes de comer; lavar bien las tablas de cortar, las encimeras, los cubiertos, la vajilla y otros utensilios de cocina que hayan estado en contacto con alimentos crudos de cualquier tipo; y evite beber agua no tratada.

1.10.2. Seguridad alimentaria

Se han propuesto respuestas sistemáticas para asegurar que los alimentos estén libres de contaminación por *T. gondii* (Kijlstra & Jongert, 2008; Opsteegh *et al.*, 2015; Mirza Alizadeh *et al.*, 2018). Estas medidas se pueden enfocar desde una doble perspectiva: en primer lugar, para evitar la contaminación alimentaria a partir de ooquistes de *T. gondii*, lo que puede ocurrir en productos vegetales frescos, en moluscos crudos (ostras y mejillones y almejas) y en agua de bebida. En segundo lugar, para evitar la transmisión de quistes tisulares en carne y productos cárnicos procedentes de animales como porcinos, bovinos, ovinos y caprinos, aves, équidos y animales de caza (Koutsoumanis *et al.*, 2018).

Los esfuerzos para evitar la contaminación por ooquistes tienen una primera actuación centrada en elevar el nivel de bioseguridad de las granjas en aras de prevenir o restringir la presencia de gatos y roedores en las mismas, así como en garantizar que el agua para el ganado y para el riego de cultivos se ajuste a los criterios de potabilidad normados por el país en cuestión. Dichas medidas tienen una capacidad significativa de éxito en animales criados bajo condiciones intensivas, siendo un buen ejemplo la reducción de la prevalencia de quistes de *T. gondii* en carnes de cerdo (Opsteegh *et al.*, 2015). Sin embargo, tal éxito es menos probable en animales criados en extensivo o bajo prácticas orgánicas al aire libre. Los programas para garantizar la esterilización de los gatos domésticos, combinados con programas eficaces para reducir la población de gatos callejeros, ayudarían potencialmente a reducir la contaminación del medio ambiente por ooquistes, pero serían extremadamente difíciles y costosos de iniciar y vigilar (Opsteegh *et al.*, 2015). Otra línea de actuación está relacionada estrechamente vinculada con la educación sanitaria, pues descansa en la actuación de los consumidores en la higiene de alimentos frescos. El lavado de frutas y verduras por parte de los consumidores individuales ya es un hábito generalizado y probablemente razonablemente eficaz para eliminar los ooquistes, suponiendo que haya agua limpia disponible (Shapiro *et al.*, 2019), aunque cabe señalar que la creciente disponibilidad de

alimentos pre-envasados, como las ensaladas "listas para comer" son una fuente potencial de infección (Caradonna *et al.*, 2017). Las medidas encaminadas a evitar la contaminación por quistes tisulares en carnes se desarrollan a través de una serie de tratamientos que incluyen congelación, irradiación y procesamiento a alta presión, pero la falta de aceptación por parte de algunos consumidores debido a los efectos significativos de estos tratamientos sobre la ternura, textura y calidad de las carnes probablemente sería un impedimento importante para una implementación generalizada (Kijlstra & Jongert, 2008; Opsteegh *et al.*, 2015; Mirza Alizadeh *et al.*, 2018).

1.10.3. *Inmunoprolifaxis en humanos y animales de abasto*

Prácticamente todas las personas corren el riesgo de contraer la infección por *T. gondii* en algún momento de su vida, por lo que una vacuna para prevenir la toxoplasmosis en humanos beneficiaría a todos (Tenter *et al.*, 2000). Idealmente, una vacuna contra *T. gondii* debería dirigirse a las niñas antes de que alcancen la edad fértil e inducir una respuesta inmunitaria protectora capaz de prevenir la transmisión vertical del parásito. Dicha vacuna reduciría la incidencia mundial de toxoplasmosis congénita, que se estima en 1,5 casos por cada 1000 nacidos vivos (~190000 casos nuevos cada año) (Jones *et al.*, 2001; Torgerson & Mastroiacovo, 2013).

Actualmente no existen vacunas para prevenir infecciones o enfermedades en humanos, sin embargo, una larga lista de vacunas experimentales han sido probadas recientemente en modelos murinos (McLeod *et al.*, 2020). Se han investigado varios candidatos vacunales, incluidas SAG, roptrias, micronemas, GRA y otras proteínas secretadas por taquizoítos. De manera similar, se probaron diferentes formulaciones, adyuvantes, rutas de inmunización y programas, que abarcan parásitos muertos o vivos atenuados, vacunas de subunidades, proteínas recombinantes, vacunas de ADN y vectores vivos para administrar antígenos de *T. gondii*. A pesar de mostrar resultados alentadores pues la mayoría de los candidatos reportan cierta capacidad para reducir la formación de quistes y prolongar la supervivencia del huésped, no hay informes de que una vacuna probada en ratones haya pasado a ensayos clínicos en humanos (Smith *et al.*, 2021).

La única vacuna comercial contra *T. gondii* (Toxovax®) se desarrolló hace más de tres décadas en Nueva Zelanda para el control del aborto en ovejas (O'Connell *et al.*, 1988; Buxton & Innes, 1995). Toxovax® consiste en taquizoítos atenuados de la cepa

S48 de *T. gondii*, que después de más de 3000 pases en ratones perdió su capacidad para desarrollar quistes tisulares de bradizoítos (Buxton, 1993). Esta vacuna se recomienda para la inmunización de ovejas como una única inyección intramuscular al menos 4 semanas antes del apareamiento. Después de la inmunización, los parásitos atenuados experimentan ciclos de replicación limitados, simulando una infección natural, y esto puede inducir una protección duradera, probablemente involucrando respuestas de células CD4⁺ y CD8⁺ junto con la producción de IFN- γ (Buxton *et al.*, 1994). Toxovax[®] se comercializa a través de MSD Animal Health y está disponible en el Reino Unido, Irlanda, Francia y Nueva Zelanda.

1.10.4. Inmunoprolifaxis en gatos

La inmunización de gatos mediante infección con cepas vivas atenuadas de *T. gondii* ha demostrado ser muy eficaces en prevenir la eliminación de ooquistes (Smith *et al.*, 2021). La cepa T-263 de *T. gondii* es un mutante inducido químicamente que carece de la capacidad de producir ooquistes, fue la primera vacuna viva atenuada investigada en gatos (Dubey, 2017). La administración oral de dos dosis de quistes tisulares T-263 o bradizoítos liberados por la digestión con pepsina indujo respuestas de anticuerpos y previno la eliminación de ooquistes en el 84 % (Frenkel *et al.*, 1991) o en el 100 % (Freyre *et al.*, 1993) de los gatitos después del desafío con una cepa productora de ooquistes. La eficacia de la cepa viva atenuada T-263 como vacuna bloqueadora de la transmisión también se investigó en un ensayo de campo a largo plazo en granjas porcinas de EE. UU. (Mateus-Pinilla *et al.*, 1999). Los gatos presentes en estas granjas porcinas fueron capturados e inmunizados por infección con bradizoítos de la cepa T-263. La inmunización de gatos redujo significativamente la infección por *T. gondii* en cerdos de finalización en estas granjas a lo largo del tiempo (Mateus-Pinilla *et al.*, 1999). A pesar de los resultados prometedores logrados con la cepa T-263 de *T. gondii*, las dificultades asociadas con la producción a gran escala de bradizoítos, el transporte, la cadena de frío y los riesgos percibidos para las personas que manipulan y administran la vacuna han inhibido su comercialización (Choromanski *et al.*, 1995).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Partiendo de los antecedentes y situación actual de la toxoplasmosis, descrita en el apartado anterior (INTRODUCCIÓN), en el proyecto de investigación para la realización de la presente tesis doctoral se plantearon varias interrogantes científicas de partida, sobre las que se elaboraron las hipótesis y objetivos de investigación.

Interrogantes científicas:

1. ¿Cuál es la prevalencia de anticuerpos de *Toxoplasma gondii* y qué factores de riesgos están asociados a su exposición en explotaciones de cerdos ibéricos manejados en extensivo en España?
2. ¿Cómo se distribuye espacialmente *T. gondii* en explotaciones de cerdos ibéricos manejados en extensivo en España?
3. ¿Cuál es la prevalencia de anticuerpos de *Toxoplasma gondii* y qué factores de riesgos están asociados a su exposición en cerdos domésticos de la provincia de Villa Clara, Cuba?
4. ¿Qué genotipos de *T. gondii* infectan a cerdos domésticos de la provincia de Villa Clara, Cuba?

Hipótesis de investigación:

1. *Toxoplasma gondii* circula en las explotaciones de cerdo ibérico manejados en extensivo en España. La distribución espacial del parásito en estas explotaciones no es homogénea. Constituyen factores riesgos asociados a su epidemiología: edad, frecuencia de limpieza, frecuencia de desinfección, tamaño de la granja, variables meteorológicas (temperatura, precipitación, humedad relativa), mortalidad en crías, en destetados, y en crecimiento, control de roedores, presencia de cerca perimetral, número de gatos en las granjas y presencia en la granja de animales ajenos al propósito de producción.
2. *Toxoplasma gondii* circula en el cerdo doméstico criado en intensivo en Cuba. Constituyen factores de riesgos asociados a la epidemiología del parásito en las granjas de cerdos de la provincia de Villa Clara: el tamaño de la granja, la altitud, y la edad.

3. Existe una elevada diversidad genética de *T. gondii* que infecta a cerdos domésticos destinados al consumo humano en la provincia de Villa Clara, Cuba.

Objetivos:

1. Determinar la seroprevalencia, factores de riesgo, y distribución espacial de *Toxoplasma gondii* en explotaciones de cerdos ibéricos manejadas en sistemas de producción extensivo en España.
2. Determinar la seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por *T. gondii* en cerdos domésticos de la provincia de Villa Clara, Cuba.
3. Caracterizar genéticamente las cepas de *T. gondii* que infectan a cerdos domésticos destinados al consumo humano en la provincia de Villa Clara, Cuba.

El desarrollo de estos objetivos ha permitido la elaboración de tres trabajos de investigación (uno en España y dos en Cuba) que han sido publicados en revistas científicas indexadas en Journal Citation Report (dos en Q1 y una en Q2), y posibilitan la presentación de la presente Tesis Doctoral en el formato de compendio por artículos (Art. 24. Tesis como compendio de publicaciones, Propuesta por la Comisión de Másteres y Doctorado de 14 de diciembre de 2011 y aprobada por Consejo de Gobierno de 21 de diciembre de 2011 de la Universidad de Córdoba):

1. Castillo-Cuenca, J. C., Díaz-Cao, J. M., Martínez-Moreno, Á., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Almería, S., García-Bocanegra, I. (2020) ‘Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain’, *Preventive Veterinary Medicine*, 175, pp. 104–854. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104854>. Factor de impacto (JCR 2020): 2,933. Posición de la revista (Categoría): Q1 (27/146) (Veterinary Sciences).
2. Castillo-Cuenca, J. C., Martínez-Moreno, Á., Diaz-Cao, J. M., Entrena-García, A., Fraga, J., Arias, P., Almería, S García-Bocanegra, I. (2021) ‘Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba’, *Parasitology Research*, 120(8), pp. 2897–2903. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07245-1>. Factor de impacto

(JCR 2021): 2,403. Posición de la revista (Categoría): Q2 (19/38) (Parasitology).

3. Castillo-Cuenca, J. C., Almería, S., Calero-Bernal, R., Fernández-Escobar, M., Fraga, J., Entrena-García, A., Arias, P., Martínez-Moreno, Á., García-Bocanegra, I. (2022) ‘Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs intended for human consumption in Cuba’, *Zoonoses and Public Health*, (Aceptado). doi: <https://doi.org/10.1111/zph.13010>. Factor de impacto (JCR 2022): 2,904 . Posición de la revista (Categoría): Q1 (19/145) (Veterinary Sciences).

PRIMER ESTUDIO

3. PRIMER ESTUDIO (FIRST STUDY)

Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain

Julio C. Castillo-Cuenca^a, José M. Díaz-Cao^{b,}, Álvaro Martínez-Moreno^b, David Cano-Terriza^b, Saúl Jiménez-Ruiz^{b, c}, Sonia Almería^{d, e}, Ignacio García-Bocanegra^b*

^a Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba.

^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (UCO), Campus Universitario de Rabanales, 14071, Córdoba, Spain.

^c SaBio - Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (UCLM-CSIC-JCCM), 13071, Ciudad Real, Spain.

^d UAB, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Barcelona, Spain.

^e U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Applied Research and Safety Assessment, Laurel, MD, 20708, USA.

*Corresponding author: E-mail address: jmdchh@gmail.com (J.M. Díaz-Cao).

Preventive Veterinary Medicine. 175, pp. 104–854. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104854>.

Abstract

Pigs reared under extensive farming conditions are currently in high commercial demand because they are associated with high-quality products. Nevertheless, the risk of contact with different pathogens of animal and public health concern is also higher in extensive production systems. *Toxoplasma gondii* is a widely prevalent zoonotic pathogen and transmission by contaminated pork is likely one of the main routes of human toxoplasmosis. The aim of this study was to determine the seroprevalence, risk factors and spatial distribution of *T. gondii* on extensive Iberian pig herds in Spain. Sera from 2245 Iberian pigs from 114 herds were collected between 2015 and 2017 and analyzed using a commercial ELISA. The apparent individual prevalence of antibodies against *T. gondii* was 24.1 % (542/2245) and the estimated true seroprevalence was 24.3 % (CI95 %: 22.5 – 26.1). Seropositivity was detected in 86.0 % (98/114; CI95 %: 77.4 – 91.1) of 114 herds analyzed. A multilevel logistic regression model showed that *T. gondii* infection was significantly more frequent in sows than in fattening pigs (OR: 2.6; CI95 %: 1.5 – 4.8) and in herds with more than three cats compared to no cats (OR: 2.9; CI95 %: 1.1–8.7). Our results indicate a widespread but heterogeneous distribution of *T. gondii* in extensively reared Iberian pig herds, which may have important implications for public health through the consumption of undercooked or improperly cured pork products.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Iberian pig, Risk factors, Seroprevalence, Spain

Introduction

Toxoplasmosis is a zoonotic disease with worldwide distribution caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular *Apicomplexan* protozoan capable of infecting most warm-blooded species. In humans, toxoplasmosis is usually asymptomatic, but can lead to abortions in primary infected pregnant women, congenital infection in their fetuses and severe disease in immunocompromised individuals (Dubey, 2009a). The consumption of raw or undercooked pork contaminated with *T. gondii* is a major route of transmission to humans (Guo *et al.*,2016; Belluco *et al.*,2018). Pigs can become infected by ingesting water or food contaminated with oocysts or tissues infected with cysts or congenitally.

The seroprevalence of *T. gondii* in domestic pigs varies widely from country to country and also between regions within the same country (Foroutan *et al.*,2019; Olsen *et al.*,2019), being influenced by individual factors, such as age (Villari *et al.*,2009; García-Bocanegra *et al.*,2010a; Olsen *et al.*,2019), management systems and/or environmental factors (Dubey, 2009b; Guo *et al.*,2016). Extensive production systems, in particular, have been shown to be an important risk factor for *T. gondii* exposure in pigs (van der Giessen *et al.*,2007; García-Bocanegra *et al.*,2010b).

Spain is the second largest pork producer in the European Union (EU) and the fourth worldwide. The Iberian pig is an autochthonous breed of the Iberian Peninsula derived from the *Sus mediterraneus* with a characteristic habitat called “dehesa” consisting of Mediterranean holm-oak and cork-oak pastures (Garrido-Fernández & León-Camacho, 2019). Iberian pigs represent about 11 % of Spanish pork production and, according to 2019 national records (MAPA *et al.*, 2019), approximately 80 % of the Spanish Iberian pig population is located in southwestern Spain. The Iberian pig is raised extensively up to the end of the fattening period (usually more than 14 months of age) and shares its habitat and natural resources with sympatric domestic and wild species (Aparicio-Tovar & Vargas-Giraldo, 2006; Cano-Terriza *et al.*, 2018). Meat products derived from the Iberian pig are highly appreciated and are currently in high commercial demand. Some of these products are consumed without cooking such as dry-cured ham, the most important meat product obtained from the Iberian pig. Viable *T. gondii* tissue cysts have been isolated from meat and ham of pigs including dry-cured products up to 12 months of curation (Gomez-Samblas *et al.*,2015; Herrero *et al.*,2017).

Serosurveys have been carried out in domestic pigs in Spain, with individual seroprevalence levels ranging between 16.8 % and 18.8 % in pigs reared indoors (García-Bocanegra *et al.*,2010a, 2010b ; Herrero *et al.*,2016), and between 22.4 % and 22.9 % in outdoor production systems (García-Bocanegra *et al.*,2010a ; Herrero *et al.*,2016). In addition, *T. gondii* exposure has also been frequently reported in humans in this country, with seroprevalence values ranging between 12.0 % and 41.4 % in pregnant women (Ramos *et al.*,2011). Although uncommon, toxoplasmosis was also identified in transplant recipients (0.14 % of 15,800) in Spanish hospitals and was the cause of mortality in 13.6 % of the infected patients (Fernández-Sabé *et al.*,2012). However, epidemiological information about this parasite in Iberian pig herds remains limited (Hernández *et al.*,2014; Pablos-Tanarro *et al.*,2018) and no large-scale studies have been conducted to date. Hence, the aims of the present study were: (i) to estimate the individual and herd seroprevalence of *T. gondii* in Iberian pigs raised under extensive management systems in Spain, (ii) to identify potential risk factors associated with *T. gondii* seropositivity in extensively-managed pig herds in this country.

Material and methods

Study design

From 2015–2017, a cross-sectional study was performed to estimate the individual and herd prevalence of antibodies against *T. gondii* in extensively reared Iberian pigs in Andalusia and Extremadura, in southwestern Spain (Fig. 4), the regions with the largest number of Iberian pig herds population in Spain (MAPA *et al.*,2019). In Andalusia, the number of herds sampled was calculated assuming an expected prevalence of 50 %, confidence level of 95 % and absolute accuracy of 10 %. A total of 101 herds were included in the study. Sampling was stratified by province, based on the Iberian pig population for each province. Herds were selected by simple random sampling from the official records of herds obtained from the Regional Government of Andalusia (CAGPDS & Consejería de Agricultura, 2019). Additionally, 13 Iberian pig herds in Extremadura were sampled using a convenience sampling for logistical reasons. Whenever possible, 20 animals per herd, including 10 sows and 10 fattening pigs, were randomly sampled. This sampling scheme allows detection of exposure with a minimum expected prevalence of 15 % and a confidence level of 95 % (Thrusfield *et al.*,2018).

Epidemiological information was gathered by direct interview with each swine farmer using a structured questionnaire. The independent variables included in this study were grouped as (1) individual data: age (sows vs. fattening pigs) and sex; (2) herd data: herd size, presence of other domestic species: cats, dogs, cattle, goats and sheep; and wild species: red deer, wild boar, badgers and rodents; number of cats on the farm, mortality percentage (at weaning, growth and breeding) and (3) biosecurity measures: rodent control, disinfection, cleaning frequency and presence of perimeter fences. Environmental data including mean annual temperature (°C), mean annual rainfall (mm) and mean annual humidity (%) were recorded from weather stations in the vicinity of the sampling herds. Climatological data were obtained from the Andalusian Environmental Information Network (REDIAM, 2019).

Sample collection and serological analysis

Blood samples were obtained by puncture of the *Sinus ophthalmicus*. Sera were obtained by centrifugation at 400 g for 10 min and stored at -20 °C until assayed. Serum samples were tested by an indirect commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (PrioCHECK ® porcine *Toxoplasma* Ab, Prionics AG, Zurich, Switzerland) for the detection of antibodies against *T. gondii* using cell culture derived tachyzoites as antigen. The ELISA was performed in accordance with the manufacturer's instructions. Positive, weakly positive and negative control sera provided by the manufacturer were included in duplicate on each plate. ELISA results were expressed as percentage of positivity (PP), calculated according to the following formula: [sample PP = ((sample optical density (OD) – mean negative control OD) / (mean positive control OD - mean negative control OD)) X 100]. Results obtained at or above the cut off of 20 PP were considered positive. The sensitivity and specificity values of this ELISA according to the manufacturer were 98.0 % and 99.6 %, respectively.

Statistical analysis

The apparent individual seroprevalence against *T. gondii* was calculated from the ratio of positive results to the total number of pigs tested. The true individual seroprevalence was calculated using the Rogan-Gladen estimator (Rogan & Gladen, 1978) and the exact binomial confidence intervals of 95 % (CI95 %) were estimated by the Blaker's method (Reiczigel *et al.*, 2010).

The association between the independent variables and *T. gondii* seropositivity was analyzed only for the region of Andalusia, where sampling was random. Variables were first tested using a chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. All variables with $P < 0.20$ were selected to be included for further modeling. Cramer's V coefficients were computed pairwise to detect collinearity problems. When collinearity was detected, the variable with the clearest epidemiological relationship with *T. gondii* was retained. Finally, the effect of the selected independent variables on the response variable (seropositivity to *T. gondii*) was investigated by using a multi-level logistic regression model. The examined variables were included as fixed factors in the models with herd included as a random factor. Variables were sequentially removed if they were not significant (P -value > 0.05). The Aikake information criterion was used to assess the best model. All pairwise interactions that were biologically plausible were evaluated. The model was rerun until all remaining variables presented statistically significant values (likelihood-ratio Wald's test, $P < 0.05$). The statistical analysis was performed using the package "lme4" (Bates *et al.*, 2015) in R software v 3.5.2 (R Core Team, 2018).

Results

Antibodies against *T. gondii* were detected in 542 of the 2245 pigs tested (24.1 %) with an estimated true individual seroprevalence of 24.3 % (CI95 %: 22.5–26.1). Seropositive animals were observed in the 86 % (98/114; CI95 %: 77.4 – 91.1) of the examined herds (Fig. 4).

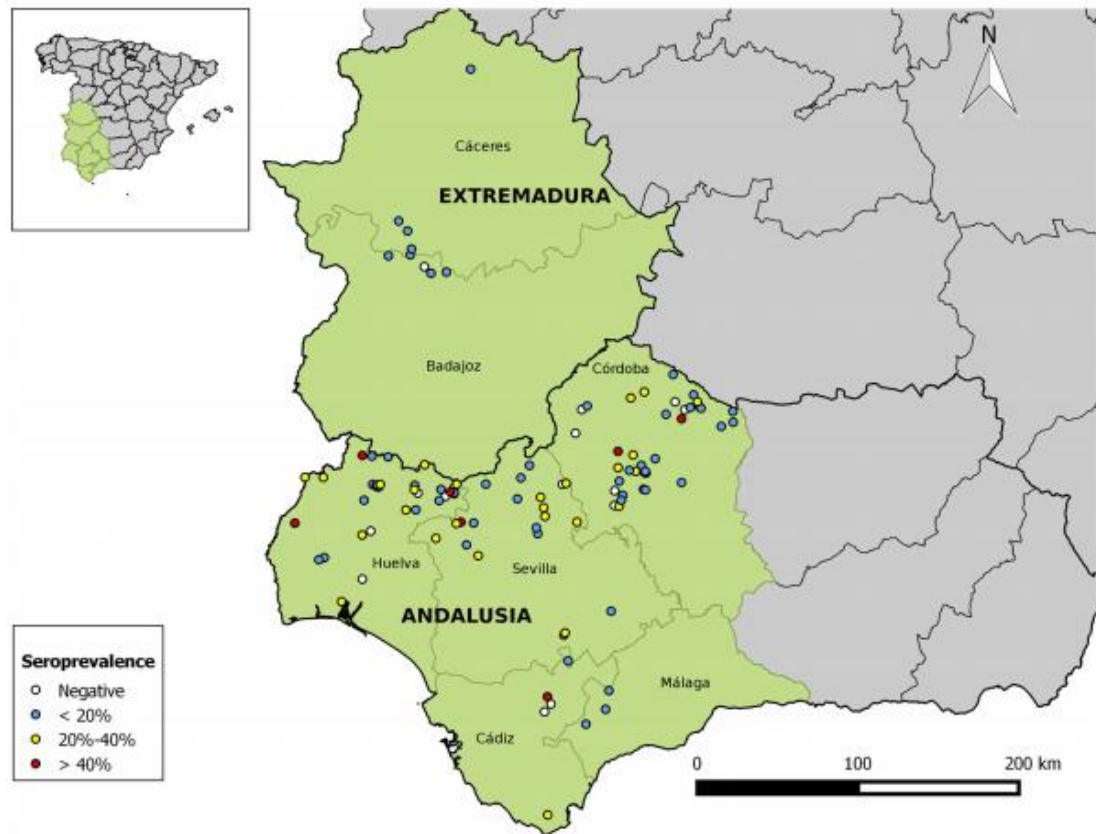


Fig. 4. Map of southwestern Spain showing the distribution and within-herd seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the sampled pig herds.

The distribution and univariate association of the independent variables and seropositivity to *T. gondii* are shown in Table 2.

Table 2. Distribution of independent variables associated with *Toxoplasma gondii* seropositivity in extensively raised Iberian pigs (n=1976) in Spain, 2015 –2017. Variables with *P*-value < 0.20 in the univariate analysis were included in the multi-level logistic regression models to determine potential risk factors.

Variable	Category	N° Positives/overall ^a (%)	<i>P</i> -Value
Age	Fattening pigs	269/1218 (22.1 %)	< 0.001
	Sows	223/678 (32.9 %)	
Cleaning frequency	< 6 months	174/642 (27.1 %)	0.511
	> 6 months	167/655 (25.5 %)	
Disinfection frequency	< 6 months	186/662 (28.1 %)	0.192
	> 6 months	163/654 (24.9 %)	
Herd size	< 127 animals	152/636 (23.9 %)	< 0.001
	127-280	127/622 (20.4 %)	

Tesis Doctoral	Castillo-Cuenca, J. C.		Primer Estudio
	> 280 animals	212/617 (34.4 %)	
Mean annual temperature	14–16 °C	165/802 (20.6 %)	< 0.001
	16-20 °C	343/1174 (29.2 %)	
Mean annual rainfall	400-600 mm	150/556 (27.0 %)	0.024
	601-800 mm	228/983 (23.2 %)	
	801-1500 mm	150/556 (27.0 %)	
Mean annual relative humidity	< 65 %	238/912 (26.1 %)	0.715
	> 65 %	270/1064 (25.4 %)	
Mortality percentage at breeding	< 5 %	277/746 (27.1 %)	< 0.001
	> 5 %	26/48 (54.2 %)	
Mortality percentage at growth	< 5 %	295/1024 (28.8 %)	0.099
	> 5 %	23/108 (21.3 %)	
Mortality percentage at weaning	< 5 %	226/808 (28.0 %)	0.265
	> 5 %	83/263 (31.6 %)	
Number of cats on the farm	No cats	239/1078 (22.2 %)	< 0.001
	< 3 cats	77/351 (21.9 %)	
	> 3 cats	119/280 (42.5 %)	
Presence of badgers	No	278/858 (32.4 %)	< 0.001
	Yes	192/951 (20.2 %)	
Presence of cattle	No	171/834 (20.5 %)	< 0.001
	Yes	276/905 (30.5 %)	
Presence of cats	No	254/1137 (22.3 %)	< 0.001
	Yes	214/679 (31.5 %)	
Presence of dogs	No	61/425 (14.4 %)	< 0.001
	Yes	407/1391 (29.3 %)	
Presence of goats	No	375/1598 (23.5 %)	< 0.001
	Yes	63/139 (45.3 %)	
Presence of red deer	No	108/418 (25.8 %)	< 0.001
	Yes	327/1281 (25.5 %)	
Presence of perimeter fences	No	7/20 (35.0 %)	0.340
	Yes	455/1776 (25.6 %)	
Presence of rodents	No	105/419 (25.1 %)	0.651
	Yes	340/1299 (26.2 %)	
Presence of sheep	No	359/1439 (24.9 %)	< 0.001
	Yes	89/318 (28.0 %)	
Presence of wild boar	No	81/310 (26.1 %)	< 0.001

	Yes	354/1389 (25.5 %)	
Rodent control	No	112/469 (23.9 %)	0.035
	Yes	227/773 (29.4 %)	

^a Missing values were omitted.

The multi-level model identified age and number of cats on the farm as risk factors associated with *T. gondii* exposure (Table 3). Individual seropositivity was higher in sows (32.9 % of 678) than in fattening pigs (22.1 % of 1218) ($P < 0.001$; OR: 2.6; CI95 %: 1.5–4.8). Seroprevalence was also significantly higher in herds with more than three cats (42.5 % of 280) compared with those with no cats (22.2 % of 1078) ($P = 0.048$; OR: 2.5; CI95 %: 1.1– 8.7). However, a smaller number of cats (between one and three) were not found to increase the risk of infection (21.9 % of 351) ($P = 0.605$; OR: 0.7; CI95 %: 0.5– 2.0).

Table 3. Results of the multi-level logistic regression model of potential risk factors associated with *Toxoplasma gondii* seropositivity in extensively raised Iberian pigs (n = 1976) in Spain, 2015-2017.

Variable	Category	Positive/Total (%)	β (S.E.)	OR	CI95 %	P -value	P -value ^a
Age	Sows	223/678 (32.9)	1.0 (0.3)	2.6	1.5-4.8	< 0.001	< 0.001
	Fattening pigs	269/1218 (22.1)		1.0	b	b	
Number of cats on the farm	> 3 cats	119/280 (42.5)	1.1 (0.5)	2.9	1.1-8.7	0.048	0.047
	1-3 cats	77/351 (21.9)	-0.3 (0.5)	0.7	0.3-2.1	0.605	
	No cats	239/1078 (22.2)		1.0	b	b	
δ^2	2.681						

^a Overall significance of the variable (Likelihood ratio test). ^b Reference category. δ^2 : Variance of random effect (herd).

Discussion

Pig production in free-range and organic management systems has become popular and its economic importance has increased in Europe during the last few decades (Früh *et al.*,2014). Food products derived from extensive production systems such as the Iberian pig in the dehesa agroforestry systems are of high quality and are in high commercial demand (Garrido-Fernández & León-Camacho, 2019). However, the implementation of effective biosecurity measures and control programs for transmissible diseases is difficult in these extensive systems (Davies, 2011). This is bound to result in high exposure to zoonotic pathogens, including *T. gondii* in pigs (van der Giessen *et al.*,2007; Kijlstra *et al.*,2009; Wallander *et al.*,2016; Cano-Terriza *et al.*,2018).

The individual seroprevalence obtained in the present study showed high *T. gondii* exposure among extensively reared Iberian pigs in Spain. Our results are consistent with the 27.1 % of 709 Iberian fattening pigs analyzed by ELISA in Andalusia between 2008 and 2009 (Hernández *et al.*, 2014). The high seropositivity levels found in both studies in different periods suggest an endemic circulation of *T. gondii* in this region. In addition, the high herd prevalence obtained in the present study indicates widespread *T. gondii* circulation in extensive Iberian pig farms in Spain. However, Pablos-Tanarro *et al.* (2018) found markedly lower seroprevalences (ranging between 11.7 % and 14.8 % using ELISA and the direct agglutination test, respectively) in 963 Iberian sows from five extensively managed herds in southwestern Spain. Nevertheless, comparisons among studies should be made with caution given the differences in number of animals or herds examined, age classes, management and environmental factors and serological methods employed.

The overall seroprevalence found in our study was higher than the 16.6 % reported for pig herds reared indoors in Spain (García-Bocanegra *et al.*, 2010b). Higher seropositivity in outdoor managed pigs has been also reported in different countries (van der Giessen *et al.*, 2007; Villari *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010a; Limon *et al.*, 2017; Pablos-Tanarro *et al.*, 2018). The rearing conditions of Iberian pigs, with long feeding periods in the dehesa and limited biosecurity measures, would be expected to favor contact with sporulated oocysts. In this regard, a high seroprevalence has also been detected in sympatric wild boar (*Sus scrofa*) populations (between 18.6 % –38.4 %) (Gauss *et al.*, 2005; Calero-Bernal *et al.*, 2016; Almería *et al.*, 2018). *Toxoplasma gondii* infections in definitive host species such as free-roaming cats (*Felis catus*), the European wild cat (*Felis sylvestris*) and the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) have also been reported in the study region, suggesting the existence of sylvatic cycles for *T. gondii* in Spanish Mediterranean ecosystems (Roelke *et al.*, 2008; Millán *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010c).

Individual seroprevalence was significantly higher in sows (32.9 %) than in fattening pigs (22.1 %), which is consistent with previous reports (Villari *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010b; Kofoed *et al.*, 2017; Olsen *et al.*, 2019) and reflects the well-known increased exposure with age and the life-long persistence of anti-*T. gondii* antibodies (Dubey, 2009b). The presence of more than three cats on the farms was also a risk factor for *T. gondii* seroprevalence, in agreement with the results found by

Meerburg *et al.* (2006). Domestic cats are frequently used for rodent control in pig herds, having access to food, water and pig facilities. Even though the presence of cats was not reported by farmers in 35 of the 114 pig herds analyzed, the entrance of free-roaming cats or other wild felid species in these farms is difficult to control and therefore, their presence cannot be ruled out. Cats are frequently infected and shed oocysts when they are young (Dubey, 2001), and the developed immunity usually prevents from re-excretion (Dubey, 1995). Consequently, a higher seroprevalence in herds with a larger number of cats probably reflects the higher likelihood for some of them being juvenile, which could be shedders and imply an additional risk of infection for pigs.

In conclusion, our results show a high and widespread *T. gondii* exposure in extensively managed Iberian pig herds in Spain. The high seroprevalence found in this breed may have important implications for public health through the consumption of undercooked or improperly cured pork products. Although curing has been shown to inactivate *T. gondii* cysts, its effectivity depends on salt concentration, time and temperature (Dubey, 1997; Kijlstra & Jongert, 2008). In this regard, the application of the minimum dry-curing times, which are defined by the Spanish Ministry of Agriculture as 600 days for ham legs and 365 days for pork shoulders, are likely to be effective in removing the infective capability of *T. gondii* (Gomez-Samblas *et al.*, 2016). Ensuring an adequate dry-curing time and proper cooking of other derived meat products can be useful measures to reduce the zoonotic risk of *T. gondii* infections. At farm level, management practices, such as the use of rodent control methods by authorized companies instead of domestic cats, could be important to reduce the risk of *T. gondii* circulation in extensively managed pig herds. In addition, risk-based surveillance could also be useful to establish control measures against *T. gondii* circulation in Iberian pig herds managed under extensive production systems.

Declaration of Competing Interest

None of the authors of this study has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the manuscript.

Acknowledgements

The present work was partially funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) research grant Ref. AGL2013-49159-C2-2-R and by the Regional Ministry of Economy and Infrastructure of the Board of Extremadura research grant Ref. TB-PORCEX. We would like to thank the Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP, in Spanish) for helping fund the doctoral training of J.C. Castillo-Cuenca. S. Jiménez-Ruiz holds a PhD contract from the UCLM co-supported by the European Social Fund (2018/12504).

References

- Almería, S., Cabezón, O., Paniagua, J., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Arenas-Montes, A., Dubey, J.P., García-Bocanegra, I., 2018. *Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem. *Parasitol. Res.* 117, 665–671.
- Aparicio-Tovar, M.A., Vargas-Giraldo, J.D., 2006. Considerations on ethics and animal welfare in extensive pig production: breeding and fattening Iberian pigs. *Livest. Sci.* 103, 237–242.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Soft.* 67, 1–48.
- Belluco, S., Patuzzi, I., Ricci, A., 2018. Bovine meat *versus* pork in *Toxoplasma gondii* transmission in Italy: a quantitative risk assessment model. *Int. J. Food Microbiol.* 269, 1–11.
- Calero-Bernal, R., Pérez-Martín, J.E., Reina, D., Serrano, F.J., Frontera, E., Fuentes, I., Dubey, J.P., 2016. Detection of zoonotic protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in wild boars from Spain. *Zoonoses Public Health* 63, 346–350.
- CAGPDS, Consejería de Agricultura, 2019. Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. (Accessed 23 June 2019). <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/consejeria/sobre-consejeria/estadisticas/paginas/ganaderia-censos-ganaderos.html>.
- Cano-Terriza, D., Risalde, M.A., Rodríguez-Hernández, P., Napp, S., Fernández-Morente, M., Moreno, I., Bezos, J., Fernández-Molera, V., Saéz, J.L., García-Bocanegra, I., 2018. Epidemiological surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in extensively raised pigs in the south of Spain. *Prev. Vet. Med.* 159, 87–91.
- Davies, P.R., 2011. Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 189–201.
- Dubey, J.P., 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* 81, 410–415.

Dubey, J.P., 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C. J. Parasitol. 83, 946–949.

Dubey, J.P., 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J. Parasitol. 87, 215–219.

Dubey, J.P., 2009a. Toxoplasmosis of Animals and Humans, second. ed. Parasites & Vectors. CRC Press Taylor & Francis Group, New York.

Dubey, J.P., 2009b. Toxoplasmosis in pigs - the last 20 years. Vet. Parasitol. 164, 89–103.

Fernández-Sabé, N., Cervera, C., Fariñas, M.C., Bodro, M., Muñoz, P., Gurguá, M., Torre-Cisneros, J., Martín-Dávila, P., Noblejas, A., Len, O., García-Reyne, A., del Pozo, J.L., Carratalá, J., 2012. Risk factors, clinical features and outcomes of toxoplasmosis in solid-organ transplant recipients: a matched case-control study. Clin. Infect. Dis. 54, 355–361.

Foroutan, M., Fakhri, Y., Riahi, S.M., Ebrahimpour, S., Namroodi, S., Taghipour, A., Spotin, A., Gamble, H.R., Rostami, A., 2019. The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: a systematic review and meta-analysis. Vet. Parasitol. 269, 42–52.

Früh, B., Bochicchio, D., Edwards, S., Hegelund, L., Leeb, C., Sundrum, A., Werne, S., Wiberg, S., Prunier, A., 2014. Description of organic pig production in Europe. Org. Agric. 4, 83–92.

García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J.P., Casal, J., Martín, G.E., Cabezón, O., Perea, A., Almería, S., 2010a. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. Parasitol. Int. 59, 421–426.

García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Simon-Grifé, M., Cabezón, O., Casal, J., Allepuz, A., Napp, S., Almería, S., 2010b. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. Res. Vet. Sci. 89, 85–87.

García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Martínez, F., Vargas, A., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., Almería, S., 2010c. Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). Vet. Parasitol. 167, 36–42.

Garrido-Fernández, A., León-Camacho, M., 2019. Assessing the effect of season, montanera length and sampling location on Iberian pig fat by compositional data analysis and standard multivariate statistics. Food Chem. 295, 377–386.

Gauss, C.B., Dubey, J.P., Vidal, D., Ruiz, F., Vicente, J., Marco, I., Lavin, S., Gortazar, C., Almería, S., 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet. Parasitol.* 131, 151–156.

Gomez-Samblas, M., Vílchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2015. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 46, 107–113.

Gómez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2016. *Toxoplasma gondii* detection and viability assays in ham legs and shoulders from experimentally infected pigs. *Food Microbiol.* 58, 112–120.

Guo, M., Mishra, A., Buchanan, R.L., Dubey, J.P., Hill, D.E., Gamble, H.R.A.Y., Pradhan, A.K., 2016. Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption of domestically produced lamb in the United States. *J. Food Prot.* 79, 1181–1187.

Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Tarradas, C., Luque, I., García-Valverde, R., Reguillo, L., Astorga, R.J., 2014. A serological survey of *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spp.* in Iberian fattening pigs reared in free-range systems. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 477–481.

Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, M., Herrera, A., Bayarri, S., 2016. *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet. Parasitol.* 224, 52–59.

Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A., Bayarri, S., 2017. *Toxoplasma gondii* in raw and dry-cured ham: the influence of the curing process. *Food Microbiol.* 65, 213–220.

Kijlstra, A., Jongert, E., 2008. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* 38, 1359–1370.

Kijlstra, A., Meerburg, B.G., Bos, A.P., 2009. Food safety in free-range and organic live-stock systems: risk management and responsibility. *J. Food Prot.* 72, 2629–2637.

Kofoed, K.G., Vorslund-Kiær, M., Nielsen, H.V., Alban, L., Johansen, M.V., 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Danish pigs. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 10, 136–138.

Limon, G., Beauvais, W., Dadios, N., Villena, I., Cockle, C., Blaga, R., Guitian, J., 2017. Cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* infection in pig farms in England. *Foodborne Pathog. Dis.* 14, 269–281.

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales Indicadores Económicos 2018. (Accessed 16 September 2019). https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectorporcinoano2018_tcm30-379728.pdf

Meerburg, B.G., Van Riel, J.W., Cornelissen, J.B., Kijlstra, A., Mul, M.F., 2006. Cats and goat whey associated with *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 6, 266 – 274.

Millán, J., Candela, M.G., Palomares, F., Cubero, M.J., Rodríguez, A., Barral, M., de la Fuente, J., Almería, S., León-Vizcaíno, L., 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. J.* 182, 114–124.

Pablos-Tanarro, A., Ortega-Mora, L.M., Palomo, A., Casasola, F., Ferre, I., 2018. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Iberian pig sows. *Parasitol. Res.* 117, 1419–1424.

Olsen, A., Berg, R., Tagel, M., Must, K., Deksne, G., Enemark, H.L., Alban, L., Johansen, M.V., H.V., Nielsen, Sandberg, M., Lundén, A., Stensvold, C.R., Pires, S.M., Jokelainen, P., 2019. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs, sheep, cattle, wild boars, and moose in the Nordic-Baltic region: a systematic review and meta-analysis. *Parasite Epidemiol. Control* 5, e00100.

R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. URL. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Ramos, J.M., Milla, A., Rodríguez, J.C., Padilla, S., Masiá, M., Gutiérrez, F., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among immigrant and native pregnant women in Eastern Spain. *Parasitol. Res.* 109, 1447–1452.

REDIAM, 2019. Red De Información Ambiental De Andalucía. (Accessed 9 July 2019). http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/rediam/menuitem.aedc2250f6db83cf8ca78ca731525ea0/?vgnnextoid=7b3ba7215670f210VgnVCM1000001325e50aRCRD&lr=lang_es.

Reiczigel, J., Földi, J., Ózsvári, L., 2010. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiol. Infect.* 138, 1674 –1678.

Roelke, M.E., Johnson, W.E., Millán, J., Palomares, F., Revilla, E., Rodríguez, A., Calzada, J., Ferreras, P., León-Vizcaíno, L., Delibes, M., O'Brien, S.J., 2008. Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 171 –178.

Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71 –76.

Thrusfield, M., Christley, R., Brown, H., Diggle, P.J., French, N., Howe, K., Kelly, L., O'Connor, A., Sargeant, J., Wood, H., 2018. *Veterinary Epidemiology*, fourth. ed. Blackwell Publishing company All.

van der Giessen, J., Fonville, M., Bouwknecht, M., Langelaar, M., Vollema, A., 2007. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 148, 371–374.

Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., Buffolano, W., 2009. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 161, 1–8.

Wallander, C., Frössling, J., Dórea, F.C., Uggl, A., Vågsholm, I., Lundén, A., 2016. Pasture is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs. *Vet. Parasitol.* 224, 27– 32.

SEGUNDO ESTUDIO

4. SEGUNDO ESTUDIO (SECOND STUDY)

Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba

Julio César Castillo-Cuenca^{1,2} · *Álvaro Martínez-Moreno*³ · *José Manuel Díaz-Cao*² ·
*Angel Entrena-García*⁴ · *Jorge Fraga*⁵ · *Pedro Casanova Arias*⁵ · *Sonia Almería*⁶ ·
*Ignacio García-Bocanegra*²

¹ Departamento, de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara, 54830 Santa Clara, Cuba.

² Animal Health and Zoonosis Research Group (GISAZ), Department of Animal Health, University of Cordoba, 14014 Córdoba, Spain.

³ Department of Animal Health (Parasitology and Parasitic Diseases), University of Cordoba, 14014 Córdoba, Spain.

⁴ Departamento de Parasitología, Centro Nacional Para La Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), 10300 La Habana, Cuba.

⁵ Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, 11400 La Habana, Cuba.

⁶ Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Nutrition (CFSAN), Office of Applied Research and Safety Assessment (OARSA), Division of Virulence Assessment, Laurel, MD, USA.

Parasitology Research, 120(8), pp. 2897–2903. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07245-1>.

Abstract

A cross-sectional study was carried out to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in pigs in the largest pork-producing region in Cuba. Serum samples from 420 pigs, including 210 sows and 210 post-weaning pigs, were tested for antibodies against *T. gondii* using a commercial indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Anti-*T. gondii* antibodies were detected in 56 animals (13.3%, 95% CI: 10.1–16.6). A generalized estimating equations model revealed that the risk factors associated with higher seropositivity in pigs were altitude (higher in farm's location < 250 m above sea level (masl) versus ≥ 250 masl) and age (higher in sows compared to post-weaning pigs). The results indicated that this protozoan parasite is widely distributed on pig farms in the study area, which is a public health concern since the consumption of raw or undercooked pork meat products containing tissue cysts is considered one of the main routes of *T. gondii* transmission worldwide. Control measures should be implemented to reduce the risk of exposure to *T. gondii* in pigs in Cuba.

Keywords: *Toxoplasma gondii* · Seroprevalence · Domestic pigs · Public health · Cuba

Introduction

Toxoplasmosis is a worldwide zoonotic disease caused by the obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, which infects virtually all warm-blooded species including human beings (Dubey *et al.*,2020). Approximately one-third of the human population is considered to be infected by this protozoan parasite (Behnke *et al.*,2020). Although *T. gondii* infection is usually asymptomatic, it can cause abortion, as well as blindness, neuromuscular disease, and even death in immunocompromised people (Dubey, 2010). Moreover, an association between toxoplasmosis and neuropsychiatric disorders, including schizophrenia, has been suggested (Flegr & Horáček, 2017).

Toxoplasma gondii is an important food-borne pathogen (EFSA, 2018). The consumption of raw or undercooked meat products containing tissue cysts is considered one of the main routes of *T. gondii* transmission worldwide (Dubey, 2010; Almeria & Dubey, 2021). In this respect, pork is one of the major sources of human toxoplasmosis in some countries (Dubey *et al.*,2020; Almeria & Dubey, 2021). Public concerns associated with *T. gondii* clearly indicate the need for epidemiological investigation in animals that can be used as a source of food. Previous immunological studies on the presence of *T. gondii* antibodies in domestic pigs carried out in Latin America showed wide variations in the seroprevalence among countries and between regions within the same country (Cañón-Franco *et al.*,2014; Feitosa *et al.*,2014; Foroutan *et al.*,2019; Dubey *et al.*,2020). In Cuba, anti-*T. gondii* antibodies have been found in human patients with acquired immunodeficiency syndrome (Alfonso *et al.*,2009) and retinochoroiditis (Regalado Andújar *et al.*,2013), in pregnant women (González-Morales *et al.*,1995), neonates (Goya Batista *et al.*,2014), and blood donors (Sánchez-Artigas *et al.*,2009). Seropositivity has also been reported in domestic animals, including cats (Grandía *et al.*,2012) and dogs (Navarrete *et al.*,2017) in this country. Nevertheless, information regarding *T. gondii* in domestic pigs in Cuba is very scarce. The only previous survey in this species was carried out in Ciego de Ávila province (Central Cuba) between 1980 and 2002 (Suárez-Hernández *et al.*,2005). Hence, the aim of this study was to assess the current seroprevalence and risk factors associated with *T. gondii* in pigs in the largest pork-producing region in Cuba.

Material and methods

Study design

A cross-sectional study was carried out to determine seroprevalence against *T. gondii* in domestic pigs in Villa Clara (Central Cuba) (Fig. 5). This region accounts for the highest number of domestic pigs and is the largest pork producer in Cuba, with annual production at around 49,332 tons (ONEI, 2017). Pork production in Cuba is characterized by an agreement management system. This means that all breeding farms, including sows, reproductive males, and piglets (from post-farrowing to post-weaning), are managed by the State government in intensive production systems. Fattening is then carried out by private swine farmers until the pigs are ready for slaughter.

The total population of all breeding farms in the study area was used to calculate sampling size. The size of the sampled farms ranged from 500 to 1,600 sows (mean: 1,050 sows). The breeds of the sows and post-weaning pigs were Yorkshire/Landrace and Yorkshire/Landrace X CC21 (Cuban paternal breed), respectively. Sample size was calculated assuming a prevalence of 50% (which provides the highest sample size in studies with unknown prevalence) with a 95% confidence level (95% CI) and desired precision of $\pm 5\%$, resulting in 384 domestic pigs to be sampled (Thrusfield et al. 2018). Sixty animals, including 30 sows and 30 post-weaning pigs, were randomly selected from each pig farm in order to detect infection with 95% probability and assuming a minimum within-farm prevalence of 6%. A total of 420 pigs were finally sampled in seven (A–G) farms managed under governmental intensive production management. All sampled farms presented very similar biosecurity measures including self-replacement gilts (replacement of breeding sows using gilts from the same herd), all-in-all out management, absence of cats, absence of other animal species, perimetral fence around the farm, rodent and insect control, disinfection and disinfestations protocols, sanitary ford, and water chlorination, among others. Farms A, B, F, and G were located < 250 m above sea level (masl), while farms C, D, and E were located at altitudes ≥ 250 masl.

Sample collection and serological analysis

The collection of samples analyzed in the present study was part of the official Animal Health Campaigns under Cuban legislation. No animals were specifically sampled for this study; therefore, no ethical approval was necessary. Blood samples (about 10 ml) were collected using the orbital sinus puncture method. Samples were

then centrifuged at 4,800 rpm for 10 min. Serum samples were separated and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. To obtain the presence of the antibodies against *T. gondii*, serum samples were analyzed using a commercial indirect ELISA (PrioCHECK® *Toxoplasma* Ab porcine, Thermo Fisher Scientific Prionics Lelystad BV) in accordance with the manufacturer's recommendations (Castillo-Cuenca et al. 2020). The sensitivity and specificity of this ELISA according to the manufacturer are 98% and 99.6%, respectively.

Statistical analysis

Individual seroprevalence against *T. gondii* was calculated as the ratio of seropositive animals to the total number of animals examined, using two-sided exact binomial confidence intervals (95% CI). Analysis of means (ANOM) applied to proportions was used to identify farms with a significantly different within-farm seroprevalence relative to the overall mean combining all the sampled farms ("grand mean"), enabling detection of groups that deviate significantly from the overall mean (Rao, 2005). The analysis was performed using the "ANOM" package (Pallmann & Hothorn, 2016) of the statistical software R (R v. 3.5.2). If a statistically significant difference between the farms was found by ANOM, a dummy variable was created ("significantly different farm" vs "other farms") and included in the bivariate analysis.

Epidemiological information including age, sex, farm (from A to G), altitude, and farm size was gathered for each sampled animal. For sows, data on offspring per birth, number of parities, weaning piglets, and stillbirths were also recorded. Bivariate chi-square and Fisher's exact tests were performed to obtain the statistical significance of independent variables regarding individual *T. gondii* status (dependent variable). Variables with $P < 0.20$ in the bivariate analysis were selected as potential risk factors. Collinearity between pairs of variables was tested by Cramer's V coefficient. Finally, a generalized estimating equation (GEE) was carried out to study the effect of the variables selected on the basis of bivariate analysis (Thrusfield *et al.*, 2018). The number of seropositive animals was assumed to follow a binomial distribution and the "farm" was included as random effect. A logarithmic link function was considered. A forward introduction of variables was used, starting with the variable with the lowest P value in bivariate analysis. At each step, the confounding effect of the included variable was assessed by computing the change in the odds ratios (ORs). The model was re-run until all remaining variables presented statistically significant values (likelihood-ratio Wald's

test, $P < 0.05$) and a potential relationship with the response variable existed. The choice of the best model was based on the quasi-likelihood under independence model criterion (Hanley *et al.*, 2003). Statistical analyses were performed using SPSS v25.0 software (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Antibodies against *T. gondii* were detected in 56 of 420 pigs tested (13.3 %, 95 % CI: 10.1–16.6). Seropositivity was found in six of the seven (85.7 %) tested farms, and the within- farm seroprevalence ranged between 5.0 and 25 %: with the highest seroprevalence observed in pigs from farm B and the lowest value in pigs from farm D had the lowest value. Interestingly, antibodies against *T. gondii* were not found in samples from farm C (Table 4) (Fig. 5). ANOM showed a significant lower seroprevalence on farm “C,” which was negative to the presence of anti-*T. gondii* antibodies, in relation to the overall mean of the other farms tested (Fig. 6).

Table 4. Distribution of the prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, using ELISA, on pig farms in Villa Clara province (Cuba) by category. Variables with P-value < 0.20 in the bivariate analysis were included in the multivariate analysis (generalized estimating equation) to determine potential risk factors

Variable	Categories	Number/overall (% positive)	OR	95% CI	Chi-square	P-value
Farm	A	8/60 (13.3)	NA	2.20–9.72	18.830	< 0.001
	B	15/60 (25.0)				
	C	0/60 (0.0)				
	D	3/60 (5.0)				
	E	6/60 (10.0)				
	F	13/60 (21.7)				
	G	11/60 (18.3)				
Altitude (m above sea level)	< 250	47/240 (19.6)	4.627	2.20–9.72	18.830	< 0.001
	≥ 250	9/180 (5.0)	*			
Farm size	> 501	23/120 (19.2)	1.918	1.07–3.43	4.497	0.022
	< 500	33/300 (11.0)	*			
Age	Sows	46/210 (21.9)	5.610	2.75–11.5	26.703	< 0.001
	Post-weaning pigs	10/210 (4.8)	*			
Sex	Male	4/106 (3.8)	0.627	0.17–2.29	0.505	0.350
	Female	6/102 (5.9)	*			

Tesis Doctoral		Castillo-Cuenca, J. C.		Segundo Estudio		
Offspring per birth	< 9	10/32 (31.3)	0.558	0.24–1.28	1.927	0.125
	≥ 10	36/178 (20.2)	*			
Parity number	< 3	30/116 (25.9)	0.588	0.30–1.16	1.927	0.125
	≥ 4	16/94 (17.0)	*			
Weaning piglets	< 9	10/47 (21.3)	1.05	0.48–2.31	0.014	0.541
	≥ 10	36/163 (22.1)	*			
Still birth	Yes	12/67 (17.9)	0.70	0.34–1.46	0.918	0.220
	No	34/143 (23.8)	*			

NA not applicable; *reference category

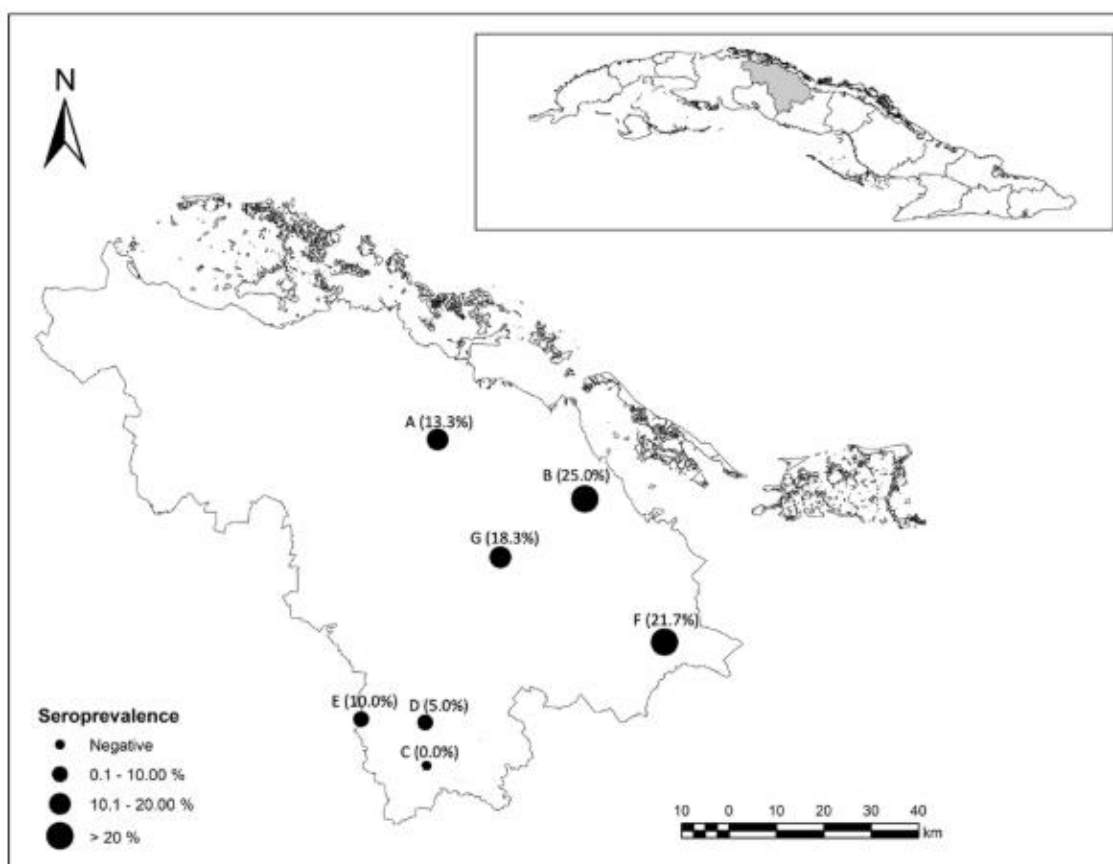


Fig. 5 Map of Villa Clara province (Cuba) showing the distribution and within-farm seroprevalence of *Toxoplasma gondii* on the sampled pig farms.

No association between seropositivity to *T. gondii* and sex, offspring per weaning piglets, and still birth was found in the bivariate analysis. Farm, altitude, farm size, age, offspring per birth, and parity number were selected for the multivariate analysis (Table 4). The final GEE model showed that the main factors associated with *T. gondii* seropositivity in pigs in Cuba were altitude and age. The prevalence of *T. gondii* antibodies was significantly higher on farm located < 250 masl (19.6%; 95% CI: 14.6–24.6)

compared to the farms located at altitude ≥ 250 masl (5.0%; 95% CI: 1.8–8.2) (OR = 5.28; $P = 0.001$; 95% CI: 1.91–14.57). Significantly higher seropositivity was also found in sows (21.9%; 95% CI: 16.3–27.5) compared to post-weaning pigs (4.8%; 95% CI: 1.8–7.6) (OR = 6.05; $P < 0.001$; 95% CI: 2.53–14.60).

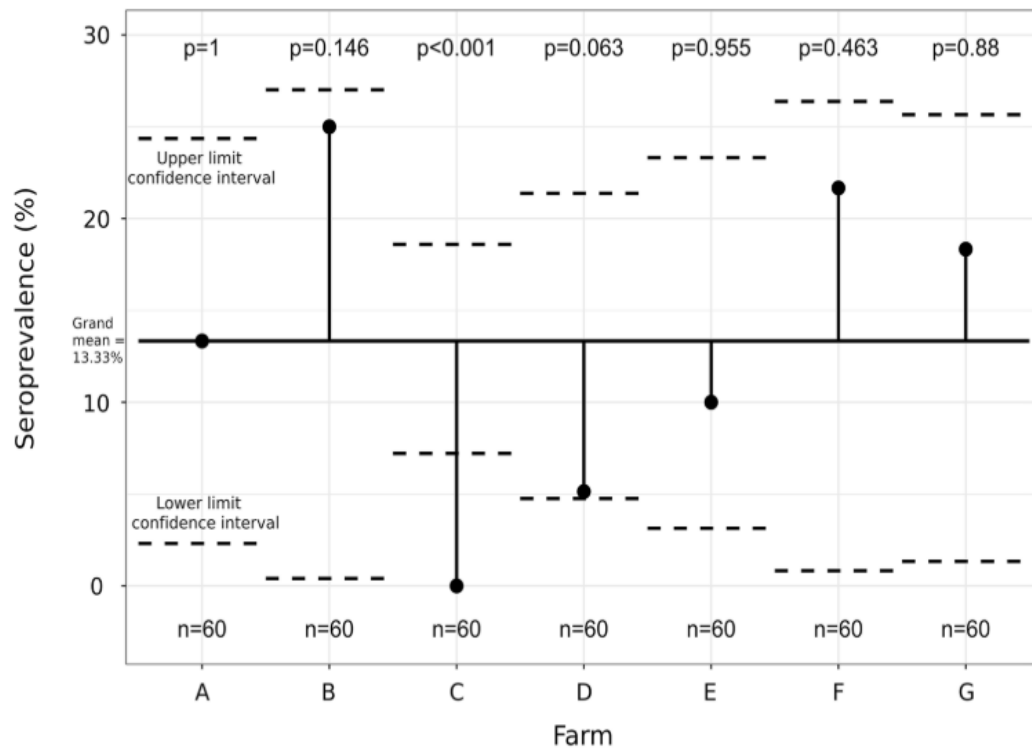


Fig. 6 Results of the analysis of means comparing seroprevalences on the sampled farms

Discussion

Consumption of contaminated undercooked or raw meat from farm animals has been known to be a major risk factor for acquisition of *T. gondii* infection in humans, and among food livestock species, pork is considered one of the main sources of *T. gondii* infection (Almeria & Dubey, 2021). The first key step to prevent transmission of this zoonotic parasite in the swine production is to determine the presence of the parasite in the farms. In this regard, serological surveillance is the most commonly used method tool for identifying *T. gondii* exposure in pigs.

The individual seroprevalence detected in pigs raised in Cuba in our study (13 %) is of the same magnitude as found previously in Cuba (14 %) and in other Latin American countries such as Brazil (13 %), Colombia (15 %), and Mexico (ranging between 13 and 17 %) (Suárez-Hernández *et al.*, 2005; Foroutan *et al.*, 2019; Dubey *et*

al.,2020). Slightly higher mean seroprevalence values were observed in Brazil (ranging between 20 and 26 %), while higher seropositivity was found in Argentina (48 %), Brazil (ranging between 33 and 52 %), Costa Rica (44 %), Hawaii (49 %), Mexico (ranging between 45 and 97 %), Panamá (32 %), and Peru (30 %) (Cañón-Franco *et al.*,2014; Foroutan *et al.*,2019; Dubey *et al.*,2020). In contrast, lower seroprevalence rates were detected in other studies in Brazil (ranging between 0 and 8 %), Chile (9 %), and Mexico (ranging between 1 and 9 %) (Foroutan *et al.*,2019; Dubey *et al.*,2020). Even though statistically accurate comparisons cannot be made given the differences in number of animals tested, the population sampled, and/ or the different serological methods used, we would like to state that the seroprevalence in pigs in the study area should be considered moderate.

At least one seropositive pig was detected in six of the seven (85.7 %) farms tested, with positive within-farm seroprevalence values ranging between 5.0 and 25.0 %. Although farm “C” was negative to the presence of anti-*T. gondii* antibodies, the number of samples collected in each farm was calculated assuming a minimum within-farm prevalence of 6 % and therefore, the possibility of that particular farm having a seroprevalence lower than 5 % could not be discounted. The results indicated that *T. gondii* infection is widespread on pig breeding farms in Cuba. Since the sampled farms were all managed under a very similar production system, the environmental characteristics may explain differences in the seroprevalences in pigs within the study region. In this regard, farms located < 250 masl showed significantly higher seropositivity compared to the raised at higher altitude. Our results are in agreement with those reported by Villari *et al.* (2009) who consider the higher altitude (> 200 masl) of the farms as a protective factor of *T. gondii* exposure; this observation is likely associated with a reduced environmental viability of oocysts with decreasing ambient temperature and, perhaps, also humidity. Higher seroprevalence levels were also found in wild boars (*Sus scrofa*) sampled in hunting states located < 600 masl compared to those sampled at higher altitude (Calero-Bernal *et al.*,2016). In contrast, other studies observed higher seropositivity to *T. gondii* in pigs raised in mountainous regions than those raised in lowlands (Alvarado-Esquivel *et al.*,2012; Papatsiros *et al.*,2016). The reason for these differences is unclear; however, environmental, and climatic conditions may impact survival of oocysts in soil, food, and water

contaminated with feline feces (Gauss *et al.*,2006), which are the likely sources of infection for pigs. Further studies are needed to address this issue.

Significantly higher seropositivity was found in sows compared to post-weaning pigs. Age is an important factor affecting *T. gondii* seroprevalence in pigs because most animals acquire *T. gondii* infection postnatally (Dubey, 2009). The higher prevalence of *T. gondii* antibodies in sows compared to post-weaning pigs is consistent with those previously reported (García-Bocanegra *et al.*,2010a; Hill *et al.*,2014; Djokic *et al.*,2016; Castillo-Cuenca *et al.*,2020) and probably reflects the cumulative likelihood of exposure to *T. gondii* and lifelong persistence of IgG antibodies. Maternal-derived antibodies decline after the first week of age, but the decay is dependent on the antibody level of the dam at birth. However, because maternally transferred antibodies can persist until 4 months of age (Dubey, 2009; García-Bocanegra *et al.*,2010b), the presence of maternally transferred antibodies detected in some seropositive post-weaning pigs cannot be ruled out.

Toxoplasmosis outbreaks have been reported in humans by ingestion of infected porcine meat containing tissue cysts (Choi *et al.*,1997; Vitale *et al.*,2014; Almeria & Dubey 2021). Even though we are not aware of any report of human toxoplasmosis directly linked to eating infected pork in Cuba, ocular toxoplasmosis (Mesa Hernández *et al.*,2011; Galbán Lueje *et al.*,2013; Bustillo *et al.*,2015; Ginorio Gavito *et al.*,2017), toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome (Alfonso *et al.*,2009), acute toxoplasmosis in pregnant women (Lombana *et al.*,2012), and congenital toxoplasmosis (Amador Morán *et al.*,2016) have been reported in this country. Moreover, seropositivity values found in pregnant women (38%) (González- Morales *et al.*,1995), neonates (23%) (Goya Batista *et al.*,2014), and blood donors (13%) (Sánchez-Artigas *et al.*,2009) indicate that *T. gondii* is widely distributed in the human population in Cuba. Since viable *T. gondii* can be found in seropositive pigs, our results suggest that the consumption of non-properly cooked pork products may contribute to human toxoplasmosis in Cuba, and studies on the zoonotic impact of this disease are urgently needed in this country.

In summary, this is the first report on *T. gondii* in pigs in Villa Clara province, the largest pork-producing region in Cuba. Although the number of sampled farms was limited, the results obtained provide a first approximation to *T. gondii* exposure in

domestic pigs in a country where there was no recent information in this animal species. The observed seropositivity indicates that this zoonotic parasite is widespread in pig breeding farms in the largest pork-producing region in Cuba. This finding indicates a public health concern because seropositive pigs can harbor tissue cysts in their meat, therefore representing a tentative zoonotic risk for consumers of raw or undercooked porcine meat or its products. In addition, evisceration and management of carcasses of infected pigs could also constitute a risk of infection for humans. Our results may contribute to the development of improved control strategies against *T. gondii* in this country. Further immunological and molecular studies on genotypes circulating in pig farms must be conducted to increase the knowledge of the epidemiology of *T. gondii* in Cuba.

Acknowledgements

We would like to thank the Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP, in Spanish) for funding the doctoral training of the first author of this research. We would also like to thank the members of the Epizootiology Department of the Swine Company in Villa Clara, and the team of the Quality Area of the National Center for Animal Production Laboratories (CENPALAB in Spanish) for their help in the sampling and analysis of the collected samples, respectively.

Funding

Universidad de Córdoba/CBUA.

Declarations

Conflict of interest: The authors declare no competing interests.

Open Access

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use,

you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C et al (2009) Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Res* 6:2. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-6-2>
- Almeria S, Dubey JP (2021) Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. *Res Vet Sci* 135:371–385. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.019>
- Alvarado-Esquivel C, Estrada-Malacón MA, Reyes-Hernández SO et al (2012) High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *J Parasitol* 98:1248–1250. <https://doi.org/10.1645/GE-3184.1>
- Amador Morán R, Coutos Ramos MJ, Peña Cedeño A et al (2016) Presentación de un caso con toxoplasmosis congénita. *Rev Cuba Obstet y Ginecol* 42. <http://revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/47/31>. Accessed Feb 2021
- Behnke MS, Saeij JPJ, Boyle JP (2020) Development and application of classical genetics in *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii*, Thirth. Wiess, L.M. and Kim, K. Academic Press, Elsevier, p 859–896. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00019-0>
- Bustillo JL, Diaz JD, Pacheco IC, Gritz DC (2015) Cuban ocular toxoplasmosis epidemiology study (COTES): incidence and prevalence of ocular toxoplasmosis in Central Cuba. *Br J Ophthalmol* 99:382–386. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305843>
- Calero-Bernal R, Pérez-Martín JE, Reina D et al (2016) Detection of zoonotic protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in wild boars from Spain. *Zoonoses Public Health* 63:346–350. <https://doi.org/10.1111/zph.12243>
- Cañón-Franco WA, López-Orozco N, Gómez-Marín JE, Dubey JP (2014) An overview of seventy years of research (1944–2014) on toxoplasmosis in Colombia. *South America Parasit Vectors* 7:427. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-427>
- Castillo-Cuenca JC, Díaz-Cao JM, Martínez-Moreno Á et al (2020) Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain. *Prev Vet Med* 175:104–854. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.06.001>
- Choi W-Y, Nam H-W, Kwak N-H et al (1997) Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis* 175:1280–1282. <https://doi.org/10.1086/593702>

Djokic V, Fablet C, Blaga R et al (2016) Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds. *Parasit Vectors* 9:466. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1753-5>

Dubey JP (2010) *Toxoplasmosis of animals and humans*. Second. CRC Press Taylor & Francis Group, New York

Dubey JP (2009) *Toxoplasmosis in pigs—the last 20 years*. *Vet Parasitol* 164:89–103. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018>

Dubey JP, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA et al (2020) All about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: 2009–2020. *Vet Parasitol* 288:109–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109185>

EFSA (2018) Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA J* 16:e05495. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5495>

Feitosa TF, Vilela VLR, Bezerra de Melo LR et al (2014) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Vet Parasitol* 202:305–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.015>

Flegr J, Horáček J (2017) *Toxoplasma*-infected subjects report an Obsessive-compulsive disorder diagnosis more often and score higher in Obsessive-Compulsive Inventory. *Eur Psychiatry* 40:82–87. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2016.09.001>

Foroutan M, Fakhri Y, Riahi SM et al (2019) The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: a systematic review and metaanalysis. *Vet Parasitol* 269:42–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.012>

Galbán Lueje T de las M, Lima León CE, Fariñas Falcón Z et al (2013) Caracterización de la toxoplasmosis ocular en pacientes de consulta externa. *Acta Med* 7:12–22. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medicadelcentro/mec-2013/mec134c.pdf>. Accessed Oct 2020

García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Dubey JP et al (2010a) Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol Int* 59:421–426. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.06.001>

García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Sibila M et al (2010b) Duration of maternally derived antibodies in *Toxoplasma gondii* naturally infected piglets. *Vet Parasitol* 170:134–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.042>

Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D et al (2006) Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. *Vet Parasitol* 136:193–200. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.013>

Ginorio Gavito DE, Vilches Lescaille D, Gracial X et al (2017) Toxoplasmosis ocular: Algunos hallazgos clínicos y seroepidemiológicos. *Rev AACC* 7:4–13. <http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/352/352>. Accessed Nov 2020

González-Morales T, Bacallo-Gallestey J, García-Santana CA, Molina- García JR (1995) Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en una población de mujeres embarazadas en Cuba. *Gac Méd Méx* 131:400. https://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1995-131-5-6-499-503.pdf. Accessed Mar 2021

Goya Batista Y, Sánchez Artigas R, Cobos Valdes D et al (2014) Determinación de anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii* en neonatos de la Sala de Neonatología del Hospital General Universitario “Vladimir Ilich Lenin”, Holguín. *Rev Cuba Investig Biomed* 33:12–18. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v33n1/ibi02114.pdf>. Accessed Oct 2020

Grandía R, Entrena Á, Cruz J et al (2012) Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y factores de riesgo asociados en *Felis catus* en La Habana. *Rev Salud Anim* 34:201. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000300013. Accessed Nov 2020

Hanley JA, Negassa A, Edwardes MD, Forrester JE (2003) Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. *Am J Epidemiol* 157:364–375. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf215>

Hill DE, Dubey JP, Baroch JA et al (2014) Surveillance of feral swine for *Trichinella spp.* and *Toxoplasma gondii* in the USA and host-related factors associated with infection. *Vet Parasitol* 205:653– 665. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.026>

Lombana RS, Cabrera MPC, Gavito DG et al (2012) Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Cuba Obstet Ginecol* 38:99–106. <http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v38n1/gin12112.pdf>. Accessed Nov 2020

Mesa Hernández E, González Peña O, Padilla González C et al (2011) Comportamiento de la toxoplasmosis ocular activa en el Instituto Cubano de Oftalmología “Ramón Pando Ferrer”. *Rev Cuba Oftalmol* 24:124–135. <http://scielo.sld.cu/pdf/oft/v24n1/oft12111.pdf>. Accessed Oct 2020

Navarrete MG, Cordeiro MD, Batista Y et al (2017) Serological detection of *Toxoplasma gondii* in domestic dogs in the western region of Cuba. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 9:9–12. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.03.005>

ONEI (2017) Anuario Estadístico de la Provincia de Villa Clara. La Habana. <http://www.onei.gob.cu/mapa/provincia/villaclara>. Accessed March 2021

Pallmann P, Hothorn LA (2016) Analysis of means: a generalized approach using R. *J Appl Stat* 43:1541–1560. <https://doi.org/10.1080/02664763.2015.1117584>

Papatsiros VG, Athanasiou LV, Stougiou D et al (2016) Cross-sectional serosurvey and risk factors associated with the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16:48–53. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1845>

Rao CV (2005) Analysis of means—a review. *J Qual Technol* 37:308–315. <https://doi.org/10.1080/00224065.2005.11980334>

Regalado Andújar B, Rodríguez Peña MS, Fraga Nodarse J, et al (2013) Aplicación de herramientas serológicas y moleculares para el diagnóstico de coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*. *Rev Cuba Med Trop* 65:13–25. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000100003. Accessed Feb 2021

Sánchez-Artigas R, Góngora-Amores W, Torres-Ponce Z, Castañeda-Comerón B (2009) Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en donantes especiales de sangre en el municipio de Holguín. *Ciencias Holguín* 15:1–8. <http://www.ciencias.holguin.cu/index.php/cienciasholguin/article/view/529>. Accessed Feb 2021

Suárez-Hernández M, González-Fernández A, Gardón-Quirola BY, Martínez-Sánchez R (2005) 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* 16:21–27. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=7396>. Accessed Mar 2021

Thrusfield M, Christley R, Brown H et al (2018) *Veterinary epidemiology*. Fourth. John Wiley & Sons, Oxford

Villari S, Vesco G, Petersen E et al (2009) Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet Parasitol* 161:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.019>

Vitale M, Tumino G, Partanna S et al (2014) Impact of traditional practices on food safety: a case of acute toxoplasmosis related to the consumption of contaminated raw pork sausage in Italy. *J Food Prot* 77:643–646. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-285>

TERCER ESTUDIO

5. TERCER ESTUDIO (THIRD STUDY)

Seroprevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs intended for human consumption in Cuba

Julio César Castillo-Cuenca¹, Sonia Almería², Rafael Calero-Bernal³, Mercedes Fernández-Escobar³, Jorge Fraga⁴, Angel Entrena-García⁵, Pedro Casanova Arias⁴, Álvaro Martínez-Moreno^{6,*}, Ignacio García-Bocanegra^{7,8}

Affiliations

¹ Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara, Santa Clara, Cuba

² Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Nutrition (CFSAN), Office of Applied Research and Safety Assessment (OARSA), Division of Virulence Assessment, Laurel, MD, USA

³ SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

⁴ Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, La Habana, Cuba

⁵ Departamento de Parasitología, Centro Nacional Para La Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba

⁶ Department of Animal Health (Parasitology and Parasitic Diseases), University of Cordoba, Córdoba, Spain

⁷ Departamento de Sanidad Animal, Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Zoonosis (GISAZ), UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

⁸ CIBERINFEC, ISCIII – CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

* **Correspondence:** Álvaro Martínez-Moreno

Department of Animal Health (Parasitology and Parasitic Diseases), University of Cordoba, Córdoba, Spain. Email: salmarma@uco.es

Abstract

Domestic pigs are considered one of the main intermediate hosts in the zoonotic transmission of *Toxoplasma gondii* in many countries. Serological and molecular studies are warranted to better understand the epidemiology and transmission patterns of this parasite worldwide. 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. Here, we aimed to estimate the seroprevalence of *T. gondii* and provide genetic characterization of the strains circulating in slaughtered pigs intended for human consumption in Central Cuba. Seroprevalence was determined in 450 serum samples from slaughtered pigs in Villa Clara province using ELISA. Anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies were detected in 100 animals (22.2%, 95% CI: 18.5–26.2). Conventional PCR of the 529-bp marker of *T. gondii* was performed in hearts and diaphragm tissues of all ELISA-seropositive pigs. *Toxoplasma gondii* DNA was detected in four animals. Further genetic characterization of the positive DNA samples was performed by multilocus PCR-RFLP and PCR-sequencing typing tools. Molecular analysis revealed four different genetic profiles that were combinations of type I, II, III and u-1 alleles, suggesting the circulation of non-clonal genotypes of *T. gondii* in domestic pigs in Cuba. Our results indicate that *T. gondii* is widely distributed in slaughtered pigs in this country, which might have important implications for public health. To the best of our knowledge, this is the first report on genetic characterization of *T. gondii* in Cuba. Although preliminary, the results suggest a high genetic diversity of *T. gondii* in the study region. Further studies based on parasite isolation are needed to definitively identify the genotypes circulating and characterize the virulence of strains detected in pigs in Cuba, and to assess the risk of zoonotic transmission from pork products in this country.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, domestic pigs, serosurvey, genetic characterization, Cuba

Impacts

- *Toxoplasma gondii* is widely distributed in slaughtered pigs intended for human consumption in Cuba.
- First report on genetic characterization of *T. gondii* in Cuba.
- *T. gondii* DNA samples characterized presented genetic profiles related to non-canonical genotypes.
- Molecular results suggest a high genetic diversity of *T. gondii* in the study region
- Control measures should be implemented to reduce the risk of exposure to *T. gondii* in pigs in Cuba.

Introduction

Toxoplasmosis is an important zoonotic disease of worldwide distribution. It is caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, which infects most homeothermic animals, including humans (Dubey, 2022). Approximately 30% of the world's human population is infected with this intracellular obligate parasite (McLeod et al., 2020). Although the infection by *T. gondii* is typically asymptomatic in immunocompetent individuals, the parasite can cause neurological and ophthalmological diseases when acquired postnatally, and serious, even fatal, cases in children infected congenitally (McLeod et al., 2020). Moreover, accumulating evidence suggests that latent infection with *T. gondii* might be associated with a variety of neuropsychiatric and behavioral conditions in human beings (Milne et al., 2020).

Consumption of infected raw or undercooked meat from farm animals, mostly pork, is considered the main route of *T. gondii* infection in humans in many countries (Belluco et al., 2018; Dubey et al., 2020). Pork is the most frequently consumed meat in Cuba (ONEI, 2017); however, epidemiological studies on *T. gondii* in pigs are very scarce in the country (Castillo-Cuenca et al., 2021; Suárez-Hernández et al., 2005), and survey studies in pigs intended for human consumption have not been carried out to date. Despite sources of infection not being attributed, clinical cases, including ocular toxoplasmosis in immunocompetent people, have been reported in this country (Bustillo et al., 2015; Ginorio Gavito et al., 2017). The incidence of congenital toxoplasmosis is unknown.

Currently, the *T. gondii* population is considered complex and diverse, constituted by 16 haplogroups assorted into six major clades (Lorenzi et al., 2016); indeed, more than 300 distinct genotypes have been identified (ToxoDB.org). Studies in the Caribbean area reported a high frequency of non-canonical strains and a noticeable proportion of type III strains (Dubey et al., 2016). Although congenital toxoplasmosis has been reported in humans in Cuba affecting different organs (Amador Morán et al., 2016), to our knowledge, there is no previous research on genetic characterization of *T. gondii* in Cuba. The main aims of the present study were to determine the seroprevalence of *T. gondii* in slaughtered pigs intended for human consumption and to genetically characterize *T. gondii* strains infecting such host species in Cuba.

Material and methods

Study area and sampling

A cross-sectional study was performed to determine the individual seroprevalence of *T. gondii* IgG antibodies and assess the genotypes circulating in fattening pigs intended for human consumption in Villa Clara (largest pork producer province in Cuba) (Figure 7).

The total pig population of all fattening farms in the study area (> 10.000) was used to calculate sampling size. The sample size was established assuming an estimated *T. gondii* seroprevalence of 50%, which provides the highest sample size in studies with unknown prevalence (Thrusfield et al., 2018), a desired absolute precision of $\pm 5\%$, and a 95% confidence level (95% CI), resulting in 384 domestic pigs being sampled.

A total of 450 blood samples, paired with heart and diaphragm tissues, were finally collected from selected slaughtered pigs (animals of around six months of age and 90 kg of weight on average) intended for human consumption at the main slaughterhouse in the province of Villa Clara. All the pigs slaughtered and sampled came from private farms, a distinct characteristic of pig fattening in Cuba (Castillo-Cuenca et al., 2021). Samples were collected from January to March 2019 during nine sampling days, taking 50 samples per sampling day. Animals were selected using a systematic random sampling method. For each sampled pig, at least 100 g of diaphragm and heart were collected, introduced in individual plastic bags, refrigerated at 4°C during transportation to the laboratory, and frozen at -20°C until analysis. Moreover, approximately 10 mL of blood was collected at the time of bleeding in the slaughter line. Data on sex and origin (at municipality level) were recorded for each sampled pig.

Serological analysis

Blood samples were centrifuged at 400 \times g for 10 min. Serum was separated and stored at -20°C until tested. Serum samples were analyzed using a commercial indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA; PrioCHECK® *Toxoplasma* Ab porcine, Thermo Fisher Scientific Prionics AG, Zurich, Switzerland) in accordance with the manufacturer's recommendations as previously described (Castillo-Cuenca et al., 2021). The sensitivity and specificity rates of this ELISA provided by the manufacturer were 98.0% and 99.6%, respectively.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from each tissue sample using the commercial QIAamp® Fast DNA Tissue kit (Qiagen®, Düsseldorf, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 25 mg of each tissue were incubated with proteinase K at 56°C for 10 min in a thermomixer. DNA samples were obtained after purification by silica gel column chromatography and eluted into 100 µL of elution buffer.

DNA detection

Screening for the *T. gondii* DNA presence in the DNA samples extracted from pig tissues was carried out by a conventional PCR amplification of the specific 529-bp repetitive element marker (Homan et al., 2000). In brief, the PCR reaction was performed in a 25 µL using HotStar Plus DNA Polymerase and a Bio-Rad T100 thermocycler. PCR products were evaluated on 2% agarose gels in 0.5X TBE buffer, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Genetic characterization by multilocus nested-PCR-RFLP

Toxoplasma gondii strains detected were characterized using a multilocus nested (Mn)-PCR-RFLP method based on ten genetic markers *SAG1*, *SAG2* (3'-*SAG2* and 5'-*SAG2*), *SAG3*, *GRA6*, *C22-8*, *L358*, *BTUB*, *C29-2*, *PK1* and *Apico* (Su et al., 2010). Basically, the multiplex PCR reaction was carried out in a 50 µL reaction volume containing 0.15 µM of each of the external forward and reverse primers, 200 µM of dNTPs (Eurogentec, Belgium), 2 mM of MgCl₂, 1X Q solution, 1X PCR Buffer, 1 Unit HotStart Plus DNA Polymerase and 10 µL of sample DNA (Qiagen®, Düsseldorf, Germany). As positive controls, 2 µL DNA extracted from the strains RH (Type I, ToxoDB#10), Wil (Type II, haplogroup 2) and PRU (Type II variant, ToxoDB#3) were used. Nuclease-free water was used as negative control. The reaction mixture was treated at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min. Subsequent individual nested PCR (nPCR) reactions were carried out in 25 µL volume containing 0.3 µM of each corresponding pair of internal forward and reverse primers, 200 µM of dNTPs, 2 mM of MgCl₂, 1X of Q solution, 1X of PCR Buffer, 1 Unit of HotStart Plus DNA Polymerase and 4 µL of previous multiplex PCR product. PCR products from internal reactions were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and examined under UV light. Each positive nPCR product (7 µL) was digested with restriction endonucleases in a 10 µL

volume then resolved on a 3 % agarose gel to reveal the DNA banding pattern. The DNA restriction patterns obtained were compared with the profiles deposited in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>).

Genetic characterization by PCR-sequencing

Because of the interest in sequence-based genotyping (Fernández-Escobar et al., 2020) and aiming to phylogenetic analyses, the amplicons of the *SAG1* and *SAG3* markers were further sequenced using a 3730XL automatic sequencer from Applied Biosystems (ABI; Microsynth Seqlab, Maschmühlenweg, Göttingen, Germany). These sequences were curated manually when necessary and analyzed using BioEdit software, version 7.0.5.3 (Hall, 1999). *SAG1* and *SAG3* sequences were also concatenated and aligned using MEGA X software (Kumar et al., 2018) to generate an unrooted phylogenetic tree and evaluate the population structure of *T. gondii* Cuban strains described here; type I and II reference strains (RH, Tg51, Wil and PRU) were included for comparison. On the other hand, generated *SAG3* sequences were also aligned to similar available sequences originated in America retrieved from the NCBI database through the BLAST tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), using MEGA X software (Kumar et al., 2018). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987) and conducted in MEGA X software. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches in each tree (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004). The sequences obtained in the present study have been deposited in GenBank (*SAG3*: OM836491-OM836494; *SAG1*: OM648096-OM648099).

Statistical analyses

Individual seroprevalence was estimated from the ratio of ELISA-positive sera to the total number of analyzed samples, with 95% exact binomial confidence intervals (95% CI). Associations between serological results and independent variables (sex and municipality) were analysed by Pearson's chi-square or Fisher's exact tests, as appropriate. Differences were considered statistically significant when p -value < 0.05. Statistical analyses were performed using SPSS 25.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

One hundred of the 450 sera were positive for anti-*T. gondii* IgG antibodies (22.2%; CI 95%: 18.5–26.2). Seropositive pigs were detected in all the municipalities sampled, and the within-municipality seroprevalence ranged between 13.6% and 36.8% (Figure 7). Statistically significant differences in seroprevalence between sexes (22.2% [54/243] and 22.2% [46/207] in males and females, respectively) ($p = 0.545$) or municipalities ($p = 0.572$) were not found.

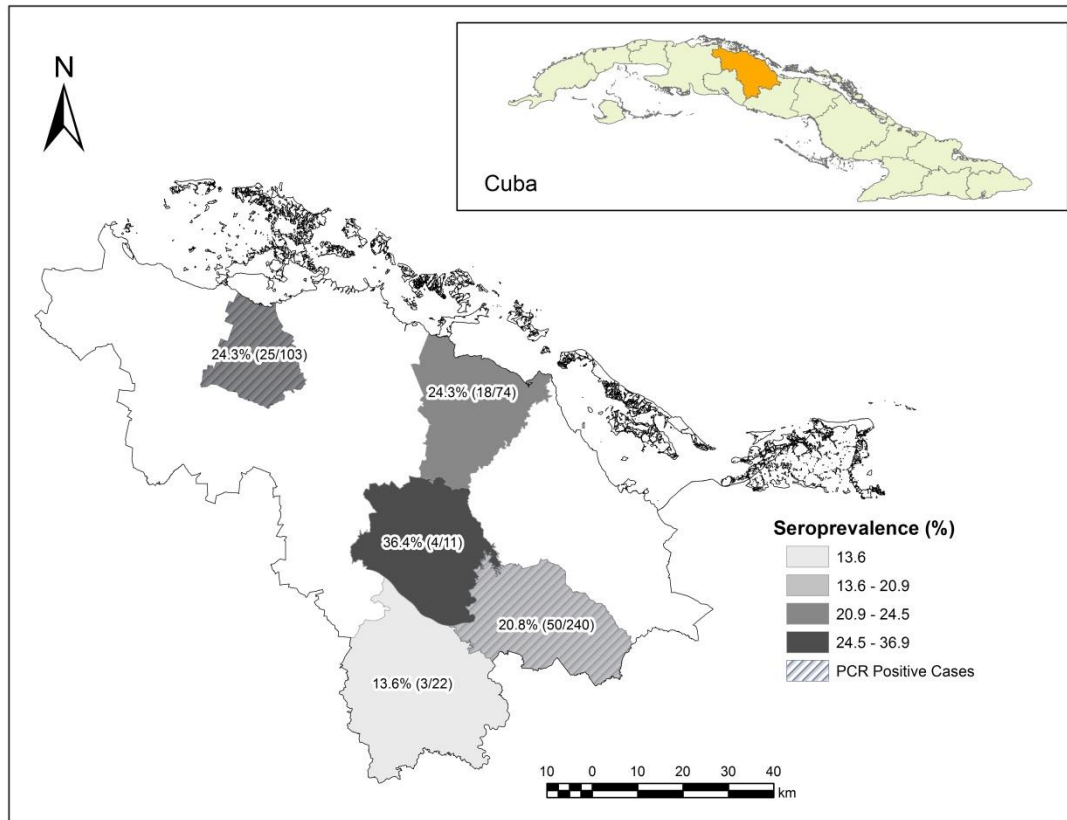


Figure 7. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* seropositivity in slaughtered pigs in Villa Clara province (Central Cuba).

Toxoplasma gondii DNA was detected in heart samples from four of the 100 ELISA-seropositive individuals (4%; pigs 77, 97, 129 and 143) by conventional PCR. *Toxoplasma gondii* DNA was also found in diaphragm tissues from pig 97 (1%). PCR-positive pigs were two males (pigs 77 and 97) from municipality of Placetas, and one female (pig 129) and one male (pig 143) from Quemado de Güines.

Only the four *T. gondii* DNA-positive samples from heart could be successfully characterized for at least five genetic markers (SAG1, SAG2, SAG3, c22-8 and L358);

samples from pig 77 could be also genotyped at *GRA6* marker. Genetic characterization by Mn-PCR-RFLP revealed four different genetic profiles that were combinations of type I, II, III and u-1 alleles. Pigs 97 and 129 were shown to be infected by undescribed potentially non-canonical genotypes, the other two PCR-positive animals resulted in allele combinations that could be related to ToxoDB #138 (pig 143) or other recombinant genotypes (pig 77) (Table 5).

Table 5. Multilocus PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* DNA from domestic pigs intended for human consumption in Cuba.

Pig ID	Municipality	<i>SAG1</i>	3'-5' <i>SAG2</i>	<i>SAG3</i>	<i>GRA6</i>	<i>C22-8</i>	<i>L358</i>	ToxoDB genotypes interpretation
77	Placetas	u-1	II	III	II	II	II	Six markers matched with ToxoDB #9, #20, #137
97	Placetas	u-1	III	III	na	II	II	No match (potential undescribed genotype)
129	Quemado de Güines	I	III	I	na	II	II	No match (potential undescribed genotype)
143	Quemado de Güines	u-1	III	III	na	III	III	Five markers matched with ToxoDB #138

na: no amplification

Regarding PCR-sequencing results, data obtained supported a certain degree of heterogeneity within the *T. gondii* population infecting pigs in Cuba. Concatenation of *SAG1+SAG3* markers (Figure 8A) allowed us to observe how Cuban pig samples split into 2 branches; sample 129 clearly clustered with RH strain, in agreement with its type I-like RFLP profile, whereas samples 77, 97 and 143 clustered together conditioned by the allele u-1 present in *SAG1* marker. On the other hand, the detected SNPs G1593T, G1594A and A1614G allowed the discrimination in a separate branch of the sample 143. G1593T and G1594A lead to an amino acid change from Gly to Tyr, while A1614G causes a change from Ser to Gly.

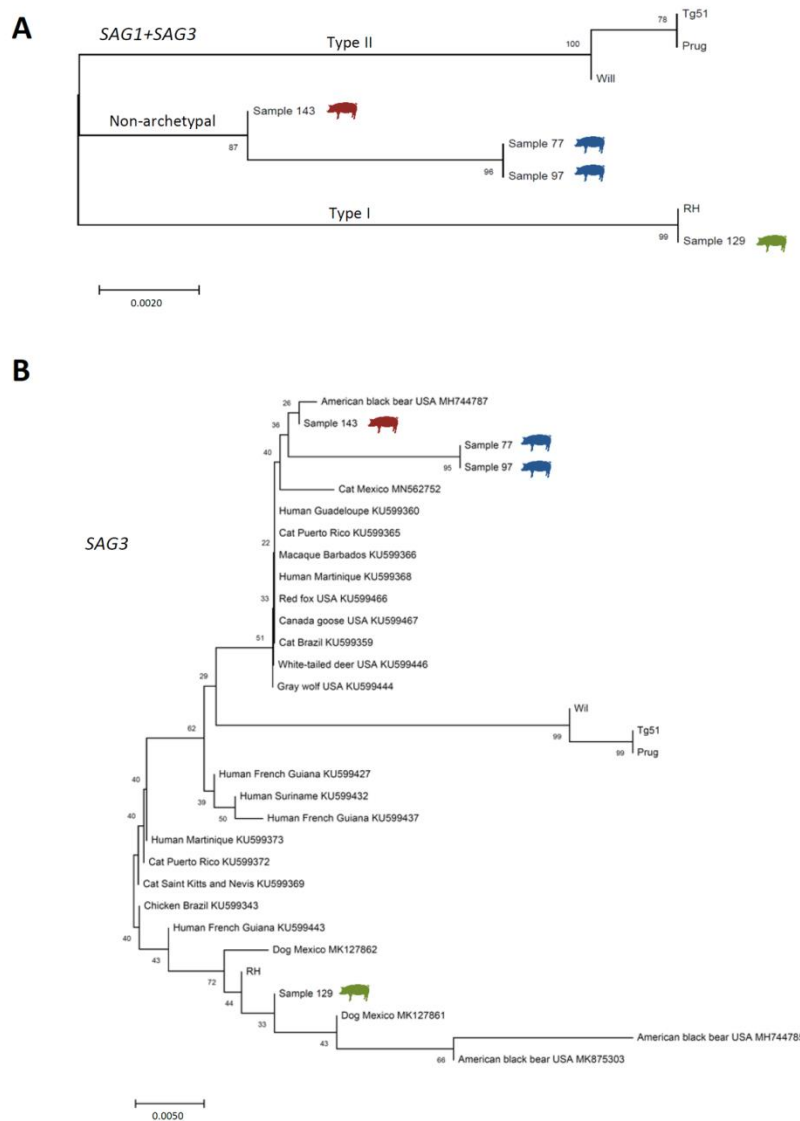


Figure 8. Phylogenetic positioning of the *Toxoplasma gondii* genetic variants detected in domestic pigs from Cuba based on **A)** concatenated *SAG1+SAG3* sequences generated in this study, and **B)** *SAG3* sequences from Cuban pigs along with similar available sequences originated in America (North, Central, and South American territories) retrieved from the NCBI database. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura *et al.*, 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Phylogenetic analyses based on *SAG3* marker sequences obtained here in addition to those retrieved from NCBI related to strains originated in America (North,

Central, and South American territories) are shown in Figure 2B. The tree showed a clear clustering of samples from pigs 77 (GenBank Accession Number: OM836491) and 97 (OM836492). Sample from animal 143 (OM836494) showed 100% homology with the isolate MH744787 from American black bear (*Ursus americanus*), among others. Finally, sample from pig 129 (OM836493) clustered with type I-related strains. In addition, this sample grouped close to sequences MK127861, MH744785, and MK875303 of recombinant isolates which have been identified as atypical variants at the *SAG3* region.

Discussion

Public concerns associated with *T. gondii* clearly indicate the need for epidemiological investigation in animals used as a source of food. In this regard, the consumption of raw or undercooked pork products is considered one of the main sources of *T. gondii* infections in humans in many countries (Dubey et al., 2020). In the present study, we provide epidemiological information on *T. gondii* in slaughtered pigs in Cuba, a country where a very limited information on this zoonotic protozoan has been reported in livestock to date.

To the best of the authors' knowledge, this is the first survey on *T. gondii* conducted in fattening pigs intended for human consumption and the first genetic characterization study on this parasite in this country. The seroprevalence obtained (22.2%) is of the same magnitude than those reported globally (19%) and for Central and South America (23%) (reviewed by Foroutan et al., 2019). Higher mean seroprevalence values in pigs (ranging between 32.5% and 96.6%) have been observed in other Central and South American countries (reviewed by Dubey, 2022), while lower seroprevalence values have been detected in fattening pigs raised in intensive farms in Brazil (ranging between 0% and 8%) (Frazão-Teixeira & de Oliveira, 2011; Miura et al., 2019; Oliveira et al., 2019), Chile (9%) (Muñoz-Zanzi et al., 2012) and Mexico (ranging between 1% and 9%) (Alvarado-Esquivel et al., 2012; Cubas-Atienzar et al., 2019).

To date, only two previous studies have been carried out on seroprevalence of *T. gondii* in domestic (not fattening) pigs in Cuba. In a first study, conducted in 2,189 pigs sampled in Ciego de Ávila province (Central Cuba) during the period 1980-2002, Suárez-Hernández et al. (2005) reported a seroprevalence of 14%. More recently,

similar overall seroprevalence (13%) was found in sows and post-weaning piglets in the province of Villa Clara (Castillo-Cuenca et al., 2021). Of note, the seroprevalence detected in fattening pigs intended for human consumption in our study (22.2%) was very similar to that found in sows (21.9%) and considerably higher than the observed in post-weaning piglets (4.8%) in that previous study. The higher *T. gondii* seropositivity observed in sows and slaughtered pigs compared to the post-weaning period in Cuban pigs agrees with those previously reported (Dubey et al., 2020; García-Bocanegra et al., 2010), and reflects a cumulative probability of exposure to *T. gondii* and lifelong persistence of antibodies. In addition, the higher *T. gondii* exposure during the finishing period could be due to the more hygienically relaxed management conditions in this period and/or the presence of outdoor facilities in growing-finishing units in the herds.

Seropositive animals were detected in all the municipalities sampled, with a within-municipality seroprevalence ranging between 13.6% and 36.9%. These findings indicate that *T. gondii* is widely distributed in slaughtered pigs from private farms in Cuba, which is in line with those previously observed in sows from breeding farms in this country (Castillo-Cuenca et al., 2021). Further studies are warranted to identify and remove the sources of exposure to *T. gondii* in pigs during the finishing period in order to reduce the zoonotic risk in Cuba.

Previous studies have shown that serological analysis of *T. gondii* using ELISA is a good method for the surveillance of the parasite in pigs (Garcia et al., 2008; Hill et al., 2006). In the present study, only four (4.0%) of the 100 ELISA-positive pigs tested positive using PCR. This finding is in accordance with those observed by Hill et al. (2006), who reported differences in the diagnostic technique sensitivities in the analysis of *T. gondii* infection in samples from both experimentally and naturally infected pigs and retail pork products, and it is due to the random distribution of tissue cysts, the limited volume of sample analyzed, and the usual low parasite burden observed in the tissues of chronically infected animals. Of note, *T. gondii* DNA was more frequently detected in heart than in diaphragm tissues. This finding agrees with those reported by other authors (Gisbert Algaba et al., 2018; Vergara et al., 2018), pointing out heart as the target organ for detection of *T. gondii* infection in pigs.

Genetic characterization of *T. gondii* is crucial since the genotype can determine the presentation and severity of clinical toxoplasmosis in immunocompetent hosts

(Dardé et al., 2020). Here, we attempted to molecularly characterize for the first time the *T. gondii* strains that circulate in domestic pigs in Cuba. The preliminary results suggest the existence of a high genetic diversity of *T. gondii* in slaughtered pigs in this country (Table 5; Figure 8). All four characterized samples presented genetic profiles related to non-canonical genotypes. Until date, numerous studies have confirmed the high genetic and genotypic diversity among *T. gondii* strains circulating in Central and South America, whose population structure have shown to be heterogeneous in this region (Dardé et al., 2020; Rajendran et al., 2012).

Molecular data on *T. gondii* in Central America and the Caribbean territories are still scarce. Previous studies showed that type III clonal genotype (ToxoDB#2) is common and widespread in this region and has been identified in different domestic hosts, including dogs, cats and chickens (Chikweto et al., 2017; Dubey et al., 2009; Dubey et al., 2016; Rajendran et al., 2012), but it was not observed in the present study. To the best of our knowledge, the only available data collected from pigs in the Caribbean area were reported by Hamilton et al. (2015) in Saint Kitts and Nevis. The authors attempted direct genotyping by Mn-PCR-RFLP using four markers (*SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, and *GRA6*) in tissue samples, and the resulting patterns suggested the presence of clonal type I (ToxoDB#10) and type III (#2) genotypes. Worldwide compilation of PCR-RFLP data (Shwab et al., 2014) identified certain geographical patterns but there are still many gaps in the Caribbean area. The analysis by microsatellite typing tools might help in this analysis, since a notorious divergence of the Caribbean organisms is expected when compared to other European or American isolates/data (Lehmann et al., 2006).

Regarding PCR-sequencing results, data obtained suggest a high degree of heterogeneity of the *T. gondii* population infecting slaughtered pigs in Cuba. Our results provided additional evidence of a rich genetic diversity of *T. gondii* in the Caribbean area. Despite its short length, *SAG3* is considered a suitable marker for phylogenetic analyses (Bertranpetit et al., 2017; Fernández-Escobar et al., 2020). In Figure 2B, taking into consideration available (NCBI) *SAG3* sequences from livestock, wild animals, and humans in the Americas, it is showed a clear cluster of the samples from two of the PCR-positive animals (pigs 77 and 97, both of them originated in the same municipality), supporting the hypothesis of a new genetic variant, presumably a new genotype infecting pigs in Cuba. On the other hand, sample from pig 143 showed 100%

homology with the isolate MH744787 from American black bear (*Ursus americanus*), among others. The specific branch clustering Wil, Tg51 and PRU reference strains demonstrated the low occurrence of type II-related strains in general in the Americas (as opposite to Europe (Fernández-Escobar et al., 2022) and specifically in the area of study. Furthermore, sample from animal 129 clustered along with type I-related strains and therefore could be presumably a virulent mice isolate; in addition, this sample grouped close to sequences MK127861, MH744785, and MK875303 of recombinant isolates showing atypical variants at *SAG3* region (Scimeca et al., 2020; Valenzuela-Moreno et al., 2020).

There is a growing body of evidence that some non-archetypal genotypes are linked to an increased occurrence of congenital and ocular toxoplasmosis in immunocompetent human patients (Dardé et al., 2020). In Cuba, unfortunately, no studies have linked clinical cases of toxoplasmosis in humans with *T. gondii* genetic characterization results. However, we hypothesized that the circulation of atypical genotypes in domestic pigs in this country could explain the high incidence rate of ocular toxoplasmosis in Cuba. In this respect, Bustillo et al. (2015) reported an incidence rate of active ocular toxoplasmosis of 58.5 per 100,000 inhabitants in the neighboring province of Sancti Spiritus, the highest incidence rate reported to date in a high-risk tropical region. Based on our results, further molecular studies are required to analyze the genetic population of *T. gondii* in pigs and humans in Cuba and try to unravel questions that arose here: i) are canonical types occurring in the area and in which proportion?, ii) are new genotypes circulating in pigs from Cuba?, and finally, iii) how divergent is the population structure of *T. gondii* of Cuba in comparison with other Caribbean and Centro-American territories? The above questions open an important avenue to hypothesize whether the observed non-canonical strains show virulent phenotypes and to what extent they may pose a risk for human beings.

In conclusion, the results obtained in the present study indicate a wide *T. gondii* circulation in domestic pig populations intended for human consumption in Central Cuba, which is of public health concern. To the best of our knowledge, this is the first report on genetic characterization of *T. gondii* in this country. Although preliminary, the results suggest that the genetic diversity of *T. gondii* in this region is high. Further studies based on parasite isolation are needed to have a complete identification of

genotypes circulating, to characterize the virulence of strains detected in pigs in Cuba, and to assess the risk of zoonotic transmission from pork products in this country.

Acknowledgements

We would like to thank the Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP, in Spanish) for funding the doctoral training of the first author of this research. We would also like to thank the members of the Departamento de Parasitología at the Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", and Mario Pablo Estrada García, Gerardo Enrique Guillen Nieto, Eduardo Canales López, Yamina Muñoz Pérez who, as scientists from the Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) made possible the sequencing of the samples that are reflected as results in this article. Also, I would like to thank the collaborations of Dr. Chunlei Su and Luis Enrique Pérez-Borroto Vega for their aid in data analysis and visualization. In addition, we would like to thank Javier Caballero Gómez for his advice in uploading the obtained sequences to GenBank.

Ethical approval

The collection of samples analyzed in the present study was part of the official Animal Health Campaigns under Cuban legislation. No animals were specifically sampled for this study; therefore, no ethical approval was necessary.

Conflict of interest statement

None of the authors of this study has any financial or personal relationship with other people or organizations that would inappropriately influence or bias the content of the paper.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the authors upon reasonable request.

Orcid

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

Sonia Almería <https://orcid.org/0000-0002-0558-5488>

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

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

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

Angel Entrena-García: <https://orcid.org/0000-0003-2006-9905>

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

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

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

References

Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Malacón, M., Reyes-Hernández, S. O., Pérez-Ramírez, J., Trujillo-López, J. I., Villena, I., & Dubey, J. P. (2012). High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 98(6), 1248–1250. <https://doi.org/10.1645/GE-3184.1>

Amador Morán, R., Coutos Ramos, M. J., Peña Cedeño, A., Alonso Uría, R. M., Pupo Portal, L., & Gómez Suárez, H. J. (2016). Presentación de un caso con toxoplasmosis congénita. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 42(1). Retrieved from <http://revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/47/31>

Belluco, S., Patuzzi, I., & Ricci, A. (2018). Bovine meat versus pork in *Toxoplasma gondii* transmission in Italy: A quantitative risk assessment model. *International Journal of Food Microbiology*, 269, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.026>

Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., Mercier, A., Devillard, S., & Ajzenberg, D. (2017). Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 48, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.020>

Bustillo, J. L., Diaz, J. D., Pacheco, I. C., & Gritz, D. C. (2015). Cuban ocular toxoplasmosis epidemiology study (COTES): Incidence and prevalence of ocular toxoplasmosis in Central Cuba. *British Journal of Ophthalmology*, 99(3), 382–386. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305843>

Castillo-Cuenca, J. C., Martínez-Moreno, Á., Diaz-Cao, J. M., Entrena-García, A., Fraga, J., Arias, P., Almería, S., & García-Bocanegra, I. (2021). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba. *Parasitology Research*, 120(8), 2897–2903. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07245-1>

Chikweto, A., Sharma, R. N., Tiwari, K. P., Verma, S. K., Calero-Bernal, R., Jiang, T., Su, C.,

Kwok, O., & Dubey, J. P. (2017). 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. *Journal of Parasitology*, 103(1), 52–55. <https://doi.org/10.1645/15-945>

Cubas-Atienzar, A. I., Hide, G., & Smith, J. E. (2019). Mat Seroprevalence Infers Low Rates of *Toxoplasma gondii* in Domestic Pigs from Yucatan, Mexico. *Journal of Parasitology*, 105(5), 738–747. <https://doi.org/10.1645/18-188>

Dardé, M.-L., Mercier, A., Su, C., Khan, A., & Grigg, M. E. (2020). Molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*. In L. M. Weiss & K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii* (3rd ed., pp. 63–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00003-7>

Dubey, J. P., Moura, L., Majumdar, D., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Kwok, O. C. H., Kelly, P., Krecek, R., & Su, C. (2009). 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*, 136(6), 589–594. <https://doi.org/10.1017/S0031182009006015>

Dubey, J. P. (2022). *Toxoplasmosis of Animals and Humans* (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003199373>

Dubey, J. P., Verma, S. K., Villena, I., Aubert, D., Geers, R., Su, C., Lee, E., Forde, M., & Krecek, R. C. (2016). 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. *Parasitology Research*, 115(4), 1627–1634. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4900-6>

Dubey, J. P., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Kwok, O. C. H., Hill, D., Yang, Y., & Su, C. (2020). All about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: 2009–2020. *Veterinary Parasitology*, 288, 109–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109185>

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on Phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>

Fernández-Escobar, M., Calero-Bernal, R., Benavides, J., Regidor-Cerrillo, J., Guerrero-Molina, M. C., Gutiérrez-Expósito, D., Collantes-Fernández, E., & Ortega-Mora, L. M. (2020). Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in Spanish sheep flocks. *Parasites & Vectors*, 13(1), 396. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04275-z>

Fernández-Escobar, M., Schares, G., Maksimov, P., Joeres, M., Ortega-Mora, L. M., & Calero-Bernal, R. (2022). *Toxoplasma gondii* Genotyping: A Closer Look Into Europe. *Frontiers in*

Cellular and Infection Microbiology, 12(March), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.842595>

Foroutan, M., Fakhri, Y., Riahi, S. M., Ebrahimpour, S., Namroodi, S., Taghipour, A., Spotin, A., Gamble, H., & Rostami, A. (2019). The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*, 269, 42–52.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.012>

Frazaõ-Teixeira, E., & de Oliveira, F. C. R. (2011). Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Cattle and Pigs in a Highly Endemic Area for Human Toxoplasmosis in Brazil. *Journal of Parasitology*, 97(1), 44–47. <https://doi.org/10.1645/GE-2457.1>

García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Sibila, M., Dubey, J. P., Cabezón, O., Martín, G., & Almeria, S. (2010). Duration of maternally derived antibodies in *Toxoplasma gondii* naturally infected piglets. *Veterinary Parasitology*, 170(1–2), 134–136.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.042>

Garcia, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., Headley, S. A., Vidotto, O., da Silva Guimarães, J., Bugni, F., & Igarashi, M. (2008). 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. *Research in Veterinary Science*, 84(2), 237–242.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.014>

Ginorio Gavito, D. E., Vilches Lescaille, D., Gracial, X., Cox Iraola, R., Casanova, P., Núñez, F. A., & Hernández, H. (2017). Toxoplasmosis ocular: Algunos hallazgos clínicos y seroepidemiológicos. *Revista Anales de La Academia de Ciencias de Cuba*, 7(3), 4–13.

Retrieved from <http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/352/352>

Gisbert Algaba, I., Verhaegen, B., Jennes, M., Rahman, M., Coucke, W., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., & De Craeye, S. (2018). 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. *International Journal for Parasitology*, 48(7), 555–560.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.12.009>

Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp*, 41, 95–98.

Hamilton, C. M., Kelly, P. J., Bartley, P. M., Burrells, A., Porco, A., Metzler, D., Ketzis, J., Innes, E., & Katzer, F. (2015). *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasites & Vectors*, 8(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0776-7>

Hill, D. E., Chirukandoth, S., Dubey, J. P., Lunney, J. K., & Gamble, H. R. (2006). Comparison

of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary Parasitology*, 141(1–2), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.008>

Homan, W., Vercammen, M., De Braekeleer, J., & Verschueren, H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, 30(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8)

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R., & Dubey, J. P. (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11423–11428. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601438103>

Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M. S., Namasivayam, S., Swapna, L. S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B., Ajioka, J., Ajzenberg, D., Boothroyd, J., Boyle, J., Dardé, M., Diaz-Miranda, M., Dubey, J., Fritz, H., Gennari, S., Gregory, B., Kim, K., Saeij, J., Su, C., White, M., Zhu, X., Howe, D., Rosenthal, B., Grigg, M., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J., Roos, D., & Sibley, L. D. (2016). Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nature Communications*, 7(1), 10147. <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>

McLeod, R., Cohen, W., Dovgin, S., Finkelstein, L., & Boyer, K. M. (2020). Human *Toxoplasma* infection. In L. M. Weiss & K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii* (3rd ed., pp. 117–227). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00004-9>

Milne, G., Webster, J. P., & Walker, M. (2020). *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? *Trends in Parasitology*, 36(12), 959–969. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.005>

Miura, A. C., de Barros, L. D., Ferreira, F. P., Neto, J. M. F., Sicupira Franco, P. M. L., Su, C., Vidotto, O., & Garcia, J. L. (2019). Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs for human consumption. *Parasitology Research*, 118(5), 1593–1599. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06274-1>

Muñoz-Zanzi, C., Tamayo, R., Balboa, J., & Hill, D. (2012). Detection of Oocyst-Associated Toxoplasmosis in Swine from Southern Chile. *Zoonoses and Public Health*, 59(6), 389–392. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01471.x>

Oliveira, G. C., de Souza Almeida, H. M., Sartori, R. S., Rossi, G. A. M., de Oliveira, L. G., & Langoni, H. (2019). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infections in swine of non-technified

rearing farms of the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil and associated risk factors. *Parasite Epidemiology and Control*, 4, e00080. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2018.e00080>

ONEI. (2017). *Anuario Estadístico de la Provincia de Villa Clara*. Villa Clara. Retrieved from <http://www.onei.gob.cu/mapa/provincia/villa-clara>

Rajendran, C., Su, C., & Dubey, J. P. (2012). Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.010>

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Scimeca, R. C., Perez, E., Fairbanks, W. S., Ammar, S., Su, C., Gerhold, R. W., & Reichard, M. V. (2020). Seroprevalence, DNA isolation, and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from black bear (*Ursus americanus*) sera collected in Eastern Oklahoma. *Parasitology Research*, 119(3), 1109–1115. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06535-z>

Shwab, E. K., Zhu, X.-Q., Majumdar, D., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>

Su, C., Schwab, 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), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>

Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X., Ajioka, J., Rosenthal, B., Dubey, J., & Sibley, L. D. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5844–5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

Suárez-Hernández, M., González-Fernández, A., Gardón-Quirola, B. Y., & Martínez-Sánchez, R. (2005). 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*, 16(1), 21–27. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=7396>

Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30),

11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>

Thrusfield, M., Christley, R., Brown, H., Diggle, P. J., French, N., Howe, K., Kelly, L., O'Connor, A., Sargeant, J., & Wood, H. (2018). *Veterinary Epidemiology*. (4th ed.). Oxford: John Wiley & Sons.

Valenzuela-Moreno, L. F., Rico-Torres, C. P., Cedillo-Peláez, C., Luna-Pastén, H., Méndez-Cruz, S. T., Reyes-García, M. E., Correa, D., Alves, B., Pena, H., & Caballero-Ortega, H. (2020). Stray dogs in the tropical state of Chiapas, Mexico, harbour atypical and novel genotypes of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, *50*(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.12.001>

Vergara, A., Marangi, M., Caradonna, T., Pennisi, L., Paludi, D., Papini, R., Ianieri, A., Giangaspero, A., & Normanno, G. (2018). *Toxoplasma gondii* Lineages Circulating in Slaughtered Industrial Pigs and Potential Risk for Consumers. *Journal of Food Protection*, *81*(8), 1373–1378. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-496>

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La toxoplasmosis es una importante enfermedad zoonótica de distribución mundial. La misma es causada por el parásito protozoario *Toxoplasma gondii* (Almeria & Dubey, 2021). Este parásito puede infectar a la mayoría de los animales de sangre caliente, incluidos los humanos y el ganado (Dubey *et al.*, 2020a; Almeria & Dubey, 2021). Aproximadamente el 30 % de la población humana mundial está infectada con este protozoo (McLeod *et al.*, 2020). Aunque la parasitación es típicamente asintomática en individuos inmunocompetentes, puede causar enfermedades neurológicas y oftalmológicas cuando se adquiere posnatalmente y provoca enfermedades graves, incluso mortales, en niños con infección congénita (McLeod *et al.*, 2020) y se ha asociado también con manifestaciones psiquiátricas y conductuales (Milne *et al.*, 2020b).

Toxoplasma gondii es considerado como uno de los parásitos de importancia veterinaria y médica más relevantes transmitido por los alimentos y el agua (Havelaar *et al.*, 2012; FAO/OMS, 2014). Teniendo en cuenta la transmisión alimentaria, el parásito ha sido incriminado como uno de los patógenos alimentarios más mortales en los Estados Unidos de América (Scallan *et al.*, 2015). Con base a la carga de enfermedad expresada en años de vida ajustados por calidad o discapacidad (DALY, siglas en inglés), *T. gondii* ocupó el segundo lugar entre 14 patógenos transmitidos por los alimentos en los EE. UU. (Batz *et al.*, 2012) y el primero en los Países Bajos (Havelaar *et al.*, 2012). Un informe de la FAO/OMS consideró a *T. gondii* como el cuarto parásito más importante del mundo (FAO/OMS, 2014).

El consumo de carne contaminada cruda o poco cocida de animales de granja es un factor de riesgo importante para la adquisición de la infección por *T. gondii* en humanos (Dubey, 2009b; Weiss & Dubey, 2009; Opsteegh *et al.*, 2016; Innes *et al.*, 2019). En un estudio multicéntrico europeo de casos y controles, del 30 al 63 % de las infecciones en mujeres embarazadas se atribuyeron a la carne, mientras que del 6 al 17 % probablemente se transmitieron a través del suelo (Cook *et al.*, 2000). Más recientemente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sugirió que la transmisión a través de la carne representa alrededor del 60 % de las infecciones por *T. gondii* y que las principales fuentes contribuyentes son la carne contaminada de vacuno, cerdo y pequeños rumiantes (Koutsoumanis *et al.*, 2018).

La carne de cerdo contaminada se considera una fuente importante de infección de *T. gondii* (Cook *et al.*, 2000; Dubey, 2009b). Un estudio en los EE. UU. estimó que el 41 % de los casos de toxoplasmosis transmitida por los alimentos eran atribuibles al consumo de carne de cerdo, lo que la convierte en una fuente importante de infección (Batz *et al.*, 2012). Los cerdos, al ser omnívoros, pueden infectarse con *T. gondii* al ingerir agua, comida y suelo contaminados con ooquistes esporulados, pero también al ingerir animales que albergan quistes tisulares de *T. gondii*, como aves y roedores; los cerdos criados en extensivo tienen más probabilidades de infectarse en estas condiciones que los criados en intensivo (Kijlstra *et al.*, 2004; van der Giessen *et al.*, 2007). La contaminación porcina ha disminuido a lo largo de los años, pero la producción de cerdos criados en extensivo podría cambiar esa tendencia (Kijlstra & Jongert, 2009; Limon *et al.*, 2017).

La seroprevalencia de *T. gondii* en cerdos domésticos varía ampliamente de un país a otro y también entre regiones dentro de un mismo país (Foroutan *et al.*, 2019; Olsen *et al.*, 2019), siendo influenciada por factores individuales, como la edad (Villari *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010b; Olsen *et al.*, 2019), sistemas de manejo y/o factores ambientales (Dubey, 2009a; Guo *et al.*, 2016). Los sistemas de producción extensiva, en particular, han demostrado ser un factor de riesgo importante para la exposición a *T. gondii* en cerdos (van der Giessen *et al.*, 2007; García-Bocanegra *et al.*, 2010a).

España es el segundo productor de carne de cerdo de la Unión Europea (UE) y el cuarto a nivel mundial. El cerdo ibérico es una raza autóctona de la Península Ibérica derivada del *Sus mediterraneus* con un hábitat característico denominado “dehesa” formado por dehesas mediterráneas de encinas y alcornoques (Garrido-Fernández & León-Camacho, 2019). Los cerdos ibéricos representan alrededor del 11 % de la producción porcina española, y según los registros nacionales de 2019, aproximadamente el 80 % de la población porcina ibérica española se encuentra en el suroeste de España (MAPA, 2019). El cerdo ibérico se cría de forma extensiva hasta el final de la ceba (normalmente más de 14 meses de edad) y comparte su hábitat y recursos naturales con especies domésticas y salvajes simpátricas (Aparicio-Tovar & Vargas-Giraldo, 2006; Cano-Terriza *et al.*, 2018). Los productos cárnicos derivados del cerdo ibérico son muy apreciados y actualmente tienen una gran demanda comercial. Algunos de estos productos se consumen sin cocción como el jamón serrano, el

producto cárnico más importante obtenido del cerdo ibérico. *Toxoplasma gondii* viables se han aislado de carne fresca y jamones de cerdos, incluidos productos curados en seco con hasta 12 meses de curación (Gomez-Samblas *et al.*, 2015; Herrero *et al.*, 2016, 2017).

En España se han realizado encuestas serológicas en cerdos domésticos, con niveles de seroprevalencia individual que oscilan entre el 16,8 % y el 18,8 % en cerdos criados en intensivo (García-Bocanegra *et al.*, 2010a, 2010b; Herrero *et al.*, 2016), y entre el 22,4 % y 22,9 % en sistemas de producción al aire libre (García-Bocanegra *et al.*, 2010b; Herrero *et al.*, 2016). Sin embargo, la información epidemiológica sobre este parásito en piaras de cerdo ibérico sigue siendo limitada (Hernández *et al.*, 2014; Pablos-Tanarro *et al.*, 2018) y hasta la fecha no se habían realizado estudios a gran escala.

Con estos antecedentes, los objetivos del **primer estudio** incluido en esta tesis doctoral, sobre la situación epidemiológica de *T. gondii* en cerdos ibéricos desarrollado en España fueron: (1) estimar la seroprevalencia individual y de rebaño de *T. gondii* en cerdos ibéricos criados bajo sistemas de manejo extensivo en España, (2) identificar los factores de riesgo potenciales asociados con la seropositividad a *T. gondii* en rebaños de cerdos ibéricos manejados en extensivo en este país.

La seroprevalencia individual obtenida en el presente estudio (24,1 %, 542/2245) mostró una alta exposición a *T. gondii* entre cerdos ibéricos criados en extensivo en España. Nuestros resultados son consistentes con los resultados obtenidos por Hernández *et al.* (2014) quienes encontraron que el 27,1 % de 709 cerdos ibéricos de engorde analizados por ELISA en Andalucía entre 2008 y 2009 fueron seropositivos a *T. gondii*. Los altos niveles de seropositividad encontrados en ambos estudios en diferentes períodos de tiempo sugieren una circulación endémica de *T. gondii* en esta región. Además, la alta prevalencia obtenida en el rebaño indica una circulación generalizada de *T. gondii* en granjas extensivas de cerdo ibérico en España. Sin embargo, Pablos-Tanarro *et al.* (2018) encontraron seroprevalencias marcadamente más bajas (que oscilaron entre el 11,7 % y el 14,8 % usando ELISA y la prueba de aglutinación directa, respectivamente) en 963 cerdas ibéricas de cinco rebaños de manejo extensivo en el suroeste de España. Sin embargo, las comparaciones entre estudios deben hacerse con precaución dadas las diferencias en el número de animales o

rebaños examinados, clases de edad, factores ambientales y de manejo, y métodos serológicos empleados.

La seroprevalencia global encontrada en nuestro estudio fue superior al 16,6 % comunicado para piaras de cerdos criados en intensivo en España (García-Bocanegra *et al.*, 2010b). También se ha informado una mayor seropositividad en cerdos manejados al aire libre en diferentes países (van der Giessen *et al.*, 2007; Villari *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010a; Limon *et al.*, 2017; Pablos-Tanarro *et al.*, 2018). Es de esperar que las condiciones de crianza de los cerdos ibéricos, con largos periodos de alimentación en la dehesa y limitadas medidas de bioseguridad favorezcan el contacto con ooquistes esporulados de *T. gondii*. En este sentido, también se han detectado altos valores de seroprevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* (entre 18,6 % – 38,4 %) en poblaciones simpátricas de jabalí (*Sus scrofa*) (Gauss *et al.*, 2005; Calero-Bernal *et al.*, 2016; Almería *et al.*, 2018). En la región de estudio también se han informado infecciones por *Toxoplasma gondii* en especies que actúan como hospedadores definitivos, como en gatos de libre itinerancia (*Felis catus*), el gato montés europeo (*Felis silvestris*) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*), lo que sugiere la existencia de ciclos selváticos para *T. gondii* en ecosistemas mediterráneos españoles (Roelke *et al.*, 2008; Millán *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010c).

La seroprevalencia individual fue significativamente mayor en cerdas (32,9 %) que en cerdos de engorde (22,1 %), lo cual concuerda con reportes previos (Villari *et al.*, 2009; García-Bocanegra *et al.*, 2010a; Kofoed *et al.*, 2017; Olsen *et al.*, 2019) y refleja el conocido aumento de la exposición con la edad y la persistencia de por vida de anticuerpos anti-*T. gondii* (Dubey, 2009a). La presencia de más de tres gatos en las granjas también fue un factor de riesgo para la seroprevalencia de *T. gondii* (Meerburg *et al.*, 2006). Los gatos domésticos se utilizan con frecuencia para el control de roedores en hatos porcinos, teniendo acceso al alimento, y el agua en las instalaciones porcinas. Si bien los ganaderos no reportaron la presencia de gatos en 35 de las 114 piaras analizadas, la entrada de gatos de libre itinerancia y otras especies de felinos silvestres en estas granjas es difícil de controlar y, por lo tanto, no se puede descartar la presencia de los mismos en dichas granjas. Los gatos se infectan con frecuencia y excretan ooquistes cuando son jóvenes (Dubey, 2001), y la inmunidad desarrollada suele evitar la re-excreción (Dubey, 1995). En consecuencia, una mayor seroprevalencia en rebaños con un mayor número de gatos probablemente refleje la mayor probabilidad de que

algunos de ellos sean juveniles, pudiendo éstos ser excretores e implicar un riesgo adicional de infección para los cerdos.

En resumen, nuestros resultados muestran una exposición elevada y generalizada a *T. gondii* en piaras de cerdos ibéricos criados en extensivo en España. La alta seroprevalencia encontrada en esta raza puede tener implicaciones importantes para la salud pública a través del consumo de productos de carnes de cerdo poco cocidos o mal curados. Aunque se ha demostrado que el curado inactiva los quistes de *T. gondii*, su eficacia depende de la concentración de sal, el tiempo y la temperatura (Dubey, 1997; Kijlstra & Jongert, 2008). En este sentido, la aplicación de los tiempos mínimos de curación en seco, que el Ministerio de Agricultura de España define como 600 días para los jamones y 365 días para las paletas, es probable que sean eficaces para eliminar la capacidad infectiva de *T. gondii* (Gomez-Samblas *et al.*, 2016). Por tanto, garantizar un adecuado tiempo de curado en seco, así como la cocción apropiada de otros derivados cárnicos pueden ser medidas útiles para reducir el riesgo zoonótico de infecciones por *T. gondii*. A nivel de granja, prácticas de manejo, tales como el control de roedores por parte de empresas autorizadas en lugar de gatos domésticos, podrían ser importantes para reducir el riesgo de circulación de *T. gondii* en rebaños de cerdos manejados en extensivo. Además, la vigilancia basada en el riesgo también podría ser útil para establecer medidas de control frente a la circulación de *T. gondii* en piaras de cerdo ibérico criados bajo un sistema de producción extensiva.

Atendiendo a los antecedentes de la temática que se aborda, resultados y experiencias obtenidas en el primer estudio epidemiológico sobre *T. gondii* en cerdos ibéricos criados en extensivo en España (Castillo-Cuenca *et al.*, 2020), al hecho de que la carne de cerdo es la carne que más se comercializa y consume en Cuba (Tamayo-León, 2022), que Villa Clara sea la provincia mayor productora de carne de cerdos en este país (ONEI, 2017), y a la escasez de estudios sobre *Toxoplasma gondii* en cerdos domésticos en Cuba nos propusimos diseñar y ejecutar estudios epidemiológicos sobre *T. gondii* en cerdos domésticos procedentes de granjas de crías y ceba de la provincia de Villa Clara. A continuación, discutiremos los resultados obtenidos en sendos estudios epidemiológicos desarrollados en Cuba.

Por lo tanto, el objetivo del **segundo estudio** de la Tesis Doctoral, enfocado a la epidemiología de *T. gondii* en cerdos domésticos procedentes de granjas de cría en Villa

Clara, Cuba, fue evaluar la seroprevalencia actual y factores de riesgo asociados a *T. gondii* en la región que posee la mayor producción de carne de cerdo en Cuba.

Estudios inmunológicos previos sobre la presencia de anticuerpos contra *T. gondii* en cerdos domésticos realizados en América Latina mostraron amplias variaciones en la seroprevalencia entre países y entre regiones dentro de un mismo país (Cañón-Franco *et al.*, 2014; Feitosa *et al.*, 2014; Foroutan *et al.*, 2019; Dubey *et al.*, 2020a). En Cuba, anticuerpos anti-*T. gondii* se han encontrado en pacientes humanos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Alfonso *et al.*, 2009) y retinocoroiditis (Regalado Andújar *et al.*, 2013), en mujeres embarazadas (González-Morales *et al.*, 1995), neonatos (Goya Batista *et al.*, 2014), y donantes de sangre (Sánchez-Artigas *et al.*, 2009). También se ha informado seropositividad en animales domésticos, incluidos gatos (Grandía *et al.*, 2012) y perros (Navarrete *et al.*, 2017) en este país. Sin embargo, la información sobre *T. gondii* en cerdos domésticos en Cuba es muy escasa. La única encuesta previa en esta especie se realizó en la provincia de Ciego de Ávila (centro de Cuba) entre 1980 y 2002 (Suárez-Hernández *et al.*, 2005).

En nuestro trabajo pudimos confirmar que la seroprevalencia individual detectada en cerdos criados en granjas de cría de la provincia Villa Clara (13 %) es de similar magnitud que la encontrada previamente en Cuba (14 %) (Suárez-Hernández *et al.*, 2005) y en otros países latinoamericanos como Brasil (13 %) (Feitosa *et al.*, 2014), Colombia (15 %) (Cañón-Franco *et al.*, 2014), y México (que oscila entre el 13 y el 17 %) (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012, 2015). Sin embargo, los valores medios de seroprevalencia fueron superiores en cerdos domésticos criados en traspatio y en extensivo en Argentina (48 %), Brasil (entre 33 y 52 %), Costa Rica (44 %), Hawái (49 %), México (rango entre 45 y 97 %), Panamá (32 %) y Perú (30 %) (revisado por Foroutan *et al.*, 2019; Dubey *et al.*, 2020a). A pesar de las similitudes y diferencias encontradas entre los valores de seroprevalencias individual para *T. gondii* reportados por varios estudios realizados en América Latina no se pueden realizar comparaciones estadísticamente precisas dadas las diferencias en el número de animales analizados, la población muestreada y/o los diferentes métodos serológicos empleados. Asimismo, nos gustaría señalar que la seroprevalencia individual para *T. gondii* en cerdos domésticos en el área de estudio debe considerarse moderada.

Se detectó al menos un cerdo seropositivo en seis de las siete granjas analizadas (85,7 %), con valores positivos de seroprevalencia dentro de la granja que oscilan 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 explotación se calculó asumiendo una prevalencia mínima dentro de cada granja del 6 % y, por tanto, no se puede descartar la posibilidad de que esa explotación en particular tuviera una seroprevalencia inferior al 5 % . Los resultados indicaron que la infección por *T. gondii* está muy extendida en las granjas porcinas de Cuba. 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 < 250 metros sobre el nivel del mar (msnm) mostraron una seropositividad significativamente mayor en comparación con las criadas a mayor altitud. Nuestros resultados concuerdan con los informados por Villari *et al.* (2009) quienes consideraron la mayor altitud (> 200 msnm) 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. También se encontraron niveles de seroprevalencia más altos en jabalíes (*Sus scrofa*) muestreados en cotos de caza ubicados a < 600 msnm en comparación con los muestreados a mayor altitud (Calero-Bernal *et al.*, 2016). Por el contrario, otros estudios observaron una mayor seropositividad a *T. gondii* en cerdos criados en regiones montañosas (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2012; Papatsiros *et al.*, 2016). 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 (Gauss *et al.*, 2006), que son las fuentes probables de infección para los cerdos. En este sentido, consideramos que se necesitan más estudios para abordar este problema.

Se han notificado brotes de toxoplasmosis en humanos por la ingestión de carne porcina infectada que contiene quistes tisulares (Vitale *et al.*, 2014; Almeria & Dubey, 2021). Aunque no tenemos conocimiento de ningún reporte de toxoplasmosis humana directamente relacionado con el consumo de carne de cerdo infectada en Cuba, se han reportado en el país la toxoplasmosis ocular (Bustillo *et al.*, 2015; Ginorio Gavito *et al.*, 2017), la encefalitis toxoplásmica en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia

adquirida (Alfonso *et al.*, 2009), toxoplasmosis aguda en mujeres embarazadas (Lombana *et al.*, 2012) y la toxoplasmosis congénita (Amador Morán *et al.*, 2016). Además, los valores de seropositividad encontrados en gestantes (38 %) (González-Morales *et al.*, 1995), neonatos (23 %) (Goya Batista *et al.*, 2014), y donantes de sangre (13 %) (Sánchez-Artigas *et al.*, 2009) indican que *T. gondii* se encuentra ampliamente distribuida en la población humana de Cuba. Dado que *T. gondii* viables se pueden encontrar en cerdos seropositivos, nuestros resultados sugieren que el consumo de productos porcinos mal cocidos puede contribuir a la toxoplasmosis humana en Cuba, así como que se necesitan con cierta urgencia estudios epidemiológicos sobre el impacto zoonótico de esta enfermedad en Cuba.

En resumen, este es el primer reporte sobre *T. gondii* en cerdos de la Provincia de Villa Clara, la región mayor productora de carne de cerdo de Cuba. Aunque el número de granjas muestreadas fue limitado, los resultados obtenidos brindan una primera aproximación de 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 cruda o poco cocida o sus productos. Asimismo, nuestros resultados pueden contribuir al desarrollo de mejores estrategias de control contra *T. gondii* en Cuba. Además, reflejan la necesidad de realizar más estudios inmunológicos y moleculares que permitan caracterizar los genotipos de *T. gondii* que circulan en granjas porcinas en Cuba, y así, profundizar en el conocimiento de la epidemiología de *T. gondii* en este país.

Sobre las conclusiones del trabajo anterior se planteó la propuesta de investigación del **tercer estudio** de este proyecto de Tesis Doctoral, cuyos objetivos fueron: (1) determinar la seroprevalencia de *T. gondii* en cerdos sacrificados destinados al consumo humano, (2) caracterizar genéticamente las cepas de *T. gondii* que infectan a dichas especies hospederas en Cuba. Este estudio es la primera encuesta sobre *T. gondii* realizada en cerdos de engorde destinados al consumo humano y el primer estudio de caracterización genética de este protozoo intracelular obligado en Cuba.

La tasa de seroprevalencia obtenida (22,2 %) es similar a las magnitudes reportadas a nivel mundial (19 %) y para Centro y Sudamérica (23 %) (revisado por Foroutan *et al.*, 2019). Hasta la fecha, solo se han realizado dos estudios previos sobre seroprevalencia de *T. gondii* en cerdos domésticos (no de engorde) en Cuba. En un primer estudio, realizado en 2 189 cerdos en la provincia de Ciego de Ávila (Centro de Cuba) durante el período 1980-2002, Suárez-Hernández *et al.* (2005) reportaron una seroprevalencia del 14 %. En nuestro propio estudio hemos encontrado una seroprevalencia general similar (13 %) en cerdas y lechones posdestete en la provincia de Villa Clara (Castillo-Cuenca *et al.*, 2021). Cabe destacar que la seroprevalencia detectada en cerdos de engorde destinados al consumo humano en nuestro estudio (22,2 %) fue muy similar a la encontrada en cerdas (21,9 %) y considerablemente superior a la observada en lechones posdestete (4,8 %) (Castillo-Cuenca *et al.*, 2021). La mayor seropositividad a *T. gondii* observada en cerdas y cerdos sacrificados en comparación con el período posdestete en cerdos cubanos concuerda con lo informado previamente (García-Bocanegra *et al.*, 2010b; Dubey *et al.*, 2020a), y refleja una probabilidad acumulada de exposición a *T. gondii* y persistencia de anticuerpos de por vida. Además, la mayor exposición a *T. gondii* durante el período de finalización podría deberse a las condiciones de manejo higiénicamente más relajadas en este período y/o presencia de animales domésticos ajenos a la granja en las unidades de crecimiento y finalización de los rebaños.

Estudios previos han demostrado que el análisis serológico de *T. gondii* mediante ELISA es un buen método para la vigilancia del parásito en cerdos (Hill *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2008). En el presente estudio, solo cuatro (4,0 %) de los 100 cerdos positivos por ELISA dieron positivo mediante PCR. Este hallazgo concuerda con los observados por Hill *et al.* (2006), quienes reportaron diferencias en las sensibilidades de las técnicas de diagnóstico en el análisis de la infección por *T. gondii* en muestras de cerdos experimental y naturalmente infectados, y en productos de carne de cerdo expendidos al por menor. Además, este hecho lo explican por 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. 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 otros autores (Gisbert Algaba

et al., 2018; Vergara *et al.*, 2018), quienes señalan al corazón como órgano diana para la detección de la infección por *T. gondii* en cerdos.

La caracterización molecular es crucial ya que el genotipo puede determinar la presentación y severidad de la toxoplasmosis (Dardé *et al.*, 2020). Aquí, caracterizamos molecularmente por primera vez las cepas de *T. gondii* que circulan en los cerdos domésticos destinados al consumo humano en Cuba. Los resultados preliminares sugieren la existencia de una alta diversidad genética de *T. gondii* en cerdos sacrificados en este país (Tabla 5; Figura 8). Las cuatro 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 (Rajendran *et al.*, 2012; Dardé *et al.*, 2020).

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 generalizado en esta región y se ha identificado en diferentes huéspedes domésticos, incluidos perros, gatos y pollos (Dubey *et al.*, 2009, 2016; Rajendran *et al.*, 2012; Chikweto *et al.*, 2017), pero no se observó en el presente estudio. Hasta donde sabemos, los únicos datos disponibles recopilados de cerdos en el área del Caribe fueron informados por Hamilton *et al.* (2015) en San Cristóbal y Nieves. Los autores intentaron la genotipificación directa mediante Mn-PCR-RFLP utilizando cuatro marcadores (SAG2, SAG3, BTUB y GRA6) en muestras de tejido, y los patrones resultantes sugirieron la presencia del tipo I clonal (genotipo ToxoDB# 10) y el tipo III (genotipo ToxoDB# 2). La compilación mundial de datos de PCR-RFLP (Shwab *et al.*, 2014) identificó ciertos patrones geográficos, pero aún existen muchos vacíos en el área del Caribe. 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 (Lehmann *et al.*, 2006).

En cuanto a los resultados de la secuenciación por PCR, 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 (Bertranpetit *et al.*, 2017; Fernández-Escobar *et al.*, 2020a). En la Figura 8B, teniendo en cuenta las secuencias SAG3 disponibles en (NCBI, siglas en inglés) procedentes de ganado, animales salvajes y humanos en las Américas, se muestra un grupo claro formado por las muestras de dos de los animales PCR positivos (cerdos 77 y 97, ambos de ellos 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 (Fernández-Escobar *et al.*, 2022) y específicamente en el área de estudio. 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; además, esta muestra se agrupó cerca de las secuencias MK127861, MH744785 y MK875303 de los aislados recombinantes que muestran variantes atípicas en la región SAG3 (Scimeca *et al.*, 2020; Valenzuela-Moreno *et al.*, 2020).

Cada vez hay más pruebas de que algunas cepas atípicas están vinculadas a una mayor carga de toxoplasmosis congénita y ocular, así como a casos raros y graves de toxoplasmosis diseminada aguda en individuos inmunocompetentes (Dardé *et al.*, 2020). 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 en este país podría explicar la alta incidencia de toxoplasmosis ocular en este país. Al respecto, Bustillo *et al.* (2015) reportaron una tasa de incidencia de toxoplasmosis ocular activa de 58,5 por 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. 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 ocurrencia de tipos canónicos en Cuba; en qué proporción?, 2) ¿Están circulando nuevos genotipos 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.

En resumen, los resultados obtenidos en el tercer estudio indican una amplia circulación de *T. gondii* en las poblaciones de cerdos domésticos destinados al consumo humano en el centro de Cuba, lo que constituye un problema de salud pública. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte sobre caracterización genética de *T. gondii* en este país, y aunque preliminares, los resultados sugieren que la diversidad genética de *T. gondii* en esta región es alta. Asimismo, 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.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos indican una elevada exposición y distribución geográfica heterogénea de *T. gondii* en explotaciones de cerdo ibérico manejados en extensivo en España. Los valores de seroprevalencia individual (24 %) y de explotación (86 %) encontrados en esta raza pueden tener implicaciones para la salud pública a través del consumo de productos cárnicos porcinos inadecuadamente tratados y, por tanto, se requiere garantizar en estos alimentos la aplicación de procedimientos de curado y cocción conforme a las indicaciones de las autoridades sanitarias (**Primer estudio**).
2. Atendiendo a los factores de riesgo identificados, la implementación de prácticas de manejo orientadas a limitar la presencia de gatos, podrían ser efectivas para reducir el riesgo de circulación de *T. gondii* en las explotaciones de cerdo ibérico (**Primer estudio**).
3. Se ha realizado el primer estudio sobre *T. gondii* en ganado porcino de la provincia de Villa Clara, la región mayor productora de carne de cerdo de Cuba. Los resultados obtenidos indican una amplia distribución del parásito en granjas porcinas de la región de estudio, con una seroprevalencia individual del 13 %, que puede considerarse moderada (**Segundo estudio**).
4. Los principales factores de riesgo asociados a la exposición a *T. gondii* en el ganado porcino de la zona de estudio se relacionaron con factores individuales (animales reproductores) y ambientales (granjas localizadas a menos de 250 metros sobre el nivel del mar) (**Segundo estudio**).
5. Se ha realizado la primera caracterización genética de *T. gondii* en Cuba, sobre muestras de ADN procedentes de cerdos de engorde destinados al consumo humano, y aunque preliminares, los resultados sugieren una elevada diversidad genética de este parásito en la región de estudio (**Tercer estudio**).
6. El análisis molecular reveló cuatro perfiles genéticos diferentes, que son combinaciones de alelos tipo I, II, III y u-1, lo que sugiere la circulación de genotipos no clonales de *T. gondii* en cerdos domésticos en Cuba. Son necesarios estudios adicionales para evaluar las características patogénicas así como las implicaciones para la salud pública de estos genotipos no canónicos (**Tercer estudio**).

7. La presente Tesis Doctoral contribuye al conocimiento de la epidemiología de *T. gondii* en el ganado porcino manejado en extensivo e intensivo en dos países (España y Cuba) en los que esta especie representa un sector clave para la economía. 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 ambos países, y de esta manera desarrollar programas de lucha frente a este protozoo en el eslabón primario de la cadena alimentaria. **(Primer, Segundo y Tercer estudio).**

CONCLUSIONS

8. CONCLUSIONS

1. The results obtained indicate a high exposure and heterogeneous geographical distribution of *T. gondii* in extensively managed Iberian pig farms in Spain. The individual (24%) and herd (86%) seroprevalence values found in this breed may have public health implications through the consumption of inadequately treated pork products. It is necessary therefore to guarantee that curing and cooking procedures in this type of food are carried out in accordance with the indications of the health authorities (**First study**).
2. Based on the risk factors identified, the implementation of management practices aimed at limiting the presence of cats could be effective in reducing the risk of *T. gondii* circulation on Iberian pig farms (**First study**).
3. The first study on *T. gondii* in pigs was carried out in Villa Clara province, the largest pork-producing region in Cuba. The results obtained indicate a wide distribution of the parasite on pig farms in the study region, with an individual seroprevalence of 13%, which can be considered moderate (**Second study**).
4. The main risk factors associated with exposure to *T. gondii* in pigs in the study area were individual (breeding animals) and environmental (farms at less than 250 meters above sea level) (**Second study**).
5. The first genetic characterization of *T. gondii* in Cuba was performed on DNA samples from fattening pigs intended for human consumption, and although preliminary, the results suggest a high genetic diversity of this parasite in the study region (**Third study**).
6. Molecular analysis revealed four different genetic profiles, which are combinations of type I, II, III and u-1 alleles, suggesting the circulation of non-clonal genotypes of *T. gondii* in domestic pigs in Cuba. Additional studies are needed to assess the pathogenic characteristics, as well as the public health implications of these non-canonical genotypes (**Third study**).
7. This doctoral thesis contributes to the knowledge of the epidemiology of *T. gondii* in pigs extensively and intensively managed in two countries (Spain and Cuba) where this species constitutes a key sector of the economy. The results obtained highlighted the need to establish surveillance programs at national level to clarify the epidemiological situation of toxoplasmosis in both countries, and

thus develop programs to combat this protozoan parasite in the primary link of the food chain (**First, Second and Third study**).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdollahi, A., Razavian, I., Razavian, E., Ghodsian, S., Almkhtar, M., Marhoommirzabak, E., Sartip, B., Parsa, H., Rostami, A. (2022) ‘*Toxoplasma gondii* infection/exposure and the risk of brain tumors: A systematic review and meta-analysis’, *Cancer Epidemiology*, 77, p. 102119. doi: 10.1016/j.canep.2022.102119.

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L.L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L. Smirnov, A., Spiegel, F. W. (2012) ‘The revised classification of eukaryotes’, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), pp. 429–514. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.

AESAN (2022) *Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Aesan-Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/agencia/seccion/sobre_aesan.htm (Accesado: 23 de mayo de 2022).

Afonso, E., Thulliez, P., Gilot-Fromont, E. (2006) ‘Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*)’, *International Journal for Parasitology*, 36(13), pp. 1373–1382. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.07.010.

Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., Dardé, M. (2002) ‘Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings’, *The Journal of Infectious Diseases*, 186(5), pp. 684–689. doi: 10.1086/342663.

Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.-L. (2010) ‘Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay’, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), pp. 4641–4645. doi: 10.1128/JCM.01152-10.

Alfonso, Y., Fraga, J., Fonseca, C., Jiménez, N., Pinillos, T., Dorta-Contreras, A. J., Cox, R., Capó, V., Pomier, O., Bandera, F., Ginorio, D. (2009) ‘Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients’, *Cerebrospinal Fluid Research*, 6, p. 2. doi: 10.1186/1743-8454-6-2.

Almería, S., Cabezón, O., Paniagua, J., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Arenas-Montes, A., Dubey, J. P., García-Bocanegra, I. (2018) ‘*Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem’, *Parasitology Research*, 117(3), pp. 665–671. doi:

10.1007/s00436-017-5705-6.

Almeria, S. & Dubey, J. P. (2021) 'Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview', *Research in Veterinary Science*, 135(March), pp. 371–385. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.019.

Alvarado-Esquivel, C., García-Machado, C., Alvarado-Esquivel, D., González-Salazar, A. M., Briones-Fraire, C., Vitela-Corrales, J., Villena, I., Dubey, J. P. (2011) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Pigs in Durango State, Mexico', *Journal of Parasitology*, 97(4), pp. 616–619. doi: 10.1645/GE-2755.1.

Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Malacón, M., Reyes-Hernández, S. O., Pérez-Ramírez, J., Trujillo-López, J. I., Villena, I., Dubey, J. P. (2012) 'High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico.', *The Journal of parasitology*, 98(6), pp. 1248–1250. doi: 10.1645/GE-3184.1.

Alvarado-Esquivel, C., Vazquez-Morales, R., Colado-Romero, E., Guzmán-Sánchez, R., Liesenfeld, O., Dubey, J. P. (2015) 'Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in landrace and mixed breed pigs slaughtered in Baja California Sur State, Mexico', *European Journal of Microbiology and Immunology*, 5(1), pp. 112–115. doi: 10.1556/eujmi-d-15-00004.

Amador Morán, R., Coutos Ramos, M. J., Peña Cedeño, A., Alonso Uría, R. M., Pupo Portal, L., Gómez Suárez, H. J. (2016) 'Presentación de un caso con toxoplasmosis congénita', *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 42(1). Disponible en: <http://revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/47/31>.

Aparicio-Tovar, M. A. & Vargas-Giraldo, J. D. (2006) 'Considerations on ethics and animal welfare in extensive pig production: Breeding and fattening Iberian pigs', *Livestock Science*, 103(3), pp. 237–242. doi: 10.1016/j.livsci.2006.05.010.

Bacci, C., Vismarra, A., Mangia, C., Bonardi, S., Bruini, I., Genchi, M., Kramer, L., Brindani, F. (2015) 'Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods', *International Journal of Food Microbiology*, 202, pp. 54–56. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.002.

Bahia-Oliveira, L. M. G., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C. F., Oréfice, F., Addiss, D. G. (2003) 'Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil', *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), pp. 55–62. doi: 10.3201/eid0901.020160.

Bai, M.-J., Zou, Y., Elsheikha, H. M., Ma, J.-G., Zheng, W.-B., Zhao, Q., Zhang, X.-X., Zhu, X.-Q. (2017) '*Toxoplasma gondii* Infection in Farmed Wild Boars (*Sus scrofa*) in Three Cities of Northeast China', *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(7), pp. 379–385. doi:

10.1089/fpd.2016.2260.

Bărburaș, D., Györke, A., Blaga, R., Bărburaș, R., Kalmár, Z., Vișan, S., Mircean, V., Blaizot, A., Cozma, V. (2019) ‘*Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Romania: what is the importance for public health?’, *Parasitology Research*, 118(9), pp. 2695–2703. doi: 10.1007/s00436-019-06396-6.

Barragan, A. & Sibley, L. D. (2002) ‘Transepithelial Migration of *Toxoplasma gondii* Is Linked to Parasite Motility and Virulence’, *Journal of Experimental Medicine*, 195(12), pp. 1625–1633. doi: 10.1084/jem.20020258.

Barragan, A. & Sibley, L. D. (2003) ‘Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers’, *Trends in Microbiology*, 11(9), pp. 426–430. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00205-1.

Basso, W., Handke, M., Sydler, T., Borel, N., Grimm, F., Sidler, X., Deplazes, P. (2015) ‘Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms’, *Parasitology International*, 64(2), pp. 157–160. doi: 10.1016/j.parint.2014.11.017.

Basso, W., Grimm, F., Ruetten, M., Djokic, V., Blaga, R., Sidler, X., Deplazes, P. (2017) ‘Experimental *Toxoplasma gondii* infections in pigs: Humoral immune response, estimation of specific IgG avidity and the challenges of reproducing vertical transmission in sows’, *Veterinary Parasitology*, 236, pp. 76–85. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.01.026.

Battisti, E., Zanet, S., Trisciuglio, A., Bruno, S., Ferroglio, E. (2018) ‘Circulating genotypes of *Toxoplasma gondii* in Northwestern Italy’, *Veterinary Parasitology*, 253(July 2017), pp. 43–47. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.023.

Batz, M. B., Hoffmann, S., Morris, J. G. (2012) ‘Ranking the Disease Burden of 14 Pathogens in Food Sources in the United States Using Attribution Data from Outbreak Investigations and Expert Elicitation†’, *Journal of Food Protection*, 75(7), pp. 1278–1291. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-418.

Behnke, M. S., Dubey, J. P., Sibley, L. D. (2016) ‘Genetic Mapping of Pathogenesis Determinants in *Toxoplasma gondii*’, *Annual Review of Microbiology*, 70(1), pp. 63–81. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104353.

Belluco, S., Mancin, M., Conficoni, D., Simonato, G., Pietrobelli, M., Ricci, A. (2016) ‘Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: A systematic review and meta-regression’, *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0153856.

Belluco, S., Simonato, G., Mancin, M., Pietrobelli, M., Ricci, A. ‘*Toxoplasma gondii* infection and food consumption: A systematic review and meta-analysis of case-controlled studies’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(18), pp. 3085–3096. doi:

10.1080/10408398.2017.1352563.

Belluco, S., Patuzzi, I., Ricci, A. (2018) 'Bovine meat *versus* pork in *Toxoplasma gondii* transmission in Italy: A quantitative risk assessment model', *International Journal of Food Microbiology*, 269, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.026.

Berger-Schoch, A. E., Herrmann, D. C., Schares, G., Müller, N., Bernet, D., Gottstein, B., Frey, C. F. (2011a) 'Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland', *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), pp. 290–297. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.11.046.

Berger-Schoch, A. E., Bernet, D., Doherr, M. G., Gottstein, B., Frey, C. F. (2011b) '*Toxoplasma gondii* in Switzerland: A Serosurvey Based on Meat Juice Analysis of Slaughtered Pigs, Wild Boar, Sheep and Cattle', *Zoonoses and Public Health*, 58(7), pp. 472–478. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01395.x.

Bernstein, M., Pardini, L., Moré, G., Unzaga, J. M., Su, C., Venturini, M. C. (2018) 'Population structure of *Toxoplasma gondii* in Argentina', *Infection, Genetics and Evolution*, 65, pp. 72–79. doi: 10.1016/j.meegid.2018.07.018.

Bertranpetit, E., Jombart, T., Paradis, E., Pena, H., Dubey, J., Su, C., Mercier, A., Devillard, S., Ajzenberg, D. (2017) 'Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin', *Infection, Genetics and Evolution*, 48, pp. 150–155. doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.020.

Bezerra, R. A., Carvalho, F. S., Guimarães, L. A., Rocha, D. S., Maciel, B. M., Wenceslau, A. A., Lopes, C. W. G., Albuquerque, G. R. (2012) 'Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil', *Veterinary Parasitology*, 189(2–4), pp. 153–161. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.036.

Bлага, R., Aubert, D., Thébault, A., Perret, C., Geers, R., Thomas, M., Alliot, A., Djokic, V., Ortis, N., Halos, L., Durand, B., Mercier, A., Villena, I., Boireau, P. (2019) '*Toxoplasma gondii* in beef consumed in France: Regional variation in seroprevalence and parasite isolation', *Parasite*, 26(77), pp. 1–14. doi: 10.1051/parasite/2019076.

Boothroyd, J. C. & Hakimi, M.-A. (2020) 'Effectors produced by rhoptries and dense granules: an intense conversation between parasite and host in many languages', in *Toxoplasma gondii*. Thirth. Elsevier, pp. 789–806. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00017-7.

Boughattas, S. (2017) '*Toxoplasma* infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidences', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), pp. 2924–2933. doi: 10.1080/10408398.2015.1084993.

Brenier-Pinchart, M.-P., Robert-Gangneux, F., Accoceberry, I., Pichard, S., Garnaud, C.,

Fricker-Hidalgo, H., Lévêque, M. F., Hoarau, G., Pelloux, H., Bastien, P., Sterkers, Y., Varlet-Marie, E. (2021) 'Multicenter Comparative Assessment of the TIB MolBiol *Toxoplasma gondii* Detection Kit and Four Laboratory-Developed PCR Assays for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis', *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(8), pp. 1000–1006. doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.05.010.

Brenier-Pinchart, M.-P., Filisetti, D., Cassaing, S., Varlet-Marie, E., Robert-Gangneux, F., Delhaes, L., Guitard, J., Yéra, H., Bastien, P., Pelloux, H., Sterkers, Y. (2022) 'Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis', *The Journal of Molecular Diagnostics*, 24(6), pp. 687–696. doi: 10.1016/j.jmoldx.2022.03.009.

Brennan, A., Donahoe, S. L., Beatty, J. A., Belov, K., Lindsay, S., Briscoe, K. A., Šlapeta, J., Barrs, V. R. (2016) 'Comparison of genotypes of *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Australia with latent infection or clinical toxoplasmosis', *Veterinary Parasitology*, 228, pp. 13–16. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.06.008.

Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., Boothroyd, J. C. (1989) 'Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction', *Journal of Clinical Microbiology*, 27(8), pp. 1787–1792. doi: 10.1128/jcm.27.8.1787-1792.1989.

Burrells, A., Taroda, A., Opsteegh, M., Schares, G., Benavides, J., Dam-Deisz, C., Bartley, P. M., Chianini, F., Villena, I., van der Giessen, J., Innes, E. A., Katzer, F. (2018) 'Detection and dissemination of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected calves, a single test does not tell the whole story', *Parasites and Vectors*, 11(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s13071-018-2632-z.

Bustillo, J. L., Diaz, J. D., Pacheco, I. C., Gritz, D. C. (2015) 'Cuban ocular toxoplasmosis epidemiology study (COTES): Incidence and prevalence of ocular toxoplasmosis in Central Cuba', *British Journal of Ophthalmology*, 99(3), pp. 382–386. doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305843.

Buxton, D. (1993) 'Toxoplasmosis: the first commercial vaccine', *Parasitology Today*, 9(9), pp. 335–337. doi: 10.1016/0169-4758(93)90236-9.

Buxton, D., Thomson, K. M., Maley, S., Wastling, J. M., Innes, E. A., Panton, W. R. M., Nicoll, S. (1994) 'Primary and secondary responses of the ovine lymph node to *Toxoplasma gondii*: Cell output in efferent lymph and parasite detection', *Journal of Comparative Pathology*, 111(3), pp. 231–241. doi: 10.1016/S0021-9975(05)80002-7.

Buxton, D. & Innes, E. A. (1995) 'A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis', *Parasitology*, 110(S1), pp. S11–S16. doi: 10.1017/S003118200000144X.

Calero-Bernal, R., Gómez-Gordo, L., Saugar, J. M., Frontera, E., Pérez-Martín, J. E., Reina, D.,

Serrano, F. J., Fuentes, I. (2013) 'Congenital Toxoplasmosis in Wild Boar (*Sus scrofa*) and Identification of the *Toxoplasma gondii* Types Involved', *Journal of Wildlife Diseases*, 49(4), pp. 1019–1023. doi: 10.7589/2013-01-024.

Calero-Bernal, R., Saugar, J. M., Frontera, E., Pérez-Martín, J. E., Habela, M. A., Serrano, F. J., Reina, D., Fuentes, I. (2015) 'Prevalence and Genotype Identification of *Toxoplasma gondii* in Wild Animals from Southwestern Spain', *Journal of Wildlife Diseases*, 51(1), pp. 233–238. doi: 10.7589/2013-09-233.

Calero-Bernal, R., Pérez-Martín, J. E., Reina, D., Serrano, F. J., Frontera, E., Fuentes, I., Dubey, J. P. (2016) 'Detection of Zoonotic Protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in Wild Boars from Spain', *Zoonoses and Public Health*, 63(5), pp. 346–350. doi: 10.1111/zph.12243.

Campbell, A. L., Goldberg, C. L., Magid, M. S., Gondolesi, G., Rumbo, C., Herold, B. C. (2006) 'First Case of Toxoplasmosis Following Small Bowel Transplantation and Systematic Review of Tissue-Invasive Toxoplasmosis Following Noncardiac Solid Organ Transplantation', *Transplantation*, 81(3), pp. 408–417. doi: 10.1097/01.tp.0000188183.49025.d5.

Cano-Terriza, D., Riscalde, M. A., Rodríguez-Hernández, P., Napp, S., Fernández-Morente, M., Moreno, I., Bezos, J., Fernández-Molera, V., Sáez, J., García-Bocanegra, I. (2018) 'Epidemiological surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in extensively raised pigs in the south of Spain', *Preventive Veterinary Medicine*, 159, pp. 87–91. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.08.015.

Cañón-Franco, W. A., López-Orozco, N., Gómez-Marín, J. E., Dubey, J. P. (2014) 'An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America.', *Parasites and vectors*, 7(427). doi: 10.1186/1756-3305-7-427.

Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S., Bracaglia, G., Normanno, G., Putignani, L., Giangaspero, A. (2017) 'Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy', *Food Microbiology*, 67, pp. 67–75. doi: 10.1016/j.fm.2017.06.006.

Carneiro, A. C. A. V., Andrade, G. M., Costa, J. G. L., Pinheiro, B. V., Vasconcelos-Santos, D. V., Ferreira, A. M., Su, C., Januário, J. N., Vitor, R. W. A. (2013) 'Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Revealed Highly Diverse Genotypes for Isolates from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil', *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), pp. 901–907. doi: 10.1128/JCM.02502-12.

Castillo-Cuenca, J. C., Díaz-Cao, J. M., Martínez-Moreno, Á., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz,

S., Almería, S., García-Bocanegra, I. (2020) 'Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain', *Preventive Veterinary Medicine*, 175(Febrero 2020), pp. 104–854. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104854.

Castillo-Cuenca, J. C., Martínez-Moreno, Á., Diaz-Cao, J. M., Entrena-García, A., Fraga, J., Arias, P., Almería, S., García-Bocanegra, I. (2021) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba', *Parasitology Research*, 120(8), pp. 2897–2903. doi: 10.1007/s00436-021-07245-1.

Chaichan, P., Mercier, A., Galal, L., Mahittikorn, A., Arie, F., Morand, S., Boumédiène, F., Udonsom, R., Hamidovic, A., Murat, J. B., Sukthana, Y., Dardé, M. L. (2017) 'Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents', *Infection, Genetics and Evolution*, 53, pp. 227–238. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.002.

Chiari, C. de A. & Neves, D. P. (1984) 'Toxoplasmosis humana adquirida através da ingestão de leite de cabra', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(3), pp. 337–340. doi: 10.1590/S0074-02761984000300007.

Chikweto, A., Sharma, R. N., Tiwari, K. P., Verma, S. K., Calero-Bernal, R., Jiang, T., Su, C., Kwok, O., Dubey, J. P. (2017). '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', *Journal of Parasitology*, 103(1), pp. 52–55. doi: 10.1645/15-945.

Choromanski, L., Freyre, A., Popiel, R., Brown, K., Grieve, R., Shibley, G. (1995) 'Safety and efficacy of modified live feline *Toxoplasma gondii* vaccine.', *Developments in biological standardization*, 84, pp. 269–281. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7796964/> (Accesado: 15 de junio de 2022).

Cong, W., Zhang, N.-Z., Hou, J.-L., Wang, X.-C., Ma, J.-G., Zhu, X.-Q., Chen, G.-J. (2017) 'First detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in market-sold oysters in China', *Infection, Genetics and Evolution*, 54, pp. 276–278. doi: 10.1016/j.meegid.2017.07.014.

Consejos de Estado y de Ministros de Cuba (2020) *Decreto Ley 9/2020 "Inocuidad Alimentaria"*. Cuba: Gaceta Oficial. Disponible en: <https://www.gacetaoficial.gob.cu/es/decreto-ley-9-de-2020-de-consejo-de-estado>.

Cook, A. J. C., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., Semprini, A. E., Dunn, D. T. (2000) 'Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis', *BMJ*, 321(7254), pp. 142–147. doi: 10.1136/bmj.321.7254.142.

- Cooper, M. K., Šlapeta, J., Donahoe, S. L., Phalen, D. N. (2015) 'Toxoplasmosis in a Pet Peach-Faced Lovebird (*Agapornis roseicollis*)', *The Korean Journal of Parasitology*, 53(6), pp. 749–753. doi: 10.3347/kjp.2015.53.6.749.
- Costa, M. A., Pinto-Ferreira, F., Almeida, R. P. A., Martins, F. D. C., Pires, A. L., Mareze, M., Mitsuka-Breganó, R., Freire, R. L., Moreira, R. V., Borges, J. M., Navarro, I. T. (2020) 'Artisan fresh cheese from raw cow's milk as a possible route of transmission in a toxoplasmosis outbreak, in Brazil', *Zoonoses and Public Health*, 67(2), pp. 122–129. doi: 10.1111/zph.12660.
- Coupe, A., Howe, L., Burrows, E., Sine, A., Pita, A., Velathanthiri, N., Vallée, E., Hayman, D., Shapiro, K., Roe, W. D. (2018) 'First report of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts and *Giardia duodenalis* in commercial green-lipped mussels (*Perna canaliculus*) in New Zealand', *Parasitology Research*, 117(5), pp. 1453–1463. doi: 10.1007/s00436-018-5832-8.
- Cubas-Atienzar, A. I., Hide, G., Jiménez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A., Smith, J. E. (2018) 'Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Yucatan, Mexico', *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14(October), pp. 191–199. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.10.009.
- Cubas-Atienzar, A. I., Hide, G., Smith, J. E. (2019) 'Mat Seroprevalence Infers Low Rates of *Toxoplasma gondii* in Domestic Pigs from Yucatan, Mexico', *Journal of Parasitology*, 105(5), pp. 738–747. doi: 10.1645/18-188.
- Damriyasa, I. M., Bauer, C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter, A. M., Volmer, R., Zahner, H. (2004) 'Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows', *Veterinary Parasitology*, 126(3), pp. 271–286. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.016.
- Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P., Pelloux, H. (2016) 'Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis', *Trends in Parasitology*, 32(6), pp. 492–506. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.001.
- Dardé, M.-L., Mercier, A., Su, C., Khan, A., Grigg, M. E. (2020) 'Molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*', in *Toxoplasma gondii*. Elsevier, pp. 63–116. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00003-7.
- Dardé, M.-L. (1996) 'Biodiversity in *Toxoplasma gondii*', in *Toxoplasma gondii*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 27–41. doi: 10.1007/978-3-642-51014-4_3.
- Dardé, M.-L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M. (1992) 'Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications.', *The Journal of Parasitology*, 78(5), pp. 786–794. doi: 10.2307/3283305.

- Dardé, M.-L., Pestre-Alexandre, M., Bouteille, B. (1988) 'Isoenzymic Characterization of Seven Strains of *Toxoplasma gondii* by Isoelectrofocusing in Polyacrylamide Gels', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39(6), pp. 551–558. doi: 10.4269/ajtmh.1988.39.551.
- de Sousa, R. Á., Lemos, J. da F., Farias, L. A., Lopes, C. D., dos Santos, K. R. (2014) 'Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pigs in southern Piauí', *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), pp. 98–100. doi: 10.1590/S1984-29612014015.
- Deksne, G. & Kirjušina, M. (2013) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Domestic Pigs (*Sus scrofa domestica*) and Wild Boars (*Sus scrofa*) in Latvia', *Journal of Parasitology*, 99(1), pp. 44–47. doi: 10.1645/GE-3187.1.
- Djokic, V., Blaga, R., Aubert, D., Durand, B., Perret, C., Geers, R., Ducry, T., Vallee, I., Djurkovic-Djakovic, O., Mzabi, A., Villena, I., Boireau, P. (2016a) '*Toxoplasma gondii* infection in pork produced in France', *Parasitology*, 143(5), pp. 557–567. doi: 10.1017/S0031182015001870.
- Djokic, V., Fablet, C., Blaga, R., Rose, N., Perret, C., Djurkovic-Djakovic, O., Boireau, P., Durand, B. (2016b) 'Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds', *Parasites and Vectors*, 9(1), p. 466. doi: 10.1186/s13071-016-1753-5.
- Donahoe, S. L., Šlapeta, J., Knowles, G., Obendorf, D., Peck, S., Phalen, D. N. (2015) 'Clinical and pathological features of toxoplasmosis in free-ranging common wombats (*Vombatus ursinus*) with multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* type II-like strains', *Parasitology International*, 64(2), pp. 148–153. doi: 10.1016/j.parint.2014.11.008.
- dos Santos, I. M. C., Leite, A. I., Furquim, M. E. C., Zanatto, D. C. de S., Fernandes, S. de J., da Silva, G. C. P., Sampaio, P. H., Machado, R. Z., André, M. R. (2019) 'Frequency of antibodies and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in backyard pig production in the city of Mossoró, state of Rio Grande do Norte, Brazil', *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(3), pp. 508–513. doi: 10.1590/s1984-29612019036.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C. A. (1998) 'Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites, and biology and development of tissue cysts', *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), pp. 267-299. doi: 10.1128/CMR.11.2.267.
- Dubey, J. P. (1998) 'Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*', *International Journal for Parasitology*, 28(7), pp. 1019–1024. doi: 10.1016/S0020-7519(98)00023-X.

- Dubey, J. P. (1995) 'Duration of Immunity to Shedding of *Toxoplasma gondii* Oocysts by Cats', *The Journal of Parasitology*, 81(3), p. 410. doi: 10.2307/3283823.
- Dubey, J. P. (1997) 'Survival of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in 0.85-6% NaCl Solutions at 4-20 C', *The Journal of Parasitology*, 83(5), p. 946. doi: 10.2307/3284295.
- Dubey, J. P. (2001) 'Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice', *Journal of Parasitology*, 87(1), pp. 215–219. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0215:OSBCFI]2.0.CO;2.
- Dubey, J. P., Quirk, T., Pitt, J. A., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Kwok, O. C. H., Leclair, D., Hill, R., Su, C. (2008) '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', *Journal of Parasitology*, 94(1), pp. 42–45. doi: 10.1645/GE-1349.1.
- Dubey, J. P., Moura, L., Majumdar, D., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Kwok, O. C. H., Kelly, P., Krecek, R. C., Su, C. (2009) '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*, 136(6), pp. 589–594. doi: 10.1017/S0031182009006015.
- Dubey, J. P. (2009a) 'Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years', *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), pp. 89–103. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.018.
- Dubey, J. P. (2009b) *Toxoplasmosis of animals and humans*. Second. New York: CRC Press Taylor & Francis Group. doi: 10.1201/9781420092370.
- Dubey, J. P., Velmurugan, G. V., Rajendran, C., Yabsley, M. J., Thomas, N. J., Beckmen, K. B., Sinnott, D., Ruid, D., Hart, J., Fair, P. A., McFee, W. E., Shearn-Bochsler, V., Kwok, O. C. H., Ferreira, L. R., Choudhary, S., Faria, E. B., Zhou, H., Felix, T. A., Su, C. (2011) 'Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type', *International Journal for Parasitology*, 41(11), pp. 1139–1147. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.06.005.
- Dubey, J. P., Hill, D. E. E., Rozeboom, D. W. W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L. R., Kwok, O. C. H., Su, C. (2012) 'High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA', *Veterinary Parasitology*, 188(1–2), pp. 14–18. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.008.
- Dubey, J. P., Verma, S. K., Ferreira, L. R., Oliveira, S., Cassinelli, A. B., Ying, Y., Kwok, O. C. H., Tuo, W., Chiesa, O. A., Jones, J. L. (2014) 'Detection and Survival of *Toxoplasma gondii* in

Milk and Cheese from Experimentally Infected Goats†’, *Journal of Food Protection*, 77(10), pp. 1747–1753. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-167.

Dubey, J. P., Verma, S. K., Villena, I., Aubert, D., Geers, R., Su, C., Lee, E., Forde, M., Krecek, R. C. (2016) ‘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’, *Parasitology Research*, 115(4), pp. 1627–1634. doi: 10.1007/s00436-015-4900-6.

Dubey, J. P. (2017) ‘Schizogony and gametogony of oocyst-deficient T-263 strain of *Toxoplasma gondii*’, *Veterinary Parasitology*, 245, pp. 160–162. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.05.024.

Dubey, J. P., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Kwok, O. C. H., Hill, D., Yang, Y., Su, C. (2020a) ‘All about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: 2009–2020’, *Veterinary Parasitology*, 288, pp. 109–185. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109185.

Dubey, J. P., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Kwok, O. C. H., Yang, Y. R., Su, C. (2020b) ‘All about toxoplasmosis in cats: the last decade’, *Veterinary Parasitology*, 283(March), pp. 109–145. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109145.

Dubey, J. P., Pena, H. F. J., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Kwok, O. C. H., Yang, Y. R., Gennari, S. M., Su, C. (2020c) ‘Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): The past decade’, *Parasitology*, 147(12), pp. 1263–1289. doi: 10.1017/S0031182020001134.

Dubey, J. P., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Verma, S. K., Kwok, O. C. H., Pedersen, K., Rosenthal, B. M., Su, C. (2020d) ‘Genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from the first national survey of feral swine revealed evidence for sylvatic transmission cycle, and presence of highly virulent parasite genotypes’, *Parasitology*, 147(3), pp. 295–302. doi: 10.1017/S0031182019001586.

Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H., Su, C. (2020e) ‘Economic and public health importance of *Toxoplasma gondii* infections in sheep: 2009–2020’, *Veterinary Parasitology*, 286(July), p. 109195. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109195.

Dubey, J. P., Hill, D., Fournet, V., Hawkins-Cooper, D., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Verma, S. K., Kwok, O. C. H., Rani, S., Fredericks, J., Adams, B., Jones, J. L., Wiegand, R. E., Ying, Y., Guo, M., Su, C., Pradhan, A. K. (2020f). ‘Low prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in fresh, unfrozen, American pasture-raised pork and lamb from retail meat stores in the United States’, *Food Control*, 109, p. 106961. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106961.

Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H. (2020g) 'Public health and economic importance of *Toxoplasma gondii* infections in goats: The last decade', *Research in Veterinary Science*, 132, pp. 292–307. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.06.014.

Dubey, J. P., Murata, F. H. A., Cerqueira-Cézar, C. K., Kwok, O. C. H. (2020h) '*Toxoplasma gondii* infections in horses, donkeys, and other equids: The last decade', *Research in Veterinary Science*, 132(July), pp. 492–499. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.005.

Dubey, J. P., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Verma, S. K., Kwok, O. C. H., Pedersen, K., Rosenthal, B. M., Su, C. (2020i) 'White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) are a reservoir of a diversity of *Toxoplasma gondii* strains in the USA and pose a risk to consumers of undercooked venison', *Parasitology*, 147(7), pp. 775–781. doi: 10.1017/S0031182020000451.

Dubey, J. P. (2020) 'The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*', in *Toxoplasma gondii*. Thirth. Elsevier, pp. 1–19. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3.

Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. (1972) 'Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats', *The Journal of Protozoology*, 19(1), pp. 155–177. doi: 10.1111/j.1550-7408.1972.tb03431.x.

Duffy, K. T., Wharton, P. J., Johnson, J. D., New, L., Holliman, R. E. (1989) 'Assessment of immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting *Toxoplasma* specific IgM.', *Journal of Clinical Pathology*, 42(12), pp. 1291–5. doi: 10.1136/jcp.42.12.1291.

Duong, H. D., Appiah-Kwarteng, C., Takashima, Y., Aye, K. M., Nagayasu, E., Yoshida, A. (2020) 'A novel luciferase-linked antibody capture assay (LACA) for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens', *Parasitology International*, 77(March), p. 102125. doi: 10.1016/j.parint.2020.102125.

EFSA (2020) *European Food Safety Authority | Ciencia de confianza para la seguridad alimentaria*, European Food Safety Authority. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/es> (Accesado: 3 de junio de 2022).

Fabian, B. T., Hedar, F., Koethe, M., Bangoura, B., Maksimov, P., Conraths, F. J., Villena, I., Aubert, D., Seeber, F., Schares, G. (2020) 'Fluorescent bead-based serological detection of *Toxoplasma gondii* infection in chickens', *Parasites and Vectors*, 13(1), p. 388. doi: 10.1186/s13071-020-04244-6.

FAO/OMS Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (2014) *Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. Microbiological Risk Assessment Series No. 23*. Rome: FAO/WHO. Disponible en: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/>.

Fariñas Acosta, L. (2019) *Consumir alimentos seguros, una prioridad también en Cuba*,

Granma - Órgano oficial del PCC. Disponible en: <https://www.granma.cu/salud/2019-06-07/consumir-alimentos-seguros-una-prioridad-tambien-en-cuba-video> (Accesado: 23 de mayo de 2022).

Feitosa, T. F., Vilela, V. L. R., Bezerra de Melo, L. R., de Almeida Neto, J. L., de Oliveira Souto, D. V., de Morais, D. F., Athayde, A., Azevedo, S., de Jesus Pena, H. F. (2014) 'Toxoplasma gondii and Neospora caninum in slaughtered pigs from Northeast, Brazil', *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), pp. 305–309. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.015.

Feitosa, T. F., Ribeiro Vilela, V. L., de Almeida-Neto, J. L., dos Santos, A., de Morais, D. F., Alves, B. F., Nakashima, F., Gennari, S., Athayde, A., Pena, H. F. J. (2017) 'High genetic diversity in Toxoplasma gondii isolates from pigs at slaughterhouses in Paraíba state, northeastern Brazil: Circulation of new genotypes and Brazilian clonal lineages', *Veterinary Parasitology*, 244, pp. 76–80. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.017.

Ferguson, D. J. P. & Dubremetz, J.-F. (2020) 'The ultrastructure of Toxoplasma gondii', in *Toxoplasma gondii*. Elsevier, pp. 21–61. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00002-5.

Fernández-Escobar, M., Calero-Bernal, R., Benavides, J., Regidor-Cerrillo, J., Guerrero-Molina, M. C., Gutiérrez-Expósito, D., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L. M. (2020a) 'Isolation and genetic characterization of Toxoplasma gondii in Spanish sheep flocks', *Parasites and Vectors*, 13(1), p. 396. doi: 10.1186/s13071-020-04275-z.

Fernández-Escobar, M., Calero-Bernal, R., Regidor-Cerrillo, J., Vallejo, R., Benavides, J., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L. M. (2020b) 'Isolation, Genotyping, and Mouse Virulence Characterization of Toxoplasma gondii From Free Ranging Iberian Pigs', *Frontiers in Veterinary Science*, 7(November), pp. 1–11. doi: 10.3389/fvets.2020.604782.

Fernández-Escobar, M., Schares, G., Maksimov, P., Joeres, M., Ortega-Mora, L. M., Calero-Bernal, R. (2022) 'Toxoplasma gondii Genotyping: A Closer Look Into Europe', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12(March), pp. 1–15. doi: 10.3389/fcimb.2022.842595.

Fernandez-Sabe, N., Cervera, C., Farinas, M. C., Bodro, M., Munoz, P., Gurgui, M., Torre-Cisneros, J., Martín-Davila, P., Noblejas, A., Len, O., Garcia-Reyne, A., Del Pozo, J. L., Carratala, J. (2012) 'Risk Factors, Clinical Features, and Outcomes of Toxoplasmosis in Solid-Organ Transplant Recipients: A Matched Case-Control Study', *Clinical Infectious Diseases*, 54(3), pp. 355–361. doi: 10.1093/cid/cir806.

Ferreira, F. P., Caldart, E. T., Freire, R. L., Mitsuka-Breganó, R., de Freitas, F. M., Miura, A. C., Mareze, M., Martins, F. D., Urbano, M., Seifert, A., Navarro, I. T. (2018) 'The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens',

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 27(3), pp. 327–337. doi: 10.1590/s1984-296120180050.

Ferroglio, E., Bosio, F., Trisciuglio, A., Zanet, S. (2014) ‘*Toxoplasma gondii* in sympatric wild herbivores and carnivores: epidemiology of infection in the Western Alps’, *Parasites and Vectors*, 7(1), p. 196. doi: 10.1186/1756-3305-7-196.

Flegr, J. & Horáček, J. (2017) ‘*Toxoplasma*-infected subjects report an Obsessive-Compulsive Disorder diagnosis more often and score higher in Obsessive-Compulsive Inventory’, *European Psychiatry*, 40, pp. 82–87. doi: 10.1016/j.eurpsy.2016.09.001.

Foroutan, M., Fakhri, Y., Riahi, S. M., Ebrahimpour, S., Namroodi, S., Taghipour, A., Spotin, A., Gamble, H. R., Rostami, A. (2019) ‘The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: A systematic review and meta-analysis’, *Veterinary Parasitology*, 269, pp. 42–52. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.04.012.

Frazão-Teixeira, E., Sundar, N., Dubey, J. P., Grigg, M. E., de Oliveira, F. C. R. (2011) ‘Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains’, *Veterinary Parasitology*, 175(1–2), pp. 33–39. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.030.

Frenkel, J. K. (1973) ‘*Toxoplasma* in and around Us’, *BioScience*, 23(6), pp. 343–352. doi: 10.2307/1296513.

Frenkel, J. K., Pfefferkorn, E. R., Smith, D. D., Fishback, J. L. (1991) ‘Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats.’, *American Journal of Veterinary Research*, 52(5), pp. 759–63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1854103/> (Accesado: 15 de junio de 2022).

Freyre, A., Choromanski, L., Fishback, J. L., Popiel, I. (1993) ‘Immunization of Cats with Tissue Cysts, Bradyzoites, and Tachyzoites of the T-263 Strain of *Toxoplasma gondii*’, *The Journal of Parasitology*, 79(5), p. 716. doi: 10.2307/3283610.

Fuglewicz, A., Piotrowski, P., Stodolak, A. (2017) ‘Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: A review’, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(6), pp. 1033–1038. doi: 10.17219/acem/61435.

Galal, L., Ajzenberg, D., Hamidović, A., Durieux, M.-F., Dardé, M.-L., Mercier, A. (2018) ‘*Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures’, *Trends in Parasitology*, 34(2), pp. 140–154. doi: 10.1016/j.pt.2017.10.010.

Galat, M. V., Kovalenko, G. A., Galat, V. F., Halka, I. V., Sytiuk, M. P., Nychyk, S. A. (2018) ‘Prevalence of toxoplasmosis among wild boars on the territory of Ukraine’, *Bulletin*

'*Veterinary biotechnology*'. Publishing House of National Academy Agrarian Sciences of Ukraine, 32(2), pp. 72–76. doi: 10.31073/vet_biotech32(2)-08.

García-Bocanegra, I., Dubey, J. P., Simon-Grifé, M., Cabezón, O., Casal, J., Allepuz, A., Napp, S., Almería, S. (2010a) 'Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain', *Research in Veterinary Science*, 89(1), pp. 85–87. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.01.017.

García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J. P., Casal, J., Martín, G. E., Cabezón, O., Perea, A., Almería, S. (2010b) 'Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain', *Parasitology International*, 59(3), pp. 421–426. doi: 10.1016/j.parint.2010.06.001.

García-Bocanegra, I., Dubey, J. P., Martínez, F., Vargas, A., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., Almería, S. (2010c) 'Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*)', *Veterinary Parasitology*, 167(1), pp. 36–42. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.044.

Garcia, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., Headley, S. A., Vidotto, O., da Silva Guimarães, J., Bugni, F., Igarashi, M. (2008) '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', *Research in Veterinary Science*, 84(2), pp. 237–242. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.04.014.

Garrido-Fernández, A. & León-Camacho, M. (2019) 'Assessing the effect of season, montanera length and sampling location on Iberian pig fat by compositional data analysis and standard multivariate statistics', *Food Chemistry*, 295, pp. 377–386. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.123.

Gaulin, C., Ramsay, D., Thivierge, K., Tataryn, J., Courville, A., Martin, C., Cunningham, P., Désilets, J., Morin, D., Dion, R. (2020) 'Acute toxoplasmosis among canadian deer hunters associated with consumption of undercooked deer meat hunted in the United States', *Emerging Infectious Diseases*, 26(2), pp. 199–205. doi: 10.3201/eid2602.191218.

Gauss, C. B. L., Dubey, J. P., Vidal, D., Ruiz, F., Vicente, J., Marco, I., Lavin, S., Gortazar, C., Almería, S. (2005) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain', *Veterinary Parasitology*, 131(1–2), pp. 151–156. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.04.023.

Gauss, C. B. L., Dubey, J. P., Vidal, D., Cabezón, O., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Marco, I., Lavin, S., Gortazar, C., Almería, S. (2006) 'Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain', *Veterinary Parasitology*, 136(3–

4), pp. 193–200. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.11.013.

Géba, E., Aubert, D., Durand, L., Escotte, S., La Carbona, S., Cazeaux, C., Bonnard, I., Bastien, F., Palos Ladeiro, M., Dubey, J. P., Villena, I., Geffard, A., Bigot-Clivot, A. (2020) ‘Use of the bivalve *Dreissena polymorpha* as a biomonitoring tool to reflect the protozoan load in freshwater bodies’, *Water Research*, 170, p. 115297. doi: 10.1016/j.watres.2019.115297.

van der Giessen, J., Fonville, M., Bouwknecht, M., Langelaar, M., Vollema, A. (2007) ‘Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands’, *Veterinary Parasitology*, 148(3–4), pp. 371–374. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.009.

Ginorio Gavito, D. E., Vilches Lescaille, D., Gracial, X., Cox Iraola, R., Casanova, P., Núñez, F. A., Hernández, H. (2017) ‘Toxoplasmosis ocular: Algunos hallazgos clínicos y seroepidemiológicos’, *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 7(3), pp. 4–13. Disponible en: <http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/352/352>.

Gisbert Algaba, I., Geerts, M., Jennes, M., Coucke, W., Opsteegh, M., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., De Craeye, S. (2017) ‘A more sensitive, efficient and ISO 17025 validated Magnetic Capture real time PCR method for the detection of archetypal *Toxoplasma gondii* strains in meat’, *International Journal for Parasitology*, 47(13), pp. 875–884. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.05.005.

Gisbert Algaba, I., Verhaegen, B., Jennes, M., Rahman, M., Coucke, W., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., De Craeye, S. (2018) ‘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’, *International Journal for Parasitology*, 48(7), pp. 555–560. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.12.009.

Gisbert Algaba, I., Verhaegen, B., Murat, J. B., Coucke, W., Mercier, A., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., De Craeye, S. (2020) ‘Molecular Study of *Toxoplasma gondii* Isolates Originating from Humans and Organic Pigs in Belgium’, *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(5), pp. 316–321. doi: 10.1089/fpd.2019.2675.

Goldstein, D. B. & Schlotterer, C. (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications, Microsatellites and Other Simple Sequences: Genomic Context and Mutational Mechanisms*. Oxford: Oxford University Press.

Gomez-Marin, J. E. & De-la-Torre, A. (2020) ‘Ocular disease due to *Toxoplasma gondii*’, in *Toxoplasma gondii*. Elsevier, pp. 229–291. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00005-0.

Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J. C., Fuentes, M. V., Osuna, A. (2015)

‘Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques’, *Food Microbiology*, 46, pp. 107–113. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.003.

Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J. C., Fuentes, M. V., Osuna, A. (2016) ‘*Toxoplasma gondii* detection and viability assays in ham legs and shoulders from experimentally infected pigs’, *Food Microbiology*, 58, pp. 112–120. doi: 10.1016/j.fm.2016.04.005.

González-Morales, T., Bacallo-Gallestey, J., García-Santana, C. A., Molina-García, J. R. (1995) ‘Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en una población de mujeres embarazadas en Cuba’, *Gac Méd Méx*, 131(5–6), p. 400. Disponible en: https://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1995-131-5-6-499-503.pdf.

Goya Batista, Y., Cobos Valdes, D., Sánche-Artigas, R., Miranda Cruz, A., Torres Ponce, Z., Labañino Mulet, N. (2014) ‘Comparación de dos métodos serológicos para el diagnóstico de anticuerpos en neonatos’, *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 33(4), pp. 393–401.

Grandía, R., Entrena, Á., Cruz, J., Ginorio, D., Domenech, I., Alfonso, A., Perdomo, L., Chi, L., Burón, M. (2012) ‘Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y factores de riesgo asociados en *Felis catus* en La Habana’, *Rev. Salud Anim.*, 34(3), p. 201. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000300013.

Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B., Suzuki, Y., Boothroyd, J. C. (2001a) ‘Success and Virulence in *Toxoplasma* as the Result of Sexual Recombination Between Two Distinct Ancestries’, *Science*, 294(5540), pp. 161–165. doi: 10.1126/science.1061888.

Grigg, M. E., Ganatra, J., Boothroyd, J. C., Margolis, T. P. (2001b) ‘Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis’, *The Journal of Infectious Diseases*, 184(5), pp. 633–639. doi: 10.1086/322800.

Grigg, M. E. & Boothroyd, J. C. (2001) ‘Rapid Identification of Virulent Type I Strains of the Protozoan Pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis at the B1 Gene’, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), pp. 398–400. doi: 10.1128/JCM.39.1.398-400.2001.

Guo, M., Dubey, J. P., Hill, D., Buchanan, R. L., Gamble, H. R., Jones, J. L., Pradhan, A. K. (2015) ‘Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption’, *Journal of Food Protection*, 78(2), pp. 457–476. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-328.

Guo, M., Mishra, A., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Gamble, H. R. A. Y., Pradhan, A. K. (2016) ‘Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption

of domestically produced lamb in the United States', *Journal of Food Protection*, 79(7), pp. 1181–1187. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-591.

Guy, E. C. & Joynson, D. H. M. (1995) 'Potential of the Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Active *Toxoplasma* Infection by Detection of Parasite in Blood', *Journal of Infectious Diseases*, 172(1), pp. 319–322. doi: 10.1093/infdis/172.1.319.

Halos, L., Thébault, A., Aubert, D., Thomas, M., Perret, C., Geers, R., Alliot, A., Escotte-Binet, S., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Durand, B., Boireau, P., Villena, I. (2010) 'An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France', *International Journal for Parasitology*, 40(2), pp. 193–200. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.06.009.

Halová, D., Mulcahy, G., Rafter, P., Turčeková, L., Grant, T., de Waal, T. (2013) '*Toxoplasma gondii* in Ireland: Seroprevalence and Novel Molecular Detection Method in Sheep, Pigs, Deer and Chickens', *Zoonoses and Public Health*, 60(2), pp. 168–173. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01514.x.

Hamilton, C. M., Kelly, P. J., Bartley, P. M., Burrells, A., Porco, A., Metzler, D., Crouch, K., Ketzis, J. K., Innes, E. A., Katzer, F. (2015) '*Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies', *Parasites and Vectors*, 8(1), p. 166. doi: 10.1186/s13071-015-0776-7.

Hamilton, C. M., Kelly, P. J., Boey, K., Corey, T. M., Huynh, H., Metzler, D., Villena, I., Su, C., Innes, E. A., Katzer, F. (2017) 'Predominance of atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* in free-roaming chickens in St. Kitts, West Indies', *Parasites and Vectors*, 10(1), p. 104. doi: 10.1186/s13071-017-2019-6.

Havelaar, A. H., Haagsma, J. A., Mangen, M.-J. J., Kemmeren, J. M., Verhoef, L. P. B., Vijgen, S. M. C., Wilson, M., Friesema, I. H. M., Kortbeek, L. M., van Duynhoven, Y. T. H. P., van Pelt, W. (2012) 'Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009', *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), pp. 231–238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.029.

Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Tarradas, C., Luque, I., García-Valverde, R., Reguillo, L., Astorga, R. J. (2014) 'A serological Survey of *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in Iberian Fattening Pigs Reared in Free-Range Systems', *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(5), pp. 477–481. doi: 10.1111/tbed.12049.

Herrero, L., Gracia, M. J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, M., Herrera, A., Bayarri, S. (2016) '*Toxoplasma gondii*: Pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat', *Veterinary Parasitology*, 224, pp. 52–59. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.05.010.

Herrero, L., Gracia, M. J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A., Bayarri, S. (2017) 'Toxoplasma gondii in raw and dry-cured ham: The influence of the curing process', *Food Microbiology*, 65, pp. 213–220. doi: 10.1016/j.fm.2017.02.010.

Herrmann, D. C., Bärwald, A., Maksimov, A., Pantchev, N., Vrhovec, M. G., Conraths, F. J., Schares, G. (2012a) 'Toxoplasma gondii sexual cross in a single naturally infected feline host: Generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III', *Veterinary Research*, 43(1), p. 39. doi: 10.1186/1297-9716-43-39.

Herrmann, D. C., Maksimov, P., Maksimov, A., Sutor, A., Schwarz, S., Jaschke, W., Schliephake, A., Denzin, N., Conraths, F. J., Schares, G. (2012b) 'Toxoplasma gondii in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: Seroprevalence and genotypes', *Veterinary Parasitology*, 185(2–4), pp. 78–85. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.10.030.

Herwaldt, B. L. (2001) 'Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures', *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), pp. 659–688. doi: 10.1128/CMR.14.3.659-688.2001.

Hill, D. E., Sreekumar, C., Gamble, H. R., Dubey, J. P. (2004) 'Effect of Commonly Used Enhancement Solutions on the Viability of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork Loin', *Journal of Food Protection*, 67(10), pp. 2230–2233. doi: 10.4315/0362-028X-67.10.2230.

Hill, D. E., Chirukandoth, S., Dubey, J. P., Lunney, J. K., Gamble, H. R. (2006) 'Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine', *Veterinary Parasitology*, 141(1–2), pp. 9–17. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.05.008.

Hill, D. E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H. R., Dubey, J. P. (2010) 'Seroprevalence of and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* in the US Swine Herd Using Sera Collected During the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006)', *Zoonoses and Public Health*, 57(1), pp. 53–59. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01275.x.

Hill, D. E., Coss, C., Dubey, J. P., Wroblewski, K., Sautter, M., Hosten, T., Muñoz-Zanzi, C., Mui, E., Withers, S., Boyer, K., Hermes, G., Coyne, J., Jagdis, F., Burnett, A., McLeod, P., Morton, H., Robinson, D., McLeod, R. (2011) 'Identification of a Sporozoite-Specific Antigen from *Toxoplasma gondii*', *Journal of Parasitology*, 97(2), pp. 328–337. doi: 10.1645/GE-2782.1.

Hill, D. E., Dubey, J. P., Baroch, J. A., Swafford, S. R., Fournet, V. F., Hawkins-Cooper, D., Pyburn, D. G., Schmit, B. S., Gamble, H. R., Pedersen, K., Ferreira, L. R., Verma, S. K., Ying, Y., Kwok, O., Feidas, H., Theodoropoulos, G. (2014) 'Surveillance of feral swine for *Trichinella spp.* and *Toxoplasma gondii* in the USA and host-related factors associated with

- infection', *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), pp. 653–665. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.07.026.
- Hill, D. E. & Dubey, J. P. (2016) 'Toxoplasma gondii as a Parasite in Food: Analysis and Control', *Microbiol Spectrum*, 4(4). doi: 10.1128/9781555819644.ch12.
- Holec-Gąsior, L., Ferrá, B., Graźlewska, W. (2019) 'Toxoplasma gondii Tetravalent Chimeric Proteins as Novel Antigens for Detection of Specific Immunoglobulin G in Sera of Small Ruminants', *Animals*, 9(12), p. 1146. doi: 10.3390/ani9121146.
- Homan, W., Vercammen, M., de Braekeleer, J., Verschueren, H. (2000) 'Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR', *International Journal for Parasitology*, 30(1), pp. 69–75. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00170-8.
- Hou, Z., Zhou, Y., Liu, D., Su, S., Zhao, Z., Xu, J., Tao, J. (2018a) 'Genotyping and virulence analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from a dead human fetus and dead pigs in Jiangsu province, Eastern China', *Acta Parasitologica*, 63(2), pp. 397–411. doi: 10.1515/ap-2018-0046.
- Hou, Z., Su, S., Liu, D., Wang, L., Jia, C., Zhao, Z., Ma, Y., Li, Q., Xu, J., Tao, J. (2018b) 'Prevalence, risk factors and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in sick pigs and stray cats in Jiangsu Province, eastern China', *Infection, Genetics and Evolution*, 60(February), pp. 17–25. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.007.
- Howe, D. K. & Sibley, L. D. (1995) 'Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease.', *The Journal of infectious diseases*, 172(6), pp. 1561–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7594717> (Accesado: 15 de abril de 2017).
- Innes, E. A., Hamilton, C., Garcia, J. L., Chryssafidis, A., Smith, D. (2019) 'A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*', *Food and Waterborne Parasitology*, 15, p. e00053. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00053.
- Jiang, H.-H., Huang, S.-Y., Zhou, D.-H., Zhang, X.-X., Su, C., Deng, S.-Z., Zhu, X.-Q. (2013) 'Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from pigs from different localities in China by PCR-RFLP', *Parasites and Vectors*, 6(1), p. 227. doi: 10.1186/1756-3305-6-227.
- Jiang, H. H., Zhang, W. B., Zhao, L., Zhou, D. H., Song, H. Q., Xu, C. M., Deng, S. Z., Zhu, X. Q. (2014) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Jiangxi province, southeastern China', *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5), pp. 362–365. doi: 10.1089/fpd.2013.1686.
- Jiang, T., Shwab, E. K., Martin, R. M., Gerhold, R. W., Rosenthal, B. M., Dubey, J. P., Su, C. (2018) 'A partition of *Toxoplasma gondii* genotypes across spatial gradients and among host

species, and decreased parasite diversity towards areas of human settlement in North America', *International Journal for Parasitology*, 48(8), pp. 611–619. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.01.008.

Jokelainen, P., Isomursu, M., Näreaho, A., Oksanen, A. (2011) 'Natural *Toxoplasma gondii* infections in European brown hares and mountain hares in Finland: proportional mortality rate, antibody prevalence, and genetic characterization', *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), pp. 154–163. doi: 10.7589/0090-3558-47.1.154.

Jokelainen, P., Näreaho, A., Hälli, O., Heinonen, M., Sukura, A. (2012) 'Farmed wild boars exposed to *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spp.*', *Veterinary Parasitology*, 187(1–2), pp. 323–327. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.026.

Jones, J. L., Lopez, A., Wilson, M., Schulkin, J., Gibbs, R. (2001) 'Congenital Toxoplasmosis: A Review', *Obstetric and Gynecologic Survey*, 56(5), pp. 296–305. doi: 10.1097/00006254-200105000-00025.

Jones, J. L. & Dubey, J. P. (2010) 'Waterborne toxoplasmosis – Recent developments', *Experimental Parasitology*, 124(1), pp. 10–25. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.013.

Jones, J. L. & Dubey, J. P. (2012) 'Foodborne toxoplasmosis', *Clinical Infectious Diseases*, 55(6), pp. 845–851. doi: 10.1093/cid/cis508.

Jost, C., Touafek, F., Fekkar, A., Courtin, R., Ribeiro, M., Mazier, D., Paris, L. (2011) 'Utility of Immunoblotting for Early Diagnosis of Toxoplasmosis Seroconversion in Pregnant Women', *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11), pp. 1908–1912. doi: 10.1128/CVI.05303-11.

Khan, A., Su, C., German, M., Storch, G. A., Clifford, D. B., Sibley, L. D. (2005) 'Genotyping of *Toxoplasma gondii* Strains from Immunocompromised Patients Reveals High Prevalence of Type I Strains', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), pp. 5881–5887. doi: 10.1128/JCM.43.12.5881-5887.2005.

Khan, A. (2006) 'Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil', *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), pp. 942–949. doi: 10.3201/eid1206.060025.

Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J. P., Darde, M. L., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., Sibley, L. D. (2007) 'Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), pp. 14872–14877. doi: 10.1073/pnas.0702356104.

Khan, A., Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., Sibley, L. D. (2011) 'Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America', *International Journal for Parasitology*, 41(6), pp. 645–655. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.01.005.

- Kijlstra, A., Eissen, O. A., Cornelissen, J., Munniksmá, K., Eijck, I., Kortbeek, T. (2004) 'Toxoplasma gondii Infection in Animal-Friendly Pig Production Systems', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(9), p. 3165. doi: 10.1167/iovs.04-0326.
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2008) 'Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat', *International Journal for Parasitology*, 38(12), pp. 1359–1370. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.06.002.
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2009) 'Toxoplasma-safe meat: close to reality?', *Trends in Parasitology*, 25(1), pp. 18–22. doi: 10.1016/j.pt.2008.09.008.
- Kim, J.-H., Kang, K.-I., Kang, W.-C., Sohn, H.-J., Jean, Y.-H., Park, B. K., Kim, Y., Kim, D.-Y. (2009) 'Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea', *Journal of Veterinary Science*, 10(2), p. 147. doi: 10.4142/jvs.2009.10.2.147.
- Klein, S., Wendt, M., Baumgärtner, W., Wohlsein, P. (2010) 'Systemic Toxoplasmosis and Concurrent Porcine Circovirus-2 Infection in a Pig', *Journal of Comparative Pathology*, 142(2–3), pp. 228–234. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.08.155.
- Kofoed, K. G., Vorlund-Kiær, M., Nielsen, H. V., Alban, L., Johansen, M. V. (2017) 'Sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in Danish pigs', *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10(April), pp. 136–138. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.10.004.
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., de Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cacciò, S., Chalmers, R., Deplazes, P., Devleeschauwer, B., Innes, E., Romig, T., van der Giessen, J., Hempen, M., van der Stede, Y., Robertson, L. (2018) 'Public health risks associated with food-borne parasites', *EFSA Journal*, 16(12). doi: 10.2903/j.efsa.2018.5495.
- Kuruca, L., Klun, I., Uzelac, A., Nikolić, A., Bobić, B., Simin, S., Djurković-Djaković, O., Lalošević, V. (2016) 'Detection of Viable *Toxoplasma gondii* in Free-Range Pigs from the Special Nature Reserve of Zasavica', *Contemporary Agriculture*, 65(3–4), pp. 1–6. doi: 10.1515/contagri-2016-0010.
- Kuruca, L., Klun, I., Uzelac, A., Nikolić, A., Bobić, B., Simin, S., Lalošević, V., Lalošević, D., Djurković-Djaković, O. (2017) 'Detection of *Toxoplasma gondii* in naturally infected domestic pigs in Northern Serbia', *Parasitology Research*, 116(11), pp. 3117–3123. doi: 10.1007/s00436-017-5623-7.
- Kuruca, L., Uzelac, A., Klun, I., Lalošević, V., Djurković-Djaković, O. (2019) '*Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic pigs in Serbia', *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(2), pp.

204–211. doi: 10.1556/004.2019.022.

Laforet, C. K., Deksne, G., Petersen, H. H., Jokelainen, P., Johansen, M. V., Lassen, B. (2019) 'Toxoplasma gondii seroprevalence in extensively farmed wild boars (*Sus scrofa*) in Denmark', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61(1), p. 4. doi: 10.1186/s13028-019-0440-x.

Lafrance-Girard, C., Arsenault, J., Thibodeau, A., Opsteegh, M., Avery, B., Quessy, S. (2018) 'Toxoplasma gondii in Retail Beef, Lamb, and Pork in Canada: Prevalence, Quantification, and Risk Factors from a Public Health Perspective', *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(12), pp. 798–808. doi: 10.1089/fpd.2018.2479.

Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R., Dubey, J. P. (2006) 'Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), pp. 11423–11428. doi: 10.1073/pnas.0601438103.

Leroy, J., Houzé, S., Dardé, M.-L., Yéra, H., Rossi, B., Delhaes, L., Gabriel, F., Loubet, P., Deleplancque, A. -S., Senneville, E., Ajana, F., Sendid, B., Malvy, D. (2020) 'Severe toxoplasmosis imported from tropical Africa in immunocompetent patients: A case series', *Travel Medicine and Infectious Disease*, 35, p. 101509. doi: 10.1016/j.tmaid.2019.101509.

Li, X., Wang, Y., Yu, F., Li, T., Zhang, D. (2010) 'An Outbreak of Lethal Toxoplasmosis in Pigs in the Gansu Province of China', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(3), pp. 442–444. doi: 10.1177/104063871002200318.

Liesenfeld, O. (2002) 'Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease?', *The Journal of infectious diseases*, 185 Suppl(Suppl 1), pp. S96–S101. doi: 10.1086/338006.

Limon, G., Beauvais, W., Dadios, N., Villena, I., Cockle, C., Blaga, R., Guitian, J. (2017) 'Cross-Sectional Study of *Toxoplasma gondii* Infection in Pig Farms in England', *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(5), pp. 269–281. doi: 10.1089/fpd.2016.2197.

Lindsay, D. S. & Dubey, J. P. (2020) 'Toxoplasmosis in wild and domestic animals', in *Toxoplasma gondii*. Elsevier, pp. 293–320. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00006-2.

Liu, Q., Wang, Z., Huang, S., Zhu, X. (2015) 'Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*', *Parasites and Vectors*, 8(1), p. 292. doi: 10.1186/s13071-015-0902-6.

Lombana, R. S., Cabrera, M. P. C., Gavito, D. G., Rodríguez, A. N., Ramírez, N. S., Guibert, I. S., Chirino, A., Arias, A. M., Abreu, R. A. P. (2012) 'Toxoplasmosis y embarazo', *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 38(1), pp. 99–106. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v38n1/gin12112.pdf>.

Loreck, K., Mitrenga, S., Heinze, R., Ehricht, R., Engemann, C., Lueken, C., Ploetz, M., Greiner, M., Meemken, D. (2020) 'Use of meat juice and blood serum with a miniaturised protein microarray assay to develop a multi-parameter IgG screening test with high sample throughput potential for slaughtering pigs', *BMC Veterinary Research*, 16(1), p. 106. doi: 10.1186/s12917-020-02308-4.

Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M. S., Namasivayam, S., Swapna, L. S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B., Ajioka, J., Ajzenberg, D., Boothroyd, J., Boyle, J., Dardé, M., Diaz-Miranda, M., Dubey, J., Fritz, H., Gennari, S., Gregory, B., Kim, K., Saeij, J., Su, C., White, M., Zhu, X., Howe, D., Rosenthal, B., Grigg, M., Parkinson, J., Liu, L., Kissinger, J., Roos, D., Sibley, L. D. (2016) 'Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes', *Nature Communications*, 7(1), p. 10147. doi: 10.1038/ncomms10147.

Loveridge-Easther, C., Yardley, A.-M., Breidenstein, B. (2018) 'Use of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of congenital toxoplasmosis', *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 22(3), pp. 239–240. doi: 10.1016/j.jaapos.2017.12.013.

Lukášová, R., Kobédová, K., Halajian, A., Bártová, E., Murat, J.-B., Rampedi, K. M., Luus-Powell, W. J. (2018) 'Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in birds from South Africa', *Acta Tropica*, 178, pp. 93–96. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.10.029.

Magalhães, F. J. R., Ribeiro-Andrade, M., Souza, F. M., Lima Filho, C. D. F., Biondo, A. W., Vidotto, O., Navarro, I. T., Mota, R. A. (2017) 'Seroprevalence and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* infection in cats, dogs, pigs and equines of the Fernando de Noronha Island, Brazil', *Parasitology International*, 66(2), pp. 43–46. doi: 10.1016/j.parint.2016.11.014.

Mai, K., Sharman, P. A., Walker, R. A., Katrib, M., de Souza, D., McConville, M. J., Wallach, M. G., Belli, S. I., Ferguson, D., Smith, N. C. (2009) 'Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites', *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), pp. 281–289. doi: 10.1590/S0074-02762009000200022.

MAPA (2019) *El sector Porcino en España, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/> (Accesado: 14 de mayo de 2019).

Marković, M., Ivočić, V., Štajner, T., Djokić, V., Klun, I., Bobić, B., Nikolić, A., Djurković-Djaković, O. (2014) 'Evidence for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in selected intermediate hosts in Serbia', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(3), pp. 173–179. doi: 10.1016/j.cimid.2014.03.001.

- Marques-Santos, F., Amendoeira, M. R. R., Carrijo, K. F., Santos, J. P. A. F., Arruda, I. F., Sudré, A. P., Brener, B., Millar, P. R. (2017) 'Occurrence of *Toxoplasma gondii* and risk factors for infection in pigs raised and slaughtered in the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais, Brazil', *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(6), pp. 570–576. doi: 10.1590/s0100-736x2017000600006.
- Marquis, N. D., Bishop, T. J., Record, N. R., Countway, P. D., Fernández Robledo, J. A. (2019) 'Molecular Epizootiology of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Maine (USA)', *Pathogens*, 8(3), p. 125. doi: 10.3390/pathogens8030125.
- Martinot, M., Greigert, V., Farnarier, C., Dardé, M. L., Piperoglou, C., Mohseni-Zadeh, M., Tarabeux, J., Guffroy, A., Villard, O., Vely, F. (2020) 'Spinal cord toxoplasmosis in a young immunocompetent patient', *Infection*, 48(2), pp. 299–302. doi: 10.1007/s15010-019-01380-9.
- Mateus-Pinilla, N. E., Dubey, J. P., Choromanski, L., Weigel, R. M. (1999) 'A Field Trial of the Effectiveness of a Feline *Toxoplasma gondii* Vaccine in Reducing *T. gondii* Exposure for Swine', *The Journal of Parasitology*, 85(5), p. 855. doi: 10.2307/3285821.
- McLeod, R., Cohen, W., Dovgin, S., Finkelstein, L., Boyer, K. M. (2020) 'Human *Toxoplasma* infection', in Weiss, L. M. and Kim, K. (eds) *Toxoplasma gondii*. third. Elsevier, pp. 117–227. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00004-9.
- Meerburg, B. G., Riel, J. W. Van, Cornelissen, J. B., Kijlstra, A., Mul, M. F. (2006) 'Cats and Goat Whey Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Pigs', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 6(3), pp. 266–274. doi: 10.1089/vbz.2006.6.266.
- de Melo Ferreira, A., Vitor, R. W. A., Gazzinelli, R. T., Melo, M. N. (2006) 'Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP', *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1), pp. 22–31. doi: 10.1016/j.meegid.2004.12.004.
- Melo, R. P. B., Almeida, J. C., de Lima, D. C. V., Carvalho, J. C. S., Porto, W. J. N., Magalhães, F. J. R., Hamilton, C. M., Katzer, F., Mota, R. A. (2020) 'Atypical *Toxoplasma gondii* genotype from a sheep and a pig on Fernando de Noronha Island, Brazil, showed different mouse virulence profiles', *Parasitology Research*, 119(1), pp. 351–356. doi: 10.1007/s00436-019-06522-4.
- Mercier, A., Ajzenberg, D., Devillard, S., Demar, M. P., de Thoisy, B., Bonnabau, H., Collinet, F., Boukhari, R., Blanchet, D., Simon, S., Carme, B., Dardé, M.-L. (2011) 'Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: Example of the anthropized environment from French Guiana', *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6), pp. 1378–1387. doi:

10.1016/j.meegid.2011.05.003.

Millán, J., Candela, M. G., Palomares, F., Cubero, M. J., Rodríguez, A., Barral, M., de la Fuente, J., Almería, S., León-Vizcaíno, L. (2009) 'Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*)', *The Veterinary Journal*, 182(1), pp. 114–124. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.04.005.

Milne, G., Webster, J. P., Walker, M. (2020a) 'Toward Improving Interventions Against Toxoplasmosis by Identifying Routes of Transmission Using Sporozoite-specific Serological Tools', *Clinical Infectious Diseases*, 71(10), pp. e686–e693. doi: 10.1093/cid/ciaa428.

Milne, G., Webster, J. P., Walker, M. (2020b) 'Toxoplasma gondii: An Underestimated Threat?', *Trends in Parasitology*, 36(12), pp. 959–969. doi: 10.1016/j.pt.2020.08.005.

Minetto, M. K., Witter, R., de Oliveira, A. C. S., Minetto, J. A., Barros, M. L., de Aguiar, D. M., Pacheco, R. (2019) 'Antibodies anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* in backyard pigs from the state of Mato Grosso, Brazil', *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 28(3), pp. 403–409. doi: 10.1590/s1984-29612019050.

Mirza Alizadeh, A., Jazaeri, S., Shemshadi, B., Hashempour-Baltork, F., Sarlak, Z., Pilevar, Z., Hosseini, H. (2018) 'A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods', *Pathogens and Global Health*, 112(6), pp. 306–319. doi: 10.1080/20477724.2018.1514137.

Miura, A. C., de Barros, L. D., Ferreira, F. P., Neto, J. M. F., Sicupira Franco, P. M. L., Su, C., Vidotto, O., Garcia, J. L. (2019) 'Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs for human consumption', *Parasitology Research*, 118(5), pp. 1593–1599. doi: 10.1007/s00436-019-06274-1.

Montoya, J. G., Berry, A., Rosso, F., Remington, J. S. (2007) 'The Differential Agglutination Test as a Diagnostic Aid in Cases of Toxoplasmic Lymphadenitis', *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), pp. 1463–1468. doi: 10.1128/JCM.01781-06.

Moré, G., Maksimov, P., Pardini, L., Herrmann, D. C., Bacigalupe, D., Maksimov, A., Basso, W., Conraths, F. J., Schares, G., Venturini, M. C. (2012) '*Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina', *Veterinary Parasitology*, 184(2–4), pp. 116–121. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.09.012.

Morrisette, N. & Gubbels, M.-J. (2020) 'The *Toxoplasma* cytoskeleton: structures, proteins, and processes', in *Toxoplasma gondii*. Thirth. Elsevier, pp. 743–788. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00016-5.

Murat, J.-B., L'Ollivier, C., Fricker Hidalgo, H., Franck, J., Pelloux, H., Piarroux, R. (2012) 'Evaluation of the New Elecsys Toxo IgG Avidity Assay for Toxoplasmosis and New Insights

into the Interpretation of Avidity Results', *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(11), pp. 1838–1843. doi: 10.1128/CVI.00333-12.

Murat, J.-B., Fricker Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P., Pelloux, H. (2013a) 'Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations?', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(9), pp. 943–956. doi: 10.1586/14787210.2013.825441.

Murat, J.-B., Dard, C., Fricker Hidalgo, H., Dardé, M.-L., Brenier-Pinchart, M.-P., Pelloux, H. (2013b) 'Comparison of the Vidas System and Two Recent Fully Automated Assays for Diagnosis and Follow-Up of Toxoplasmosis in Pregnant Women and Newborns', *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(8), pp. 1203–1212. doi: 10.1128/CVI.00089-13.

Navarrete, M. G., Cordeiro, M. D., Batista, Y., Alonso, J. C., Márquez, M., Roque, E., Fonseca, A. (2017) 'Serological detection of *Toxoplasma gondii* in domestic dogs in the western region of Cuba', *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9, pp. 9–12. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.03.005.

Nayeri, T., Sarvi, S., Sharif, M., Daryani, A. (2021) '*Toxoplasma gondii*: A possible etiologic agent for Alzheimer's disease', *Heliyon*, 7(6), p. e07151. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07151.

NCBI (2022) *Taxonomy browser (*Toxoplasma gondii*)*, *National Center for Biotechnology Information*. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5811&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle (Accesado: 28 de enero de 2022).

Nicolle & Manceaux, L. (1908) 'Sur une infection {à} corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi', *CR Acad Sci*, 147, pp. 763–766. Disponible en: <http://www.citeulike.org/user/JelenaBraum/article/9723502> (Accesado: 15 de abril de 2017).

O'Connell, E., Wilkins, M. F., Te Punga, W. A. (1988) 'Toxoplasmosis in sheep II. The ability of a live vaccine to prevent lamb losses after an intravenous challenge with *Toxoplasma gondii*', *New Zealand Veterinary Journal*, 36(1), pp. 1–4. doi: 10.1080/00480169.1988.35461.

Olinda, R. G., Pena, H. F. J., Frade, M. T. S., Ferreira, J. S., Maia, L. Â., Gennari, S. M., Oliveira, S., Dantas, A. F. M., Riet-Correa, F. (2016) 'Acute toxoplasmosis in pigs in Brazil caused by *Toxoplasma gondii* genotype Chinese 1', *Parasitology Research*, 115(7), pp. 2561–2566. doi: 10.1007/s00436-016-4999-0.

Oliveira, G. C., de Souza Almeida, H. M., Sartori, R. S., Rossi, G. A. M., de Oliveira, L. G., Langoni, H. (2019) 'Prevalence of *Toxoplasma gondii* infections in swine of non-technified rearing farms of the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil and associated risk

factors', *Parasite Epidemiology and Control*, 4, p. e00080. doi: 10.1016/j.parepi.2018.e00080.

Olsen, A., Berg, R., Tagel, M., Must, K., Deksné, G., Enemark, H. L., Alban, L., Johansen, M. V., Nielsen, H. V., Sandberg, M., Lundén, A., Stensvold, C. R., Pires, S. M., Jokelainen, P. (2019) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs, sheep, cattle, wild boars, and moose in the Nordic-Baltic region: A systematic review and meta-analysis', *Parasite Epidemiology and Control*, p. e00100. doi: 10.1016/j.parepi.2019.e00100.

ONEI (2017) *Anuario Estadístico de la Provincia de Villa Clara*. Villa Clara. Disponible en: <http://www.onei.gob.cu/mapa/provincia/villa-clara>.

Onyiche, T. E. & Ademola, I. O. (2015) 'Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in Ibadan, Nigeria', *Journal of Parasitic Diseases*. Springer India, 39(2), pp. 309–314. doi: 10.1007/s12639-013-0350-1.

Opsteegh, M., Langelaar, M., Sprong, H., den Hartog, L., De Craeye, S., Bokken, G., Ajzenberg, D., Kijlstra, A., van der Giessen, J. (2010) 'Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR', *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), pp. 193–201. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.027.

Opsteegh, M., Teunis, P., Züchner, L., Koets, A., Langelaar, M., van der Giessen, J. (2011) 'Low predictive value of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle for detection of parasite DNA', *International Journal for Parasitology*, 41(3), pp. 343–354. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.10.006.

Opsteegh, M., Kortbeek, T. M., Havelaar, A. H., van der Giessen, J. W. B. (2015) 'Intervention Strategies to Reduce Human *Toxoplasma gondii* Disease Burden', *Clinical Infectious Diseases*, 60(1), pp. 101–107. doi: 10.1093/cid/ciu721.

Opsteegh, M., Schares, G., Blaga, R., van der Giessen, J. (2016) 'Experimental studies on *Toxoplasma gondii* in the main livestock species (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01) Final report', *EFSA Supporting Publications*, 13(2). doi: 10.2903/sp.efsa.2016.EN-995.

Opsteegh, M., Spano, F., Aubert, D., Balea, A., Burrells, A., Cherchi, S., Cornelissen, J. B. W. J., Dam-Deisz, C., Guitian, J., Györke, A., Innes, E. A., Katzer, F., Limon, G., Possenti, A., Pozio, E., Schares, G., Villena, I., Wisselink, H. J., van der Giessen, J. W. B. (2019) 'The relationship between the presence of antibodies and direct detection of *Toxoplasma gondii* in slaughtered calves and cattle in four European countries', *International Journal for Parasitology*, 49(7), pp. 515–522. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.01.005.

Opsteegh, M., Dam-Deisz, C., de Boer, P., DeCraeye, S., Faré, A., Hengeveld, P., Luiten, R., Schares, G., van Solt-Smits, C., Verhaegen, B., Verkleij, T., van der Giessen, J., Wisselink, H.

- J. (2020) 'Methods to assess the effect of meat processing on viability of *Toxoplasma gondii*: towards replacement of mouse bioassay by in vitro testing', *International Journal for Parasitology*, 50(5), pp. 357–369. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.04.001.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta Viana, K. Y., Guzmán-Marín, E., Segura-Correa, J. C., Álvarez-Fleites, M., Jiménez-Coello, M. (2013) 'Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico', *BioMed Research International*, 2013, pp. 6–11. doi: 10.1155/2013/231497.
- Ozgonul, C. & Besirli, C. G. (2017) 'Recent Developments in the Diagnosis and Treatment of Ocular Toxoplasmosis', *Ophthalmic Research*, 57(1), pp. 1–12. doi: 10.1159/000449169.
- Pablos-Tanarro, A., Ortega-Mora, L. M., Palomo, A., Casasola, F., Ferre, I. (2018) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Iberian pig sows', *Parasitology Research*, 117(5), pp. 1419–1424. doi: 10.1007/s00436-018-5837-3.
- Pan, M., Lyu, C., Zhao, J., Shen, B. (2017) 'Sixty Years (1957–2017) of Research on Toxoplasmosis in China—An Overview', *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2017.01825.
- Pan, S., Thompson, R. C. A., Grigg, M. E., Sundar, N., Smith, A., Lymbery, A. J (2012) 'Western Australian Marsupials Are Multiply Infected with Genetically Diverse Strains of *Toxoplasma gondii*', *PLoS ONE*, 7(9), p. e45147. doi: 10.1371/journal.pone.0045147.
- Papatsiros, V. G., Athanasiou, L. V, Stougiou, D., Papadopoulos, E., Maragkakis, G. G., Katsoulos, P. D., Lefkaditis, M., Kantas, D., Tzika, E. D., Tassis, P. D., Boutsini, S. (2016) 'Cross-sectional serosurvey and risk factors associated with the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Greece.', *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 16(1), pp. 48–53. doi: 10.1089/vbz.2015.1845.
- Papini, R., di Ciccio, P., Marangi, M., Ghidini, S., Zanardi, E., Vergara, A., Giangaspero, A., Nardoni, S., Rocchigiani, G., Mancianti, F., Ianieri, A. (2017) 'Occurrence of *Toxoplasma gondii* in Carcasses of Pigs Reared in Intensive Systems in Northern Italy', *Journal of Food Protection*, 80(3), pp. 515–522. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-314.
- Paugam, A., Dupouy-Camet, J., Sumuyen, M.-H., Romand, S., Lamoril, J., Derouin, F. (1995) 'Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice', *Parasite*, 2(2), pp. 181–184. doi: 10.1051/parasite/1995022181.
- Pelloux, H., Brun, E., Vernet, G., Marcillat, S., Jolivet, M., Guergour, D., Fricker-Hidalgo, H., Goullier-Fleuret, A., Ambroise-Thomas, P. (1998) 'Determination of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity: adaptation to the vidas system (bioMérieux)', *Diagnostic*

Microbiology and Infectious Disease, 32(2), pp. 69–73. doi: 10.1016/S0732-8893(98)00077-7.

Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., Su, C. (2008) ‘Population structure and mouse-irulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil’, *International Journal for Parasitology*, 38(5), pp. 561–569. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.09.004.

Plaza, J., Dámek, F., Villena, I., Innes, E. A., Katzer, F., Hamilton, C. M. (2020) ‘Detection of *Toxoplasma gondii* in retail meat samples in Scotland’, *Food and Waterborne Parasitology*, 20, p. e00086. doi: 10.1016/j.fawpar.2020.e00086.

Pomares, C., Devillard, S., Holmes, T. H., Olariu, T. R., Press, C. J., Ramirez, R., Talucod, J., Estran, R., Su, C., Dubey, J. P., Ajzenberg, D., Montoya, J. G. (2018) ‘Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* DNA Samples Isolated From Humans Living in North America: An Unexpected High Prevalence of Atypical Genotypes’, *The Journal of Infectious Diseases*, 218(11), pp. 1783–1791. doi: 10.1093/infdis/jiy375.

Puvanesuaran, V. R., Noordin, R., Balakrishnan, V. (2013) ‘Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates from Wild Boars in Peninsular Malaysia’, *PLoS ONE*, 8(4), p. e61730. doi: 10.1371/journal.pone.0061730.

Qu, D., Zhou, H., Han, J., Tao, S., Zheng, B., Chi, N., Su, C., Du, A. (2013) ‘Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in pork’, *Veterinary Parasitology*, 192(1–3), pp. 98–103. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.10.010.

Rajendran, C., Su, C. & Dubey, J. P. (2012) ‘Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations’, *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), pp. 359–368. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.010.

Ramos, J. M., Milla, A., Rodríguez, J. C., Padilla, S., Masiá, M., Gutiérrez, F. (2011) ‘Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among immigrant and native pregnant women in Eastern Spain’, *Parasitology Research*, 109(5), pp. 1447–1452. doi: 10.1007/s00436-011-2393-5.

Ranucci, D., Battisti, E., Veronesi, F., Diaferia, M., Morganti, G., Branciarri, R., Ferroglio, E., Valiani, A., Chiesa, F. (2020) ‘Absence of Viable *Toxoplasma gondii* in Artisanal Raw-Milk Ewe Cheese Derived from Naturally Infected Animals’, *Microorganisms*, 8(1), p. 143. doi: 10.3390/microorganisms8010143.

Regalado Andújar, B., Rodríguez Peña, M. S., Fraga Nodarse, J., Rojas Rivero, L., Núñez Fernández, F. Á., Jerez Puebla, L. E. (2013) ‘Aplicación de herramientas serológicas y moleculares para el diagnóstico de coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*’, *Rev Cubana Med*

Trop, 65(1), pp. 13–25. Disponible en: <http://ref.scielo.org/dgrky9>.

Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., Costa, J.-M. (2003) ‘Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes’, *BMC Infectious Diseases*, 3(1), p. 7. doi: 10.1186/1471-2334-3-7.

Ribeiro-Andrade, M., de Crasto Souza Carvalho, J., Amorim da Silva, R., da Conceição Carvalho, M., Nascimento Porto, W. J., Mota, R. A. (2019) ‘Inter- and intra-genotype differences in induced cystogenesis of recombinant strains of *Toxoplasma gondii* isolated from chicken and pigs’, *Experimental Parasitology*, 207, p. 107775. doi: 10.1016/j.exppara.2019.107775.

Richomme, C., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., Ajzenberg, D., Mercier, A., Ducrot, C., Ferté, H., Delorme, D., Villena, I. (2009) ‘Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France’, *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), pp. 296–300. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.06.014.

Robert-Gangneux, F. & Darde, M.-L. (2012) ‘Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis’, *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), pp. 264–296. doi: 10.1128/CMR.05013-11.

Roelke, M. E., Johnson, W. E., Millán, J., Palomares, F., Revilla, E., Rodríguez, A., Calzada, J., Ferreras, P., León-Vizcaíno, L., Delibes, M., O’Brien, S. J. (2008) ‘Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*)’, *European Journal of Wildlife Research*, 54(2), pp. 171–178. doi: 10.1007/s10344-007-0122-2.

Rostami, A., Riahi, S. M., Fakhri, Y., Saber, V., Hanifehpour, H., Valizadeh, S., Gholizadeh, M., Pouya, R. H., Gamble, H. R. (2017) ‘The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among wild boars: A systematic review and meta-analysis’, *Veterinary Parasitology*, 244(May), pp. 12–20. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.013.

Rostami, A., Riahi, S. M., Gamble, H. R., Fakhri, Y., Nourollahpour Shiadeh, M., Danesh, M., Behniafar, H., Paktinat, S., Foroutan, M., Mokdad, A. H., Hotez, P. J., Gasser, R. B. (2020) ‘Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis’, *Clinical Microbiology and Infection*, 26(6), pp. 673–683. doi: 10.1016/j.cmi.2020.01.008.

Rousseau, A., Escotte-Binet, S., La Carbona, S., Dumètre, A., Chagneau, S., Favennec, L., Kubina, S., Dubey, J. P., Majou, D., Bigot-Clivot, A., Villena, I., Aubert, D. (2019) ‘*Toxoplasma gondii* Oocyst Infectivity Assessed Using a Sporocyst-Based Cell Culture Assay

Combined with Quantitative PCR for Environmental Applications’, *Applied and Environmental Microbiology*, 85(20). doi: 10.1128/AEM.01189-19.

Sabin, A. B. & Feldman, H. A. (1948) ‘Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*).’, *Science*, 108, pp. 660–663. doi: 10.1016/S0007-8506(07)62823-6.

Sacks, J. J. (1982) ‘Toxoplasmosis Infection Associated With Raw Goat’s Milk’, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 248(14), p. 1728. doi: 10.1001/jama.1982.03330140038029.

Saeij, J. P. J., Boyle, J. P., Boothroyd, J. C. (2005) ‘Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host’, *Trends in Parasitology*, 21(10), pp. 476–481. doi: 10.1016/j.pt.2005.08.001.

Samico-Fernandes, E. F. T., de Melo, R. P. B., de Cássia Peixoto Kim, P., de Almeida, J. C., de Barros, L. D., Garcia, J. L., da Silva, J., Mota, R. A. (2015) ‘First report of genotype #65 of *Toxoplasma gondii* in pigs’, *Parasitology Research*, 114(10), pp. 3927–3930. doi: 10.1007/s00436-015-4664-z.

Samico-Fernandes, E. F. T., Samico-Fernandes, M. F. T., de Albuquerque, P. P. F., de Almeida, J. C., de Souza Santos, A., da Rocha Mota, A., de Souza Neto, O., Mota, R. A. (2017) ‘*Toxoplasma gondii* in backyard pigs: seroepidemiology and mouse bioassay’, *Acta Parasitologica*, 62(2), pp. 466–470. doi: 10.1515/ap-2017-0054.

Sánchez-Artigas, R., Góngora-Amores, W., Torres-Ponce, Z., Castañeda-Comerón, B. (2009) ‘Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en donantes especiales de sangre en el municipio de Holguín.’, *Ciencias Holguín*, 15(4), pp. 1–8. Disponible en: <http://www.ciencias.holguin.cu/index.php/cienciasholguin/article/view/529>.

Santoro, M., Viscardi, M., Sgroi, G., D’Alessio, N. D., Veneziano, V., Pellicano, R., Brunetti, R., Fusco, G. (2019) ‘Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of wild boars (*Sus scrofa*) from southern Italy reveals high prevalence and parasite load’, *Parasites and Vectors*, 12(1), p. 335. doi: 10.1186/s13071-019-3586-5.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Jones, T. F., Griffin, P. M. (2015) ‘An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years’, *Epidemiology and Infection*, 143(13), pp. 2795–2804. doi: 10.1017/S0950268814003185.

Schumacher, A. C., Elbadawi, L. I., de Salvo, T., Straily, A., Ajzenberg, D., Letzer, D., Moldenhauer, E., Handly, T. M., Hill, D., Dardé, M. -L., Pomares, C., Passebosc-Faure, K.,

- Bisgard, K., Gomez, C. A., Press, C., Smiley, S., Montoya, J. G., Kazmierczak, J. J. (2021) 'Toxoplasmosis Outbreak Associated With *Toxoplasma gondii*-Contaminated Venison-High Attack Rate, Unusual Clinical Presentation, and Atypical Genotype', *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 72(9), pp. 1557–1565. doi: 10.1093/cid/ciaa285.
- Schwenk, H. T., Khan, A., Kohlman, K., Bertaina, A., Cho, S., Montoya, J. G., Contopoulos-Ioannidis, D. G. (2021) 'Toxoplasmosis in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients', *Transplantation and Cellular Therapy*, 27(4), pp. 292–300. doi: 10.1016/j.jtct.2020.11.003.
- Scimeca, R. C., Perez, E., Fairbanks, W. S., Ammar, S., Su, C., Gerhold, R. W., Reichard, M. V. (2020) 'Seroprevalence, DNA isolation, and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from black bear (*Ursus americanus*) sera collected in Eastern Oklahoma', *Parasitology Research*, 119(3), pp. 1109–1115. doi: 10.1007/s00436-019-06535-z.
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L. A., van Wormer, E., Villena, I. (2019) 'Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food', *Food and Waterborne Parasitology*, 15, p. e00049. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00049.
- Shwab, E. K., Zhu, X.-Q., Majumdar, D., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., Su, C. (2014) 'Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping', *Parasitology*, 141(4), pp. 453–461. doi: 10.1017/S0031182013001844.
- Shwab, E. K., Saraf, P., Zhu, X. Q., Zhou, D. H., McFerrin, B. M., Ajzenberg, D., Schares, G., Hammond-Aryee, K., van Helden, P., Higgins, S. A., Gerhold, R. W., Rosenthal, B. M., Zhao, X., Dubey, J. P., Su, C. (2018) 'Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(29), pp. E6956–E6963. doi: 10.1073/pnas.1722202115.
- Sibley, L. D. & Boothroyd, J. C. (1992) 'Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage', *Nature*, 359(6390), pp. 82–85. doi: 10.1038/359082a0.
- Sickinger, E., Gay-Andrieu, F., Jonas, G., Schultess, J., Stieler, M., Smith, D., Hausmann, M., Stricker, R., Stricker, R., Dhein, J., Braun, H.-B. (2008) 'Performance characteristics of the new ARCHITECT Toxo IgG and Toxo IgG Avidity assays', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62(3), pp. 235–244. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.005.
- Sinai, A. P., Watts, E. A., Dhara, A., Murphy, R. D., Gentry, M. S., Patwardhan, A (2016) 'Reexamining Chronic *Toxoplasma gondii* Infection: Surprising Activity for a “Dormant”

Parasite', *Current Clinical Microbiology Reports*, 3(4), pp. 175–185. doi: 10.1007/s40588-016-0045-3.

Sinai, A. P., Knoll, L. J., Weiss, L. M. (2020) 'Bradyzoite and sexual stage development', in *Toxoplasma gondii*. Thirth. Elsevier, pp. 807–857. doi: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00018-9.

Slany, M., Reslova, N., Babak, V., Lorencova, A. (2016) 'Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat from different production systems in the Czech Republic', *International Journal of Food Microbiology*, 238, pp. 252–255. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.020.

Smith, N. C., Goulart, C., Hayward, J. A., Kupz, A., Miller, C. M., van Dooren, G. G. (2021) 'Control of human toxoplasmosis', *International Journal for Parasitology*, 51(2–3), pp. 95–121. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.11.001.

Soete, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J. F. (1993) '*Toxoplasma gondii*: Kinetics of Bradyzoite-Tachyzoite Interconversion in vitro', *Experimental Parasitology*, 76(3), pp. 259–264. doi: 10.1006/expr.1993.1031.

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), pp. 1–11. doi: 10.1017/S0031182009991065.

Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X., Ajioka, J., Rosenthal, B., Dubey, J. P., Sibley, L. D. (2012) 'Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), pp. 5844–9. doi: 10.1073/pnas.1203190109.

Su, C., Zhang, X., Dubey, J. P. (2006) 'Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites', *International Journal for Parasitology*, 36(7), pp. 841–848. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.03.003.

Suárez-Hernández, M., González-Fernández, A., Gardón-Quirola, B. Y., Martínez-Sánchez, R. (2005) '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*, 16(1), pp. 21–27. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=7396>.

Sutterland, A. L., Kuin, A., Kuiper, B., van Gool, T., Leboyer, M., Fond, G., de Haan, L. (2019) 'Driving us mad: the association of *Toxoplasma gondii* with suicide attempts and traffic accidents – a systematic review and meta-analysis', *Psychological Medicine*, 49(10), pp. 1608–1623. doi: 10.1017/S0033291719000813.

Tagwireyi, W. M., Etter, E., Neves, L. (2019) 'Seroprevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic animals in southeastern South Africa', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 86(1), pp. 1–6. doi: 10.4102/ojvr.v86i1.1688.

Tamayo-León, R. (2022) *Tenemos alternativas para incrementar la producción de carne de cerdo en Cuba*, Granma - Órgano oficial del PCC. Disponible en: <https://www.granma.cu/cuba/2022-04-09/tenemos-alternativas-para-incrementar-la-produccion-de-carne-de-cerdo> (Accesado: 6 de julio de 2022).

Tao, Q., Wang, Z., Feng, H., Fang, R., Nie, H., Hu, M., Zhou, Y., Zhao, J. (2011) 'Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection on Pig Farms in Central China', *Journal of Parasitology*, 97(2), pp. 262–264. doi: 10.1645/GE-2646.1.

Tedde, T., Marangi, M., Papini, R., Salza, S., Normanno, G., Virgilio, S., Giangaspero, A. (2019) '*Toxoplasma gondii* and Other Zoonotic Protozoans in Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and Blue Mussel (*Mytilus edulis*): A Food Safety Concern?', *Journal of Food Protection*, 82(3), pp. 535–542. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-157.

Tenter, A. M., Barta, J. R., Beveridge, I., Duszynski, D. W., Mehlhorn, H., Morrison, D. A., Andrew Thompson, R. C., Conrad, P. A. (2002) 'The conceptual basis for a new classification of the coccidia', *International Journal for Parasitology*, 32(5), pp. 595–616. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00021-8.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., Weiss, L. M. (2000) '*Toxoplasma gondii*: from animals to humans', *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), pp. 1217–1258. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00124-7.

Torgerson, P. R. & Mastroiacovo, P. (2013) 'The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review', *Bulletin of the World Health Organization*, 91(7), pp. 501–508. doi: 10.2471/BLT.12.111732.

Trisciuglio, A., Zanet, S., Marellò, G., Chiesa, F., Nucera, D. M., Bergallo, M., Gennero, M., Ferroglio, E. (2015) 'The use of loop-mediated isothermal amplification improves *Toxoplasma gondii* detection in wildlife', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), pp. 754–757. doi: 10.1177/1040638715611170.

Valenzuela-Moreno, L. F., Rico-Torres, C. P., Cedillo-Peláez, C., Luna-Pastén, H., Méndez-Cruz, S. T., Reyes-García, M. E., Correa, D., Alves, B. F., Pena, H. F. J., Caballero-Ortega, H. (2020) 'Stray dogs in the tropical state of Chiapas, Mexico, harbour atypical and novel genotypes of *Toxoplasma gondii*', *International Journal for Parasitology*, 50(1), pp. 85–90. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.12.001.

- Velmurugan, G. V., Su, C., Dubey, J. P. (2009) 'Isolate Designation and Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates From Pigs in the United States', *Journal of Parasitology*, 95(1), pp. 95–99. doi: 10.1645/GE-1746.1.
- Vergara, A., Marangi, M., Caradonna, T., Pennisi, L., Paludi, D., Papini, R., Ianieri, A., Giangaspero, A., Normanno, G. (2018) '*Toxoplasma gondii* Lineages Circulating in Slaughtered Industrial Pigs and Potential Risk for Consumers', *Journal of Food Protection*, 81(8), pp. 1373–1378. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-496.
- Veronesi, F., Santoro, A., Milardi, G. L., Diaferia, M., Branciarri, R., Miraglia, D., Cioffi, A., Gabrielli, S., Ranucci, D. (2017) 'Comparison of PCR assays targeting the multi-copy targets B1 gene and 529 bp repetitive element for detection of *Toxoplasma gondii* in swine muscle', *Food Microbiology*, 63, pp. 213–216. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.022.
- Villard, O., Breit, L., Cimon, B., Franck, J., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Pelloux, H., Villena, I., Candolfi, E. (2013) 'Comparison of Four Commercially Available Avidity Tests for *Toxoplasma gondii*-Specific IgG Antibodies', *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(2), pp. 197–204. doi: 10.1128/CVI.00356-12.
- Villard, O., Cimon, B., L'Ollivier, C., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Pelloux, H., Villena, I., Candolfi, E. (2016) 'Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(1), pp. 22–33. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009.
- Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., Buffolano, W. (2009) 'Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy', *Veterinary Parasitology*, 161(1–2), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.019.
- Villena, I., Durand, B., Aubert, D., Blaga, R., Geers, R., Thomas, M., Perret, C., Alliot, A., Escotte-Binet, S., Thébault, A., Boireau, P., Halos, L. (2012) 'New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 183(3–4), pp. 203–208. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.08.001.
- Vitale, M., Tumino, G., Partanna, S., La Chiusa, S., Mancuso, G., La Giglia, M., Di Marco Lo Presti, V. (2014) 'Impact of Traditional Practices on Food Safety: A Case of Acute Toxoplasmosis Related to the Consumption of Contaminated Raw Pork Sausage in Italy', *Journal of Food Protection*, 77(4), pp. 643–646. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-285.
- Wang, D., Liu, Y., Jiang, T., Zhang, G., Yuan, G., He, J., Su, C., Yang, N. (2016) 'Seroprevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs intended for human

consumption in Liaoning province, northeastern China', *Parasites and Vectors*, 9(1), p. 248. doi: 10.1186/s13071-016-1525-2.

Wang, H., Wang, T., Luo, Q., Huo, X., Wang, L., Liu, T., Xu, X., Wang, Y., Lu, F., Lun, Z., Yu, L., Shen, J. (2012) 'Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China', *International Journal of Food Microbiology*, 157(3), pp. 393–397. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.011.

Wang, H., Zhang, L., Ren, Q., Yu, F., Yang, Y. (2017) 'Diagnosis of Swine Toxoplasmosis by PCR and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Henan, Central China', *BMC Veterinary Research*, 13(1), p. 152. doi: 10.1186/s12917-017-1079-3.

Wang, L., Cheng, H.-W., Huang, K.-Q., Xu, Y.-H., Li, Y.-N., Du, J., Yu, L., Luo, Q. -L., Wei, W., Jiang, L., Shen, J.-L. (2013) '*Toxoplasma gondii* prevalence in food animals and rodents in different regions of China: isolation, genotyping and mouse pathogenicity', *Parasites and Vectors*, 6(1), p. 273. doi: 10.1186/1756-3305-6-273.

Watts, E. A., Dhara, A., Sinai, A. P. (2017) 'Purification *Toxoplasma gondii* tissue cysts using percoll gradients', *Current Protocols in Microbiology*, 2017(May), pp. 20C.2.1-20C.2.19. doi: 10.1002/cpmc.30.

Weiss, L. M. & Dubey, J. P. (2009) 'Toxoplasmosis: A history of clinical observations', *International Journal for Parasitology*, 39(8), pp. 895–901. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.004.

Wu, S.-M., Ciren, D., Huang, S.-Y., Xu, M.-J., Ga, G., Yan, C., Mahmoud, M. S., Zou, F. -C., Zhu, X.-Q. (2012) 'First Report of *Toxoplasma gondii* Prevalence in Tibetan Pigs in Tibet, China', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(8), pp. 654–656. doi: 10.1089/vbz.2012.0968.

Zhang, H., Thekisoe, O. M. M., Aboge, G. O., Kyan, H., Yamagishi, J., Inoue, N., Nishikawa, Y., Zakimi, S., Xuan, X. (2009) '*Toxoplasma gondii*: Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method', *Experimental Parasitology*, 122(1), pp. 47–50. doi: 10.1016/j.exppara.2009.01.012.

Zhang, Y., Lai, B. S., Juhas, M., Zhang, Y. (2019) '*Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis', *Microbiological Research*, 227(May), p. 126293. doi: 10.1016/j.micres.2019.06.003.

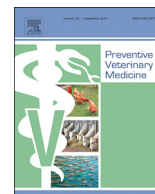
Zhou, P., Nie, H., Zhang, L.-X., Wang, H.-Y., Yin, C.-C., Su, C., Zhu, X. -Q., Zhao, J.-L. (2010) 'Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates From Pigs in China', *Journal of Parasitology*, 96(5), pp. 1027–1029. doi: 10.1645/GE-2465.1.

Zhuo, X., Huang, B., Luo, J., Yu, H., Yan, B., Yang, Y., Du, A. (2015) 'Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays based on ITS-1 for rapid detection

of *Toxoplasma gondii* in pork', *Veterinary Parasitology*, 208(3–4), pp. 246–249. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.01.008.

ANEXOS

10. ANEXOS



Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain

Julio C. Castillo-Cuenca^a, José M. Díaz-Cao^{b,*}, Álvaro Martínez-Moreno^b, David Cano-Terriza^b, Saúl Jiménez-Ruiz^{b,c}, Sonia Almería^{d,e}, Ignacio García-Bocanegra^b

^a Departamento de Zootecnia y Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba

^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (UCO), Campus Universitario de Rabanales, 14071, Córdoba, Spain

^c SaBio - Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (UCLM-CSIC-JCCM), 13071, Ciudad Real, Spain

^d UAB, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Barcelona, Spain

^e U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Applied Research and Safety Assessment, Laurel, MD, 20708, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Toxoplasma gondii
Iberian pig
Risk factors
Seroprevalence
Spain

ABSTRACT

Pigs reared under extensive farming conditions are currently in high commercial demand because they are associated with high-quality products. Nevertheless, the risk of contact with different pathogens of animal and public health concern is also higher in extensive production systems. *Toxoplasma gondii* is a widely prevalent zoonotic pathogen and transmission by contaminated pork is likely one of the main routes of human toxoplasmosis. The aim of this study was to determine the seroprevalence, risk factors and spatial distribution of *T. gondii* on extensive Iberian pig herds in Spain. Sera from 2245 Iberian pigs from 114 herds were collected between 2015 and 2017 and analyzed using a commercial ELISA. The apparent individual prevalence of antibodies against *T. gondii* was 24.1 % (542/2245) and the estimated true seroprevalence was 24.3 % (CI95 %: 22.5–26.1). Seropositivity was detected in 86.0 % (98/114; CI95 %: 77.4–91.1) of 114 herds analyzed. A multi-level logistic regression model showed that *T. gondii* infection was significantly more frequent in sows than in fattening pigs (OR: 2.6; CI95 %: 1.5–4.8) and in herds with more than three cats compared to no cats (OR: 2.9; CI95 %: 1.1–8.7). Our results indicate a widespread but heterogenous distribution of *T. gondii* in extensively reared Iberian pig herds, which may have important implications for public health through the consumption of undercooked or improperly cured pork products.

1. Introduction

Toxoplasmosis is a zoonotic disease with worldwide distribution caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular Apicomplexan protozoan capable of infecting most warm-blooded species. In humans, toxoplasmosis is usually asymptomatic, but can lead to abortions in primary infected pregnant women, congenital infection in their fetuses and severe disease in immunocompromised individuals (Dubey, 2009a). The consumption of raw or undercooked pork contaminated with *T. gondii* is a major route of transmission to humans (Guo et al., 2016; Belluco et al., 2018). Pigs can become infected by ingesting water or food contaminated with oocysts or tissues infected with cysts or congenitally.

The seroprevalence of *T. gondii* in domestic pigs varies widely from country to country and also between regions within the same country

(Foroutan et al., 2019; Olsen et al., 2019), being influenced by individual factors, such as age (Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010a; Olsen et al., 2019), management systems and/or environmental factors (Dubey, 2009b; Guo et al., 2016). Extensive production systems, in particular, have been shown to be an important risk factor for *T. gondii* exposure in pigs (Van der Giessen et al., 2007; García-Bocanegra et al., 2010b).

Spain is the second largest pork producer in the European Union (EU) and the fourth worldwide. The Iberian pig is an autochthonous breed of the Iberian Peninsula derived from the *Sus mediterraneus* with a characteristic habitat called “dehesa” consisting of Mediterranean holm-oak and cork-oak pastures (Garrido-Fernández and León-Camacho, 2019). Iberian pigs represent about 11 % of Spanish pork production and, according to 2019 national records (MAPA et al., 2019), approximately 80 % of the Spanish Iberian pig population is located in

* Corresponding author.

E-mail address: jmdchh@gmail.com (J.M. Díaz-Cao).

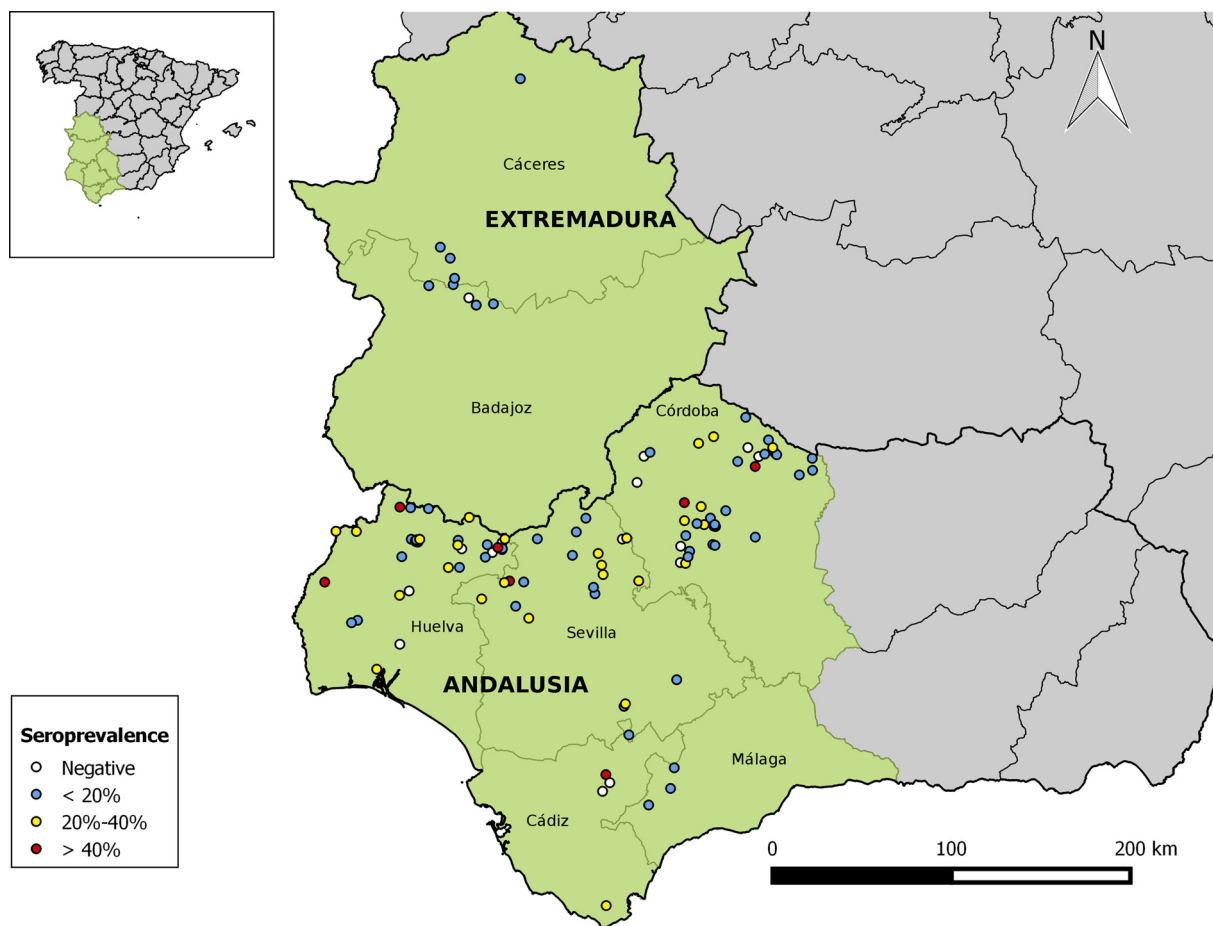


Fig. 1. Map of southwestern Spain showing the distribution and within-herd seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the sampled pig herds.

southwestern Spain. The Iberian pig is raised extensively up to the end of the fattening period (usually more than 14 months of age) and shares its habitat and natural resources with sympatric domestic and wild species (Aparicio-Tovar and Vargas-Giraldo, 2006; Cano-Terriza et al., 2018). Meat products derived from the Iberian pig are highly appreciated and are currently in high commercial demand. Some of these products are consumed without cooking such as dry-cured ham, the most important meat product obtained from the Iberian pig. Viable *T. gondii* tissue cysts have been isolated from meat and ham of pigs including dry-cured products up to 12 months of curation (Gomez-Sambles et al., 2015; Herrero et al., 2017).

Serosurveys have been carried out in domestic pigs in Spain, with individual seroprevalence levels ranging between 16.8 % and 18.8 % in pigs reared indoors (García-Bocanegra et al., 2010a, 2010b; Herrero et al., 2016), and between 22.4 % and 22.9 % in outdoor production systems (García-Bocanegra et al., 2010a; Herrero et al., 2016). In addition, *T. gondii* exposure has also been frequently reported in humans in this country, with seroprevalence values ranging between 12.0 % and 41.4 % in pregnant women (Ramos et al., 2011). Although uncommon, toxoplasmosis was also identified in transplant recipients (0.14 % of 15,800) in Spanish hospitals and was the cause of mortality in 13.6 % of the infected patients (Fernández-Sabé et al., 2012). However, epidemiological information about this parasite in Iberian pig herds remains limited (Hernández et al., 2014; Pablos-Tanarro et al., 2018) and no large-scale studies have been conducted to date. Hence, the aims of the present study were: (i) to estimate the individual and herd seroprevalence of *T. gondii* in Iberian pigs raised under extensive management systems in Spain, (ii) to identify potential risk factors associated with *T. gondii* seropositivity in extensively-managed pig herds in this country.

2. Material and methods

2.1. Study design

From 2015–2017, a cross-sectional study was performed to estimate the individual and herd prevalence of antibodies against *T. gondii* in extensively reared Iberian pigs in Andalusia and Extremadura, in southwestern Spain (Fig. 1), the regions with the largest number of Iberian pig herds population in Spain (MAPA et al., 2019). In Andalusia, the number of herds sampled was calculated assuming an expected prevalence of 50 %, confidence level of 95 % and absolute accuracy of 10 %. A total of 101 herds were included in the study. Sampling was stratified by province, based on the Iberian pig population for each province. Herds were selected by simple random sampling from the official records of herds obtained from the Regional Government of Andalusia (CAGPDS and Consejería de Agricultura, 2019). Additionally, 13 Iberian pig herds in Extremadura were sampled using a convenience sampling for logistical reasons. Whenever possible, 20 animals per herd, including 10 sows and 10 fattening pigs, were randomly sampled. This sampling scheme allows detection of exposure with a minimum expected prevalence of 15 % and a confidence level of 95 % (Thrusfield et al., 2018).

Epidemiological information was gathered by direct interview with each swine farmer using a structured questionnaire. The independent variables included in this study were grouped as (1) individual data: age (sows vs. fattening pigs) and sex; (2) herd data: herd size, presence of other domestic species: cats, dogs, cattle, goats and sheep; and wild species: red deer, wild boar, badgers and rodents; number of cats on the farm, mortality percentage (at weaning, growth and breeding) and (3) biosecurity measures: rodent control, disinfection, cleaning frequency

Table 1

Distribution of independent variables associated with *Toxoplasma gondii* seropositivity in extensively raised Iberian pigs (n = 1976) in Spain, 2015–2017. Variables with P-value < 0.20 in the univariate analysis were included in the multi-level logistic regression models to determine potential risk factors.

Variable	Category	N° positives/ overall ^a (%)	P-value
Age	Fattening pigs	269/1218 (22.1 %)	< 0.001
	Sows	223/678 (32.9 %)	
Cleaning frequency	< 6 months	174/642 (27.1 %)	0.511
	> 6 months	167/655 (25.5 %)	
Disinfection frequency	< 6 months	186/662 (28.1 %)	0.192
	> 6 months	163/654 (24.9 %)	
Herd size	< 127 animals	152/636 (23.9 %)	< 0.001
	127-280 animals	127/622 (20.4 %)	
	> 280 animals	212/617 (34.4 %)	
Mean annual temperature	14–16 °C	165/802 (20.6 %)	< 0.001
	16–20 °C	343/1174 (29.2 %)	
Mean annual rainfall	400–600 mm	150/556 (27.0 %)	0.024
	601–800 mm	228/983 (23.2 %)	
	801–1500 mm	150/556 (27.0 %)	
Mean annual relative humidity	< 65 %	238/912 (26.1 %)	0.715
	> 65 %	270/1064 (25.4 %)	
Mortality percentage at breeding	< 5 %	277/746 (27.1 %)	< 0.001
	> 5 %	26/48 (54.2 %)	
Mortality percentage at growth	< 5 %	295/1024 (28.8 %)	0.099
	> 5 %	23/108 (21.3 %)	
Mortality percentage at weaning	< 5 %	226/808 (28.0 %)	0.265
	> 5 %	83/263 (31.6 %)	
Number of cats on the farm	No cats	239/1078 (22.2 %)	< 0.001
	< 3 cats	77/351 (21.9 %)	
	> 3 cats	119/280 (42.5 %)	
Presence of badgers	No	278/858 (32.4 %)	< 0.001
	Yes	192/951 (20.2 %)	
Presence of cattle	No	171/834 (20.5 %)	< 0.001
	Yes	276/905 (30.5 %)	
Presence of cats	No	254/1137 (22.3 %)	< 0.001
	Yes	214/679 (31.5 %)	
Presence of dogs	No	61/425 (14.4 %)	< 0.001
	Yes	407/1391 (29.3 %)	
Presence of goats	No	375/1598 (23.5 %)	< 0.001
	Yes	63/139 (45.3 %)	
Presence of red deer	No	108/418 (25.8 %)	< 0.001
	Yes	327/1281 (25.5 %)	
Presence of perimeter fences	No	7/20 (35.0 %)	0.340
	Yes	455/1776 (25.6 %)	
Presence of rodents	No	105/419 (25.1 %)	0.651
	Yes	340/1299 (26.2 %)	
Presence of sheep	No	359/1439 (24.9 %)	< 0.001
	Yes	89/318 (28.0 %)	
Presence of wild boar	No	81/310 (26.1 %)	< 0.001
	Yes	354/1389 (25.5 %)	
Rodent control	No	112/469 (23.9 %)	0.035
	Yes	227/773 (29.4 %)	

^a Missing values were omitted.

and presence of perimeter fences. Environmental data including mean annual temperature (°C), mean annual rainfall (mm) and mean annual humidity (%) were recorded from weather stations in the vicinity of the sampling herds. Climatological data were obtained from the Andalusian Environmental Information Network (REDIAM, 2019).

2.2. Sample collection and serological analysis

Blood samples were obtained by puncture of the *Sinus ophthalmicus*. Sera were obtained by centrifugation at 400 g for 10 min and stored at –20 °C until assayed. Serum samples were tested by an indirect commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (PrioCHECK® porcine *Toxoplasma* Ab, Prionics AG, Zurich, Switzerland) for the

detection of antibodies against *T. gondii* using cell culture derived tachyzoites as antigen. The ELISA was performed in accordance with the manufacturer's instructions. Positive, weakly positive and negative control sera provided by the manufacturer were included in duplicate on each plate. ELISA results were expressed as percentage of positivity (PP), calculated according to the following formula: [(sample PP = ((sample optical density (OD) – mean negative control OD) / (mean positive control OD - mean negative control OD)) X 100]. Results obtained at or above the cut-off of 20 PP were considered positive. The sensitivity and specificity values of this ELISA according to the manufacturer were 98.0 % and 99.6 %, respectively.

2.3. Statistical analysis

The apparent individual seroprevalence against *T. gondii* was calculated from the ratio of positive results to the total number of pigs tested. The true individual seroprevalence was calculated using the Rogan-Gladen estimator (Rogan and Gladen, 1978) and the exact binomial confidence intervals of 95 % (CI95 %) were estimated by the Blaker's method (Reiczigel et al., 2010).

The association between the independent variables and *T. gondii* seropositivity was analyzed only for the region of Andalusia, where sampling was random. Variables were first tested using a chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. All variables with $P < 0.20$ were selected to be included for further modeling. Cramer's V coefficients were computed pairwise to detect collinearity problems. When collinearity was detected, the variable with the clearest epidemiological relationship with *T. gondii* was retained. Finally, the effect of the selected independent variables on the response variable (seropositivity to *T. gondii*) was investigated by using a multi-level logistic regression model. The examined variables were included as fixed factors in the models with herd included as a random factor. Variables were sequentially removed if they were not significant (P -value > 0.05). The Aikake information criterion was used to assess the best model. All pairwise interactions that were biologically plausible were evaluated. The model was rerun until all remaining variables presented statistically significant values (likelihood-ratio Wald's test, $P < 0.05$). The statistical analysis was performed using the package "lme4" (Bates et al., 2015) in R software v 3.5.2 (R Core Team, 2018).

3. Results

Antibodies against *T. gondii* were detected in 542 of the 2245 pigs tested (24.1 %) with an estimated true individual seroprevalence of 24.3 % (CI95 %: 22.5–26.1). Seropositive animals were observed in the 86 % (98/114; CI95 %: 77.4–91.1) of the examined herds (Fig. 1).

The distribution and univariate association of the independent variables and seropositivity to *T. gondii* are shown in Table 1. The multi-level model identified age and number of cats on the farm as risk factors associated with *T. gondii* exposure (Table 2). Individual seropositivity was higher in sows (32.9 % of 678) than in fattening pigs (22.1 % of 1218) ($P < 0.001$; OR: 2.6; CI95 %: 1.5–4.8). Seroprevalence was also significantly higher in herds with more than three cats (42.5 % of 280) compared with those with no cats (22.2 % of 1078) ($P = 0.048$; OR: 2.5; CI95 %: 1.1–8.7). However, a smaller number of cats (between one and three) were not found to increase the risk of infection (21.9 % of 351) ($P = 0.605$; OR: 0.7; CI95 %: 0.5–2.0).

4. Discussion

Pig production in free-range and organic management systems has become popular and its economic importance has increased in Europe during the last few decades (Früh et al., 2014). Food products derived from extensive production systems such as the Iberian pig in the *dehesa* agroforestry systems are of high quality and are in high commercial demand (Garrido-Fernández and León-Camacho, 2019). However, the

Table 2

Results of the multi-level logistic regression model of potential risk factors associated with *Toxoplasma gondii* seropositivity in extensively raised Iberian pigs (n = 1976) in Spain, 2015-2017.

Variable	Category	Positive/Total (%)	β (S.E.)	OR	CI95 %	P-value	P-value ^a
Age	Sows	223/678 (32.9)	1.0 (0.3)	2.6	1.5-4.8	< 0.001	< 0.001
	Fattening pigs	269/1218 (22.1)		1.0	^b	^b	
Number of cats on the farm	> 3 cats	119/280 (42.5)	1.1 (0.5)	2.9	1.1-8.7	0.048	0.047
	1-3 cats	77/351 (21.9)	-0.3 (0.5)	0.7	0.3-2.1	0.605	
	No cats	239/1078 (22.2)		1.0	^b	^b	
σ^2		2.681					

^a Overall significance of the variable (Likelihood ratio test). ^b Reference category. σ^2 : Variance of random effect (herd).

implementation of effective biosecurity measures and control programs for transmissible diseases is difficult in these extensive systems (Davies, 2011). This is bound to result in high exposure to zoonotic pathogens, including *T. gondii* in pigs (van der Giessen et al., 2007; Kijlstra et al., 2009; Wallander et al., 2016; Cano-Terriza et al., 2018).

The individual seroprevalence obtained in the present study showed high *T. gondii* exposure among extensively reared Iberian pigs in Spain. Our results are consistent with the 27.1 % of 709 Iberian fattening pigs analyzed by ELISA in Andalusia between 2008 and 2009 (Hernández et al., 2014). The high seropositivity levels found in both studies in different periods suggest an endemic circulation of *T. gondii* in this region. In addition, the high herd prevalence obtained in the present study indicates widespread *T. gondii* circulation in extensive Iberian pig farms in Spain. However, Pablos-Tanarro et al. (2018) found markedly lower seroprevalences (ranging between 11.7 % and 14.8 % using ELISA and the direct agglutination test, respectively) in 963 Iberian sows from five extensively managed herds in southwestern Spain. Nevertheless, comparisons among studies should be made with caution given the differences in number of animals or herds examined, age classes, management and environmental factors and serological methods employed.

The overall seroprevalence found in our study was higher than the 16.6 % reported for pig herds reared indoors in Spain (García-Bocanegra et al., 2010b). Higher seropositivity in outdoor managed pigs has been also reported in different countries (van der Giessen et al., 2007; Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010a; Limon et al., 2017; Pablos-Tanarro et al., 2018). The rearing conditions of Iberian pigs, with long feeding periods in the *dehesa* and limited biosecurity measures, would be expected to favor contact with sporulated oocysts. In this regard, a high seroprevalence has also been detected in sympatric wild boar (*Sus scrofa*) populations (between 18.6 %–38.4 %) (Gauss et al., 2005; Calero-Bernal et al., 2016; Almería et al., 2018). *Toxoplasma gondii* infections in definitive host species such as free-roaming cats (*Felis catus*), the European wild cat (*Felis sylvestrus*) and the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) have also been reported in the study region, suggesting the existence of sylvatic cycles for *T. gondii* in Spanish Mediterranean ecosystems (Roelke et al., 2008; Millán et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010c).

Individual seroprevalence was significantly higher in sows (32.9 %) than in fattening pigs (22.1 %), which is consistent with previous reports (Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010b; Kofoed et al., 2017; Olsen et al., 2019) and reflects the well-known increased exposure with age and the life-long persistence of anti-*T. gondii* antibodies (Dubey, 2009b). The presence of more than three cats on the farms was also a risk factor for *T. gondii* seroprevalence, in agreement with the results found by Meerburg et al. (2006). Domestic cats are frequently used for rodent control in pig herds, having access to food, water and pig facilities. Even though the presence of cats was not reported by farmers in 35 of the 114 pig herds analyzed, the entrance of free-roaming cats or other wild felid species in these farms is difficult to control and therefore, their presence cannot be ruled out. Cats are

frequently infected and shed oocysts when they are young (Dubey, 2001), and the developed immunity usually prevents from re-excretion (Dubey, 1995). Consequently, a higher seroprevalence in herds with a larger number of cats probably reflects the higher likelihood for some of them being juvenile, which could be shedders and imply an additional risk of infection for pigs.

In conclusion, our results show a high and widespread *T. gondii* exposure in extensively managed Iberian pig herds in Spain. The high seroprevalence found in this breed may have important implications for public health through the consumption of undercooked or improperly cured pork products. Although curing has been shown to inactivate *T. gondii* cysts, its effectivity depends on salt concentration, time and temperature (Dubey, 1997; Kijlstra and Jongert, 2008). In this regard, the application of the minimum dry-curing times, which are defined by the Spanish Ministry of Agriculture as 600 days for ham legs and 365 days for pork shoulders, are likely to be effective in removing the infective capability of *T. gondii* (Gómez-Samblas et al., 2016). Ensuring an adequate dry-curing time and proper cooking of other derived meat products can be useful measures to reduce the zoonotic risk of *T. gondii* infections. At farm level, management practices, such as the use of rodent control methods by authorized companies instead of domestic cats, could be important to reduce the risk of *T. gondii* circulation in extensively managed pig herds. In addition, risk-based surveillance could also be useful to establish control measures against *T. gondii* circulation in Iberian pig herds managed under extensive production systems.

Declaration of Competing Interest

None of the authors of this study has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the manuscript.

Acknowledgements

The present work was partially funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) research grant Ref. AGL2013-49159-C2-2-R and by the Regional Ministry of Economy and Infrastructure of the Board of Extremadura research grant Ref. TB-PORCEX. We would like to thank the Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP, in Spanish) for helping fund the doctoral training of J.C. Castillo-Cuenca. S. Jiménez-Ruiz holds a PhD contract from the UCLM co-supported by the European Social Fund (2018/12504).


References

- Almería, S., Cabezón, O., Paniagua, J., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Arenas-Montes, A., Dubey, J.P., García-Bocanegra, I., 2018. *Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem. Parasitol. Res. 117, 665–671.
- Aparicio-Tovar, M.A., Vargas-Giraldo, J.D., 2006. Considerations on ethics and animal welfare in extensive pig production: breeding and fattening Iberian pigs. Livest. Sci.

- 103, 237–242.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Soft.* 67, 1–48.
- Belluco, S., Patuzzi, I., Ricci, A., 2018. Bovine meat versus pork in *Toxoplasma gondii* transmission in Italy: a quantitative risk assessment model. *Int. J. Food Microbiol.* 269, 1–11.
- Calero-Bernal, R., Pérez-Martín, J.E., Reina, D., Serrano, F.J., Frontera, E., Fuentes, I., Dubey, J.P., 2016. Detection of zoonotic protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suis hominis* in wild boars from Spain. *Zoonoses Public Health* 63, 346–350.
- CAGPDS, Consejería de Agricultura, 2019. Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. (Accessed 23 June 2019). <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/consejeria/sobre-consejeria/estadisticas/paginas/ganaderia-censos-ganaderos.html>.
- Cano-Terriza, D., Rivalde, M.A., Rodríguez-Hernández, P., Napp, S., Fernández-Morente, M., Moreno, I., Bezos, J., Fernández-Molera, V., Saéz, J.L., García-Bocanegra, I., 2018. Epidemiological surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in extensively raised pigs in the south of Spain. *Prev. Vet. Med.* 159, 87–91.
- Davies, P.R., 2011. Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 189–201.
- Dubey, J.P., 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* 81, 410–415.
- Dubey, J.P., 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85–6% NaCl solutions at 4–20 C. *J. Parasitol.* 83, 946–949.
- Dubey, J.P., 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol.* 87, 215–219.
- Dubey, J.P., 2009a. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, second. ed. Parasites & Vectors. CRC Press Taylor & Francis Group, New York.
- Dubey, J.P., 2009b. Toxoplasmosis in pigs - the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164, 89–103.
- Fernández-Sabé, N., Cervera, C., Fariñas, M.C., Bodro, M., Muñoz, P., Gurguí, M., Torre-Cisneros, J., Martín-Dávila, P., Noblejas, A., Len, O., García-Reyne, A., del Pozo, J.L., Carratalá, J., 2012. Risk factors, clinical features and outcomes of toxoplasmosis in solid-organ transplant recipients: a matched case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 54, 355–361.
- Foroutan, M., Fakhri, Y., Riahi, S.M., Ebrahimpour, S., Namroodi, S., Taghipour, A., Spotin, A., Gamble, H.R., Rostami, A., 2019. The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: a systematic review and meta-analysis. *Vet. Parasitol.* 269, 42–52.
- Früh, B., Bochicchio, D., Edwards, S., Hegelund, L., Leeb, C., Sundrum, A., Werne, S., Wiberg, S., Prunier, A., 2014. Description of organic pig production in Europe. *Org. Agric.* 4, 83–92.
- García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J.P., Casal, J., Martín, G.E., Cabezón, O., Perea, A., Almería, S., 2010a. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol. Int.* 59, 421–426.
- García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Simon-Grifé, M., Cabezón, O., Casal, J., Allepuz, A., Napp, S., Almería, S., 2010b. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. *Res. Vet. Sci.* 89, 85–87.
- García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Martínez, F., Vargas, A., Cabezón, O., Zorrilla, I., Arenas, A., Almería, S., 2010c. Factors affecting seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. Parasitol.* 167, 36–42.
- Garrido-Fernández, A., León-Camacho, M., 2019. Assessing the effect of season, mountain length and sampling location on Iberian pig fat by compositional data analysis and standard multivariate statistics. *Food Chem.* 295, 377–386.
- Gauss, C.B., Dubey, J.P., Vidal, D., Ruiz, F., Vicente, J., Marco, I., Lavin, S., Gortazar, C., Almería, S., 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet. Parasitol.* 131, 151–156.
- Gomez-Sambas, M., Vilchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2015. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 46, 107–113.
- Gómez-Sambas, M., Vilchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2016. *Toxoplasma gondii* detection and viability assays in ham legs and shoulders from experimentally infected pigs. *Food Microbiol.* 58, 112–120.
- Guo, M., Mishra, A., Buchanan, R.L., Dubey, J.P., Hill, D.E., Gamble, H.R.A.Y., Pradhan, A.K., 2016. Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption of domestically produced lamb in the United States. *J. Food Prot.* 79, 1181–1187.
- Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Tarradas, C., Luque, I., García-Valverde, R., Reguillo, L., Astorga, R.J., 2014. A serological survey of *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in Iberian fattening pigs reared in free-range systems. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 477–481.
- Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, M., Herrera, A., Bayarri, S., 2016. *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet. Parasitol.* 224, 52–59.
- Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A., Bayarri, S., 2017. *Toxoplasma gondii* in raw and dry-cured ham: the influence of the curing process. *Food Microbiol.* 65, 213–220.
- Kijlstra, A., Jongert, E., 2008. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* 38, 1359–1370.
- Kijlstra, A., Meerburg, B.G., Bos, A.P., 2009. Food safety in free-range and organic livestock systems: risk management and responsibility. *J. Food Prot.* 72, 2629–2637.
- Kofoed, K.G., Vorslund-Kiær, M., Nielsen, H.V., Alban, L., Johansen, M.V., 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Danish pigs. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 10, 136–138.
- Limon, G., Beauvais, W., Dadios, N., Villena, I., Cockle, C., Blaga, R., Guitian, J., 2017. Cross-sectional study of *toxoplasma gondii* infection in pig farms in England. *Foodborne Pathog. Dis.* 14, 269–281.
- MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales Indicadores Económicos 2018. (Accessed 16 Septemeber 2019). https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectorporcinoano2018_tcm30-379728.pdf.
- Meerburg, B.G., Van Riel, J.W., Cornelissen, J.B., Kijlstra, A., Mul, M.F., 2006. Cats and goat whey associated with *toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 6, 266–274.
- Millán, J., Candela, M.G., Palomares, F., Cubero, M.J., Rodríguez, A., Barral, M., de la Fuente, J., Almería, S., León-Vizcaíno, L., 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. J.* 182, 114–124.
- Pablos-Tanarro, A., Ortega-Mora, L.M., Palomo, A., Casasola, F., Ferre, I., 2018. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Iberian pig sows. *Parasitol. Res.* 117, 1419–1424.
- Olsen, A., Berg, R., Tagel, M., Must, K., Deksné, G., Enemark, H.L., Alban, L., Johansen, M.V., H.V., Nielsen, Sandberg, M., Lundén, A., Stensvold, C.R., Pires, S.M., Jokelainen, P., 2019. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs, sheep, cattle, wild boars, and moose in the Nordic-Baltic region: a systematic review and meta-analysis. *Parasite Epidemiol. Control* 5, e00100.
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. URL: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ramos, J.M., Milla, A., Rodríguez, J.C., Padilla, S., Masiá, M., Gutiérrez, F., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among immigrant and native pregnant women in Eastern Spain. *Parasitol. Res.* 109, 1447–1452.
- REDIAM, 2019. Red De Información Ambiental De Andalucía. (Accessed 9 July 2019). http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/rediam/menuitem.aedc2250f6db83cf8ca78ca731525ea0?vgnextoid=7b3ba7215670f210VgnVCM1000001325e50aRCRD&lr=lang_es.
- Reiczigel, J., Földi, J., Ózsvári, L., 2010. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiol. Infect.* 138, 1674–1678.
- Roelke, M.E., Johnson, W.E., Millán, J., Palomares, F., Revilla, E., Rodríguez, A., Calzada, J., Ferreras, P., León-Vizcaíno, L., Delibes, M., O’Brien, S.J., 2008. Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 171–178.
- Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71–76.
- Thrusfield, M., Christley, R., Brown, H., Diggle, P.J., French, N., Howe, K., Kelly, L., O’Connor, A., Sargeant, J., Wood, H., 2018. *Veterinary Epidemiology*, fourth. ed. Blackwell Publishing company All.
- van der Giessen, J., Fonville, M., Bouwknegt, M., Langelaar, M., Vollema, A., 2007. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 148, 371–374.
- Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., Buffolano, W., 2009. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 161, 1–8.
- Wallander, C., Frössling, J., Dórea, F.C., Ugglá, A., Vågsholm, I., Lundén, A., 2016. Pasture is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs. *Vet. Parasitol.* 224, 27–32.



Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in domestic pigs raised from Cuba

Julio César Castillo-Cuenca^{1,2} · Álvaro Martínez-Moreno³ · José Manuel Díaz-Cao² · Angel Entrena-García⁴ · Jorge Fraga⁵ · Pedro Casanova Arias⁵ · Sonia Almería⁶ · Ignacio García-Bocanegra² 

Received: 23 March 2021 / Accepted: 9 July 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

A cross-sectional study was carried out to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and associated risk factors in pigs in the largest pork-producing region in Cuba. Serum samples from 420 pigs, including 210 sows and 210 post-weaning pigs, were tested for antibodies against *T. gondii* using a commercial indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Anti-*T. gondii* antibodies were detected in 56 animals (13.3%, 95% CI: 10.1–16.6). A generalized estimating equations model revealed that the risk factors associated with higher seropositivity in pigs were altitude (higher in farm's location < 250 m above sea level (masl) versus ≥ 250 masl) and age (higher in sows compared to post-weaning pigs). The results indicated that this protozoan parasite is widely distributed on pig farms in the study area, which is a public health concern since the consumption of raw or undercooked pork meat products containing tissue cysts is considered one of the main routes of *T. gondii* transmission worldwide. Control measures should be implemented to reduce the risk of exposure to *T. gondii* in pigs in Cuba.

Keywords *Toxoplasma gondii* · Seroprevalence · Domestic pigs · Public health · Cuba

Section Editor: Xing-Quan ZHU

✉ Ignacio García-Bocanegra
nacho.garcia@uco.es

- ¹ Departamento, de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara, 54830 Santa Clara, Cuba
- ² Animal Health and Zoonosis Research Group (GISAZ), Department of Animal Health, University of Cordoba, 14014 Córdoba, Spain
- ³ Department of Animal Health (Parasitology and Parasitic Diseases), University of Cordoba, 14014 Córdoba, Spain
- ⁴ Departamento de Parasitología, Centro Nacional Para La Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), 10300 La Habana, Cuba
- ⁵ Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, 11400 La Habana, Cuba
- ⁶ Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Nutrition (CFSAN), Office of Applied Research and Safety Assessment (OARSA), Division of Virulence Assessment, Laurel, MD, USA

Introduction

Toxoplasmosis is a worldwide zoonotic disease caused by the obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, which infects virtually all warm-blooded species including human beings (Dubey et al. 2020). Approximately one-third of the human population is considered to be infected by this protozoan parasite (Behnke et al. 2020). Although *T. gondii* infection is usually asymptomatic, it can cause abortion, as well as blindness, neuromuscular disease, and even death in immunocompromised people (Dubey 2010). Moreover, an association between toxoplasmosis and neuropsychiatric disorders, including schizophrenia, has been suggested (Flegr and Horáček 2017).

Toxoplasma gondii is an important food-borne pathogen (EFSA 2018). The consumption of raw or undercooked meat products containing tissue cysts is considered one of the main routes of *T. gondii* transmission worldwide (Dubey 2010; Almeria and Dubey 2021). In this respect, pork is one of the major sources of human toxoplasmosis in some countries (Dubey et al. 2020; Almeria and Dubey 2021). Public concerns associated with *T. gondii* clearly indicate the need for epidemiological investigation in animals that can be used as a source of food. Previous immunological studies

on the presence of *T. gondii* antibodies in domestic pigs carried out in Latin America showed wide variations in the seroprevalence among countries and between regions within the same country (Cañón-Franco et al. 2014; Feitosa et al. 2014; Foroutan et al. 2019; Dubey et al. 2020). In Cuba, anti-*T. gondii* antibodies have been found in human patients with acquired immunodeficiency syndrome (Alfonso et al. 2009) and retinochoroiditis (Regalado Andújar et al. 2013), in pregnant women (González-Morales et al. 1995), neonates (Goya Batista et al. 2014), and blood donors (Sánchez-Artigas et al. 2009). Seropositivity has also been reported in domestic animals, including cats (Grandía et al. 2012) and dogs (Navarrete et al. 2017) in this country. Nevertheless, information regarding *T. gondii* in domestic pigs in Cuba is very scarce. The only previous survey in this species was carried out in Ciego de Ávila province (Central Cuba) between 1980 and 2002 (Suárez-Hernández et al. 2005). Hence, the aim of this study was to assess the current

seroprevalence and risk factors associated with *T. gondii* in pigs in the largest pork-producing region in Cuba.

Material and methods

Study design

A cross-sectional study was carried out to determine seroprevalence against *T. gondii* in domestic pigs in Villa Clara (Central Cuba) (Fig. 1). This region accounts for the highest number of domestic pigs and is the largest pork producer in Cuba, with annual production at around 49,332 tons (ONEI 2017). Pork production in Cuba is characterized by an agreement management system. This means that all breeding farms, including sows, reproductive males, and piglets (from post-farrowing to post-weaning), are managed by the State government in intensive production systems. Fattening

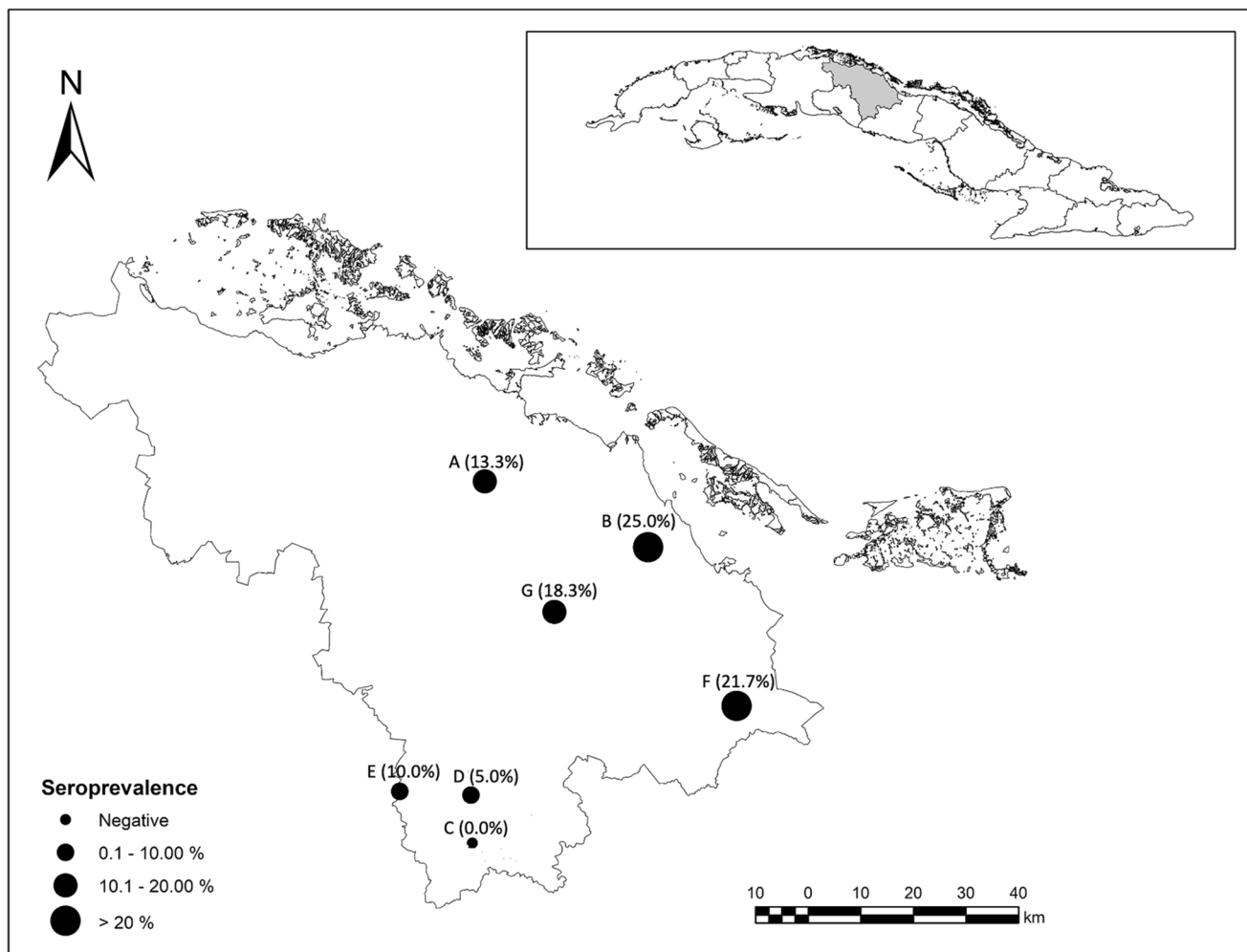


Fig. 1 Map of Villa Clara province (Cuba) showing the distribution and within-farm seroprevalence of *Toxoplasma gondii* on the sampled pig farms

is then carried out by private swine farmers until the pigs are ready for slaughter.

The total population of all breeding farms in the study area was used to calculate sampling size. The size of the sampled farms ranged from 500 to 1,600 sows (mean: 1,050 sows). The breeds of the sows and post-weaning pigs were Yorkshire/Landrace and Yorkshire/Landrace X CC21 (Cuban paternal breed), respectively. Sample size was calculated assuming a prevalence of 50% (which provides the highest sample size in studies with unknown prevalence) with a 95% confidence level (95% CI) and desired precision of $\pm 5\%$, resulting in 384 domestic pigs to be sampled (Thrusfield et al. 2018). Sixty animals, including 30 sows and 30 post-weaning pigs, were randomly selected from each pig farm in order to detect infection with 95% probability and assuming a minimum within-farm prevalence of 6%. A total of 420 pigs were finally sampled in seven (A–G) farms managed under governmental intensive production management. All sampled farms presented very similar biosecurity measures including self-replacement gilts (replacement of breeding sows using gilts from the same herd), all-in-all out management, absence of cats, absence of other animal species, perimetral fence around the farm, rodent and insect control, disinfection and disinfestations protocols, sanitary ford, and water chlorination, among others. Farms A, B, F, and G were located < 250 m above sea level (masl), while farms C, D, and E were located at altitudes ≥ 250 masl.

Sample collection and serological analysis

The collection of samples analyzed in the present study was part of the official Animal Health Campaigns under Cuban legislation. No animals were specifically sampled for this study; therefore, no ethical approval was necessary. Blood samples (about 10 ml) were collected using the orbital sinus puncture method. Samples were then centrifuged at 4,800 rpm for 10 min. Serum samples were separated and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. To obtain the presence of the antibodies against *T. gondii*, serum samples were analyzed using a commercial indirect ELISA (PrioCHECK® *Toxoplasma* Ab porcine, Thermo Fisher Scientific Prionics Lelystad BV) in accordance with the manufacturer's recommendations (Castillo-Cuenca et al. 2020). The sensitivity and specificity of this ELISA according to the manufacturer are 98% and 99.6%, respectively.

Statistical analysis

Individual seroprevalence against *T. gondii* was calculated as the ratio of seropositive animals to the total number of animals examined, using two-sided exact binomial confidence intervals (95% CI). Analysis of means (ANOM) applied to proportions was used to identify farms with a significantly

different within-farm seroprevalence relative to the overall mean combining all the sampled farms (“grand mean”), enabling detection of groups that deviate significantly from the overall mean (Rao 2005). The analysis was performed using the “ANOM” package (Pallmann and Hothorn 2016) of the statistical software R (R v. 3.5.2). If a statistically significant difference between the farms was found by ANOM, a *dummy* variable was created (“significantly different farm” vs “other farms”) and included in the bivariate analysis.

Epidemiological information including age, sex, farm (from A to G), altitude, and farm size was gathered for each sampled animal. For sows, data on offspring per birth, number of parities, weaning piglets, and stillbirths were also recorded. Bivariate chi-square and Fisher's exact tests were performed to obtain the statistical significance of independent variables regarding individual *T. gondii* status (dependent variable). Variables with $P < 0.20$ in the bivariate analysis were selected as potential risk factors. Collinearity between pairs of variables was tested by Cramer's *V* coefficient. Finally, a generalized estimating equation (GEE) was carried out to study the effect of the variables selected on the basis of bivariate analysis (Thrusfield et al. 2018). The number of seropositive animals was assumed to follow a binomial distribution and the “farm” was included as random effect. A logarithmic link function was considered. A forward introduction of variables was used, starting with the variable with the lowest *P* value in bivariate analysis. At each step, the confounding effect of the included variable was assessed by computing the change in the odds ratios (ORs). The model was re-run until all remaining variables presented statistically significant values (likelihood-ratio Wald's test, $P < 0.05$) and a potential relationship with the response variable existed. The choice of the best model was based on the quasi-likelihood under independence model criterion (Hanley et al. 2003). Statistical analyses were performed using SPSS v25.0 software (Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

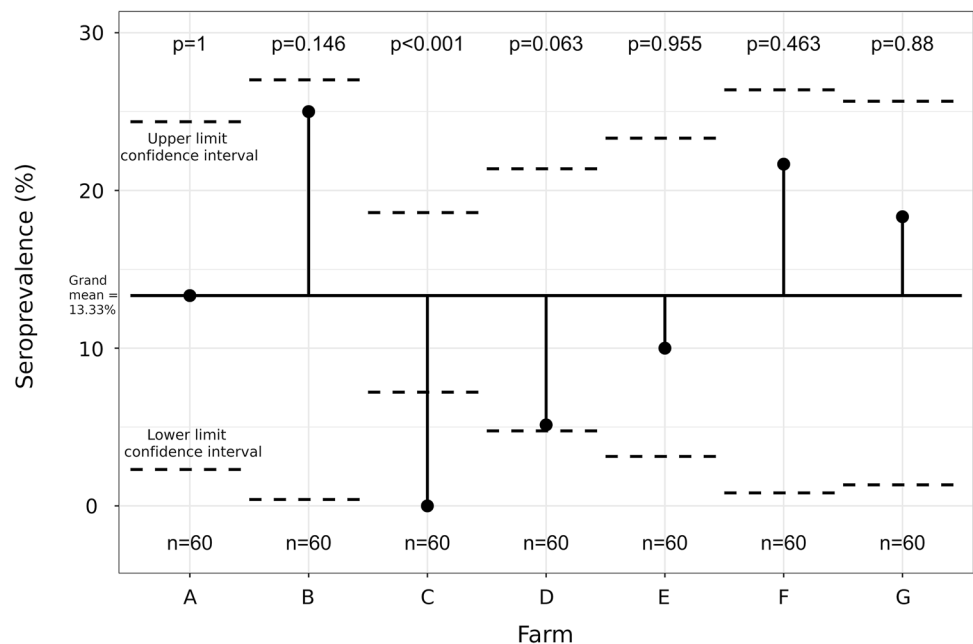
Antibodies against *T. gondii* were detected in 56 of 420 pigs tested (13.3%, 95% CI: 10.1–16.6). Seropositivity was found in six of the seven (85.7%) tested farms, and the within-farm seroprevalence ranged between 5.0 and 25%: with the highest seroprevalence observed in pigs from farm B and the lowest value in pigs from farm D had the lowest value. Interestingly, antibodies against *T. gondii* were not found in samples from farm C (Table 1) (Fig. 1). ANOM showed a significant lower seroprevalence on farm “C,” which was negative to the presence of anti-*T. gondii* antibodies, in relation to the overall mean of the other farms tested (Fig. 2).

Table 1 Distribution of the prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, using ELISA, on pig farms in Villa Clara province (Cuba) by category. Variables with *P*-value < 0.20 in the bivariate

analysis were included in the multivariate analysis (generalized estimating equation) to determine potential risk factors

Variable	Categories	Number/overall (%) positive)	OR	95% CI	Chi-square	<i>P</i> -value
Farm	A	8/60 (13.3)	NA		25.385	<0.001
	B	15/60 (25.0)				
	C	0/60 (0.0)				
	D	3/60 (5.0)				
	E	6/60 (10.0)				
	F	13/60 (21.7)				
	G	11/60 (18.3)				
Altitude (m above sea level)	< 250	47/240 (19.6)	4.627	2.20–9.72	18.830	<0.001
	≥ 250	9/180 (5.0)	*			
Farm size	> 501	23/120 (19.2)	1.918	1.07–3.43	4.497	0.022
	< 500	33/300 (11.0)	*			
Age	Sows	46/210 (21.9)	5.610	2.75–11.5	26.703	<0.001
	Post-weaning pigs	10/210 (4.8)	*			
Sex	Male	4/106 (3.8)	0.627	0.17–2.29	0.505	0.350
	Female	6/102 (5.9)	*			
Offspring per birth	< 9	10/32 (31.3)	0.558	0.24–1.28	1.927	0.125
	≥ 10	36/178 (20.2)	*			
Parity number	< 3	30/116 (25.9)	0.588	0.30–1.16	1.927	0.125
	≥ 4	16/94 (17.0)	*			
Weaning piglets	< 9	10/47 (21.3)	1.05	0.48–2.31	0.014	0.541
	≥ 10	36/163 (22.1)	*			
Still birth	Yes	12/67 (17.9)	0.70	0.34–1.46	0.918	0.220
	No	34/143 (23.8)	*			

NA not applicable; *reference category

Fig. 2 Results of the analysis of means comparing seroprevalences on the sampled farms

No association between seropositivity to *T. gondii* and sex, offspring per weaning piglets, and still birth was found in the bivariate analysis. Farm, altitude, farm size, age, offspring per birth, and parity number were selected for the multivariate analysis (Table 1). The final GEE model showed that the main factors associated with *T. gondii* seropositivity in pigs in Cuba were altitude and age. The prevalence of *T. gondii* antibodies was significantly higher on farm located < 250 masl (19.6%; 95% CI: 14.6–24.6) compared to the farms located at altitude \geq 250 masl (5.0%; 95% CI: 1.8–8.2) (OR = 5.28; P = 0.001; 95% CI: 1.91–14.57). Significantly higher seropositivity was also found in sows (21.9%; 95% CI: 16.3–27.5) compared to post-weaning pigs (4.8%; 95% CI: 1.8–7.6) (OR = 6.05; P < 0.001; 95% CI: 2.53–14.60).

Discussion

Consumption of contaminated undercooked or raw meat from farm animals has been known to be a major risk factor for acquisition of *T. gondii* infection in humans, and among food livestock species, pork is considered one of the main sources of *T. gondii* infection (Almeria and Dubey 2021). The first key step to prevent transmission of this zoonotic parasite in the swine production is to determine the presence of the parasite in the farms. In this regard, serological surveillance is the most commonly used method tool for identifying *T. gondii* exposure in pigs.

The individual seroprevalence detected in pigs raised in Cuba in our study (13%) is of the same magnitude as found previously in Cuba (14%) and in other Latin American countries such as Brazil (13%), Colombia (15%), and Mexico (ranging between 13 and 17%) (Suárez-Hernández et al. 2005; Foroutan et al. 2019; Dubey et al. 2020). Slightly higher mean seroprevalence values were observed in Brazil (ranging between 20 and 26%), while higher seropositivity was found in Argentina (48%), Brazil (ranging between 33 and 52%), Costa Rica (44%), Hawaii (49%), Mexico (ranging between 45 and 97%), Panamá (32%), and Peru (30%) (Cañón-Franco et al. 2014; Foroutan et al. 2019; Dubey et al. 2020). In contrast, lower seroprevalence rates were detected in other studies in Brazil (ranging between 0 and 8%), Chile (9%), and Mexico (ranging between 1 and 9%) (Foroutan et al. 2019; Dubey et al. 2020). Even though statistically accurate comparisons cannot be made given the differences in number of animals tested, the population sampled, and/or the different serological methods used, we would like to state that the seroprevalence in pigs in the study area should be considered moderate.

At least one seropositive pig was detected in six of the seven (85.7%) farms tested, with positive within-farm seroprevalence values ranging between 5.0 and 25.0%. Although

farm “C” was negative to the presence of anti-*T. gondii* antibodies, the number of samples collected in each farm was calculated assuming a minimum within-farm prevalence of 6% and therefore, the possibility of that particular farm having a seroprevalence lower than 5% could not be discounted. The results indicated that *T. gondii* infection is widespread on pig breeding farms in Cuba. Since the sampled farms were all managed under a very similar production system, the environmental characteristics may explain differences in the seroprevalences in pigs within the study region. In this regard, farms located < 250 masl showed significantly higher seropositivity compared to the raised at higher altitude. Our results are in agreement with those reported by Villari et al. (2009) who consider the higher altitude (> 200 masl) of the farms as a protective factor of *T. gondii* exposure; this observation is likely associated with a reduced environmental viability of oocysts with decreasing ambient temperature and, perhaps, also humidity. Higher seroprevalence levels were also found in wild boars (*Sus scrofa*) sampled in hunting states located < 600 masl compared to those sampled at higher altitude (Calero-Bernal et al. 2016). In contrast, other studies observed higher seropositivity to *T. gondii* in pigs raised in mountainous regions than those raised in lowlands (Alvarado-Esquivel et al. 2012; Papatsiros et al. 2016). The reason for these differences is unclear; however, environmental, and climatic conditions may impact survival of oocysts in soil, food, and water contaminated with feline feces (Gauss et al. 2006), which are the likely sources of infection for pigs. Further studies are needed to address this issue.

Significantly higher seropositivity was found in sows compared to post-weaning pigs. Age is an important factor affecting *T. gondii* seroprevalence in pigs because most animals acquire *T. gondii* infection postnatally (Dubey 2009). The higher prevalence of *T. gondii* antibodies in sows compared to post-weaning pigs is consistent with those previously reported (García-Bocanegra et al. 2010a; Hill et al. 2014; Djokic et al. 2016; Castillo-Cuenca et al. 2020) and probably reflects the cumulative likelihood of exposure to *T. gondii* and lifelong persistence of IgG antibodies. Maternal-derived antibodies decline after the first week of age, but the decay is dependent on the antibody level of the dam at birth. However, because maternally transferred antibodies can persist until 4 months of age (Dubey 2009; García-Bocanegra et al. 2010b), the presence of maternally transferred antibodies detected in some seropositive post-weaning pigs cannot be ruled out.

Toxoplasmosis outbreaks have been reported in humans by ingestion of infected porcine meat containing tissue cysts (Choi et al. 1997; Vitale et al. 2014; Almeria and Dubey 2021). Even though we are not aware of any report of human toxoplasmosis directly linked to eating infected pork in Cuba, ocular toxoplasmosis (Mesa Hernández et al.

2011; Galbán Lueje et al. 2013; Bustillo et al. 2015; Ginorio Gavito et al. 2017), toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome (Alfonso et al. 2009), acute toxoplasmosis in pregnant women (Lombana et al. 2012), and congenital toxoplasmosis (Amador Morán et al. 2016) have been reported in this country. Moreover, seropositivity values found in pregnant women (38%) (González-Morales et al. 1995), neonates (23%) (Goya Batista et al. 2014), and blood donors (13%) (Sánchez-Artigas et al. 2009) indicate that *T. gondii* is widely distributed in the human population in Cuba. Since viable *T. gondii* can be found in seropositive pigs, our results suggest that the consumption of non-properly cooked pork products may contribute to human toxoplasmosis in Cuba, and studies on the zoonotic impact of this disease are urgently needed in this country.

In summary, this is the first report on *T. gondii* in pigs in Villa Clara province, the largest pork-producing region in Cuba. Although the number of sampled farms was limited, the results obtained provide a first approximation to *T. gondii* exposure in domestic pigs in a country where there was no recent information in this animal species. The observed seropositivity indicates that this zoonotic parasite is widespread in pig breeding farms in the largest pork-producing region in Cuba. This finding indicates a public health concern because seropositive pigs can harbor tissue cysts in their meat, therefore representing a tentative zoonotic risk for consumers of raw or undercooked porcine meat or its products. In addition, evisceration and management of carcasses of infected pigs could also constitute a risk of infection for humans. Our results may contribute to the development of improved control strategies against *T. gondii* in this country. Further immunological and molecular studies on genotypes circulating in pig farms must be conducted to increase the knowledge of the epidemiology of *T. gondii* in Cuba.

Acknowledgements We would like to thank the Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP, in Spanish) for funding the doctoral training of the first author of this research. We would also like to thank the members of the Epizootiology Department of the Swine Company in Villa Clara, and the team of the Quality Area of the National Center for Animal Production Laboratories (CENPALAB in Spanish) for their help in the sampling and analysis of the collected samples, respectively.

Funding Universidad de Córdoba/CBUA.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are

included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C et al (2009) Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Res* 6:2. <https://doi.org/10.1186/1743-8454-6-2>
- Almeria S, Dubey JP (2021) Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. *Res Vet Sci* 135:371–385. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.019>
- Alvarado-Esquivel C, Estrada-Malacón MA, Reyes-Hernández SO et al (2012) High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *J Parasitol* 98:1248–1250. <https://doi.org/10.1645/GE-3184.1>
- Amador Morán R, Coutos Ramos MJ, Peña Cedeño A et al (2016) Presentación de un caso con toxoplasmosis congénita. *Rev Cuba Obstet y Ginecol* 42. <http://revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/47/31>. Accessed Feb 2021
- Behnke MS, Saeij JPJ, Boyle JP (2020) Development and application of classical genetics in *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii*, Thirth. Wiess, L.M. and Kim, K. Academic Press, Elsevier, p 859–896. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00019-0>
- Bustillo JL, Diaz JD, Pacheco IC, Gritz DC (2015) Cuban ocular toxoplasmosis epidemiology study (COTES): incidence and prevalence of ocular toxoplasmosis in Central Cuba. *Br J Ophthalmol* 99:382–386. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305843>
- Calero-Bernal R, Pérez-Martín JE, Reina D et al (2016) Detection of zoonotic protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in wild boars from Spain. *Zoonoses Public Health* 63:346–350. <https://doi.org/10.1111/zph.12243>
- Cañón-Franco WA, López-Orozco N, Gómez-Marín JE, Dubey JP (2014) An overview of seventy years of research (1944–2014) on toxoplasmosis in Colombia. *South America Parasit Vectors* 7:427. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-427>
- Castillo-Cuenca JC, Díaz-Cao JM, Martínez-Moreno Á et al (2020) Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in intensively raised Iberian pigs in Spain. *Prev Vet Med* 175:104–854. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.06.001>
- Choi W-Y, Nam H-W, Kwak N-H et al (1997) Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis* 175:1280–1282. <https://doi.org/10.1086/593702>
- Djokic V, Fablet C, Blaga R et al (2016) Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds. *Parasit Vectors* 9:466. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1753-5>
- Dubey JP (2010) *Toxoplasmosis of animals and humans*. Second. CRC Press Taylor & Francis Group, New York
- Dubey JP (2009) Toxoplasmosis in pigs—the last 20 years. *Vet Parasitol* 164:89–103. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018>
- Dubey JP, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA et al (2020) All about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: 2009–2020. *Vet Parasitol* 288:109–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109185>
- EFSA (2018) Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA J* 16:e05495. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5495>
- Feitosa TF, Vilela VLR, Bezerra de Melo LR et al (2014) *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast,

- Brazil. *Vet Parasitol* 202:305–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.015>
- Flegr J, Horáček J (2017) *Toxoplasma*-infected subjects report an Obsessive-compulsive disorder diagnosis more often and score higher in Obsessive-Compulsive Inventory. *Eur Psychiatry* 40:82–87. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2016.09.001>
- Foroutan M, Fakhri Y, Riahi SM et al (2019) The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: a systematic review and meta-analysis. *Vet Parasitol* 269:42–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.012>
- Galbán Lueje T de las M, Lima León CE, Fariñas Falcón Z et al (2013) Caracterización de la toxoplasmosis ocular en pacientes de consulta externa. *Acta Med* 7:12–22. <https://www.medigraphic.com/pdfs/mecicadelcentro/mec-2013/mec134c.pdf>. Accessed Oct 2020
- García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Dubey JP et al (2010a) Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol Int* 59:421–426. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.06.001>
- García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Sibila M et al (2010b) Duration of maternally derived antibodies in *Toxoplasma gondii* naturally infected piglets. *Vet Parasitol* 170:134–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.042>
- Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D et al (2006) Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. *Vet Parasitol* 136:193–200. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.013>
- Ginorio Gavito DE, Vilches Lescaille D, Gracial X et al (2017) Toxoplasmosis ocular: Algunos hallazgos clínicos y seroepidemiológicos. *Rev AACC* 7:4–13. <http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/352/352>. Accessed Nov 2020
- González-Morales T, Bacallo-Gallestey J, García-Santana CA, Molina-García JR (1995) Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en una población de mujeres embarazadas en Cuba. *Gac Méd Méx* 131:400. https://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1995-131-5-6-499-503.pdf. Accessed Mar 2021
- Goya Batista Y, Sánchez Artigas R, Cobos Valdes D et al (2014) Determinación de anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii* en neonatos de la Sala de Neonatología del Hospital General Universitario “Vladimir Ilich Lenin”, Holguín. *Rev Cuba Investig Biomed* 33:12–18. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v33n1/ibi02114.pdf>. Accessed Oct 2020
- Grandía R, Entrena Á, Cruz J et al (2012) Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y factores de riesgo asociados en *Felis catus* en La Habana. *Rev Salud Anim* 34:201. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000300013. Accessed Nov 2020
- Hanley JA, Negassa A, Edwardes MD, Forrester JE (2003) Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. *Am J Epidemiol* 157:364–375. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf215>
- Hill DE, Dubey JP, Baroch JA et al (2014) Surveillance of feral swine for *Trichinella spp.* and *Toxoplasma gondii* in the USA and host-related factors associated with infection. *Vet Parasitol* 205:653–665. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.026>
- Lombana RS, Cabrera MPC, Gavito DG et al (2012) Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Cuba Obstet Ginecol* 38:99–106. <http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v38n1/gin12112.pdf>. Accessed Nov 2020
- Mesa Hernández E, González Peña O, Padilla González C et al (2011) Comportamiento de la toxoplasmosis ocular activa en el Instituto Cubano de Oftalmología “Ramón Pando Ferrer”. *Rev Cuba Oftalmol* 24:124–135. <http://scielo.sld.cu/pdf/oft/v24n1/oft12111.pdf>. Accessed Oct 2020
- Navarrete MG, Cordeiro MD, Batista Y et al (2017) Serological detection of *Toxoplasma gondii* in domestic dogs in the western region of Cuba. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 9:9–12. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.03.005>
- ONEI (2017) Anuario Estadístico de la Provincia de Villa Clara. La Habana. <http://www.onei.gob.cu/mapa/provincia/villa-clara>. Accessed March 2021
- Pallmann P, Hothorn LA (2016) Analysis of means: a generalized approach using R. *J Appl Stat* 43:1541–1560. <https://doi.org/10.1080/02664763.2015.1117584>
- Papatsiros VG, Athanasiou LV, Stougiou D et al (2016) Cross-sectional serosurvey and risk factors associated with the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16:48–53. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1845>
- Rao CV (2005) Analysis of means—a review. *J Qual Technol* 37:308–315. <https://doi.org/10.1080/00224065.2005.11980334>
- Regalado Andújar B, Rodríguez Peña MS, Fraga Nodarse J, et al (2013) Aplicación de herramientas serológicas y moleculares para el diagnóstico de coriorretinitis por *Toxoplasma gondii*. *Rev Cuba Med Trop* 65:13–25. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000100003. Accessed Feb 2021
- Sánchez-Artigas R, Góngora-Amores W, Torres-Ponce Z, Castañeda-Comerón B (2009) Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en donantes especiales de sangre en el municipio de Holguín. *Ciencias Holguín* 15:1–8. <http://www.ciencias.holguin.cu/index.php/cienciasholguin/article/view/529>. Accessed Feb 2021
- Suárez-Hernández M, González-Fernández A, Gardón-Quirola BY, Martínez-Sánchez R (2005) 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* 16:21–27. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=7396>. Accessed Mar 2021
- Thrusfield M, Christley R, Brown H et al (2018) *Veterinary epidemiology*. Fourth. John Wiley & Sons, Oxford
- Villari S, Vesco G, Petersen E et al (2009) Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet Parasitol* 161:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.019>
- Vitale M, Tumino G, Partanna S et al (2014) Impact of traditional practices on food safety: a case of acute toxoplasmosis related to the consumption of contaminated raw pork sausage in Italy. *J Food Prot* 77:643–646. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-285>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.