

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EN CARNES DESTINADAS AL  
CONSUMO HUMANO EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ USANDO  
PCR ANIDADA (n-PCR) DEL GEN *B1***

**JUAN DAVID MEDINA HERNÁNDEZ**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de  
Biólogo**

**Director:**

**GUSTAVO ADOLFO VALLEJO  
M.Sc., Ph.D**

**Codirectores:**

**JULIO CESAR CARRANZA MARTÍNEZ  
M.Sc., Ph.D**

**JORGE ENRIQUE GÓMEZ MARÍN  
MD., M.Sc., Ph.D**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
IBAGUÉ – TOLIMA**

**2018**



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO DETECCIÓN MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EN CARNES  
DESTINADAS AL CONSUMO HUMANO EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ USANDO  
PCR ANIDADA (n-PCR) DEL GEN B1

AUTORES Juan David Medina Hernández (070100232012)

DIRECTOR Gustavo Adolfo Vallejo (Universidad del Tolima)  
CO-DIRECTOR(ES) Julio Cesar Carranza Martínez (Universidad del Tolima)  
Jorge Enrique Gómez Marín (Universidad del Quindío)

JURADOS Olga Patricia Fuya Oviedo (Instituto Nacional de Salud)  
Victoria Eugenia Rodríguez Gutiérrez (Universidad del Tolima)

CALIFICACIÓN 4.6

APROBADO  REPROBADO

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

FIRMAS

*n. olga*  
JURADO 1.

*Olga Patricia Fuya Oviedo*  
Director del trabajo

*Victoria Eugenia Rodríguez Gutiérrez*  
JURADO 2.

*Victoria Eugenia Rodríguez Gutiérrez*  
Director del Programa (*ad hoc*)

Ciudad y fecha: Ibagué 25 de Julio 2018

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y familiares, por el incesable apoyo brindado y el ejemplo que me han dado.

El Doctor Vallejo, por la confianza dada, abrir las puertas a este proyecto, y ser ejemplo de excelencia en el ámbito tanto académico como personal.

Al profesor Carranza, por atender a las inquietudes presentadas y los consejos dados.

A Yazmín Suárez Quevedo, quien con su paciencia e inteligencia es ejemplo de mujer científica y ser humano.

A Daniel Zabala, por sus comentarios y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes día a día compartimos vivencias que forjaron una mayor confianza y un excelente ambiente de aprendizaje.

Al Dc. Jorge Enrique Gómez M. y los grupos de trabajo del CIBM (Centro de Investigaciones Biomédicas) por su acogida durante mi corto periodo de capacitación y el compartir su amplio conocimiento en el campo de la toxoplasmosis.

Al Doctor Ricardo Wagner Almeida Vitor del departamento de parasitología de la Universidad Federal de Minas Gerais de Brasil y el grupo de parasitología SLRN del INS de Bogotá por la donación del ADN de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

A Sebastián, Tatiana, Helena y Francy, quienes me impulsaron a seguir adelante y ofrecieron momentos que alegraron el alma.

A J A Varón, por su paciencia, cariño y comprensión a lo largo de este camino.

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	14
<b>1. OBJETIVOS</b>	16
1.1. OBJETIVO GENERAL	16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES</b>	17
2.1. ÁREA DE ESTUDIO	17
2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> ( <i>T. gondii</i> )	19
2.2.1. Formas	20
2.2.1.1. Ooquiste	20
2.2.1.2. Taquizoíto	21
2.2.1.3. Bradizoítos	21
2.2.2. Ciclo de vida	22
2.2.2.1. Fase sexual	22
2.2.2.2. Fase asexual	22
2.3. LA TOXOPLASMOSIS	24
2.3.1. Formas de transmisión	24
2.3.1.1. Toxoplasmosis por transmisión horizontal	24
2.3.1.2. Toxoplasmosis por transmisión vertical	25
2.3.2. Sintomatología de la toxoplasmosis	25
2.3.2.1. En el feto (Toxoplasmosis congénita)	25
2.3.2.2. En personas inmunocompetentes	25
2.3.2.3. En pacientes inmunodeficientes	26
2.4. GENOTIPOS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.5. METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN DE <i>T. gondii</i>	27
2.5.1. Métodos tradicionales de detección (no basados en ADN)	28
2.5.1.1. Microscopía	28

2.5.1.2.	Bioensayo	28
2.5.1.3.	Pruebas Serológicas	29
2.5.2.	Métodos basados en detección del ADN del parásito	30
2.6.	PREVALENCIA DE <i>Toxoplasma gondii</i>	31
2.7.	TRATAMIENTO DE LA TOXOPLASMOSIS	40
2.7.1.	En adultos	40
2.7.2.	En mujeres embarazadas	40
2.7.2.1.	Placentario	40
2.7.2.2.	Fetal.	40
2.7.2.3.	En toxoplasmosis congénita	41
2.8.	PREVENCIÓN DE LA TOXOPLASMOSIS	41
<b>3.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	44
3.1.	TAMAÑO MUESTRAL	44
3.2.	OBTENCIÓN DE ADN	44
3.2.1.	Digestión de la muestra	45
3.2.2.	Extracción y purificación de ADN	45
3.3.	CUANTIFICACIÓN DE ADN	45
3.4.	DETECCIÓN DE ADN DE <i>Toxoplasma gondii</i>	45
3.5.	VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS	47
3.5.1.	Electroforesis en gel de agarosa al 1%	45
3.5.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%	46
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	49
4.1.	ESTANDARIZACIÓN DE LA n-PCR	49
4.1.1.	BLAST	49
4.1.2.	PCR in silico y BLAST-Primer	49
4.1.3.	PCR con control Positivo	52
4.1.4.	Prueba de sensibilidad	54
4.2.	OBTENCIÓN DE ADN	56

4.3.	MUESTRAS DE CARNES Y PREVALENCIA DE <i>T. gondii</i>	58
4.4.	OTROS RESULTADOS	66
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	67
5.1.	ESTANDARIZACIÓN DE LA n-PCR	67
5.2.	OBTENCIÓN DE ADN	67
5.3.	PREVALENCIA EN CARNES	68
5.3.1.	Prevalencia en carnes de res	69
5.3.2.	Prevalencia en carnes de pollo	69
5.3.3.	Prevalencia en carnes de cerdo	70
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	71
	<b>RECOMENDACIONES</b>	72
	<b>REFERENCIAS</b>	73
	<b>ANEXOS</b>	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Área urbana de Ibagué	17
<b>Figura 2.</b> Organelos de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
<b>Figura 3.</b> Formas de <i>T. gondii</i>	21
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	23
<b>Figura 5.</b> BLAST grafico de los primers Toxo N2 y Toxo C2 usados por C. D. Jones et al. (2000)	50
<b>Figura 6.</b> BLAST descriptivo de los primers Toxo N2 y Toxo C2 usados por C. D. Jones et al. (2000)	51
<b>Figura 7.</b> BLAST grafico de los primers Toxo N2 modificado y Toxo C2 propuestos por Ponce & Gomez-Marín (2003)	52
<b>Figura 8.</b> BLAST descriptivo de los primers Toxo N2 modificado y Toxo C2 propuestos por Ponce & Gomez-Marín (2003)	53
<b>Figura 9.</b> Resultados de análisis de primers con la herramienta bioinformática PCR Products	54
<b>Figura 10.</b> Visualización de productos de la primera ronda de PCR con los primers Toxo N1 - Toxo C1 (127pb) sobre ADN de referencia en gel de agarosa al 1%	55
<b>Figura 11.</b> Visualización de productos de la segunda ronda de PCR (97pb) sobre ADN de referencia en gel de agarosa al 1%	55
<b>Figura 12.</b> Visualización del producto de la segunda ronda de PCR en gel de poliacrilamida al 6%.	56
<b>Figura 13.</b> Ubicación de muestras positivas en la ciudad de Ibagué	64
<b>Figura 14.</b> Estimaciones e intervalos de confianza de las muestras evaluadas	65
<b>Figura 15.</b> Primer blast para los primers Toxo N1 -Toxo C2	96
<b>Figura 16.</b> Primer blast para los primers Toxo N1 -Toxo C2	96

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comunas de Ibagué y sus características	18
<b>Tabla 2.</b> Taxonomía de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
<b>Tabla 3.</b> Número de genotipos obtenidos por Shwab et al., (2014)	27
<b>Tabla 4.</b> Estudios de detección de <i>Toxoplasma gondii</i> por métodos tradicionales	32
<b>Tabla 5.</b> Estudios basados en detección del ADN del parásito	36
<b>Tabla 6.</b> Primers para detección del gen <i>B1</i> de <i>T. gondii</i>	46
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción para la n-PCR del gen <i>B1</i>	46
<b>Tabla 8.</b> Cantidad de ADN obtenido evaluando dos temperaturas de digestión de las muestras con PK.	57
<b>Tabla 9.</b> Resultados de detección de muestras tomadas en otros municipios	57
<b>Tabla 10.</b> Características de las comunas y coordenadas de las muestras tomadas	59
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la detección de muestras de carne	62
<b>Tabla 12.</b> Estimaciones e intervalos de confianza de las muestras evaluadas	64
<b>Tabla 13.</b> Componentes de TBE 5X	90
<b>Tabla 14.</b> Preparación de TBE diluido	90
<b>Tabla 15.</b> Componentes para preparar gel de acrilamida al 6%	92
<b>Tabla 16.</b> Componentes de la Acrilamida al 30%	93
<b>Tabla 17.</b> Componentes de las soluciones usadas para la coloración de geles de poliacrilamida al 6%	94

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Protocolo de extracción de ácidos nucleicos por Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (FCAI)	85
<b>Anexo B.</b> Cuantificación por espectrofotometría: NanoDrop.	87
<b>Anexo C.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1%	89
<b>Anexo D.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%	92
<b>Anexo E.</b> Primer-BLAST	96

## LISTA DE ABREVIACIONES

- AB:** Azul de Alcian
- AC/HS:** Prueba diferencial de aglutinación
- AD:** (AG) Reacción de aglutinación directa
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AT:** (Avidity Test) Test de avidéz
- BAL:** Liquido bronco alveolar
- BLAST:** (Basic Local Alignment Search Tool) Alineamiento de secuencias de tipo local
- CDC:** Center for Disease Control and Prevention
- CSF:** Fluido cerebroespinal
- DT:** (Sabin–Feldman Dye Test) Test de Sabin–Feldman
- ELFA:** (Enzyme-Linked Fluorescent Assay) Ensayo fluorescente ligado a enzimas
- ELISA:** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas
- FCAI:** Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico
- ICT:** Immunochromatographic Test
- IFI:** Inmuno-Fluorescencia Indirecta o (Indirect Fluorescent Antibody Test - IFAT)
- INS:** Instituto Nacional de Salud
- ISAGA:** (Immunosorbent Agglutination Assay)
- LIPT:** Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical
- n-PCR:** PCR anidada
- NPIs:** (Neglected Parasitic Infections) Infecciones parasitarias negligenciadas
- LAT:** (Latex Agglutination Test) Prueba de aglutinación de latex
- LCR:** Liquido cefaloraquideo
- MAT:** (Modified Agglutination Test) Prueba de aglutinación modificada
- PAS:** Ácido Peryódico de Schiff
- PIA:** (Piezoelectric Immunoagglutination Assay)
- PCR:** (Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de polimerasa
- RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism

**SAG:** (Surface Antigen) Antígeno de superficie

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

**WB:** (Western Blotting) Western Blot

## RESUMEN

*Toxoplasma gondii* es un parásito con gran potencial zoonótico que puede infectar un amplio rango de hospederos de sangre caliente, entre estos, animales del sector pecuario, causando pérdidas a la industria. Para el humano ha sido descrito como patógeno en personas inmunosuprimidas y afecta el desarrollo del feto en infecciones ocurridas durante el embarazo, además, se asocia a diversos trastornos del comportamiento en personas sanas.

El humano puede adquirir *T. gondii* al consumir carnes contaminadas mal cocidas; el presente proyecto determinó la prevalencia de la prevalencia de *T. gondii* actualmente desconocía en la ciudad de Ibagué, en carnes de consumo humano como res, pollo y cerdo; se estandarizó una metodología que proporcionara ADN en la cantidad y calidad necesaria para una PCR anidada del Gen *B1*, seguido de un corrido electroforético y posterior visualización.

Se tomaron 186 muestras de carne comercializada en la zona urbana de la ciudad de Ibagué (62 de res, 62 de pollo y 62 de cerdo) para las cuales se calculó la prevalencia del parásito en cada tipo de carne evaluada y los intervalos de confianza. Se obtuvo una prevalencia general del 18,82% del total de las muestras evaluadas, siendo la carne de cerdo la de mayor porcentaje 22,58% (14/62), seguida por las muestras de carne de res 19,35% (12/62) y el más bajo el de las muestras de pollo 14,52% (9/62). Mostrando así que los tres tipos de carne representan un riesgo para la infección por *T. gondii* en humanos.

**Palabras clave:** Carnes, PCR anidada, Prevalencia, Toxoplasmosis.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is a parasite with great zoonotic potential that can infect a wide range of warm-blooded hosts, among them, animals of the livestock sector, causing losses to the industry. For humans, it has been described as a pathogen in immunosuppressed people and it affects the development of the fetus in infections that occur during pregnancy, and it is also associated with various behavioral disorders in healthy people.

The human can acquire *T. gondii* by eating badly cooked contaminated meats; the present project determined the prevalence of the prevalence of *T. gondii* currently unknown in the city of Ibagué, in meat for human consumption as beef, chicken and pork; a methodology was standardized that would provide DNA in the quantity and quality necessary for a nested PCR of the *B1* gene, followed by an electrophoretic run and subsequent visualization.

186 samples of meat marketed in the urban area of the city of Ibagué were taken (62 of beef, 62 of chicken and 62 of pork) for which the prevalence of the parasite was calculated in each type of meat evaluated and the confidence intervals. A general prevalence of 18.82% of the total samples evaluated was obtained, pork being the highest percentage 22.58% (14/62), followed by the beef samples 19.35% (12 / 62) and the lowest one of the chicken samples 14.52% (9/62). Showing that the three types of meat represent a risk for *T. gondii* infection in humans.

**Keywords:** Meat, nested-PCR, prevalence, toxoplasmosis.

## INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es considerada una de las infecciones parasitarias olvidadas dentro de un grupo de cinco enfermedades parasitarias que han sido blanco de la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) para la acción en salud pública; acompañando en este grupo a la toxoplasmosis se encuentran la enfermedad de Chagas, la cisticercosis, la toxocariasis y la trichomoniasis («Parasites - Neglected Parasitic Infections (NPIs)», 2016). Esta enfermedad es causada por *Toxoplasma gondii*, un parásito protozoario del filo Apicomplexa que infecta a la mayoría de especies de sangre caliente, incluyendo humanos («CDC - Toxoplasmosis - Biology», 2015) y además causa grandes pérdidas económicas en el sector pecuario (Ferra, Holec-Gaşior, & Kur, 2015).

Este parásito presenta amplia distribución geográfica y los felinos juegan un papel importante en el ciclo de vida y la epidemiología de la toxoplasmosis, ya que son los huéspedes definitivos y expulsan en las heces ooquistes ambientalmente resistentes (Dubey et al., 2004; Yang et al., 2015). La principal fuente de infección para los animales de producción es a través de la ingesta de alimentos o agua contaminados con ooquistes esporulados liberados en las heces de gatos infectados (Maharana, Panigrahi, Baithalu, Parida, & Allaie, 2010). El humano puede ser infectado por los mismos medios que los animales de producción, sumándose a estos el consumo de carne cruda o mal cocida de animales que contienen quistes tisulares, el manejo de las cajas de arena para gatos sin la adecuada precaución y cajas de arena en parques para niños que podrían contener heces de gatos y por tanto ooquistes de *T. gondii* los cuales pueden ser ingeridos de manera accidental (Dubey et al., 2011; Zulpo et al., 2012). Se ha demostrado que hasta un 95% de algunas poblaciones humanas han sido infectados con *Toxoplasma gondii* y que la infección es a menudo más alta en las zonas del mundo con altitudes más bajas, que tienen climas cálidos y húmedos («CDC - Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors», 2015). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud en 1983 reportó que el 47.71% de la población general había tenido contacto con el parásito, hecho evidenciado en la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma*, y fue la región Caribe donde se

reportaron los títulos más altos del país. En este mismo estudio la proporción de individuos positivos presentó aumento con la edad, pasando de 32% en los menores de 10 años a un 65,3% en adultos de 60 años, esto es debido a que la producción de este anticuerpo continua durante toda la vida, una vez adquirida la infección (Juliao Ruiz et al., 1983).

La toxoplasmosis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en individuos inmunodeprimidos y puede causar graves problemas de salud en los adultos sanos (Barrios, Duran Botello, & González Velásquez, 2012; Luft et al., 1993; Montoya & Liesenfeld, 2004). Pese que en el humano la infección crónica sólo se desarrolla en un pequeño grupo de personas, la mayoría presentan un estado latente que aparenta no tener riesgo directo a la salud física; sin embargo, se ha asociado *T. gondii* a tasas de aumento de trastornos de comportamiento, incluyendo el homicidio, suicidio y otras violencias autodirigidas (Lester, 2012; Pedersen, Mortensen, Norgaard-Pedersen, & Postolache, 2012), además, ha sido sindicado del aumento en la incidencia de la esquizofrenia y otras enfermedades neuropsiquiátricas (Fabiani, Pinto, & Bruschi, 2013).

Asimismo, se ha establecido que existe una divergencia geográfica en la distribución de las cepas de *Toxoplasma* (Morisset et al., 2008) y que la toxoplasmosis no es transmitida de persona a persona, excepto en casos de trasmisión de la madre al niño (congénita o transmisión vertical) y transfusión de sangre o trasplante de órgano. La población se infecta principalmente por tres rutas de transmisión: I. Comida contaminada, II. Animal – humano (zoonótica) y III. Madre a niño (congénitos), aparte de estas se pueden presentar casos raros como accidentes en pruebas experimentales («CDC - Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors», 2015). Debido a que una de las principales formas reportadas para el humano adquirir *T. gondii* es por ingesta de carnes mal cocidas, el presente trabajo busca estimar la prevalencia de *T. gondii* en carnes destinadas al consumo humano y así hacer un acercamiento al porcentaje de exposición de la comunidad ibaguereña a dicho parásito por esta vía de transmisión.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de *Toxoplasma gondii* en carnes destinadas al consumo humano en el casco urbano de la ciudad de Ibagué usando PCR anidada (n-PCR).

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1. Detectar el ADN de *T. gondii* en muestras de carne de res, pollo y cerdo mediante n-PCR.

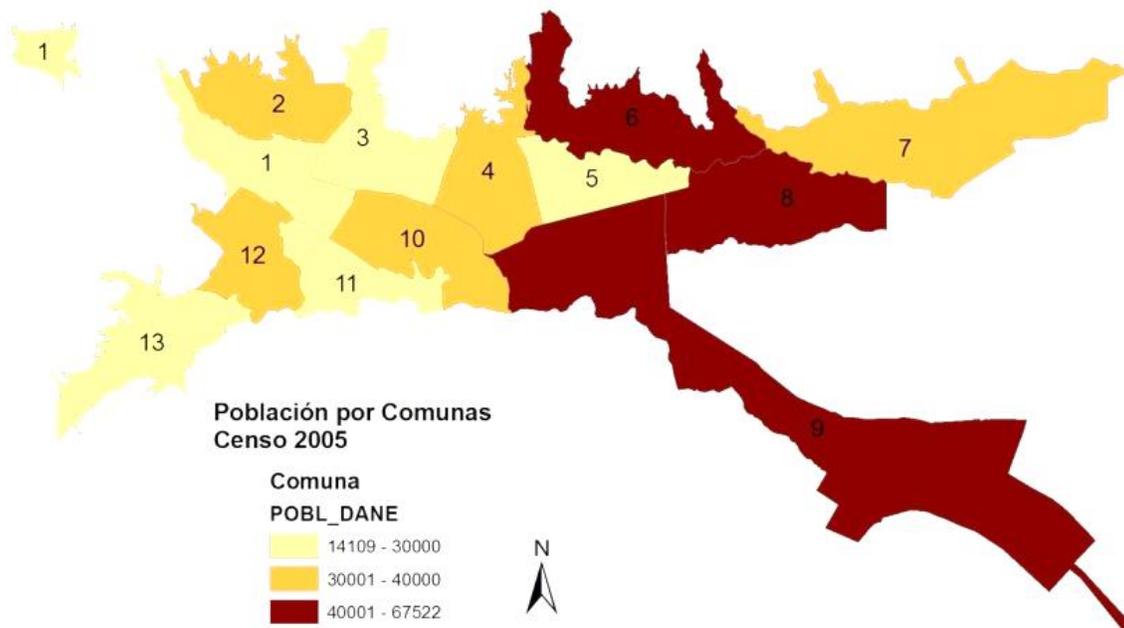
1.2.2. Determinar la prevalencia de *T. gondii* en carnes de consumo humano comercializadas en la zona urbana de la ciudad de Ibagué.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

### 2.1. ÁREA DE ESTUDIO

El muestreo se realizó en el casco urbano de la ciudad de Ibagué, localizada en el centro del país, Capital del departamento del Tolima, se encuentra a 1.285 metros sobre el nivel del mar con una temperatura media de 21°C. Su área municipal cubre 1.498 Km<sup>2</sup> los cuales se distribuyen en una zona montañosa que se extiende por la cordillera central y una amplia zona plana conocida como la meseta de Ibagué. El 2,41% pertenece al área urbana y 97,59% al área rural. El área urbana está dividida en 13 comunas (Figura 1) y 445 barrios (Tabla 1), el área rural está integrada por 19 centros poblados en 17 corregimientos y 140 veredas (Alcaldía de Ibagué, 2014, 2016; WEB de la Alcaldía Municipal de Ibagué, 2018).

**Figura 1.** Área urbana de Ibagué. Distribución espacial de la población por comunas según censo del 2005.



Fuente: Alcaldía de Ibagué (2012)

**Tabla 1.** Comunas de Ibagué y sus características.

<b>Comuna</b>	<b>Nombre</b>	<b>Barrios</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>% del área urbana total</b>
1	Centro	11	252,1296	6
2	Centenario	22	210,417	5
3	San Francisco	17	241,5981	6
4	Piedra Pintada	24	214,1354	5
5	El Jordán	32	181,1584	4
6	La Gaviota	64	377,4216	9
7	El Salado	63	499,9619	12
8	El Jardín	71	394,8867	9
9	Picaleña	57	1.070	25
10	El Estadio	24	251,4901	6
11	Las Brisas	23	164,52	4
12	Kennedy	23	194	4
13	Boquerón	14	265,45	6
<b>Total</b>		445	4.317,1688	100

Fuente: Alcaldía de Ibagué (2012)

En el ámbito agropecuario para el 2013 en Ibagué se hablaba de una estructura poblacional animal bovina de 38.920 cabezas; la porcicultura tecnificada, tradicional y traspatio llegaba a 9.697 cabezas, aumentando en cerca de un 3% con respecto al año anterior; la producción de aves de aproximadamente 3'132.206, para esta se dice que se presentó un incremento sostenido cercano al 4% anual acorde a la tendencia nacional (Alcaldía de Ibagué, 2016).

Las plantas de sacrificio según el Fondo Ganadero del Tolima (2018) son:

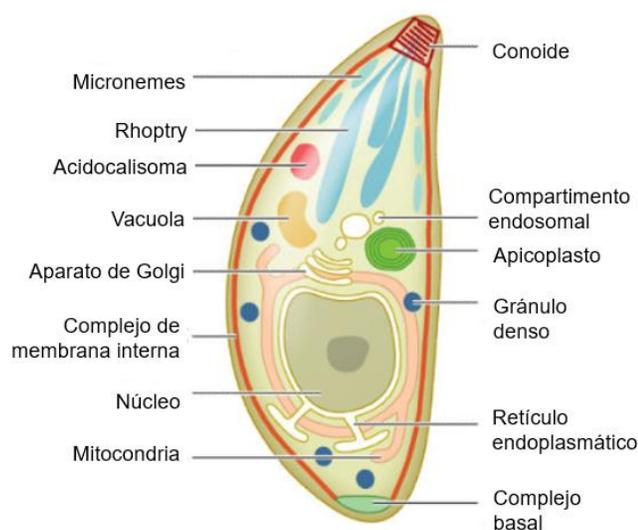
- Ibagué:
  - Capacidad instalada: 400 bovinos/día.
  - Capacidad instalada de 250 porcinos/día.
- Espinal: Capacidad instalada: 150 bovinos/día

En cuanto a la producción avícola para la región es reconocida la empresa POLLOSGAR®, la cual tiene una capacidad instalada de 18000 aves/día (POLLOSGAR, 2018)

## 2.2. TOXOPLASMA GONDII (T. GONDII)

*T. gondii* es un protozooario intracelular obligado de distribución mundial, que pertenece al filo Apicomplexa (Ajzenberg, Dumètre, & Dardé, 2005). Fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux que lo encontraron cuando trabajaban en el norte de África, y por Splendore en Brasil (Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000; Weiss & Dubey, 2009). El nombre del género se deriva de la palabra griega "toxón", que significa "arco", refiriéndose a la forma de media luna del organismo (Figura 2) y la denominación de especie se originó del nombre del roedor del norte de África, *Ctenodactylus gundi*, a partir del cual se aisló este parásito (Tabla 2) (Black & Boothroyd, 2000). Su identificación fue seguida rápidamente por su reconocimiento como patógeno humano (Weiss & Dubey, 2009).

**Figura 2.** Organelos de *Toxoplasma gondii*. Organelos más relevantes del estado de taquizoíto.



Fuente: Adaptado de Blader, Coleman, Chen, Gubbels, & Hill (2016).

**Tabla 2.** Taxonomía de *Toxoplasma gondii*.

<b>Dominio</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Protista
<b>Super grupo</b>	SAR o Harosa
<b>Super filo</b>	Alveolata
<b>Filo</b>	Apicomplexa
<b>Clase</b>	Sporozoasida
<b>Subclase</b>	Coccidiasina
<b>Orden</b>	Eimeriorina
<b>Familia</b>	<i>Toxoplasmatidae</i>
<b>Género</b>	<i>Toxoplasma</i>
<b>Especie</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> (Nicolle & Manceaux, 1908)

Fuente: Tomado de Adl & Needs Authors (2013) y Bahia-Olivera, Gomez-Marín, & Shapiro (2017)

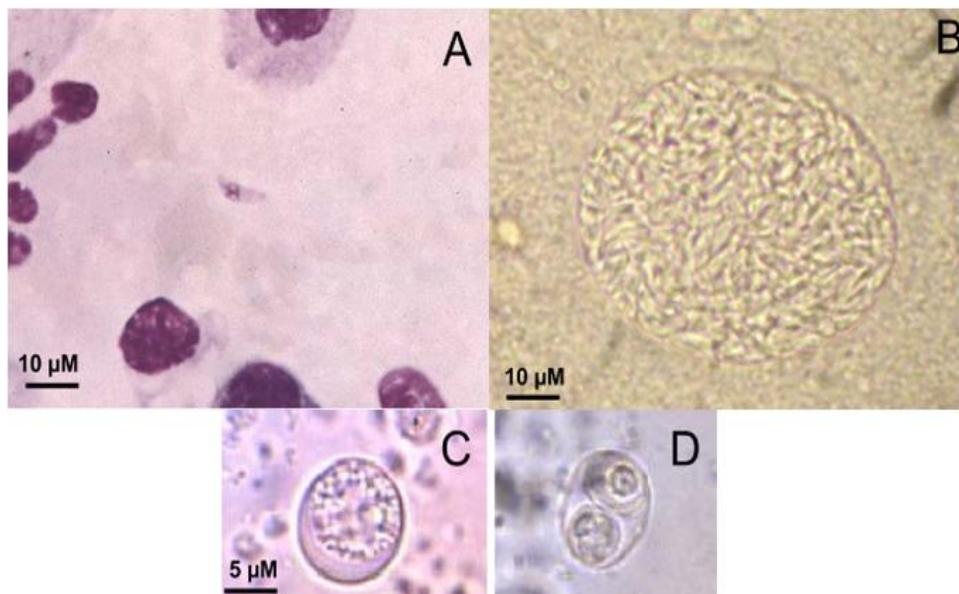
**2.2.1.** Formas: *T. gondii* presenta tres formas características conocidas como ooquiste, taquizoíto y bradizoíto (Figura 3).

**2.2.1.1.** Ooquiste: Se encuentran en las heces de los gatos, tiene forma esferoide, midiendo de 11-15  $\mu\text{m}$  por 9-11  $\mu\text{m}$  (Díaz, Zambrano, Chacón, Rocha, & Díaz, 2010). Durante la infección aguda, varios millones de ooquistes se eliminan en las heces de los gatos durante 7-21 días después de una infección primaria de los animales. La esporulación de los ooquistes se produce en el medio ambiente durante los próximos 1 y 5 días o hasta 21, dependiendo de la aireación y la temperatura, momento en el cual se vuelve infeccioso; cada ooquiste lleva en su interior dos esporoquistes y estos a su vez cuentan con cuatro esporozoítos. La gran resistencia de la pared del ooquiste permite al parásito sobrevivir más de un año en el suelo cuando las condiciones de humedad y temperatura (4-37°C) son favorables (Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003).

**2.2.1.2.** Taquizoíto: Presentan entre 2-4 $\mu$ m de ancho y 4-8  $\mu$ m de largo, se trata de la forma diseminativa del parásito capaz de invadir cualquier tipo de célula de vertebrados, se multiplican por repetidas endodiogonias dentro de la célula, que es un tipo de división especializada en la cual se da lugar a dos células hijas dentro de su madre, y así sucesivamente hasta ocuparla, cuando la acumulación es entre 64 y 128 taquizoítos la célula se lisa (Díaz et al., 2010; Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

**2.2.1.3.** Bradizoítos: Son morfológicamente muy similares a los taquizoítos pero de replicación más lenta, formas que aparecen de 7 a 10 días después de la infección, tienen forma de coma y están rodeados de una verdadera membrana formando un quiste, que parasitan diferentes células del organismo, siendo el estado letárgico o inactivo en huéspedes inmunocompetentes, estas formas de bradizoítos latentes están rodeadas por una pared de quistes rica en carbohidratos dentro de la vacuola parasitófora (Díaz et al., 2010; Weiss & Dubey, 2009)

**Figura 3.** Formas de *T. gondii*. A) Taquizoítos en una muestra de fluido de lavado broncoalveolar teñido con Giemsa (aumento, X500); B) Quiste en el cerebro de un ratón infectado lleno de bradizoítos (aumento, X500); C) Ooquiste sin esporular (aumento, X1,000); D) Ooquiste esporulado (aumento, X1,000).



Fuente: Tomado de Robert-Gangneux & Dardé (2012).

**2.2.2.** Ciclo de vida: Posee un ciclo de vida típico de parásitos coccidios que viven en los tejidos, con fase sexual y asexual (Figura 4).

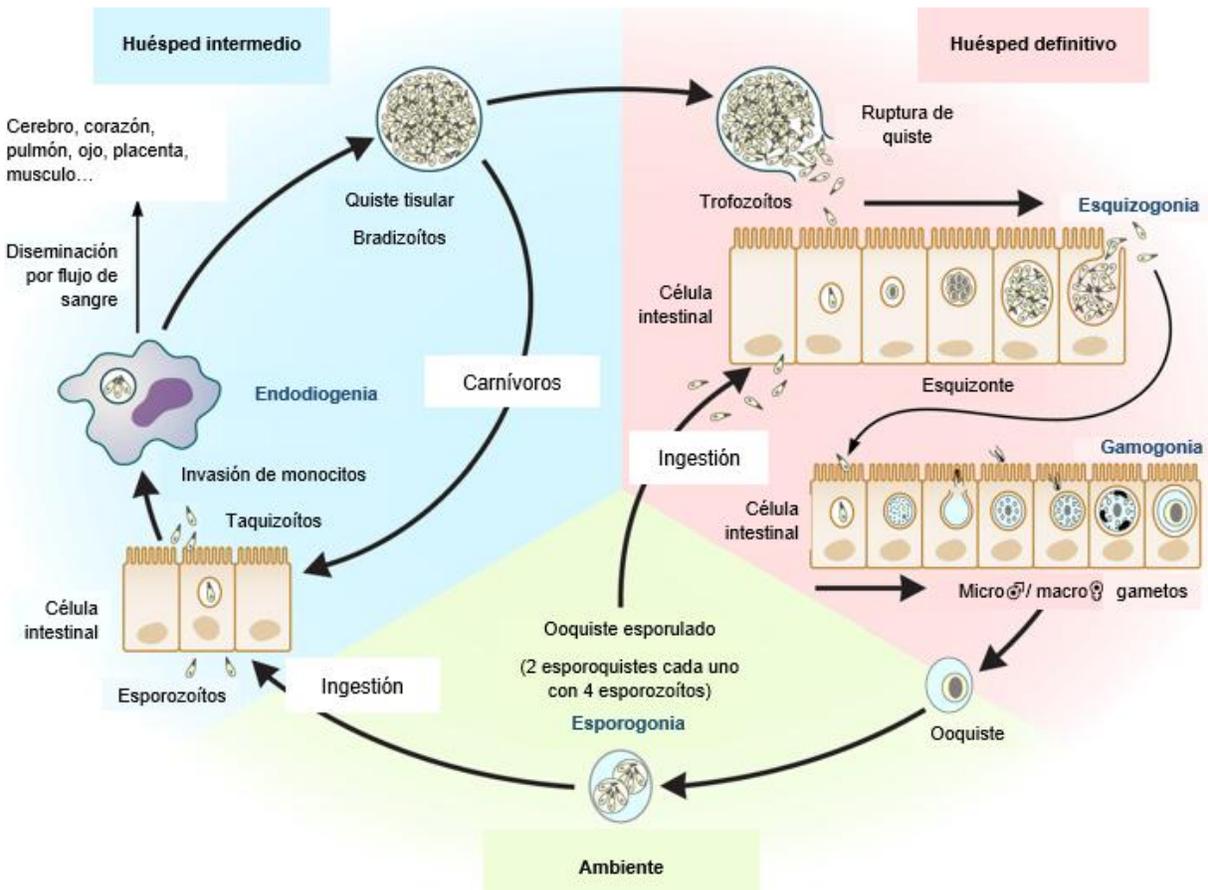
**2.2.2.1.** Fase sexual: Se produce exclusivamente en el huésped definitivo, en este caso los miembros de la familia de felinos, se han reportado cerca de 19 especies entre los generos *Felis*, *Oncifelis*, *Lynx*, *Acinonyx* y *Panthera* (Dubey, 2009a; Su et al., 2003); especialmente es atribuido a la especie *Felis catus* Linnaeus, 1758 (gato común); ocurre en el intestino de este, dando como resultado la producción de ooquistes. Con la ingesta del parásito en cualquiera de sus formas por los felinos los parásitos se diferencian en microgametos masculinos y macrogametos femeninos, cuya fecundación da origen a la formación de un ooquiste diploide y no esporulado que se elimina con las deyecciones (Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003).

Cuando un animal susceptible ingiere ooquistes esporulados, los esporozoítos penetran en el revestimiento intestinal, se vuelven taquizoítos y se establece una infección. Se ha demostrado que *F. catus* puede actuar como hospedador intermediario, es decir, *T. gondii* puede llevar a cabo tanto su ciclo sexual como el asexual en el gato común (Maharana et al., 2010; Montoya & Liesenfeld, 2004).

**2.2.2.2.** Fase asexual: Se lleva a cabo en hospederos intermediarios donde se producen invasiones extraintestinales; consiste en dos etapas distintas de crecimiento dependiendo de si la infección es en la fase aguda o crónica. La etapa taquizoíto define el rápido crecimiento de forma del parásito que se encuentra en la fase aguda de la toxoplasmosis, en esta fase se desarrolla un ciclo lítico que se diferencia en 5 pasos: unión, invasión, formación de vacuolas, replicación, y salida (Blader et al., 2016); entran en todas las células nucleadas por penetración activa y forman una vacuola citoplásmica, después de la replicación repetida con un tiempo de generación de 6 a 8 h (*in vitro*) salen de la célula a infectar las células vecinas, generalmente después de 64 a 128 parásitos acumulados, las células del huésped se rompen y los taquizoítos se diseminan a través del torrente sanguíneo e infectan muchos tejidos, incluidos el SNC, los ojos, el musculo esquelético y cardíaco, y la placenta. (Montoya & Liesenfeld, 2004; Radke & White, 1998;

Smith, 1995). En el animal infectado, Los taquizoítos se transforman en bradizoítos bajo la presión de la respuesta inmune formando quistes tisulares; los quistes tisulares contienen cientos y miles de bradizoítos y se forman dentro de las células del huésped, se encuentran predominantemente en el sistema nervioso central y el tejido muscular, donde pueden residir durante toda la vida del anfitrión. Los bradizoítos pueden liberarse a partir de quistes, transformarse nuevamente en taquizoítos y provocar el recrudecimiento de la infección en pacientes inmunocomprometidos (Black & Boothroyd, 2000; Kim, 2015; Weiss & Dubey, 2009).

**Figura 4.** Ciclo de vida de *T. gondii*. Se muestran la biología, la infección y la replicación de las tres etapas infecciosas de los parásitos en sus respectivos huéspedes.



Fuente: Adaptado de Robert-Gangneux & Dardé (2012).

La reproducción asexual se produce en una variedad de huéspedes intermediarios, y por esto es considerado un patógeno zoonótico significativo ya que puede infectar

prácticamente a todas las especies de animales de sangre caliente, incluyendo animales salvajes, animales de la industria agropecuaria, mamíferos marinos y el humano. (Black & Boothroyd, 2000; Dubey, 2009b; Weiss & Dubey, 2009). Es considerado como uno de los patógenos eucariotas más exitosos en cuanto al número de especies que sirven de huésped y el porcentaje de animales que infecta alrededor del mundo (Su, Shwab, Zhou, Zhu, & Dubey, 2010).

### **2.3. LA TOXOPLASMOSIS**

Es una zoonosis ampliamente distribuida que transcurre con síntomas clínicos leves no específicos en la mayoría de los pacientes humanos y animales (Restrepo Isaza., 2007). Se ha dicho que es responsable de la pérdida de la visión en al menos un 1% y en Suramérica hasta un 10% de las personas infectadas (Gómez Marín, Zuluaga, Pechené Campo, Triviño, & de-la-Torre, 2018), con alta morbilidad de fetos y pacientes inmunosuprimidos; además de lo anterior, ha ocasionado grandes pérdidas económicas y productivas en el sector agropecuario debido a que puede ocasionar aborto espontáneo, la reanudación o la retención de la placenta, el nacimiento inanimado, y el nacimiento de jóvenes débiles y demacrados en ovejas, cabras y cerdos (Camossi et al., 2011; Ferra et al., 2015; Maharana et al., 2010; Meireles, Galisteo, Pompeu, & Andrade, 2004).

**2.3.1. Formas de transmisión:** Dependiendo de la forma en que se transmite esta puede ser horizontal o vertical.

**2.3.1.1.** Toxoplasmosis por transmisión horizontal: I. Clásicamente, el consumo de carne poco cocida se ha atribuido a ser el principal factor de riesgo para la adquisición de toxoplasmosis debido a que *T. gondii* en estas se presenta en quistes tisulares que contienen bradizoítos resistentes en cierto grado a enzimas digestivas como tripsinas y peptinas (Tenter et al., 2000), además, se ha detectado la presencia de *T. gondii* en leche de animales como ovejas, cabras y vacas (Camossi et al., 2011; J. L. Jones & Dubey, 2012; Tenter et al., 2000); y II. Los ooquistes eliminados en las heces de gatos contaminan el medio ambiente y estos tienen una gran probabilidad de ser ingeridos junto

con el agua o los alimentos crudos, lo que representa una fuente de infección para los animales de sangre caliente (L. A. Silva, Andrade, Carneiro, & Vitor, 2014; Slifko, Smith, & Rose, 2000; Weiss & Dubey, 2009).

**2.3.1.2.** Toxoplasmosis por transmisión vertical: Se da por el paso de los taquizoítos vía transplacentaria, de la madre a su hijo durante el embarazo, en esta, los taquizoítos son capaces de llegar al feto y ocasionar daños de diverso nivel dependiendo del estado del desarrollo en el cual se encuentre el feto (Tenter et al., 2000; Wang et al., 2011).

**2.3.2.** Sintomatología de la toxoplasmosis: La infección transcurre en la mayoría de los casos en forma asintomática, sólo entre 10 y 20 % de los casos son sintomáticos durante una infección, sus principales síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, mialgia, cuello rígido, dolor en los ojos, dolor de garganta, linfadenitis, coriorretinitis y raramente miocarditis o miositis (Dubey, 2009a; Hill & Dubey, 2002; Montoya & Liesenfeld, 2004; Restrepo Isaza., 2007). Sin embargo, diferentes pacientes presentan diferentes síntomas y afectaciones como mostraremos a continuación:

**2.3.2.1.** En el feto (Toxoplasmosis congénita): Las lesiones ocasionadas por la enfermedad al feto varían dependiendo del momento en el cual se da la infección, pudiendo ir desde bajo coeficiente intelectual, retinocoroiditis, hidrocefalia, calcificación intracerebral, aspecto de niño prematuro, hepatoesplenomegalia, ictericia, neumonitis, miocarditis y otros; hasta aborto espontaneo y muerte del neonato. Entre más temprano en el embarazo se desarrolle la infección más severos son los daños que se causan (Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzman-Marin, et al., 2016; Tenter et al., 2000; Wang et al., 2011).

**2.3.2.2.** En personas inmunocompetentes: La inmunidad controla la infección inicial y el parásito permanece en las células formando los quistes tisulares y allí permanecen indefinidamente, sin embargo hay reportes de toxoplasmosis en pacientes inmunocompetentes como lo es el caso de una mujer de 59 años en la cual presentaba neumonía no especificada y bajo un estudio de mayor profundidad se encontró que

presentaba quistes de *T. gondii* en sus pulmones (C. X. Shen, Zhang, Song, Xie, & Wang, 2015) o el caso de un joven de 15 años con síndrome nefrótico (Barrios et al., 2012). Además de esto, *T. gondii* ha sido asociado a un aumento en las tasas de trastornos de comportamiento humano como: El aumento en la incidencia del Alzheimer, la esquizofrenia y otras enfermedades neuropsiquiátricas (Fabiani et al., 2013; Torres et al., 2018), el homicidio, suicidio y otras violencias auto-dirigidas (Lester, 2012; Pedersen et al., 2012).

**2.3.2.3.** En pacientes inmunodeficientes: En esta categoría se incluyen personas con SIDA, pacientes con trasplante de órganos, inmunodeficiencias primarias, enfermedades malignas de tipo hematológico, especialmente enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, pacientes que reciben terapia inmunosupresora, corticosteroides o drogas citotóxicas. Se ha encontrado que *T. gondii* afecta principalmente los ojos, el corazón, el hígado, los ganglios linfáticos, los pulmones y otros órganos, pero la complicación más frecuente y severa es la encefalitis, (Restrepo Isaza., 2007; C. X. Shen et al., 2015).

De manera general se dice que cerca del 20% de los pacientes que presentan toxoplasmosis ocular pueden quedar ciegos (Kijlstra & Jongert, 2009).

#### **2.4. GENOTIPOS DE *Toxoplasma gondii***

Howe y Sibley (1995) propusieron que los aislamientos de *T. gondii* pueden agruparse en tres tipos (I, II, III) basándose en el polimorfismo del ADN de locus simple detectados por PCR-RFLP, y que la mayoría de las cepas eran clonales, es decir, que *T. gondii* presentaba una estructura de población clonal con baja diversidad genética, además que el tipo I es el más letal para ratones, y que el II y III son menos patogénicos (Derouin, Howe, & Honore, 1997; Howe & Sibley, 1995; Morisset et al., 2008; Sibley, Mordue, Su, Robben, & Howe, 2002). Para Colombia, en la revisión de Cañón-Franco, López-Orozco, Gómez-Marín, & Dubey, (2014) mencionan que de 10 aislados de *T. gondii* el 80% correspondían al genotipo I.

Recientes estudios usando polimorfismos por microsatélites detectados por PCR multiplex y multilocus PCR-RFLP han revelado algunos linajes atípicos (Ajzenberg et al., 2002, 2009; Cañón-Franco et al., 2014; Su, Zhang, & Dubey, 2006). Por lo que en la actualidad se establece que la tipificación típica de tres linajes clonales no es suficiente debido a que se ha encontrado una naturaleza polimórfica de las cepas, especialmente en la región de Sur América (Cañón-Franco et al., 2014; Pfaff et al., 2014).

Shwab et al., (2014) reporta 189 genotipos diferentes alrededor del mundo, que solo unos pocos genotipos dominan en el hemisferio norte, mientras que cientos de genotipos coexisten y unos pocos tienen una frecuencia relativamente más alta en el hemisferio sur; estos resultados sugieren una estructura de población clonal en el norte y una estructura de población epidémica en el sur (Tabla 3).

**Tabla 3.** Número de genotipos obtenidos por Schwab et al., (2014).

Regiones geográficas	África	Asia	Europa	Norte América	Centro/ Sur América
Número de aislados	141	102	64	501	646
Genotipos no compartidos con otras regiones	13	10	9	40	156

Fuente: Adaptado de Schwab et al., (2014)

En el estudio de Schwab et al., (2014) también mencionan que África comparte 5 genotipos con Asia, 5 con Europa, 4 con Norte América y 5 con Centro/Sur América; Asia comparte 5 genotipos con Europa, 6 con Norte América y 8 con Centro/Sur América; Europa comparte 6 genotipos con Norte América y 6 con Centro/Sur América; y Norte América comparte 17 genotipos con Centro/Sur América.

## 2.5. METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN DE *T. gondii*

Existen diversas técnicas que permiten la detección del parásito en diversos individuos, según el objetivo y sujeto de estudio, algunas se basan en la detección del ADN de parásito y otras no, a continuación, encontraremos algunas de las más usadas.

**2.5.1. Métodos tradicionales de detección (no basados en ADN):** Existen tres metodologías principales que no usan el ADN del parásito para determinar su presencia como lo son la detección microscópica, el bioensayo y las diferentes pruebas serológicas.

**2.5.1.1. Microscopía:** Esta técnica se trata de la visualización de muestra coprológica o de tejido al microscopio. Si la muestra es de excretas de gato pueden encontrarse ooquistes; si se trata de tejido infectado puede presentar bradizoitos o taquizoitos, esta se vale de tinciones con HE (Hematoxilina y eosina), ácido peryódico de Schiff (PAS) y azul de Alcian (AB) que permiten un mejor contraste y por tanto mejor detección (Black & Boothroyd, 2000; P. de C. da Silva et al., 2010); en muestras de líquidos cefalorraquídeo (LCR) o amniótico se pueden observar taquizoítos (Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003); muestras de agua y/o ambientales (cajas de arena, materas o suelos) también pueden ser analizadas por este medio y presentar ooquistes (Lilly & Wortham, 2013).

Para mejorar la capacidad de detección la muestra puede ser procesada por filtración o centrifugación para concentrarla; sin embargo, la detección por microscopia de los ooquistes expulsados en las heces por los gatos y de quistes en los diversos tejidos carece de sensibilidad y especificidad ya que los resultados dependen de la agudeza visual y entrenamiento de quien realiza la prueba (Salant, Spira, & Hamburger, 2010).

**2.5.1.2. Bioensayo:** Esta metodología es más sensible que la microscopía y determina la viabilidad de los ooquistes (Dubey et al., 2013; Hill & Dubey, 2002); requiere animales de prueba, usualmente gatos o ratones vivos, los cuales son alimentados con quistes aislados o tejido sospechoso y se espera a que *T. gondii* se multiplique en su interior (Morisset et al., 2008); sin embargo, esto representa un riesgo biológico debido a la multiplicación de las fuentes de infección y posible fuga de las mismas (Salant et al., 2010). No obstante, los ensayos en ratones han establecido que los diferentes genotipos

de *T. gondii* presentan variación en su virulencia y letalidad (Sibley et al., 2002). Así, ratones que mueren después de unos días de ser alimentados con la muestra problema puede que fallezcan por toxoplasmosis, pero debido a la variación en la virulencia es necesario examinar cuerpos y/o sacrificar y examinar tejidos del cerebro de los ratones por medio de microscopia u otra técnica. En los gatos que se ha dado tejido infectado se examinan las heces por microscopia o se dan a ratones y se procede como se mencionó anteriormente.

**2.5.1.3.** Pruebas serológicas: La medición de anticuerpos en suero mediante el uso de varias pruebas serológicas ha sido comúnmente usada para la determinación de exposición a *T. gondii* (Salant et al., 2010). Se conoce que dependiendo de los anticuerpos detectados se puede establecer o estimar la fase de infección en la cual se encuentra el individuo; debido a que los títulos de IgM aparecen tempranamente después de la infección y decrecen rápidamente por lo que se utiliza para la detección de la enfermedad en su estado agudo mientras que los títulos de IgG permanecen bajos durante las primeras semanas y posteriormente se incrementan significativamente, así: El detectar –IgM y +IgG es señal de haber estado en contacto con *T. gondii* o presentarse una reinfección, +IgM y –IgG o +IgM y +IgG es señal de que *T. gondii* se encuentra en la fase aguda, los resultados de –IgM y –IgG se presumen como si no existiera factor de riesgo, sin embargo –IgM y –IgG también puede presentarse en una fase activa de la parasitosis, arrojando falsos negativos (Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marin, et al., 2016).

Existen otros dos tipos de anticuerpos que han sido usados para detectar la toxoplasmosis en su fase aguda, o fase inicial: Los anticuerpos IgA se pueden detectar en el suero de adultos con infección aguda y niños infectados congénitamente utilizando métodos de ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA) o ensayo de inmuno absorción por aglutinación (ISAGA). Los anticuerpos IgE son detectables por ELISA en sueros de adultos con infección aguda, los lactantes con infección congénita, y los niños con toxoplasmosis ocular congénita. La duración de IgE seropositividad es menor que

con los anticuerpos IgM o IgA y por lo tanto parece ser útil como un método complementario para la identificación de infecciones adquiridas recientemente.

En la actualidad existen una gran variedad de pruebas serológicas como: Test de Sabin-Fledman (DT), reacción de aglutinación directa (AG), prueba diferencial de aglutinación (AC/HS), test de aglutinación modificada (MAT), test de aglutinación de látex (LAT), prueba de hemato-aglutinación indirecta (IHA), test de inmuno-florescencia indirecta (IFA o IFAT), ELISA, ensayo fluorescente ligado a enzimas (ELFA), ISAGA, prueba inmunocromatografica (IC), ensayo de inmuno aglutinación piezoelectrica (PIA) y Western Blot (WB).

**2.5.2. Métodos basados en detección del ADN del parásito:** Los métodos convencionales no son engañosos usualmente, sin embargo, son limitados en casos de pacientes inmunocomprometidos o prenatales. La amplificación por PCR utiliza para detectar *T. gondii* su propio ADN, y dicha detección puede hacerse a partir de fluidos y tejidos corporales del individuo a examinar. Se ha utilizado con éxito para diagnosticar toxoplasmosis congénita, ocular, cerebral y diseminada.

La PCR realizada en el líquido amniótico ha revolucionado el diagnóstico de la infección por *T. gondii* fetal al permitir un diagnóstico precoz, evitando de este modo el uso de procedimientos más invasivos en el feto. La PCR ha permitido la detección de ADN de *T. gondii* en el tejido cerebral, fluido cerebroespinal (CSF), fluido vítreo y acuoso, el líquido de lavado broncoalveolar (BAL), orina, líquido amniótico y de sangre periférica. Además, que existen diferentes tipos de secuencias de ADN objetivos útiles para la detección e incluso para genotipificar como lo son SAG1, 5'SAG2, 3'SAG2, altSAG2, SAG3, BTub, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1 y apico (Bacci et al., 2015; Chabbert, Lachaud, Crobu, & Bastien, 2004).

Burg, Grover, Pouletty, & Boothroyd en 1989 propusieron el Gen *B1* para la detección directa y sensible de *T. gondii* por medio de una PCR anidada (n-PCR) con fines de diagnóstico en humanos; en su artículo mencionan que esta secuencia se encuentra

repetida en el genoma del parásito entre 25 y 50 veces, siendo 35 veces el número más probable y aceptado por diferentes autores. Burg et al. (1989) también evaluaron la especificidad de los primers usados y encontraron que *Sarcocystis*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, y *Absidia* spp. no amplificaban con estos.

Los primers propuestos por Burg et al. (1989) eran de más de 20pb, y a través del tiempo se han modificado, C. D. Jones et al. en su estudio en el 2000 emplea como base los primers de Burg et al. (1989). Ponce & Gomez-Marín en el 2003 realizaron la estandarización y validación para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por VIH, usando los primers empleados en el estudio de C. D. Jones et al. (2000), esta vez el primer Toxo N2 fue rectificado y sus condiciones de amplificación modificados; esta prueba ha sido usada para evaluar la presencia de *T. gondii* en agua, carnes y humanos con excelentes resultados (Alvarez et al., 2015; Campo-Portacio et al., 2014; Franco-Hernandez, Acosta, Cortés-Vecino, & Gómez-Marín, 2015; Triviño-Valencia, Lora-Suárez, Zuluaga, & Gomez-Marin, 2016). Estudios realizados por Cortés Cortés, Hernández Castro, Mantilla, Medina, & Duque (2014) mediante ensayos de exclusividad de la técnica de PCR para la detección del gen *B1* de *T. gondii* determinó la especificidad de los oligonucleótidos propuestos por Ponce & Gomez-Marín (2003) mediante el ensayo con ADN de otros microorganismos como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania braziliensis*. Al revelar el producto de PCR de estos organismos con los oligonucleótidos para el gen *B1* bajo las mismas condiciones de PCR no se observó producto de amplificación.

## **2.6. PREVALENCIA DE *Toxoplasma gondii***

Cerca del 30% de la población humana está infectada de forma crónica por este parásito (Schlüter et al., 2014). Debido a que este parásito es cosmopolita y presenta relevancia a nivel de salud pública se pueden encontrar diversos estudios llevados a cabo con diferentes técnicas parasitológicas tanto tradicionales como moleculares en diferentes objetos de estudio como lo son: Deyecciones de gato, sangre de diferentes animales, muestras de suelo, tejidos de animales, muestras de sangre periférica de humanos y

más recientemente muestras de agua, frutas y verduras; a continuación, en las tablas 4 y 5 se muestran algunos de los estudios que se han desarrollado en estos ámbitos.

**Tabla 4.** Estudios de detección de *Toxoplasma gondii* por métodos tradicionales.

<b>Método</b>	<b>Sujeto de estudio</b>	<b>Porcentaje</b> <b>(<math>\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}</math>)</b>	<b>Locación</b>	<b>Referencia</b>
<b>Microscopia</b>	Heces de gato	0,6 (1/158)	Egipto	(Al-Kappany et al., 2010)
	Heces de gato	14,2 (1/7*)	Adís Abeba, Etiopia	(Dubey et al., 2013)
<b>Bioensayo</b>	<i>Sus scrofa</i>	25 (7/28)	Sao Paulo, Brasil	(de A Dos Santos et al., 2005)
	Gato directamente	74,1 (83/112*)	Egipto	(Al-Kappany et al., 2010)
	Lengua	47,3 (53/112*)		
	Cerebro	32,1 (36/112*)		
	Gato: tejido ensayado de ratón KO	Corazón 26,7 (357/1337)		
	Lengua	12,8 (171/1336)		
Cerebro	7,2 (97/1347)			
Cabra	Tejido de miocardio dado a ratón	57,6 (83/144*)	Beltsville, Maryland, USA	(Dubey et al., 2011)

<b>Método</b>	<b>Sujeto de estudio</b>		<b>Porcentaje</b> $\left(\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}\right)$	<b>Locación</b>	<b>Referencia</b>
	Gato	Heces y corazón	19,4 (7/36)	Adís Abeba, Etiopia	(Dubey et al., 2013)
<b>DT</b>	Suero dilución 1:16	Humanos	66,53	Montevideo, Uruguay	(Freyre & Falcón, 1990)
		6-10 años	30		
		41-45 años	77		
		71-75 años	88		
		Novillos	1,71 (4/233)		
		Cerdos	70 (422/600)		
<b>MAT</b>	<i>Sus scrofa</i>		18,7 (49/261)	Sao Paulo, Brasil	(de A Dos Santos et al., 2005)
	Gatos		97,4 (154/158)	Egipto	(Al-Kappany et al., 2010)
	Cabra		53,4 (125/234)	Beltsville, Maryland, USA	(Dubey et al., 2011)
	Gato	Corazón	91,6 (33/36)	Adís Abeba, Etiopia	(Dubey et al., 2013)
	Ovejas	Corazón	38,2 (83/217)	Túnez	(Boughattas, Ayari, Sa, Aoun, & Bouratbine, 2014)
	Corderos	Corazón	73,6 (92/125)		

Ensayo Serológico

<b>Método</b>	<b>Sujeto de estudio</b>		<b>Porcentaje</b> $\left(\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}\right)$	<b>Locación</b>	<b>Referencia</b>
<b>LAT</b>	Oveja		24,3 (537/2209)	Irán	(Hashemi-Fesharki, 1996)
	Cabra		20 (106/530)		
<b>IFI</b> <b>o</b> <b>IFAT</b>	Humanos	General	47,1	Colombia	(Juliao Ruiz et al., 1983)
		0-9 años	32		
		≥60 años	65,3		
<b>IFAT</b>	Carne de consumo humano (Anti IgG)	Equinos	21	Caldas,	(Jorge Enrique Cárdenas Pérez et al., 2006)
		Porcinos	15	Colombia	
		Aves	16		
		Bovinos	35		
<b>IHA</b>	Oveja		24,6 (271/1102)	Irán	(Hashemi-Fesharki, 1996)
	Cabra		18,5 (20/108)		
	Gatos callejeros		17 (17/100)	Sao Paulo,	(Meireles et al., 2004)
	Perros callejeros		38 (76/200)	Brasil	
	<b>ELISA</b>	Gatos callejeros	IgG	40 (40/100)	Sao Paulo,
Perros callejeros				50,5 (101/200)	Brasil
Oveja, caballo y cerdos		Antígenos quiméricos	90 – 100	Gdansk, Polonia	(Ferra et al., 2015)
		TLA (T. lysate antigen)	100		

<b>Método</b>	<b>Sujeto de estudio</b>		<b>Porcentaje</b> <b>(<math>\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}</math>)</b>	<b>Locación</b>	<b>Referencia</b>
	Cerdos	Tejido del miocardio	95,2 (20/21 <sup>*</sup> )	Emilia-Romagna, Italia	(Bacci et al., 2015)
	Cerdos	IG	96,6 (58/60)	Mérida, Yucatán, México	(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzman-Marin, et al., 2016)
	Mujeres con abortos en su vida (Muestra de sangre periférica)	IgG  IgM	59 (95 <sup>*</sup> /161)  3,72 (6 <sup>*</sup> /116)		
<b>ELFA</b>	Mujeres gestantes	IgG anti <i>Toxoplasma</i>	0 (0/100 <sup>*</sup> )	Sincelejo, Colombia	(Blanco, Assia-Mercado, Montero-Perez, & Orozco-Mendez, 2011)
<b>Avidity Test</b>	Mujeres con abortos en su vida (Muestra de sangre periférica)	IgG	98,94 (94/95 <sup>*</sup> )	Mérida, Yucatán, México	(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzman-Marin, et al., 2016)

Método	Sujeto de estudio	Porcentaje ( $\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}$ )	Locación	Referencia
<b>Imágenes diagnósticas</b>	Mujer de 59 años, VIH negativo, a través de tomografía computarizada	100 (1/1*)	Hospital pulmonar de Shanghai	(C. Shen, Zhang, Song, Xie, & Wang, 2015)

Fuente: Autor

**Tabla 5.** Estudios basados en detección del ADN del parásito.

Método	Sujeto de estudio	Blanco	Porcentaje ( $\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}$ )	Locación	Referencia
<b>PCR</b>	Corazón de ovejas	<i>B1</i>	50 (17/34*)	Túnez	(Boughattas et al., 2014)
	Cordero Res	<i>B1</i>	14% (7/50) 4% (2/59)	Ahvaz, Irán	(Rahdar, Samarbaf-Zadeh, & Arab, 2012)
	Heces de gatos	529bp	6,12 (3/49)	Condado de Rockbirdge, Virginia	(Lilly & Wortham, 2013)
<b>qPCR</b>	Líquido amniótico de mujeres embarazadas	<i>RE</i>	4,6 (82/1792)	Francia y el extranjero	(Costa et al., 2013)
		<i>B1</i>	86,3 (63/73*)		
		<i>P30</i>	67,1 (49/73*)		
Frutas y vegetales	<i>B1</i>	9,72 (21/216)	Norte de Polonia	(Lass, Pietkiewicz, Szostakowska, & Myjak, 2012)	
	<i>SAG2</i>	38% (8/21*) 6 Tipo I 2 Tipo II			
Muestras de agua	529bp	8,79 (124/1411)	Escocia	(Wells et al., 2015)	

<b>Método</b>	<b>Sujeto de estudio</b>	<b>Blanco</b>	<b>Porcentaje</b> <b>(<math>\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}</math>)</b>	<b>Locación</b>	<b>Referencia</b>
	Mujeres con abortos en su vida (Muestra de sangre periférica)	B1	3,84 (5/130)	Mérida, Yucatán, México	(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzman-Marin, et al., 2016)
	Una muestra de heces de gato	AF	49,82 (278/558)	Ardenas, Francia	(Simon et al., 2017)
	Lugar de muestreo		88,14 (119/135)		
<b>nPCR</b>	Carnes de consumo humano	B1	52,7 (95/180)	Eje cafetero, Colombia	(Lora-Suárez et al., 2007)
	Res	B1	43 (29/60)		
	Pollo		40 (24/60)		
	Cerdo		70 (42/60)		
	Mujeres gestantes seronegativas	B1	12 (12/100)	Sincelejo, Colombia	(Blanco et al., 2011)
	Res	B1	27,5 (11/40)	Sincelejo, Colombia	(Campo-Portacio et al., 2014)
	Pollo		35 (13/40)		
	Cerdo		32,5 (14/40)		
	Res	B1	35 (22/60)	Bogotá, Colombia	(Franco-Hernandez et al., 2015)
	Pollo		29,7 (33/60)		
	Cerdo		39 (24/60)		
	Pacientes con toxoplasmosis ocular	B1	77,5 (69/89)	Quindío, Colombia	(Alvarez et al., 2015)
	Niños		46,6 (7/15)		

Método	Sujeto de estudio	Blanco	Porcentaje ( $\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}$ )	Locación	Referencia
	(congénita) Infectados asintomáticos		19,6 (123/625*)		
	Muestras de carne		32,4 (38/117)		
	Res		35 (14/40)		
	Pollo		29,7 (12/37)		
	Cerdo		30 (12/40)		
	Pacientes con toxoplasmosis ocular	ROP1 6	17,3 (12/69*)		
	Niños (Toxoplasmosis congénita) Infectados asintomáticos		14,2 (1/7*)  19,5 (24/123*)		
	Res		21,4 (3/13)		
	Pollo		18 (2/11)		
	Cerdo		16,2 (2/12)		
	Muestras de agua	ITS1	35,2 (6/17*)	Escocia	(Wells et al., 2015)
	Cerdo, muestra de: Lengua	SAG1	23,2 (13/56)	Mérida, Yucatán,	(Hernández- Cortazar,
	Lomo		7 (4/57)	México	Acosta-Viana,
	Sangre		0		Guzman-
	Mujeres con abortos en su vida (sangre)	SAG1	6,92 (9/130)		Marin

Método	Sujeto de estudio	Blanco	Porcentaje ( $\frac{\text{Positivos}}{\text{Muestras}}$ )	Locación	Referencia
	Salchichas de cerdo	SAG2	27,14 (19/77) 14 Tipo I 5 Tipo II	Botucatu, Sao Paulo, Brasil	(A. V. da Silva, de Oliveira, Pezerico, Domingues, & Langoni, 2005)

Fuente: Autor

Para Colombia, se han llevado diversos estudios, algunos de los más relevantes son: El Instituto Nacional de Salud realizó un estudio y reportó que el 47,71% de la población general había tenido contacto con el parásito, evidenciado por la detección de anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma* (Juliao Ruiz et al., 1983). Un estudio de aguas de Armenia llevado a cabo por Triviño-Valencia, Lora-Suárez, Zuluaga, & Gomez-Marin en el 2016 con el uso de PCR para el análisis de muestras reporta una prevalencia del 58,6% de *T. gondii*.

Estudios previos realizados a carnes para Colombia usando PCR han mostrado: En Sincelejo se detectó *T. gondii* en el 32% de las carnes analizadas (Campo-Portacio et al., 2014); en el departamento del Quindío con 117 muestras de carnes analizadas se reportó un 32,4% prevalencia del parásito, entre los tipos de carnes que se evaluaron estaban carne de res, cerdo, y pollo con un porcentaje de prevalencia del 35%, 30% y 29,7% respectivamente (Alvarez et al., 2015); y una prevalencia del 43% en plantas de sacrificio de Bogotá con 79 muestras positivas de las 180, siendo 39% en cerdo, 35% en res 29,7% en pollo (Franco-Hernandez et al., 2015).

En la actualidad no hay pruebas disponibles que puedan determinar la fuente de infección, por lo tanto la proporción de la población humana que adquiere la infección por ingesta de ooquistes en el medio ambiente o por el consumo de carne contaminada no se conoce (Dubey et al., 2011). Es claro que la mejor forma de prevención de la

adquisición de la enfermedad es la concientización y educación de la población con mayor riesgo de infección como las mujeres embarazadas y los pacientes inmunocomprometidos (Díaz et al., 2010; M. Opsteegh, Kortbeek, Havelaar, & van der Giessen, 2015).

## **2.7. TRATAMIENTO DE LA TOXOPLASMOSIS**

Según sea el paciente se deben tomar medidas diferentes para el tratamiento.

**2.7.1.** En adultos: No se tratan las personas por el solo hecho de tener títulos de anticuerpos sin presentar síntomas. La inmunidad adquirida ayuda a controlar la infección y la quimioterapia suministrada es supresiva de la proliferación toxoplasmósica, atacando los taquizoítos, pero no cura la infección porque no erradica los bradizoítos de los quistes.

El tratamiento clásico se hace con pirimetamina y sulfonamidas, se administra por vía oral la pirimetamina con una carga inicial de 100 a 200 mg/día durante los 2 primeros días y continuar con 50 a 75 mg diarios durante cuatro a seis semanas; Simultáneamente con la pirimetamina se administra sulfadiazina u otras sulfas como la sulfadoxina; inicialmente una carga de 75 mg/kg en los adultos, para continuar luego con 1 a 1,5 gramos diarios cada 6 horas, durante 4 a 6 semanas (Restrepo Isaza., 2007).

**2.7.2.** En mujeres embarazadas según Díaz et al. (2010) el tratamiento puede ser:

**2.7.2.1.** Placentario: Al ocurrir seroconversión materna sin evidencia de infección fetal y antes de las 20 semanas de gestación, se indica espiramicina por su menor potencial de teratogenicidad a dosis de 9000000 U o 3-4 g/día dividida en 3 dosis cada 24 horas.

**2.7.2.2.** Fetal: En la segunda mitad del embarazo con aislamiento del *T. gondii* en líquido amniótico (sugerido entre semana 20 y 26) por PCR y/o cultivo celular o

inoculación en ratones. La OMS y el CDC de Atlanta recomiendan como principal esquema de tratamiento la combinación de pirimetamina a dosis de 25-100 mg/día, sulfadiazina 1-1,5 g cada 6 horas y ácido folínico 10-25 mg simultáneamente a cada dosis de pirimetamina. En ciertas situaciones la clindamicina 300 mg cada 8 horas puede ser una opción. Estos esquemas se sugieren administrar ininterrumpidamente o durante 3-4 semanas con descanso de 1 semana entre ciclo y ciclo hasta por lo menos 2 semanas antes de la culminación del embarazo.

**2.7.2.3.** En toxoplasmosis congénita: Si se realizó la detección y tratamiento placentario se deben presentar con controles hematológicos cada 1-2 semanas, se da 2 mg/Kg/día los dos primeros días y se continúa con 1 mg/kg/día de pirimetamina durante dos a seis meses. El medicamento puede presentar reacciones secundarias, especialmente por problemas en el metabolismo del ácido fólico, por lo que es necesario administrar suplemento adicional de ácido polínico 1 mg diario, o levadura de pan fresca 50 mg/kg/día dos veces al día durante 2 a 6 meses (Díaz et al., 2010; Restrepo Isaza., 2007). Los medicamentos alternativos puede ser clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, atovaquone, azitromicina y claritromicina; en embarazo se ha utilizado espiramicina (Restrepo Isaza., 2007)

## **2.8. PREVENCIÓN DE LA TOXOPLASMOSIS**

Debido a que el parásito es considerado ubicuo y las fuentes de infección son tan variadas se deben tener diferentes cuidados para prevenir la infección.

Según Díaz et al. (2010) la prevención en el embarazo puede ser: 1) primaria: dirigida a prevenir la enfermedad desde el principio, es decir, evitar la infección por parte de la embarazada, por medio de prevención epidemiológica; 2) secundaria: su fin es disminuir la transmisión de la madre al feto y al mismo tiempo disminuir la severidad de la toxoplasmosis congénita a través de cribaje serológico materno, identificación de hallazgos anormales fetales, diagnóstico fetal en fase aguda y tratamiento en útero; 3) terciaria: consiste en disminuir la severidad de las secuelas de la enfermedad con

diagnóstico, seguimiento y tratamiento del producto de la concepción en vida extrauterina.

Recomendar las normas higiénicas y de salud culinaria es prácticamente el único aspecto consensuado en todo lo que respecta a toxoplasmosis para llevar a cabo la prevención primaria y se aconseja según Díaz et al., (2010) y Marieke Opsteegh, Prickaerts, Frankena, & Evers (2011):

- Higiene personal estricta (lavado de manos).
- Congelar las carnes a  $-12^{\circ}\text{C}$  por los menos un par de días.
- Consumo de carnes bien cocidas (por lo menos a  $56^{\circ}$  por 10 min).
- Consumo de frutas y verduras lavadas.
- Lavar utensilios y superficies antes de preparar alimentos o antes de ingerirlos, así parezcan estar limpios y aquellos que hayan servido para preparación de alimentos evitando la contaminación cruzada.
- Limpiar y desinfectar regularmente la nevera.
- No tener gatos o educarlos y no dejarles salir. De tener gatos, no alimentar los con comida cruda. Hacer la limpieza todos los días de la cubeta de excretas con uso de guantes, máscara y agua hervida.
- Hervir el agua para consumo humano y la que se usa para el preparado de alimentos, o tratarla con filtros adecuados o con tintura de yodo al 2% durante por lo menos 3 horas, pues se sabe que el tratamiento que se realiza al agua va dirigido contra bacterias como salmonelas, coliformes y *Pseudomonas*, tratamiento que no inactiva los ooquistes de *Toxoplasma* que pueda contener la misma (Campo-Portacio et al., 2014).
- Evitar trabajos de jardinería o en áreas donde hay tierra, de realizarlos se debe usar guantes y lavarse las manos al culminar.
- A personas que practiquen excursiones o realicen actividades al aire libre recomendar no ingerir agua de lagos, ríos, arroyos, charcos naturales o tanques (recomendar llevar su propio suministro de agua).

- Evitar comer en sitios donde no se tenga la certeza de las normas de salubridad y de preparación de alimentos.
- Durante la manipulación de carnes crudas, frutas y vegetales utilizar guantes, evitar el contacto de las manos enguantadas o no, con los ojos y la boca.
- Procurar eliminar roedores e insectos coprofágicos como cucarachas y moscas.
- Promocionar la consulta preconcepcional donde se podrán identificar pacientes de riesgo y aquellas que no lo presenten, aportando información veraz y minimizar el miedo a esta patología antes que logren embarazarse. Existen estudios que demuestran que el riesgo de seroconversión es 9 veces menor en pacientes bien informadas.

Para las granjas de producción animal el riesgo de contaminación ambiental de los ooquistes puede abordarse según Kijlstra & Jongert (2008, 2009):

- Retirando gatos del entorno de la granja.
- Limitar el acceso de felinos a áreas de reservorios de agua para consumo y/o alimentos.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. TAMAÑO MUESTRAL**

Al aplicar un margen de error del 5%, el nivel de confianza del 95% para una proporción de la población esperada del 40% según estudios realizados en otras regiones de Colombia (Campo-Portacio et al., 2014; Franco-Hernandez et al., 2015; Lora-Suárez et al., 2007) y el efecto del diseño muestral estimado del 0,5 para un tamaño de población infinita se estima un tamaño muestral de 186, las cuales se tomaron de la siguiente manera: 62 de res, 62 de pollo y 62 de cerdo. El cálculo se realizó utilizando el software Epi-Info (CDC, versión 7.2.0.1).

Las muestras se obtuvieron de comercializadoras de carne (Tiendas de barrio, plazas o almacenes de cadena) de la ciudad de Ibagué, la ciudad se encuentra dividida en 13 comunas como se muestra en la tabla 1, debido a que de cada tipo de carne debía tomarse 62 muestras se decidió tomar 4 muestras por cada comuna en los diferentes barrios al azar, y para las comunas más grandes más de 4; además, se tomaron algunos puntos al azar del departamento del Tolima para realizar pruebas. Se colectaron aproximadamente 100 g de cada tejido que se almacenaron refrigerados a +4°C hasta su posterior análisis en el laboratorio (Boughattas et al., 2014; Campo-Portacio et al., 2014).

#### **3.2. OBTENCIÓN DE ADN**

Se establece una metodología que permita los mejores resultados en cuanto a la cantidad y calidad de ADN obtenido por lo que se probaron diferentes tiempos y temperaturas de digestión de la muestra, extracción y purificación de ADN como se muestra a continuación.

**3.2.1.** Digestión de la muestra: A partir de 100g de carne se realizan cortes con una hoja de bisturí estéril al azar hasta obtener 5g de muestra en una caja de petri estéril.

Se realizaron pruebas de digestión con Buffer de lisis (H<sub>2</sub>O milli Q, EDTA, NaCl 5M y SDS) y proteinasa K (Solución de trabajo 200µg/mL) a dos temperaturas y tiempos diferentes para evaluar la calidad de ADN obtenido, estas son:

- Digestión a 37°C toda la noche (16h).
- Digestión a 56°C por 1h.

**3.2.2.** Extracción y purificación de ADN a partir de la muestra digerida: Se realizaron pruebas de extracción a partir de 500µL de muestra digerida con el método de Fenol Cloroformo Alcohol Isoamilico (Anexo A) y la digestión con RNasa A (Concentración de trabajo de 50µg/mL) (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

### **3.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN**

Se realizó la cuantificación con NanoDrop 2000 posterior a la extracción y purificación de ADN para determinar cuál es la mejor opción para el tratamiento de las muestras, siendo la que permita mayor concentración de ADN (ng/µL) y pureza (Relación 260/280) la que se usará para las muestras del estudio (Anexo B).

### **3.4. DETECCIÓN DE ADN DE *Toxoplasma gondii***

Se trata de una PCR anidada (n-PCR) con dos pares de primers (Tabla 6) que se basan en el estudio original de Burg et al (1989), los cuales fueron base para los primers usados por Jones, Okhravi, Adamson, & Tasker (2000) que son un poco más cortos que los originales; los primers propuestos por Ponce & Gomez-Marín (2003), tiene como base los propuestos por C. D. Jones et al. (2000), pero al realizar el análisis comparativo con la secuencia del gen *B1* encontrada en el GenBank (Genbank accession number AF179871) por medio del programa MEGA V7.0.21 se observó un nucleótido adicional (Citosina en la posición 11 del primer). Los primers anteriormente mencionados también

fueron analizados con las herramientas bioinformáticas Nucleotide BLAST, PCR Products y Primer-BLAST. El protocolo se ajustó y se desarrolló la detección para las muestras del estudio con la combinación de primers que arrojaron mejores resultados.

**Tabla 6.** Primers para detección del gen *B1* de *T. gondii*.

<b>Primers Primera reacción</b>		<b>Secuencia</b>
<b>Primer F</b>	Toxo N1	GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG
<b>Primer R</b>	Toxo C1	TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC
<b>Primers Segunda reacción</b>		<b>Secuencia</b>
<b>Primer F</b>	Toxo N2	TGCATAGGTTGCAGTCACTG
<b>Primer F</b>	Toxo N2 modificado	TGCATAGGTTGCCAGTCACTG
<b>Primer R</b>	Toxo C2	GGCGACCAATCTGCGAATACA

Fuente: Autor

La mezcla de reacción propuesta se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Mezcla de reacción para la n-PCR del gen *B1*.

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu$ L)
<b>Buffer 10X</b>	1X	2
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,5mM	1,2
<b>dNTPs</b>	2,5mM	1,6
<b>Primer F</b>	1 $\mu$ M	0,8
<b>Primer R</b>	1 $\mu$ M	0,8
<b>Taq Polimerasa</b>	1U	0,1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	11,5
<b>ADN</b>		2

Fuente: Autor - LIPT

Después de hacer la mezcla, se lleva al termociclador, con perfil térmico que se estandarizó por Ponce & Gomez-Marín (2003) para la realización de la prueba que consta de dos fases, con las siguientes condiciones:

Primera ronda de PCR de 40 ciclos usando los cebadores N1 y C1, con denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, denaturación 94 °C por 1 minuto, anillado a 53 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión a 72 °C por 10 minutos.

Segunda ronda de PCR se hará con el producto de la primera amplificación como templado, usando 30 ciclos con los cebadores N2 y C2 con denaturación inicial a 94 °C por 5 minutos, denaturación a 94°C por 1 minuto, anillado a 53 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Se empleará como control positivo ADN de la cepa RH de *T. gondii* a una concentración de 1pg/μL, se contó con la donación de este por dos fuentes, el Doctor Ricardo Wagner Almeida Vitor del departamento de parasitología de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) de Brasil y el grupo de parasitología SLRN del INS de Bogotá; y como control negativo agua estéril.

Se espera un producto de amplificación de 97 pares de bases (pb) para la segunda reacción y de presentar gran cantidad de ADN del parásito podría apreciarse una banda de 127pb producto de la primera reacción (C. D. Jones et al., 2000; Lora-Suárez et al., 2007; Ponce & Gomez-Marín, 2003).

### **3.5. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS**

**3.5.1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo C): 10μL de los productos de la reacción de PCR que se mezclan con 2μl de 6x de buffer de carga se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en una solución tampón al 0,5X de tris-ácido bórico-EDTA (TBE) a 120 voltios durante aproximadamente 60 minutos y se realiza tinción con Gel Red Nucleic Acid Gel Stain Biotium® y visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta (254-260nm). El tamaño del fragmento fue determinado utilizando marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

**3.5.2.** Electroforesis en gel de acrilamida al 6% (Anexo D): Se elige este tipo de gel por su alta sensibilidad para detectar los productos de PCR de las muestras problema, para este, 5µL de los productos de la segunda reacción de PCR que se mezclan con 1µl de 6x de buffer de carga se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en una solución tampón al 1X de tris-ácido bórico-EDTA (TBE) a 80 voltios durante aproximadamente 40 minutos y se realiza tinción con nitrato de plata, posteriormente se toma imagen de gel para el análisis. El tamaño del fragmento fue determinado utilizando marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos se almacenaron en una base de datos de Microsoft Excel 2016 y se determinó la frecuencia de infección de cada uno de los tipos de carne, estableciendo la prevalencia y los intervalos de confianza con el programa estadístico InfoStat versión 2016e, como los datos evaluados serán de tipo categórico (Positivo o negativo) se emplea una prueba de estimación paramétrica basado en una proporción.

## 4. RESULTADOS

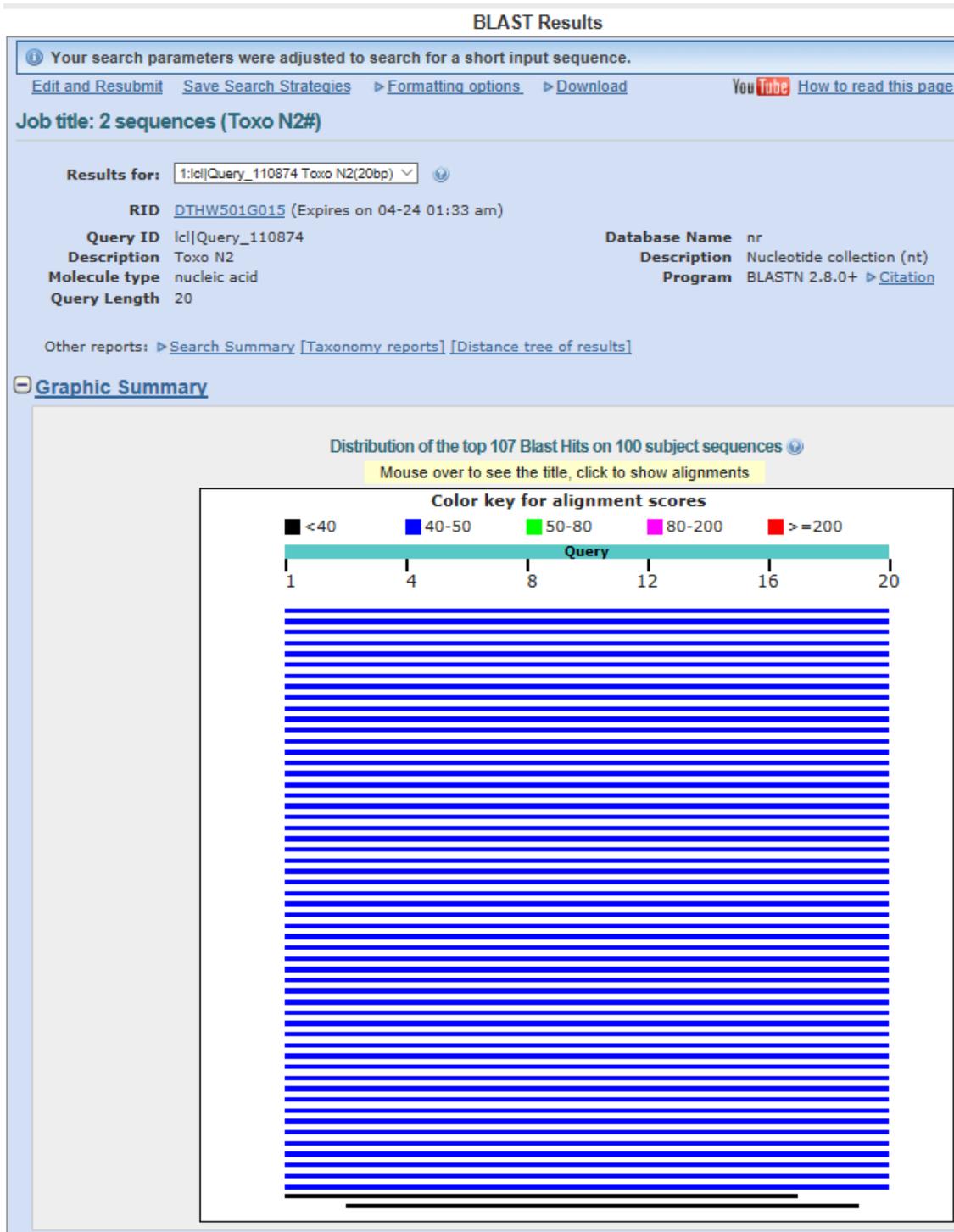
### 4.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA n-PCR

**4.1.1. BLAST:** Al realizar el análisis informático con la herramienta bioinformática “Nucleotide BLAST” del sitio web [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) se encontró que los primers Toxo N2 – Toxo C2 (C. D. Jones et al., 2000) presentan homología con las secuencias almacenadas de *Toxoplasma gondii* (Figura 5), encontrando 66 secuencias parecidas (Figura 6). Mientras que los primers Toxo N2 modificado – Toxo C2 (Ponce & Gomez-Marín, 2003) no revelaron secuencias homologas con *T. gondii* (Figuras 7 y 8).

**4.1.2. PCR in silico y BLAST-Primer:** El análisis de los primers para la segunda ronda de la PCR con la herramienta bioinformática “PCR Products” del sitio web [https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_products.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html) para la secuencia en formato fasta en el GenBank (Genbank accession number AF179871) reveló un producto de amplificación de 97pb para los primers Toxo N2 - Toxo C2 usados previamente por C. D. Jones et al. (2000) (Figura 9A), mientras que para el set Toxo N2 modificado – Toxo C2 propuesto por Ponce & Gomez-Marín (2003) nos arrojaba como resultado la frase “No PCR products were obtained” (Figura 9B)

Dichos resultados se repitieron al usar la herramienta bioinformática “Primer-BLAST” del sitio web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Anexo E).

**Figura 5.** BLAST grafico de los primers Toxo N2 y Toxo C2 usados por C. D. Jones et al. (2000).



Fuente: Autor

**Figura 6.** BLAST descriptivo de los primers Toxo N2 y Toxo C2 usados por C. D. Jones et al. (2000).

Buscar en la página  1 de 66 < > Opciones

Sequences producing significant alignments:

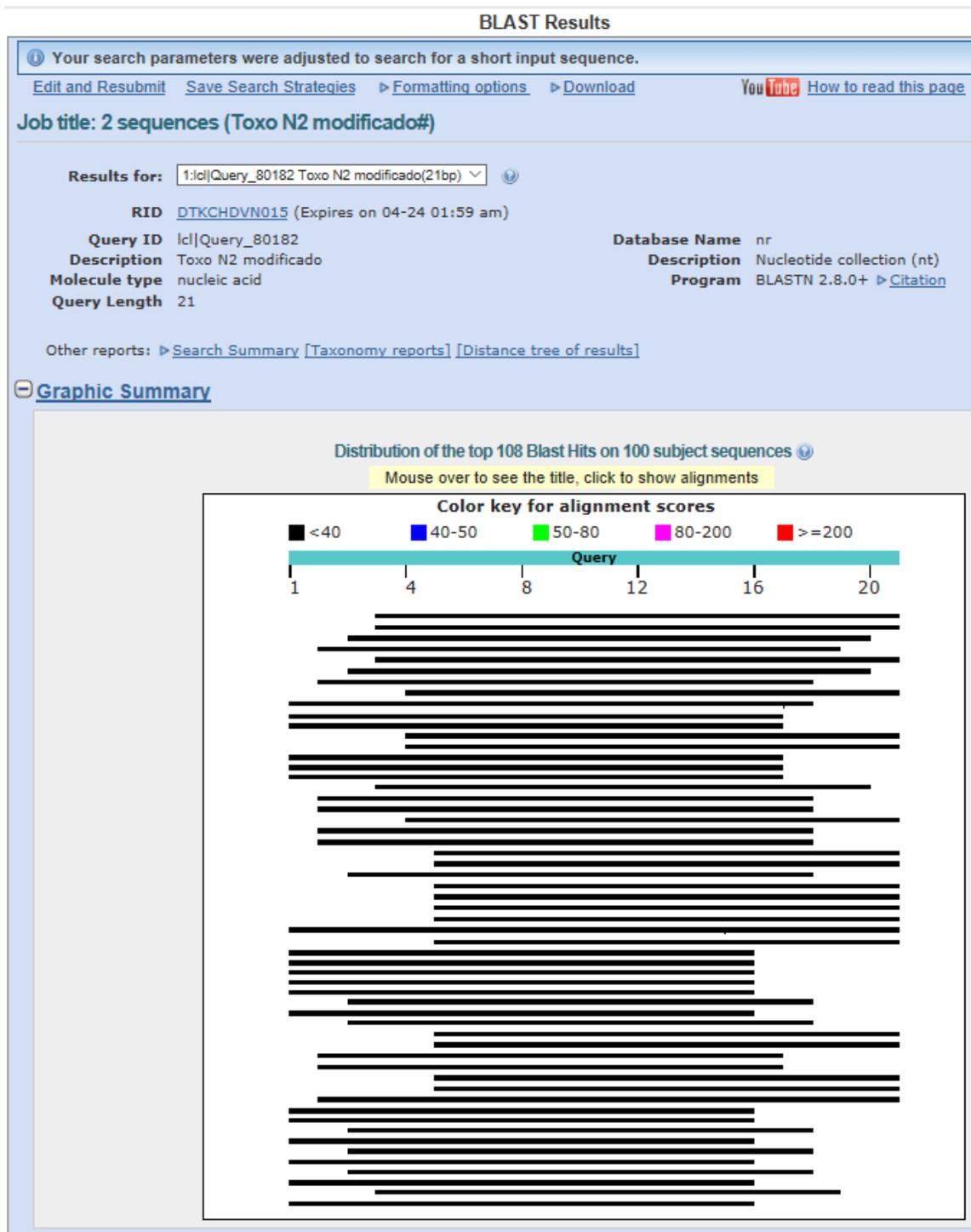
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate M508_13 B1 gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KU288755.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii B1 (b1) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KR559682.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: J</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">AB743597.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: J</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">AB743595.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: J</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">AB743593.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii GRA6 gene for granule antigen protein GRA6, partial sequence, isolate: J</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">AB743592.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Coalatilla184 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270388.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo179 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270387.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo178 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270386.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo177 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270385.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo175 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270384.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Tecuanillo174 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, ps</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270383.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Coalatilla173 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270382.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Coalatilla170 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270381.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate StaRosa114 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, part</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270380.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate StaRosa112 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, part</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270379.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Juluapan110 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, par</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270378.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Tecoman108 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, pa</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270377.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate StaRosa107 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, part</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270376.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate ElReal111 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, parti</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270375.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate ElReal109b glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, parti</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270374.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate ElReal109a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, parti</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270373.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Camalote106 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, pa</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270372.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Camalote104 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, pa</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270371.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate StaRosa103 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, part</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270370.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Camalote102b glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, p</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270369.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Camalote102a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, p</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270368.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Estacion101b glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, pa</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270367.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Estacion101a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, pa</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270366.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate StaRosa113 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, part</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270365.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Estacion98 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, parti</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270364.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate Bayardo11 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (B1) gene, parti</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KX270363.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate CVASU/DPP/Goat-3/2015 antigen protein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KU900748.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate CVASU/DPP/Goat-2/2015 antigen protein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KU900747.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Toxoplasma gondii isolate CVASU/DPP/Goat-1/2015 antigen protein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.29	100%	<a href="#">KU900746.1</a>

Fuente: Autor

**Figura 7.** BLAST grafico de los primers Toxo N2 modificado y Toxo C2 propuestos por Ponce & Gomez-Marín (2003).



Fuente: Autor

**Figura 8.** BLAST descriptivo de los primers Toxo N2 modificado y Toxo C2 propuestos por Ponce & Gomez-Marín (2003).

Buscar en la página Toxoplasma Sin resultados < > Opciones

Sequences producing significant alignments:  
 Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Sus scrofa</i> ERCC excision repair 1 endonuclease non-catalytic subunit (ERCC	36.2	36.2	85%	4.6	100%	<a href="#">XM_021093261.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Pygocentrus nattereri</i> uncharacterized LOC108427227 (LOC108427227), mRNA	36.2	36.2	85%	4.6	100%	<a href="#">XM_017897223.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Ziziphus jujuba</i> anaphase-promoting complex subunit 1 (LOC107413881), mRNA	36.2	36.2	85%	4.6	100%	<a href="#">XM_018021938.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Aptenx australis</i> mantelli genome assembly AptMant0_scaffold scaffold40	36.2	36.2	85%	4.6	100%	<a href="#">LK084862.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Sus scrofa</i> mRNA clone OVRM10131D12, expressed in ovary	36.2	36.2	85%	4.6	100%	<a href="#">AK235974.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Xenopus tropicalis</i> clone CH216-36J13, complete sequence	36.2	36.2	85%	4.6	100%	<a href="#">AC147893.3</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i> dnaJ homolog subfamily B member 1-like (LOC1	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">XM_023017907.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Acanthochromis polyacanthus</i> uncharacterized LOC110980255 (LOC1109802	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">XM_022207425.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Oryzias latipes</i> strain HSOK chromosome 1	34.2	64.4	85%	18	100%	<a href="#">CP020821.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Asparagus officinalis</i> ABC transporter E family member 2 (LOC109839972), tr	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">XM_020408447.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Asparagus officinalis</i> ABC transporter E family member 2 (LOC109839972), tr	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">XM_020408448.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Pelobacter acetylenicus</i> strain DSM 3246, complete genome	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">CP015455.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Pelobacter acetylenicus</i> strain DSM 3247 genome	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">CP015518.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> strain S40542 chromosome 1, complete sequence	34.2	64.4	80%	18	100%	<a href="#">CP015413.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> strain S4054249 chromosome 1, complete sequence	34.2	64.4	80%	18	100%	<a href="#">CP015411.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> strain S4054 chromosome 1, complete sequence	34.2	64.4	80%	18	100%	<a href="#">CP015415.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Tilletiaria anomala</i> UBC 951 hypothetical protein mRNA	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">XM_013385362.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Aptenx australis</i> mantelli genome assembly AptMant0_scaffold scaffold692	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">LK085323.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Schistosoma rodhaini</i> genome assembly S_rodhaini_Burundi_scaffold SROB_scaffold00004	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">LL957396.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Schistocephalus solidus</i> genome assembly S_solidus_NST_G2_scaffold SSLN_scaffold00016	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">LL922910.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Trichobilharzia regenti</i> genome assembly T_regenti_v1_0_4_scaffold TRE_scaffold0081434	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">LL063017.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Schistosoma rodhaini</i> genome assembly S_rodhaini_Burundi_scaffold SROB_scaffold00042	34.2	34.2	80%	18	100%	<a href="#">LL961231.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Halymorpha halys</i> putative thiamine transporter SLC35F3 (LOC106884320), t	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">XM_024359033.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Halymorpha halys</i> putative thiamine transporter SLC35F3 (LOC106884320), t	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">XM_024359031.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome X	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">CP027088.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome 24	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">CP027092.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome 21	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">CP027089.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome 19	32.2	62.4	76%	71	100%	<a href="#">CP027087.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome 2	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">CP027070.1</a>
<input type="checkbox"/> <i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome 1	32.2	62.4	100%	71	100%	<a href="#">CP027069.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Chrysemys picta bellii</i> RUN and FYVE domain containing 4 (RUFY4), mRNA	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">XM_024104847.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Oryzias latipes</i> anoctamin 5 (ano5), transcript variant X5, mRNA	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">XM_020703971.2</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Oryzias latipes</i> anoctamin 5 (ano5), transcript variant X4, mRNA	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">XM_020703970.2</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Oryzias latipes</i> anoctamin 5 (ano5), transcript variant X3, mRNA	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">XM_020703969.2</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Oryzias latipes</i> anoctamin 5 (ano5), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	76%	71	100%	<a href="#">XM_020703968.2</a>

Fuente: Autor

**Figura 9.** Resultados de análisis de primers con la herramienta bioinformática PCR Products.

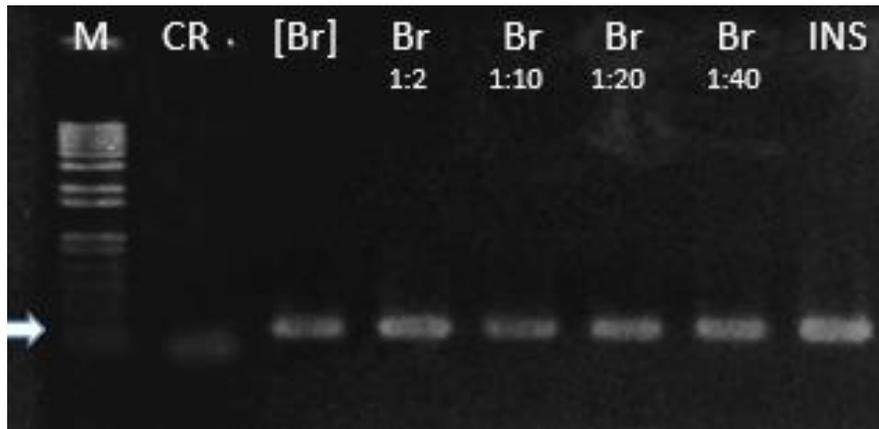
<b>A</b>	PCR Products results  >97 bp product from linear template AF179871.1 Toxoplasma gondii B1 gene, partial sequence, TGCATAGGTTGCAGTCACTGACGAGCTCCOCTCTGCTGGCGAAAAGTGAAATTCATGAGT ATCTGTGCAACTTTGGTGTATTGCGAGATTGGTCGCC
<b>B</b>	PCR Products results  No PCR products were obtained.

Fuente: Autor

**4.1.3.** PCR con control Positivo. Se observó el producto de amplificación con los primers en el ADN de referencia dado por el Dr. Ricardo Vitor del departamento de parasitología de la UFMG de Brasil (Br) y el dado por el Instituto Nacional de Salud de Bogotá (INS) con la mezcla establecida para las dos rondas de PCR (Figuras 11 y 12); fue visible que para la segunda ronda con los primers Toxo N2 modificado – Toxo C2 (Ponce & Gomez-Marín, 2003) se presentaba irregularidad en la detección del ADN del parásito como se muestra a continuación en la figura 11B.

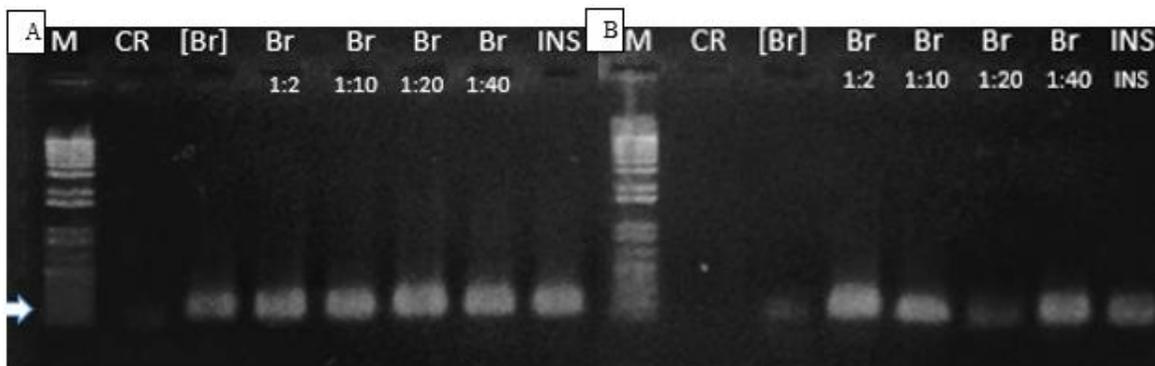
**4.1.4.** Prueba de sensibilidad. Con el fin de determinar la cantidad mínima de ADN detectable al haber modificado el número de ciclos de 14 a 30 se desarrolló la dilución del ADN de referencia obteniendo que esta prueba lograba detectar hasta 1fg (Figura 12).

**Figura 10.** Visualización de productos de la primera ronda de PCR con los primers Toxo N1 - Toxo C1 (127pb) sobre ADN de referencia en gel de agarosa al 1%. M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; Br) ADN de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* donado por el Dr. Ricaro Vitor de la UFMG; INS) ADN de la cepa RH de *T. gondii* referencia donado por el -INS de Bogotá.



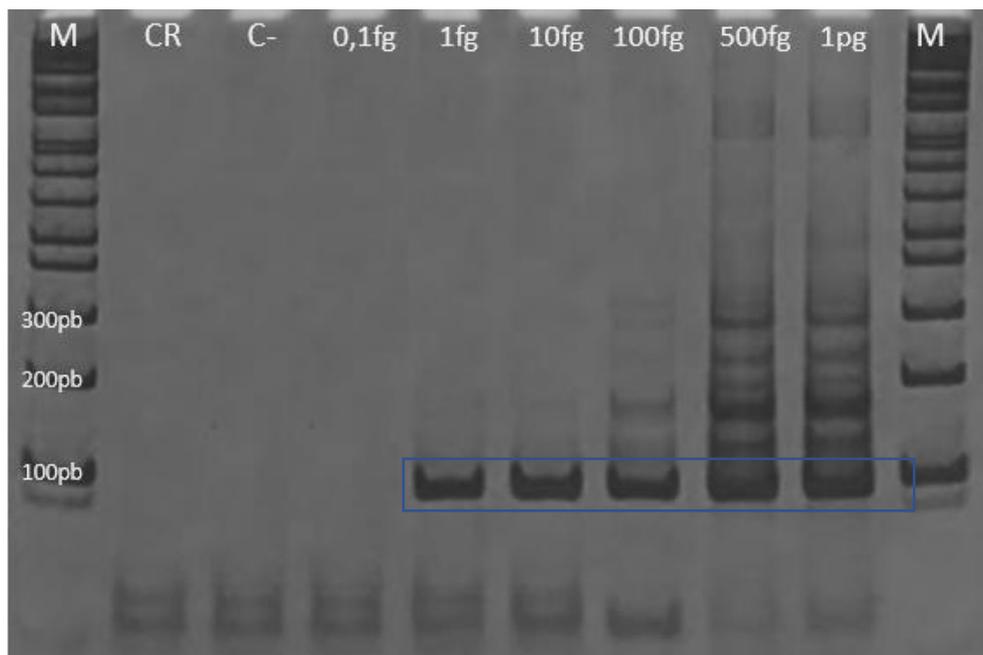
Fuente: Autor

**Figura 11.** Visualización de productos de la segunda ronda de PCR (97pb) sobre ADN de referencia en gel de agarosa al 1%: A. Primers Toxo N2 - Toxo C2 según Jones et al., (2000); B. Primers Toxo N2 .toxox C2 según Ponce & Gomez-Marín (2003). M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; Br) ADN de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* donado por el Dr. Ricaro Vitor de la UFMG; INS) ADN de la cepa RH de *T. gondii* referencia donado por el INS de Bogotá.



Fuente: Autor

**Figura 12.** Visualización del producto de la segunda ronda de PCR en gel de poliacrilamida al 6%. Diluciones de ADN de referencia. En recuadro azul, banda de 97pb obtenida usando los primers Toxo N2 - Toxo C2 (C. D. Jones et al., 2000). M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; C-) Control negativo (Agua destilada); canaletas de la 4 a las 9 diluciones de ADN de la cepa RH de *T. gondii*.



Fuente: Autor

#### 4.2. OBTENCIÓN DE ADN

Como resultado de los ensayos de digestión de la muestra se observó que al realizar la digestión de la muestra por 1h con Proteínasa K se obtuvo mayor cantidad de ADN según la cuantificación en Nanodrop 2000 (Tabla 8).

Al realizar la digestión a 56°C la muestra liberaba más fácilmente líquido (Buffer de lisis y contenido celular) mientras que al realizar la digestión a 37°C el volumen de muestra recuperado para realizar la extracción y purificación de ADN con la metodología de FCAI propuesta por Sambrook et al., (1989) era menor.

**Tabla 8.** Cantidad de ADN obtenido evaluando dos temperaturas de digestión de las muestras con PK.

Muestra de	37°C/16h		56°C/1h	
	ng/ $\mu$ L	Relación 260/280	ng/ $\mu$ L	Relación 260/280
<b>Chivo</b>	325,3	1,75	1263,2	1,86
<b>Chivo 2</b>	50,1	1,62	562,1	1,82
<b>Res</b>	40,5	1,47	161	1,7
<b>Conejo</b>	170	1,62	260	1,75
<b>Cerdo</b>	96,2	1,78	554,2	1,79
<b>Pollo</b>	278,2	1,76	64010,7	1,87

Fuente: Autor

Se realizó la prueba de detección por n-PCR estandarizada para *Toxoplasma gondii* a algunas de las muestras que presentaron mayor cantidad de ADN en la tabla 8, estas procedían de municipios diferentes a Ibagué y los organismos presentaban hábitos de cría orgánica, los resultados se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados de detección de muestras tomadas en otros municipios

Carne de	Coordenadas del lugar de compra	Municipio	Resultado de n-PCR
<b>Conejo</b>	4.927733, -75.061778	Libano	Positivo
<b>Chivo</b>	4.277671, -75.019129	Gualanday	Positivo
<b>Chivo 2</b>	4.277671, -75.019129	Gualanday	Negativo
<b>Cerdo</b>	4.253319, -74.985837	Potrerrillo	Positivo

Fuente: Autor

#### 4.3. MUESTRAS DE CARNES Y PREVALENCIA DE *T. gondii*

A continuación, se muestra el número de muestras tomadas para cada comuna y las coordenadas del lugar donde se adquirieron (Tabla 10). Los resultados obtenidos para cada tipo de carne por barrio se muestran en la tabla 11, con ayuda del software Epi-Info (CDC, versión 7.2.0.1) se ubicó en un mapa de la ciudad de Ibagué las muestras que dieron positivas para *Toxoplasma gondii* (Figura 13). Los cálculos de prevalencia (estimación de proporción) para cada tipo de carne y los intervalos de confianza en la tabla 12.

**Tabla 10.** Características de las comunas y coordenadas de las muestras tomadas.

Comuna	Muestras		
	N° de muestras	Barrio	Coordenadas
1	4	La Pola	4.447373, -75.245411
		San Pedro Alejandrino	4.434714, -75.230658
		Libertador	4.446410, -75.247684
		Centro	4.441307, -75.240402
2	5	Belencito	4.4493334, -75.239221
		Ancón	4.449743, -75.234765
		Santa Barbara	4.453609, -75.245356
		Belén	4.451084, -75.244811
		La Aurora	4.454901, -75.234970
3	4	Gaitán Parte Alta	4.443678, -75.215683
		Antonio Nariño	4.443840, -75.222876
		San Simón PB	4.442549, -75.219246
		El Carmen	4.443718, -75.230616
4	5	Calarcá	4.439641, -75.210106
		Gaitán Parte Baja	4.443640, -75.211440
		Onzaga	4.444200, -75.208005
		Restrepo	4.438040, -75.214959
		Sorrento	4.447586, -75.210789
5	5	Jordán 8va Etapa	4.440534, -75.193978
		La Campiña	4.442511, -75.189608
		Jordán 9na Etapa	4.441789, -75.202082
		Arrayanes	4.438694, -75.192310
		Jordán 7ma Etapa	4.442365, -75.195641
6	5	La Gaviota	4.454375, -75.180932
		Entre Ríos	4.446146, -75.188868
		Cañaveral	4.449237, -75.184412
		Plazas del Bosque	4.448963, -75.201540
		Los Mandarinos	4.453173, -75.203239

7	5	Salado	4.449820, -75.146532
		San Pablo	4.447365, -75.159341
		Santa Ana	4.443637, -75.164304
		Urb. Portales del Norte	4.447369, -75.150075
		Modelia II	4.450373, -75.133391
8	5	Topacio	4.440942, -75.162977
		Caminos del Norte/ Plaza del Jardín	4.443090, -75.173774
		Ciudadela Simón Bolívar	4.434414, -75.182698
		El Bunde	4.441160, -75.178343
		Ciudadela Simón Bolívar III	4.436170, -75.173660
9	6	Valparaíso	4.439268, -75.187921
		Jordán 3ra Etapa	4.436080, -75.194837
		Picaleña	4.398124, -75.141801
		Hacienda Piedra Pintada	4.432674, -75.204332
		Santa Rita	4.409308, -75.164390
		Villa Café	4.427452, -75.189630
10	5	Las Palmas	4.433871, -75.215875
		Montealegre	4.436033, -75.216881
		La Francia	4.433538, -75.221728
		Santa Helena	4.431488, -75.214161
		Hipódromo	4.438397, -75.224590
11	5	12 de octubre	4.431223, -75.230947
		Los Mártires	4.427266, -75.218032
		Refugio	4.427819, -75.233129
		Las Brisas	4.428634, -75.226832
		Bosque	4.427137, -75.221676
12	4	Ricaute	4.430935, -75.243748
		Ricaute/Parque	4.430415, -75.242418
		Kennedy	4.427426, -75.241778

		Yuldaima	4.433504, -75.238963
13	4	Granada	4.421427, -75.257337
		Miramar	4.425848, -75.252700
		Boquerón	4.414616, -75.263979
		San Isidro	4.427462, -75.256117

Fuente: Autor

**Tabla 11.** Resultados de la detección de muestras de carne.

Fecha de Compra	Barrio	Resultados n-PCR		
		Res	Pollo	Cerdo
24/04/2017	Gaitán Parte Alta	Positivo	Positivo	Negativo
26/04/2017	Las Palmas	Negativo	Negativo	Positivo
5/05/2017	La Pola	Positivo	Negativo	Negativo
6/06/2017	Belencito	Negativo	Negativo	Negativo
7/06/2017	Jordán 8va Etapa	Positivo	Negativo	Positivo
7/06/2017	Salado	Positivo	Negativo	Positivo
5/07/2017	Calarcá	Negativo	Negativo	Negativo
6/07/2017	Valparaíso	Negativo	Negativo	Negativo
7/07/2017	San Pedro Alejandrino	Negativo	Negativo	Negativo
16/07/2017	12 de octubre	Negativo	Negativo	Negativo
19/07/2017	La Gaviota	Negativo	Positivo	Negativo
21/07/2017	Ricaute	Positivo	Negativo	Negativo
21/07/2017	Granada	Negativo	Negativo	Positivo
21/07/2017	Miramar	Negativo	Negativo	Negativo
1/08/2017	Los Mártires	Positivo	Positivo	Negativo
2/08/2017	Topacio	Negativo	Negativo	Negativo
9/08/2017	Ricaute/Parque	Negativo	Negativo	Negativo
9/08/2017	Caminos del Norte/ Plaza del Jardín	Negativo	Negativo	Negativo
13/08/2017	Ancón	Negativo	Negativo	Negativo

Fecha de Compra	Barrio	Resultados n-PCR		
		Res	Pollo	Cerdo
13/08/2017	Antonio Nariño	Negativo	Negativo	Positivo
22/08/2017	Gaitán Parte Baja	Negativo	Negativo	Negativo
28/08/2017	La Campiña	Negativo	Negativo	Negativo
28/08/2017	Jordán 3ra Etapa	Negativo	Negativo	Negativo
9/09/2017	Entre Ríos	Negativo	Positivo	Negativo
9/09/2017	Montealegre	Negativo	Positivo	Negativo
11/09/2017	Santa Barbara	Negativo	Negativo	Negativo
11/09/2017	Libertador	Negativo	Positivo	Negativo
15/09/2017	La Francia	Positivo	Negativo	Negativo
15/09/2017	San Pablo	Negativo	Negativo	Positivo
13/10/2017	Santa Helena	Negativo	Negativo	Negativo
6/10/2017	Kennedy	Negativo	Positivo	Negativo
20/10/2017	San Simón PB	Negativo	Negativo	Negativo
20/10/2017	Onzaga	Negativo	Negativo	Positivo
27/10/2017	Picaleña	Negativo	Negativo	Positivo
29/10/2017	Jordán 9na Etapa	Negativo	Negativo	Negativo
2/11/2017	Santa Ana	Negativo	Negativo	Negativo
2/11/2017	Cañaverál	Negativo	Negativo	Positivo
17/11/2017	Refugio	Positivo	Negativo	Positivo
17/11/2017	Ciudadela Simón Bolívar	Positivo	Positivo	Negativo
26/11/2017	Yuldaima	Negativo	Negativo	Positivo
26/11/2017	Boquerón	Negativo	Negativo	Negativo
3/12/2017	Belén	Negativo	Negativo	Negativo
3/12/2017	Hacienda Piedra Pintada	Negativo	Negativo	Negativo
10/12/2017	Centro	Negativo	Negativo	Negativo
12/12/2017	Restrepo	Negativo	Negativo	Negativo
16/12/2017	Plazas del Bosque	Negativo	Negativo	Negativo
16/12/2017	El Carmen	Negativo	Negativo	Negativo

Fecha de Compra	Barrio	Resultados n-PCR		
		Res	Pollo	Cerdo
21/12/2017	El Bunde	Negativo	Negativo	Positivo
21/12/2017	Arrayanes	Negativo	Negativo	Negativo
14/01/2018	San Isidro	Negativo	Negativo	Negativo
14/01/2018	Las Brisas	Positivo	Negativo	Negativo
16/01/2018	Hipódromo	Negativo	Negativo	Negativo
16/01/2018	Urb. Portales del Norte	Negativo	Negativo	Negativo
22/01/2018	La Aurora	Negativo	Negativo	Negativo
23/01/2018	Santa Rita	Negativo	Negativo	Negativo
31/01/2018	Sorrento	Positivo	Negativo	Negativo
31/01/2018	Jordán 7ma Etapa	Negativo	Negativo	Negativo
4/02/2018	Ciudadela Simón Bolívar III	Negativo	Negativo	Positivo
4/02/2018	Villa Café	Negativo	Negativo	Negativo
4/02/2018	Modelía II	Negativo	Negativo	Negativo
4/02/2018	Bosque	Positivo	Negativo	Negativo
11/02/2018	Los Mandarinos	Negativo	Positivo	Positivo

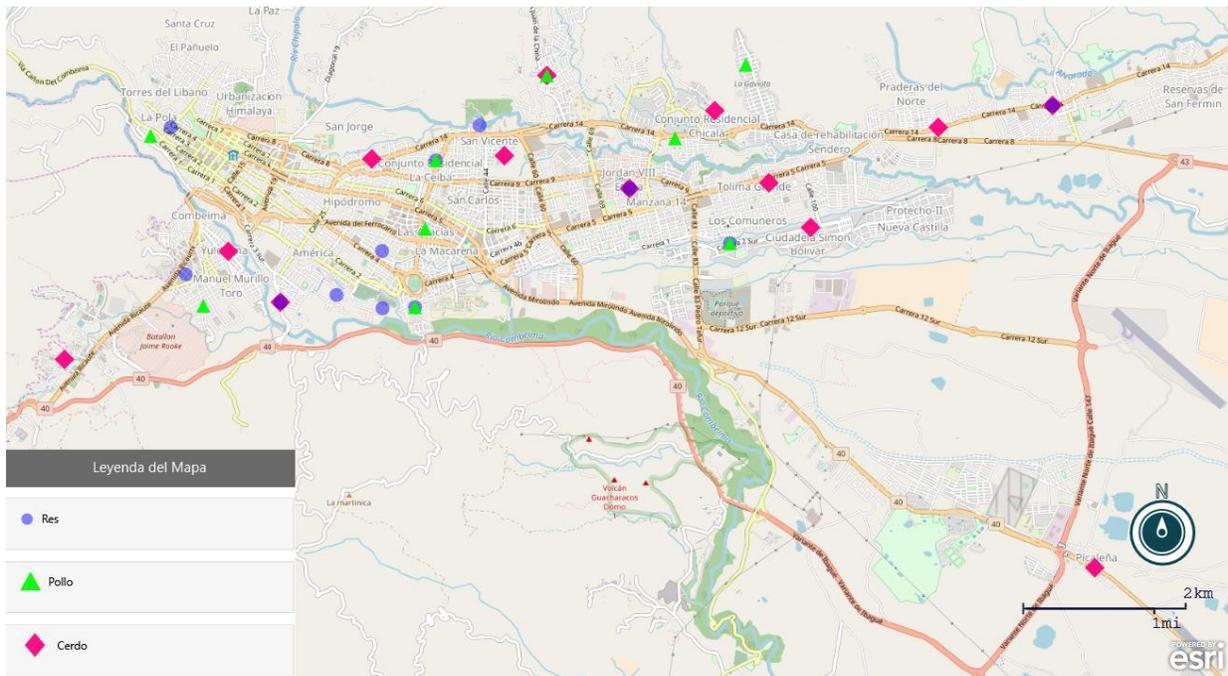
Fuente: Autor

**Tabla 12.** Estimaciones e intervalos de confianza de las muestras evaluadas.

Variable	x	n	Estimación	E.E.	IC de 95%	
					LI	LS
Carnes	35	186	0,1882	0,0287	0,1320	0,2443
Res	12	62	0,1935	0,0502	0,1042	0,3137
Pollo	9	62	0,1452	0,0447	0,0686	0,2578
Cerdo	14	62	0,2258	0,0531	0,1293	0,3497

Fuente: Autor

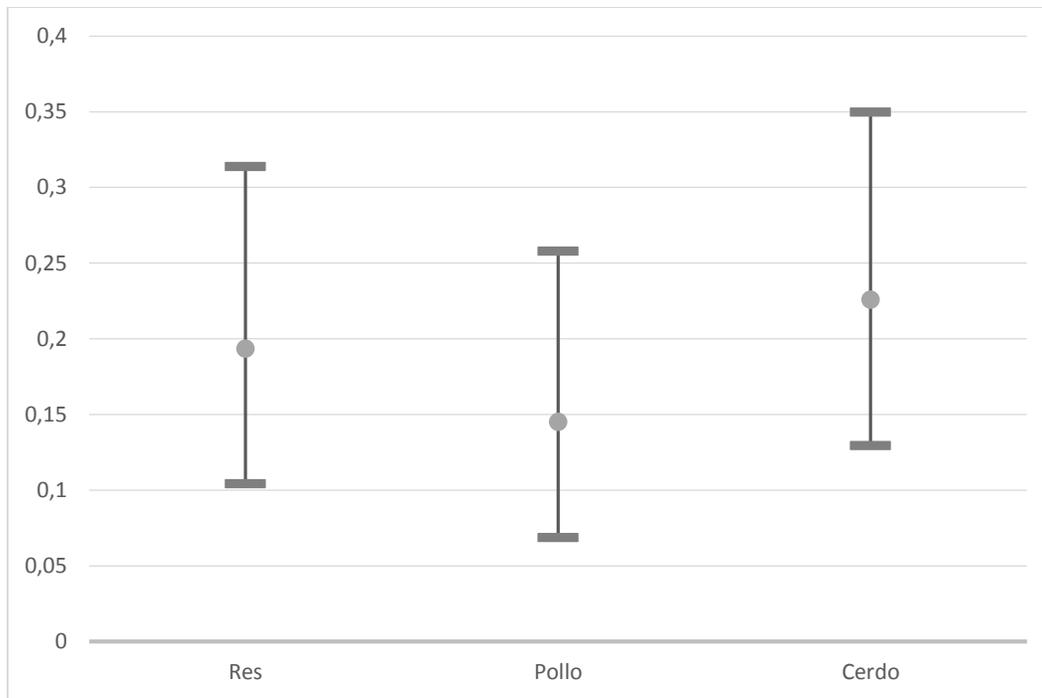
**Figura 13.** Ubicación de muestras positivas en la ciudad de Ibagué.



Fuente: Autor

Los resultados estadísticos mostraron una prevalencia de *T. gondii* (Estimación) del 18,82% para las muestras de carne (35 de 186), siendo la prevalencia más alta la de la carne de cerdo (22,58%) y la más baja en las muestras de carne de pollo (14,52%). Sin embargo, no existe diferencia significativa entre las prevalencias de las muestras evaluadas (Figura 14), se puede decir que los tres presentan un riesgo para la salud, pero ninguno significativamente más que otro.

**Figura 14.** Estimaciones e intervalos de confianza de las muestras evaluadas.



Fuente: Autor

#### 4.4. OTROS RESULTADOS

Dentro del ámbito de este proyecto se desarrollaron competencias en técnicas de biología molecular y análisis bioinformático, cumpliendo el objetivo de los grupos de investigación universitarios, como es la formación de nuevos recursos humanos en investigación, fortaleciendo así la comunidad científica regional y nacional.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA n-PCR

En este estudio se utilizó la técnica de PCR para estimar el grado de infección de *T. gondii* en estas fuentes de alimento humano (Campo-Portacio et al., 2014; Franco-Hernandez et al., 2015; Lora-Suárez et al., 2007), la ventaja de esta técnica es que una sola metodología permite hacer análisis en carnes de diferentes especies mientras que para los estudios basados en seroprevalencia para cada especie se requiere un anticuerpo secundario diferente, otra técnica es el bioensayo utilizando ratones o gatos que permite saber, además, si el parásito es viable, pero ésta es más costosa y prolongada de realizar (Hill & Dubey, 2002; Morisset et al., 2008).

Como se observa en la figura 12, hemos logrado detectar hasta 1 fg de ADN de referencia de *T. gondii* al aumentar el número de ciclos en la segunda reacción y usar los primers Toxo N2 – Txo C2 (C. D. Jones et al., 2000) mientras que Ponce & Gomez-Marín (2003) habían establecido 10fg con el primer Toxo N2 modificado y 14 ciclos como su límite de detección de ADN del parásito puro.

### 5.2. OBTENCIÓN DE ADN

Estudios en los que se lleva a cabo la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras de carne utilizan de kits de extracción de ADN de la muestra, ejemplo de estos son los de Bacci et al. (2015), Franco-Hernandez et al. (2015), Lora-Suárez et al. (2007) y Rahdar, Samarbaf-Zadeh, & Arab (2012); sin embargo, estos limitan la cantidad de muestra que se puede trabajar y la cantidad de ADN que se obtiene, por esto se optó por una metodología clásica que permite trabajar con una mayor cantidad de muestra, obteniendo una cantidad ADN igual o superior y de calidad idónea.

### 5.3. PREVALENCIA EN CARNES

Cualquier tipo de carne de animal de sangre caliente ha sido considerada tradicionalmente como una fuente importante de infección por *Toxoplasma* en los países occidentales, el riesgo asociado con el tipo de carne (pollo, cordero, cerdo y ternera, etc.) varía en los países, según los hábitos alimentarios locales y la prevalencia en los animales productores de carne (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). En reces, pollos y cerdos los quistes sobreviven entre 3 y 4 meses en corazón y músculo esquelético, estas características de resistencia hacen pensar que la infección persiste en estos animales de abasto (Hill & Dubey, 2002; Lora-Suárez et al., 2007). La carne contaminada es una fuente de infección importante para los seres humanos y en Colombia se ha encontrado que puede ser la fuente de infección para el 25% de los casos de toxoplasmosis durante el embarazo (Díaz et al., 2010).

Investigaciones a nivel mundial muestran amplios rangos de prevalencia en diferentes animales, para el presente estudio se encontró un 18,82%. Los resultados para Colombia han sido variables en cuanto a la prevalencia reportada en diferentes ciudades, ejemplo claro de este es el estudio realizado por Lora-Suárez et al. (2007) en el que se puede observar que tres ciudades del eje cafetero obtienen prevalencias para el mismo tipo de carnes trabajados en este estudio del 33% en Manizales (20% en res, 0% en pollo y 80% en cerdo), 65% en Pereira (45% en res, 70% en pollo y 60% en cerdo) y 60% en Armenia (80% en res, 25% en pollo y 70% en cerdo).

Las diferentes metodologías de producción de los animales, el tamaño de las granjas, las condiciones sanitarias y de bioseguridad como la presencia de insectos (cucarachas o insectos coprófagos), animales silvestres y foráneos, especialmente, gatos seropositivos y la cantidad de roedores infectado; asimismo, el sistema de control empleado, las fuentes de agua, la cercanía a las poblaciones urbanas y el uso de productos concentrados fabricados con materias primas de origen animal o vegetal contaminado pueden tener relación con la prevalencia del parásito en las distintas especies estudiadas.

A continuación, se analizarán cada tipo de carne y se compararán los resultados con diferentes estudios reportados.

**5.3.1. Prevalencia en carnes de res:** Los animales herbívoros, como el ganado bovino tienden, a adquirir el parásito consumiendo heno, pasturas, forraje o agua contaminada por ooquistes provenientes de heces de gatos (Kijlstra & Jongert, 2008). En este estudio se determinó una prevalencia del 19,35% para las muestras de res analizadas a lo largo del estudio; el nivel encontrado se aproxima al reportado por Lora-Suárez et al. (2007) para la ciudad de Manizales utilizando n-PCR sobre el gen *B1* (20% en res); sin embargo, diferentes prevalencias con amplias diferencias entre ellas han sido obtenidos incluso para una misma ciudad pero para plantas de sacrificio diferentes como lo muestra el estudio realizado por Franco-Hernandez et al., (2015) usando esta misma metodología de detección en el que dos tipos de plantas de sacrificio presentaron 63% de prevalencia del parásito para la planta tipo 1 (procesamiento de más de 480 bovinos y más de 400 cerdos cada 8 h) y un 10% para la planta tipo 2 (procesamiento de más de 320 bovinos y más de 240 cerdos cada 8 h).

**5.3.2. Prevalencia en carnes de pollo:** En carnes de pollo existe una baja prevalencia de la infección por *T. gondii* debido a las prácticas de manejo y condiciones de producción intensiva en que son criados este tipo de animales; al ser criados en galpones, no están en contacto con heces de gatos como lo pueden estar aquellos animales que deambulan abiertamente, y debido a que toman el alimento directamente de comederos tubulares y no del suelo que podría estar infectado con ooquistes se reduce la posibilidad de contraer la infección, sin embargo, queda abierta la posibilidad a su infección por medio de agua contaminada (Campo-Portacio et al., 2014; Liu et al., 2017; Triviño-Valencia et al., 2016). En el presente estudio, reportamos la presencia de *T. gondii* en el 14,52% de las muestras evaluadas, porcentaje cercano al reportado por J. E. Cárdenas Pérez et al. (2006) usando IFI en muestras de pollo del departamento de Caldas (16%).

Se ha visto que a medida que aumenta la edad de los individuos en una población las seroprevalencias aumentan debido a que ha sido mayor el tiempo de exposición al

parásito, ejemplo de esto es el estudio realizado por Juliao Ruiz et al. (1983) el cual reporta que el 32% de colombianos de entre 0-9 años han estado en contacto y podrían presentar quistes tisulares de *T. gondii* y este porcentaje aumenta al 65% en la población mayor de 60 años; debido a que los pollos que se comercializan actualmente tienen aproximadamente 60 días de vida su tiempo de exposición es poco y por tanto podría esperarse que este también sea un factor determinante para los niveles bajos de prevalencia.

**5.3.3. Prevalencia en carnes de cerdo:** El cerdo es un animal de hábitos omnívoros, estos pueden adquirir *T. gondii* de la misma manera que los herbívoros, además de infectarse por el consumo de ratones que llevan quistes tisulares o la ingesta de insectos con hábitos coprófagos (Kijlstra & Jongert, 2008). La carne de cerdo es una de las más consumidas en la actualidad (Lora-Suárez et al., 2007), asimismo, es una de las especies en la que más se ha aislado el parásito, por lo que su carne se ha considerado como la fuente más importante de transmisión de *T. gondii* para el hombre (Dubey, 2009b), en el presente trabajo encontramos una prevalencia del 22,58% de las muestras evaluadas, porcentaje cercano al reportado en lenguas de cerdo por Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzman-Marin, et al. (2016) en México (23,2%) usando n-PCR sobre la secuencia SAG1. Sin embargo, investigaciones a nivel mundial muestran prevalencias de hasta el 96,6% (Bacci et al., 2015; Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marin, et al., 2016).

## 6. CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra la utilidad de la técnica molecular PCR anidada (n-PCR) para la detección directa de *Toxoplasma gondii* en carnes comercializadas para el consumo humano. Además, es el primer trabajo de detección molecular de *T. gondii* realizado para la ciudad de Ibagué.

La prevalencia general de *T. gondii* en carnes (Res, pollo y cerdo) destinadas al consumo humano comercializadas en la zona urbana de la ciudad de Ibagué usando n-PCR fue del 18,82% (35/186).

Las carnes analizadas se pueden considerar como alimentos de riesgo potencial para la transmisión de la infección por *Toxoplasma gondii* según la prevalencia encontrada en el presente estudio y reportada en otros.

Los tres tipos de carne representan un riesgo para la infección por *T. gondii*, y pese a que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a su prevalencia se observa un mayor nivel de riesgo en el consumo de carne de cerdo (22,58%), seguido por el de res (19,35%) y por último el pollo (14,52%).

## RECOMENDACIONES

Se debe realizar la caracterización molecular de las muestras positivas para contribuir en mayor medida a los estudios de epidemiología de *Toxoplasma gondii* y establecer qué genotipos están circulando en las muestras de carne de consumo humano (Res, pollo y cerdo) para la ciudad de Ibagué y en qué porcentajes.

Es necesario llevar a cabo estudios de detección de *T. gondii* en frutas y verduras, agua y suelos para profundizar en la epidemiología de *T. gondii* en la ciudad de Ibagué para conocer los riesgos que pueden representar y los cuidados que se deben tener respecto a estos.

## REFERENCIAS

- Adl, S. M., & Needs Authors, O. (2013). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryote Microbiology*, 59(5), 1-45. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>.The
- Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., ... Dardé, M.-L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of infectious diseases*, 186(5), 684-689. <https://doi.org/10.1086/342663>
- Ajzenberg, D., Dumètre, A., & Dardé, M. (2005). Multiplex PCR for Typing Strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of clinical microbiology*, 43(4), 1940-1943. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1940>
- Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J., ... Villena, I. (2009). Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Toxoplasmosis in Immunocompromised Patients and Correlation with Clinical Findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(8), 1155-1167. <https://doi.org/10.1086/597477>
- Al-Kappany, Y. M., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Kwok, O. C. H., Abu-Elwafa, S. a, Hilali, M., & Dubey, J. P. (2010). High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: isolation of viable *Toxoplasma gondii*, tissue distribution, and isolate designation. *The Journal of parasitology*, 96(6), 1115-1118. <https://doi.org/10.1645/GE-2554.1>
- Alcaldía de Ibagué. (2012). *Plan de Desarrollo Socioeconómico y Territorial : Comuna 12*.
- Alcaldía de Ibagué. Decreto 0823 del 2014 (2014).
- Alcaldía de Ibagué. (2016). *Plan de Desarrollo 2016-2019*.
- Alvarez, C., de la Torre, A., Vargas, M., Herrera, C., Uribe-Huertas, L. D., Lora-Suárez, F. M., & Gomez-Marin, J. E. (2015). Striking Divergence in *Toxoplasma* ROP16 Nucleotide Sequences From Human and Meat Samples. *The Journal of infectious diseases*, 211(12), 2006-2013. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu833>
- Bacci, C., Vismarra, A., Mangia, C., Bonardi, S., Bruini, I., Genchi, M., ... 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,

54-56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.002>

- Bahia-Olivera, L., Gomez-Marín, J. E., & Shapiro, K. (2017). GLOBAL WATER PATHOGEN PROJECT. En R. Fayer & W. Jakubowski (Eds.), *Global Water Pathogen Project*. Michigan State University, E. Lansing, MI.: UNESCO.
- Barrios, J. E., Duran Botello, C., & González Velásquez, T. (2012). Nephrotic syndrome with a nephritic component associated with toxoplasmosis in an immunocompetent young man. *Colombia Medica*, *43*(3), 226-229.
- Black, M. W., & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *64*(3), 607-623. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>
- Blader, I., Coleman, B., Chen, C., Gubbels, M., & Hill, C. (2016). The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later, 463-485. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>.The
- Blanco, P. J., Assia-Mercado, Y. M., Montero-Perez, Y. M., & Orozco-Mendez, K. E. (2011). ELFA IgG anti-Toxoplasma y PCR anidada para el diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres gestantes de Sincelejo, Colombia. *Infectio*, *15*(4), 253-258. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70739-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70739-1)
- Boughattas, S., Ayari, K., Sa, T., Aoun, K., & Bouratbine, A. (2014). Survey of the parasite *Toxoplasma gondii* in human consumed ovine meat in Tunis City. *PLoS ONE*, *9*(1), 1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085044>
- 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), 1787-1792.
- Camossi, L. G., Greca-Júnior, H., Correa, A. P. F. L., Richini-Pereira, V. B., Silva, R. C., Da Silva, A. V., & Langoni, H. (2011). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Veterinary Parasitology*, *177*(3-4), 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.007>
- Campo-Portacio, D. M., Discuviche-Rebolledo, M. A., Blanco-Tuiran, P. J., Montero-Perez, Y. M., Orozco-Mendez, K. E., & Assia-Mercado, Y. M. (2014). Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen *B1* en carnes de consumo humano. *Infectio*, *18*(3), 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.05.001>

- 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 & vectors*, 7, 427. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-427>
- Cárdenas Pérez, J. E., Aricapa Giraldo, H. J., Ríos Candelo, S. M., Guevara Garay, L. A., Meza Osorio, J. A., & Correa Salgado, R. A. (2006). PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- *Toxoplasma gondii* EN CUATRO ESPECIES DE CONSUMO HUMANO EN CALDAS-COLOMBIA ANTIBODY PREVALENCE IN SPECIES OF HUMAN CONSUMPTION IN CALDAS , COLOMBIA. *Biosalud*, 5, 33-42.
- Cárdenas Pérez, J. E., Giraldo Aricapa, H. J., Ríos Candelo, S. M., Garay Guevara, L. A., Meza Osorio, J. A., & Correa Salgado, R. A. (2006). PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI- *Toxoplasma gondii* EN CUATRO ESPECIES DE CONSUMO HUMANO EN CALDAS-COLOMBIA. *Biosalud*, 5, 33-42.
- CDC - Toxoplasmosis - Biology. (2015).
- CDC - Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors. (2015).
- Chabbert, E., Lachaud, L., Crobu, L., & Bastien, P. (2004). Comparison of Two Widely Used PCR Primer Systems for Detection of Toxoplasma in Amniotic Fluid , Blood , and Tissues Comparison of Two Widely Used PCR Primer Systems for Detection of Toxoplasma in Amniotic Fluid , Blood , and Tissues. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1719-1722. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1719>
- Cortés Cortés, L. J., Hernández Castro, D. C., Mantilla, M., Medina, M. I., & Duque, S. (2014). Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección del gen *B1* de *T. gondii*. *NOVA*, 12, 137-141.
- Costa, J.-M., Alanio, A., Moukoury, S., Clairet, V., Debruyne, M., Poveda, J.-D., & Bretagne, S. (2013). Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluids based on *B1* gene polymorphism using minisequencing analysis. *BMC infectious diseases*, 13, 552. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-552>
- da Silva, A. V., de Oliveira, M. A., Pezerico, S. B., Domingues, P. F., & Langoni, H. (2005). Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. *Parasitología latinoamericana*, 60, 65-68. <https://doi.org/10.4067/S0717-77122005000100011>
- da Silva, P. de C., Shiraishi, C. S., da Silva, A. V., Goncalves, G. F., Goncales Sant'Ana,

- D. de M. G., & Araújo, E. J. de A. (2010). *Toxoplasma gondii*: A morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Experimental Parasitology*, 125(4), 380-383. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.004>
- de A Dos Santos, C. B., de Carvalho, A. C. F. B., Ragozo, A. M. a, Soares, R. M., Amaku, M., Yai, L. E. O., ... Gennari, S. M. (2005). First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary parasitology*, 131, 207-211. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.039>
- Derouin, F., Howe, D. K., & Honore, S. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with Determination of Genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1411-1414. [https://doi.org/0095-1137/97/\\$04.0010](https://doi.org/0095-1137/97/$04.0010)
- Díaz, L., Zambrano, B., Chacón, G., Rocha, A., & Díaz, S. (2010). Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 70(3), 190-205. [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(14\)69287-0](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(14)69287-0)
- Dubey, J. P. (2009a). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 877-882. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>
- Dubey, J. P. (2009b). Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 89-103. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018>
- Dubey, J. P., Darrington, C., Tiao, N., Ferreira, L. R., Choudhary, S., Molla, B., ... Gebreyes, W. a. (2013). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from Addis Ababa, Ethiopia. *The Journal of parasitology*, 99(1), 56-8. <https://doi.org/10.1645/GE-3229.1>
- Dubey, J. P., Navarro, I. T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R. L., Kawabata, H. H., ... Isabel, S. (2004). *TOXOPLASMA GONDII* INFECTIONS IN CATS FROM PARANA SEROPREVALENCE , TISSUE DISTRIBUTION , AND BIOLOGIC AND GENETIC CHARACTERIZATION OF ISOLATES linked to drinking water from a municipal water reservoir in. *Society*, 90(4), 721-726.
- Dubey, J. P., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., ... Jones, J. L. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated

- from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 41(8), 827-833. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.006>
- Fabiani, S., Pinto, B., & Bruschi, F. (2013). Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: Can serological studies establish a clear relationship? *Neurological Sciences*, 34(4), 417-425. <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1197-4>
- Ferra, B., Holec-Gašior, L., & Kur, J. (2015). Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. *Parasitology international*, 64(5), 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.03.004>
- Fondo Ganadero del Tolima, W. (2018). Fonodo Ganadero del Tolima S.A./Dirección mercadeo de servicios.
- Franco-Hernandez, E. N., Acosta, A., Cortés-Vecino, J., & Gómez-Marín, J. E. (2015). Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. *Parasitology Research*, (November). <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4790-7>
- Freyre, A., & Falcón, J. (1990). Perfil de la transmisión de toxoplasmosis en algunos países de latinoamérica. *VETERINARIA*, 25, 5-13.
- Gómez Marín, J. E., Zuluaga, J. D., Pechené Campo, E. J., Triviño, J., & de-la-Torre, A. (2018). Polymerase chain reaction (PCR) in ocular and ganglionar toxoplasmosis and the effect of therapeutics for prevention of ocular involvement in South American setting. *Acta Tropica*, (November 2017), 0-1. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.013>
- Hashemi-Fesharki, R. (1996). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle , sheep and goats in Iran. *Veterinary Parasitology*, 61, 1-3. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00818-7](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00818-7)
- Hernández-Cortazar, I. B., Acosta-Viana, K. Y., Guzmán-Marin, E., Ortega-Pacheco, A., Torres-Acosta, J. F. de J., & Jimenez-Coello, M. (2016). Presence of *Toxoplasma gondii* in Pork Intended for Human Consumption in Tropical Southern Mexico. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(12), 695-699. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2165>

- Hernández-Cortazar, I. B., Acosta-Viana, K. Y., Guzman-Marin, E., Segura-Correa, J. C., Ortega-Pacheco, A., Carrillo-Martínez, J. R., ... Jimenez-Coello, M. (2016). *Toxoplasma gondii* in women with recent abortion from Southern Mexico. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(3), 193-198. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)61012-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61012-X)
- Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(10), 634-640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease Function p30 Surface Antigen p22 Surface Antigen Rhoptry protein Unknown cDNA Unknown Unknown cDNA. *The Journal of Infectious Diseases*, 1561-1566.
- Jones, C. D., Okhravi, N., Adamson, P., & Tasker, S. (2000). Comparison of PCR Detection Methods for B1, P30 and 18S rDNA Genes of T. Gondii in Aqueous Humor. *Investigative Ophthalmology*, 41(3), 634-644. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8)
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2012). Foodborne Toxoplasmosis. *Journal of Food Safety*, 55(1), 845-851. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00063.x>
- Juliao Ruiz, O., Corredor Arjona, A., & Moreno Moreno, G. S. (1983). Estudio Nacional de Salud, Toxoplasmosis en Colombia.
- Kijlstra, A., & Jongert, E. (2008). Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *International Journal for Parasitology*, 38(12), 1359-1370. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.002>
- Kijlstra, A., & Jongert, E. (2009). Toxoplasma-safe meat: close to reality? *Trends in Parasitology*, 25(1), 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.008>
- Kim, K. (2015). A Bradyzoite is a Bradyzoite is a Bradyzoite? *Trends in Parasitology*, 31(12), 610-612. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.005>
- Lass, a., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., & Myjak, P. (2012). The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1414-8>

- Lester, D. (2012). *Toxoplasma gondii* and Homicide. *Psychological Reports*, 111(1), 196-197. <https://doi.org/10.2466/12.15.16.PR0.111.4.196-197>
- Lilly, E. L., & Wortham, C. D. (2013). High prevalence of *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. *Parasites & vectors*, 6(1), 266. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-266>
- Liu, X. C., He, Y., Han, D. G., Zhang, Z. C., Li, K., Wang, S., ... Li, X. R. (2017). Detection of *Toxoplasma gondii* in chicken and soil of chicken farms in Nanjing region, China. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0277-3>
- Lora-Suárez, F. M., Aricapa, H., Perez JE, Arias, L., Idarraga, S., Mier, D., & Gomez-Marín, J. E. (2007). Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. *Infectio*, 11(3), 117-123.
- Luft, B. J., Hafner, R., Korzun, A. H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E. M., ... Remington, J. S. (1993). Toxoplasmic Encephalitis in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med*, 329(14), 995-1000. <https://doi.org/DOI:10.1056/NEJM199309303291403>
- Maharana, B., Panigrahi, M., Baithalu, R. K., Parida, S., & Allaie, I. M. (2010). Toxoplasmosis: Beware of cats !!! *Veterinary World*, 3(5), 247-249.
- Martín-Hernández, I., & García-Izquierdo, S. M. (2003). Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*, 28(3), 19-27.
- Meireles, L. R., Galisteo, a. J., Pompeu, E., & Andrade, H. F. (2004). *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Tropical Medicine and International Health*, 9(8), 876-881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01280.x>
- Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet*, 363(9425), 1965-1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Morisset, S., Peyron, F., Lobry, J. R., Garweg, J., Ferrandiz, J., Musset, K., ... Cesbron-Delauw, M. F. (2008). Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes and Infection*, 10(7), 742-747.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.001>

- 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), 101-107. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu721>
- Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K., & Evers, E. G. (2011). A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, *150*(2-3), 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.022>
- Parasites - Neglected Parasitic Infections (NPIs). (2016).
- Pedersen, M. G., Mortensen, P. B., Norgaard-Pedersen, B., & Postolache, T. T. (2012). *Toxoplasma gondii* Infection and Self-directed Violence in Mothers. *Archives of General Psychiatry*, *69*(11), 1. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.668>
- Pfaff, A. W., Rochet, E., Brunet, J., Sabou, M., Sauer, A., Bourcier, T., ... Candolfi, E. (2014). New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, *44*(2), 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.007>
- POLLOSGAR. (2018). POLLOSGAR/ProcesoProductivo.
- Ponce, N. C., & Gomez-Marín, J. E. (2003). Estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa ( PCR ) para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH. *Infectio*, *7*, 8-14.
- Radke, J. R., & White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *94*(2), 237-247. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00074-7)
- Rahdar, M., Samarbaaf-Zadeh, A. R., & Arab, L. (2012). Evaluating the prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat and meat products in Ahvaz by PCR method. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *5*(4), 570-573. <https://doi.org/10.5812/jjm.4280>
- Restrepo Isaza., M. (2007). Toxoplasmosis: parasitic zoonosis. *CES med*, *21*(Supl 1), 41-48. Recuperado a partir de <http://www.ces.edu.co/descargas/Toxoplasmosis.pdf>
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(2), 264-296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

- Saavedra, G. M., & Ortega, Y. R. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from slaughterhouses in Lima, Peru, and Georgia, U.S.A. *The Journal of parasitology*, 90(4), 902-904. <https://doi.org/10.1645/GE-258R>
- Salant, H., Spira, D. T., & Hamburger, J. (2010). A comparative analysis of coprologic diagnostic methods for detection of toxoplasma gondii in cats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 865-870. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0635>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (N. Ford, C. Nolan, & M. Ferguson, Eds.) (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Groß, U., Pleyer, U., & Lüder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 917-929. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>
- Shen, C., Zhang, G., Song, X., Xie, S., & Wang, C. (2015). *Toxoplasma gondii* Pneumonia in an Immunocompetent Individual. *The American Journal of the Medical Sciences*, 350(1), 70-71. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000496>
- 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), 453-61. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
- Sibley, L. D., Mordue, D. G., Su, C., Robben, P. M., & Howe, D. K. (2002). Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1417), 81-8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1017>
- Silva, L. A., Andrade, R. O., Carneiro, A. C., & Vitor, R. (2014). Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS ONE*, 9(2), 3-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090237>
- Simon, J. A., Kurdzielewicz, S., Jeannot, E., Dupuis, E., Marnef, F., Aubert, D., ... Poulle, M. L. (2017). Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. *International Journal for Parasitology*, 47(6), 357-367.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.01.004>
- Slifko, T. R., Smith, H. V., & Rose, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1379-1393. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00128-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00128-4)
- Smith, J. E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: The cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 25(11), 1301-1309. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00067-C](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00067-C)
- Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., & Sibley, L. D. (2003). Recent Expansion of *Toxoplasma* Through Enhanced Oral Transmission. *Science*, 299(5605), 414-416. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>
- 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), 1-11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>
- 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), 841-848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1217-1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Torres, L., Robinson, S., Kim, D., Yan, A., Cleland, T. A., & Bynoe, M. S. (2018). *Toxoplasma gondii* alters NMDAR signaling and induces signs of Alzheimer ' s disease in wild-type , C57BL / 6 mice, 1-19.
- Triviño-Valencia, J., Lora-Suárez, F. M., Zuluaga, J. D., & Gomez-Marin, J. E. (2016). Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitology Research*, 115(5), 1789-1797. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5>
- Wang, T., Liu, M., Gao, X. J., Zhao, Z. J., Chen, X. G., & Lun, Z. R. (2011). *Toxoplasma gondii*: The effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice. *Experimental Parasitology*, 127(1), 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.003>

- WEB de la Alcaldía Municipal de Ibagué. (2018). Alcaldia Municipal de Ibagué/Localización. Recuperado a partir de <http://www.ibague.gov.co/portal/seccion/contenido/index.php?type=3&cnt=53>
- Weiss, L., & Dubey, J. (2009). Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 895-901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>.Toxoplasmosis
- Wells, B., Shaw, H., Innocent, G., Guido, S., Hotchkiss, E., Parigi, M., ... Katzer, F. (2015). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Research*, 87, 175-181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.015>
- Yang, Y., Ying, Y., Verma, S. K., Cassinelli, A. B. M., Kwok, O. C. H., Liang, H., ... Dubey, J. P. (2015). Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China. *Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.006>
- Zulpo, D. L., Headley, S. A., Biazzono, L., da Cunha, I. A. L., Igarashi, M., de Barros, L. D., ... Garcia, J. L. (2012). Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology*, 131(2), 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.006>

# **ANEXOS**

## **Anexo A.** Protocolo de extracción de ácidos nucleicos por Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (FCAI)

### **Extracción de ácidos nucleicos por FCAI**

- A 500  $\mu$ L de muestra digerida, adicionar el mismo volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
- Mezclar por inversión suavemente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 3 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo y agregar un volumen igual de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1).
- Mezclar por inversión durante 5 minutos
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 3 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo, agregar 10% de volumen de acetato de sodio 3 M y el doble de volumen de etanol absoluto frio.
- Mezclar por inversión.
- Colocar el tubo en cama de hielo durante 15 minutos.
- Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 500  $\mu$ L de etanol al 70%.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante, dejar secar el pellet y agregar 50  $\mu$ L de TE (Tris-EDTA, pH 8.0).
- Almacenar a 4 °C. Hasta la purificación

### **Purificación de ADN por Fenol Cloroformo Alcohol-Isoamílico**

- Adicionar a la muestra 450  $\mu$ L de H<sub>2</sub>Odd y 2,5  $\mu$ L de ribonucleasa A (Solución de trabajo 50  $\mu$ g/mL).
- Dejar en digestión en baño María durante 1 hora a 37°C.

- Repetir el procedimiento de extracción por el método Fenol- Cloroformo- Alcohol Isoamílico.
- Resuspender en 50  $\mu$ L de TE (Tris-EDTA pH 8.0)
- Almacenar a 4°C

#### **Preparación de FCAI (25:24:1) y CAI (24:1)**

- Para un volumen de 100 mL de FCAI, adicionar 50 mL de fenol saturado con Tris-HCl, 48 mL de cloroformo y 2 mL de alcohol isoamílico.
- Para un volumen de 100 mL de CAI, mezclar 96 mL de cloroformo y 4 mL de alcohol isoamílico

#### **Preparación de acetato de sodio 3M pH 5,2 (100 mL)**

Pesar 40,81 g de Acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ ) y llevar a 100 mL de  $H_2O$ . Medir y ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial, y autoclavar a 15 Lb durante 10 minutos.

#### **Preparación de TE (50 mL)**

Mezclar 0,5 mL de Tris-HCl 1M pH 8 y 0,1mL EDTA 0,5M pH 8. Adicionar 49,4 mL de  $H_2O$ .

## **Anexo B.** Cuantificación por espectrofotometría: NanoDrop.

Antes de iniciar la cuantificación, es necesario disponer de los elementos necesarios:

- NanoDrop
- Computador con el software de cuantificación
- Papel de arroz
- Micropipeta de 0,5 – 10  $\mu\text{L}$
- Punteras correspondientes a la micropipeta
- Descartador
- Muestras a cuantificar con su respectivo blanco (deben estar a temperatura ambiente).

### Procedimiento

- 1) Conecte el NanoDrop a la UPS o estabilizador.
- 2) Conecte el cable USB del NanoDrop al puerto correspondiente del computador.
- 3) Abra el acceso directo del programa Nanodrop-ND2000.
- 4) En el menú principal del programa, escoja el grupo registrado bajo el cual va a realizar el trabajo.
- 5) Nuevamente, en el menú principal seleccione la APLICACIÓN que va a utilizar (nucleic acids).
- 6) Proceda a calibrar con la solución blanco que será TE (disolvente donde se conserva la muestra). Para ello tome 1  $\mu\text{L}$  de TE y ubíquela sobre el pedestal inferior, luego baje el brazo del pedestal superior, quedando la gota atrapada entre ambos pedestales.
- 7) Verificar que la gota se vea formando una columna líquida entre ambos pedestales, esto permitirá que el haz de luz de la lámpara de Xenón la atraviese y se pueda cuantificar la muestra.
- 8) Seleccione la casilla solapar espectro
- 9) Limpie los pedestales con agua destilada empleando papel de arroz.
- 10) Tome 1  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN a cuantificar y ubíquela sobre el pedestal inferior, luego baje el brazo del pedestal superior, quedando la gota atrapada entre ambos pedestales. A continuación, se da medir

11) Tome el registro de los datos necesarios.

12) Repita el paso 9.

NOTA: Realice la medición del blanco cada 8 muestras.

### **Anexo C. Electroforesis en gel de agarosa 1%**

- Ensamblar la cámara molde del gel y colocar el peine.
- En un frasco de vidrio agregar 1 g de agarosa y llevar a 100 mL con TBE 0.5X nuevo, tapar con vinipel y perforar con una punta.
- Fundir la agarosa en horno microondas durante 3 minutos.
- Completar el volumen perdido con agua destilada.
- Enfriar la agarosa, teniendo cuidado que esta no se gelifique en el frasco, adicionar 1,5  $\mu$ L de GelRed (10,000X).
- Servir la agarosa en la cámara desde una esquina para evitar la formación de burbujas y esperar aproximadamente 30 minutos para que gelifique. Cuando el gel está listo, se puede ver translúcido.
- Adicionar en la cuba de electroforesis el buffer de corrido TBE 0.5X.
- Retirar los peines de la cámara molde del gel y colocar el gel en cámara de electroforesis.
- Agregar buffer de carga a las muestras dependiendo del volumen de la muestra.
- Sembrar 10  $\mu$ L la muestra en las canaletas (Evite tocar el gel con la puntera).
- Coloque la tapa de la cámara y conecte los cables a la fuente de poder en su respectivo polo.
- Dejar correr la electroforesis a 100 V por ~ 60 minutos (Depende del tamaño de la muestra).
- Luego de finalizar el corrido, visualizar en transiluminador con luz UV, tome la fotografía y discuta los resultados sobre esta.

### **Preparación de TBE**

La preparación de TBE consiste en adicionar todos los componentes y homogenizarlos usando un agitador magnético. Puede almacenarse a temperatura ambiente.

**Tabla 13.** Componentes de TBE 5X

Componente	Volumen	
	1 L	2 L
Tris Base (g)	54	108
Ácido bórico (g)	27,5	55
EDTA 0,5 M pH 8.0 (mL)	20	40
H <sub>2</sub> O	Completar el volumen	

Fuente: LIPT

**Tabla 14.** Preparación de TBE diluido

Concentración	Volumen			
	500 mL		1000 mL	
	TBE 5X (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	TBE 5X (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)
0,5X	50	450	100	900
1X	100	400	200	800

Fuente: LIPT

**Preparación de 50 mL de EDTA 0,5 M pH 8.0:**

1. Pesar 9,30 g de EDTA. 2H<sub>2</sub>O
2. Adicionar 30 mL de H<sub>2</sub>O y homogenizar
3. Medir y ajustar el pH con lentejas de NaOH al comienzo y luego con solución de NaOH 1N.
4. Completar los 50 mL con H<sub>2</sub>O
5. Autoclavar a 15psi por 15 minutos.

**Buffer de carga**

Para preparar 10 mL de buffer de cargar se pesa 0,025 g de Azul de bromofenol (0,25%) y 4 g de sacarosa (40%) y se afora a 10 mL con H<sub>2</sub>O. La relación es 1 µL de buffer de carga por cada 5 µL de muestra.

### **Marcador de peso molecular**

Mezclar 16 µL de Buffer de carga 6X, con 80 µL de TBE 1X nuevo y adicionar 4 µL de Marcador de peso molecular (1µg/µL).

## Anexo D. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%

**Tabla 15.** Componentes para preparar gel de acrilamida al 6%

Reactivos	Volumen	
	10mL	12mL
H <sub>2</sub> Odd (mL)	6	7,2
Acrilamida 30% (mL)	2	2,4
TBE 5X (mL)	2	2,4
Persulfato de amonio (μL)	80	84
TEMED (μL)	4	4,2

Fuente: LIPT

### Procedimiento:

- Limpiar vidrios, separadores y cauchos con agua desionizada y etanol 70%, secar con un paño limpio.
- Ensamblar la cámara molde del gel de poliacrilamida.
- Adicionar agua a la cámara, esperar de 1 a 3 minutos, para verificar que no haya filtración. Seguidamente retirar el agua y secar la.
- Mezclar en un recipiente de vidrio limpio los componentes del gel de poliacrilamida.
- Servir la solución de poliacrilamida en la cámara de electroforesis, colocar el peine adecuado teniendo en cuenta que no se formen burbujas.
- Esperar a que el gel se polimerice.
- Adicionar buffer de carga a las muestras (1 μL de buffer de carga 6X por cada 5 μL de muestra)
- Retirar el peine, lavar las canaletas con agua desionizada y TBE 1X nuevo utilizando jeringa para retirar el exceso de acrilamida.
- Realizar el montaje de la cámara molde en la cámara de electroforesis, agregar TBE 1X en los contenedores de la cámara.
- Sembrar aproximadamente 4 μL de muestra en cada canaleta.

- Conectar los cables a la fuente de poder y dejar a 80 voltios (El tiempo del corrido varía dependiendo del tamaño del gel fragmento y el área del gel)

### Preparación de acrilamida al 30%

**Tabla 16.** Componentes de la Acrilamida al 30%

<b>Componente</b>	<b>100 mL</b>
Acrilamida	29(g)
NN-metilen-bisacrilamida	1(g)
H <sub>2</sub> O	Aforar a 100 (mL)

Fuente: LIPT

#### Procedimiento:

- Pesar los componentes y se adicionan en un frasco previamente rotulado con la cantidad de H<sub>2</sub>O a utilizar. Es necesario usar doble guante, tapaboca, careta y bata manga larga como medidas de protección para pesar los componentes, ya que la acrilamida es neurotóxica.
- Adicionar H<sub>2</sub>O y llevar a baño de maría a 37 °C hasta que se disuelva.
- Cubrir con papel aluminio el frasco, rotularlo y almacenarlo a 4 °C

### Preparación de persulfato de amonio 10%

Pesar 1g de persulfato de amonio y llevar a 10mL con H<sub>2</sub>O.

### Protocolo coloración con nitrato de plata para geles de poli(acrilamida) al 6%

**Tabla 17.** Componentes de las soluciones usadas para la coloración de geles de poliacrilamida al 6%

<b>Solución Fijadora</b>	
Etanol absoluto	40mL
Ácido acético	1mL
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Llevar a 400 mL
<b>Solución con Nitrato de Plata</b>	
Nitrato de plata	0,15 g
Solución fijadora	50 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	100 mL
<b>Solución Reveladora</b>	
Formaldehido	1 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	140 mL
NaOH	2 g

Fuente: LIPT

Procedimiento:

- Preparar cada una de las soluciones (Fijadora, nitrato de plata y reveladora).
- Cuando el corrido haya finalizado, adicionar la solución fijadora en una bandeja limpia y en ella colocar el gel de poliacrilamida. Desmontar el gel de poliacrilamida retirando los vidrios, verificar la orientación del gel.
- Agitar suavemente durante 5 minutos
- Retirar la solución fijadora y adicionar la solución de nitrato de plata. Agitar suavemente durante 10 minutos.
- Retirar la solución de nitrato de plata, lavar rápidamente con agua desionizada. Seguidamente, retire el agua.
- Adicionar la solución reveladora y agitar constantemente hasta que sean visibles las bandas y el gel tomé la tonalidad deseada.
- Retirar la solución de revelado y adicionar solución fijadora.

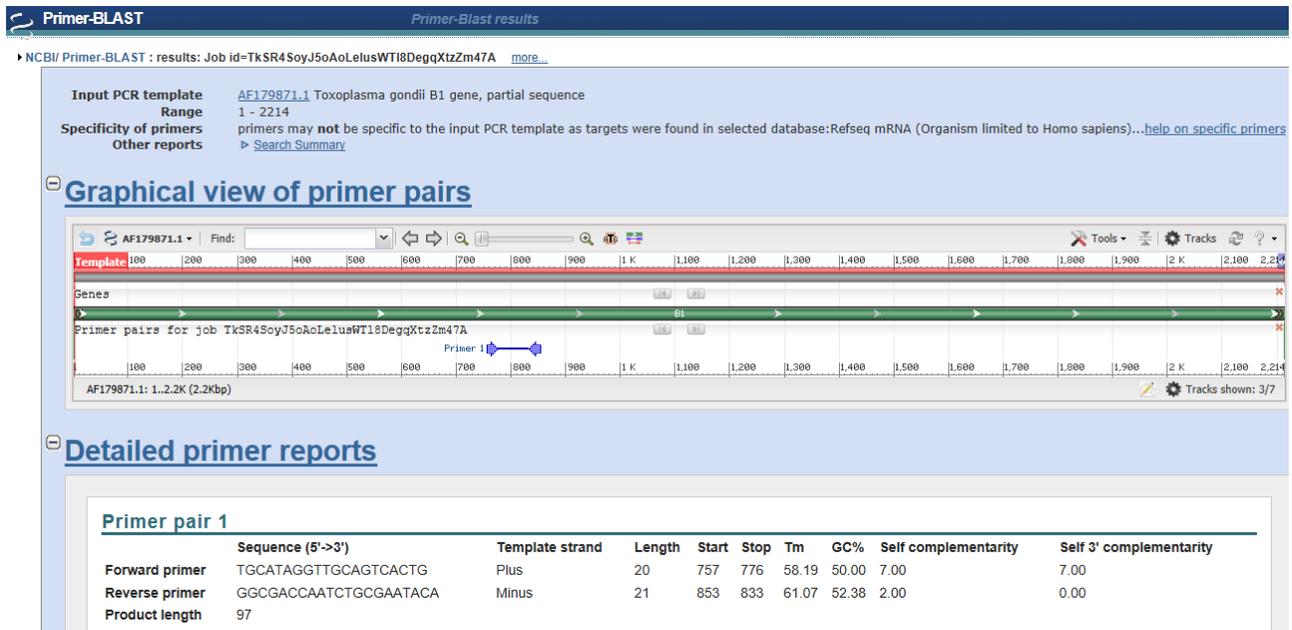
- Para fijar el gel, se humedece una hoja de papel celofán con solución fijadora y se cubre un vidrio de montaje. sobre este, se coloca el gel y encima otra hoja de papel celofán humedecido. Evitar la formación de burbujas; una vez deshidratado el gel despegar y recortar.

**NOTA:** No adicionar las soluciones directamente sobre el gel y no toque el gel durante el proceso de coloración.

## Anexo E. Primer-BLAST

Resultados mostrados para los primers Toxo N2 – Toxo C2 propuestos por Ponce & Gomez-Marín (2003) (Figura 15)

**Figura 15.** Primer blast para los primers Toxo N1 -Toxo C2



Fuente: Autor

Resultados mostrados para los primers Toxo N2 modificado – Toxo C2 usados por C. D. Jones et al. (2000) (Figura 16)

**Figura 16.** Primer blast para los primers Toxo N1 -Toxo C2



Fuente: Autor

 Universidad del Tolima	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

Juan David Medina Hernández	con C.C N°	1.110.553.438
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

**Autorizar**

**No Autorizar**  **Motivo:** \_\_\_\_\_

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del

 Universidad del Tolima	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “...**Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “...**Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo: **DETECCIÓN MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EN CARNES DESTINADAS AL CONSUMO HUMANO EN LA CIUDAD DE IBAGUÉ USANDO PCR ANIDADA (n-PCR) DEL GEN B1**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

**Biólogo**

---

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):
- 

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):
- 

- Artículo publicado en revista:
- 

- Capítulo publicado en libro:
- 

- Conferencia a la que se presentó:
-

 Universidad del Tolima	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: **14** Mes: **Agosto** Año: **2018**

Autores:

Firma

Nombre:	Juan David Medina Hernández		C.C.	1.110.553.438
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.