



**Detección de *Toxoplasma gondii* a partir de alimentos en restaurantes
escolares en la ciudad de Armenia, Colombia**

Autor:

Ovidio Alejandro Zamora Vélez

Director:

Fabiana María Lora Suárez Lic. Biol. PhD.

Co-director:

Jorge Enrique Gómez Marín MD. PhD.

**“Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de Magister en Ciencias Biomédicas”**

Universidad del Quindío

Facultad de Ciencias de la Salud

Maestría en Ciencias Biomédicas

Abril de 2018

(Dedicatoria)

A mi hermosa y amada abuela

Dora Ramírez Peláez (1927-2017.)

“Me siento extraño sin tu presencia y perdido sin tu luz, que iluminaba mi camino. Millones de besos y abrazos tuyos quedaron en mi ser. En mi memoria, tu voz dulce y tibia con frases de apoyo, amor y cariño. En tus días de adiós me dijiste estar orgullosa, así, espero que en cada paso que dé, como en los de hoy, no permitir que cambie tu decisión”.

Agradecimientos

Gracias a mis padres Gloria Marina Vélez Ramírez y Ovidio Zamora Alonso, por su apoyo y paciencia durante toda mi formación, a mis hermanos Laura Tatiana Zamora Vélez y Jorge Mario Zamora Vélez y a mi sobrina y alegría de mi hogar María Antonia Silva Zamora. Gracias a mi tío Cesar Arturo Velásquez Ramírez por su gran soporte en momentos difíciles. Gracias a Nataly Velasco Velásquez y su familia, quien me ha acompañado con su amor y motivación en esta gran etapa de mi vida.

Gracias a mis tutores Fabiana María Lora Suárez y Jorge Enrique Gómez Marín, por su respaldo, orientación y conocimiento que me han compartido durante mi formación y que ha permitido culminar este proyecto.

Agradezco al Centro de Investigaciones Biomédicas, su director Leonardo Padilla, a todo su personal y el grupo GEPAMOL y GYMOL, a quienes considero personas importantes en mi vida y con quienes he pasado muy gratos momentos que seguramente no olvidaré.

Un agradecimiento a la línea de Giardiasis y parásitos intestinales del grupo GEPAMOL, con quienes formaron parte esencial para el desarrollo de este proyecto, en especial, Valeria Pinto, Natalia Hernández y Deicy Muñoz por estos últimos dos años de trabajo juntos, regalarme su amistad y alegría y deseo para cada uno de sus integrantes un excelente futuro lleno de éxitos.

Gracias a mis compañeros de maestría y amigos Andrés Felipe Martínez, Johanna Díaz, José Hincapié y Estefanía Buitrago por su gran apoyo en clase y en el laboratorio.

Gracias a la Dra. Karen Shapiro, Dra. Minji Kim, Dra. Andrea Packham y la Dra. Patricia Conrad por abrirme las puertas de su equipo en la Universidad

de Davis, California. Quienes me regalaron un poco de su conocimiento y me permitieron tener una experiencia inolvidable en una ciudad, universidad y laboratorio de gran calidad.

Gracias al secretario de educación por darnos los permisos necesarios para la recolección de las muestras, a todos los rectores y coordinadores de las instituciones visitadas y las/los manipuladores de alimentos de los restaurantes escolares.

Un agradecimiento al programa de Maestría en Ciencias Biomédicas, a su directora Olga Alicia Nieto y a los profesores, por todo su apoyo, orientación y permitir que se puedan ir alcanzando poco a poco nuestras metas.

Agradezco a COLCIENCIAS por la financiación de este proyecto y la oportunidad que nos dio para llevarlo a cabo. Cod: 111372553376.

Resumen

Introducción. Los alimentos y agua son una fuente de infección de parásitos intestinales que pueden provocar diferentes enfermedades y síntomas. Entre estos parásitos podemos encontrar al *Toxoplasma gondii* ubicado en el cuarto puesto entre los 24 parásitos más peligrosos para los humanos transmitidos por fuentes de alimento. Por lo cual, el objetivo del estudio fue Establecer la frecuencia de presencia de ADN de *T. gondii* en muestras de alimentos, agua y superficies vivas e inertes en restaurantes escolares en la ciudad de Armenia, Colombia.

Materiales y métodos. Diez restaurantes fueron seleccionados al azar y visitados para diligenciar encuestas y tomar muestras de alimentos (vegetales y carne), agua (agua de grifo, agua hervida para jugo), jugo y superficies vivas e inertes para un total de 213 muestras. Se les realizó extracción de ADN y la presencia de *T. gondii* fue evaluada por PCR y PCR en tiempo real. Un Ji cuadrado fue utilizado para determinar si hay correlación entre las variables.

Resultados. Entre los 10 restaurantes escolares, el 60% (6/10) presentaron ADN de *T. gondii*. Así, se obtuvo un 6,1% (13/213) muestras positivas para la secuencia B1 de *T. gondii*. Entre estas, el 15,3% (2/13) resultaron de agua hervida y 15,3% (2/13) de grifo; 7,6% (1/13) de jugo de guayaba; 7,6% (1/13) de carne cruda de res; 7,6% (1/13) en pepino; 23,07% (3/13) en superficies vivas o palma de manos de los manipuladores de alimentos y 23,07% (3/13) en superficies inertes. Se encontró una correlación estadísticamente significativa con el “tipo de suelo de la cocina” (P=0,01) y “experiencia laboral de manipuladores” (P=0,0001).

Conclusión. Este es el primer estudio en detectar ADN en superficies vivas e inertes y jugo en restaurantes escolares. Los usuarios podrían encontrarse

en riesgo de infección debido a la contaminación y posibles rutas de contaminación entre las matrices evaluadas.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	14
2. Objetivos	16
3. Antecedentes.....	17
4. Materiales y métodos.....	23
4.1. Lugar de estudio y toma de muestras	23
4.2. Procesamiento de muestras vegetales para la detección de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
4.3. Procesamiento de muestras de agua para la detección de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
4.4. Procesamiento de muestras de jugo para la detección de ADN de <i>T. gondii</i>	26
4.5. Procesamiento de superficies vivas e inertes.	27
4.6. Extracción de ADN.	27
<i>Extracción de ADN utilizando el estuche de Wizard Genomics de Promega (USA)</i>	27
<i>Extracción de ADN utilizando el estuche de Qiagen (Alemania)</i>	28
<i>Extracción de ADN utilizando el estuche de Wizard Genomics de Promega (USA) en muestras de carne</i>	28
4.7. Detección de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR en tiempo real utilizando la secuencia repetitiva RE y B1	29
4.8. Detección de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR convencional anidada para la secuencia B1	30
4.9. Visualización de los productos amplificados por electroforesis	31
4.10. Estandarización de técnicas.	32

<i>Estandarización de la curva de amplificación en qPCR para la secuencia RE y B1 de T. gondii</i>	32
<i>Límite de detección y evaluación de inhibición de la PCR convencional para la secuencia B1 y PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE de T. gondii asociado a lechuga (Lactuca sativa var. Iceberg) y repollo (Brassica olareacea var. Capitata)</i>	33
4.11. Evaluación de inhibición en la PCR en tiempo real a partir de muestras positivas por PCR anidada.	34
4.12. Análisis estadísticos	34
5. Resultados	36
5.1. Muestras amplificadas PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE y por PCR convencional para la secuencia B1 de <i>T. gondii</i>	36
<i>Muestras amplificadas por PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE de T. gondii</i>	36
<i>Muestras amplificadas por PCR convencional para la secuencia B1 de T. gondii</i>	36
5.2. Estandarización de técnicas.	39
<i>Estandarización de la curva de amplificación en qPCR para la secuencia RE y B1 de T. gondii</i>	39
<i>Límite de detección de la PCR convencional para la secuencia B1 y PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE de T. gondii</i>	41
<i>Evaluación de inhibición de PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 asociada a lechuga (Lactuca sativa var. iceberg) y repollo (Brassica olareacea var. capitata) utilizando para la extracción de ADN el estuche de Wizard</i>	42
<i>Evaluación de inhibición de PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 asociada a lechuga (Lactuca sativa var. iceberg) y repollo (Brassica</i>	

<i>olareacea var. capitata) utilizando para la extracción de ADN el estuche de Qiagen.</i>	42
<i>Límite de detección y evaluación de inhibición de la PCR convencional para la secuencia B1 T. gondii a partir de ADN extraído con el estuche de Wizard y Qiagen.</i>	43
5.3. Evaluación de inhibición de la PCR en tiempo real asociado a muestras.	46
5.4. Encuestas para manipuladores de alimentos y evaluación de aspectos higiénicos y sanitarios.	46
<i>Análisis descriptivo de encuestas realizadas a manipuladoras/es.</i>	46
5.5. Análisis estadísticos.	48
<i>Correlación de variables encuestadas en comparación con la presencia de ADN de T. gondii.</i>	48
6. Discusión.....	51
7. Conclusiones.....	62
8. Recomendaciones.....	63
9. Bibliografía	64
10. Trabajo con la comunidad.....	75
11. Socialización en eventos científicos.....	76
12. Anexos.....	81
Anexo 1.....	81
Anexo 2.....	84
Anexo 3.....	88
Anexo 4.....	90
Anexo 5.....	91

Lista de figuras

- Figura 1. Rutas de transmisión de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en diferentes hospederos.** Transporte de ooquistes de *T. gondii* a través de corrientes de agua (flecha azul) en el ambiente y por medio de felinos domésticos y salvajes (flecha roja). Las flechas grises indicando posibles rutas de transmisión. Modificado de Vanwormer *et al.*, 2013 (2)..... 15
- Figura 2. Reporte de seroprevalencia de *T. gondii* para diferentes especies de animales y porcentaje de excreción de ooquistes a partir de félidos.** Los porcentajes indican la seroprevalencia observada por especies animales y el porcentaje de gatos derramamiento de ooquistes activamente. Las flechas representan la ruta de transmisión. Modificado de Kijlstra *et al.*, 2008 (23). 19
- Figura 3. Comparación de la secuencia RE y B1 amplificadas.** Promedio del ciclo umbral (Ct: *Cycle threshold*) para diferentes concentraciones de ADN de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en PCR en tiempo real por reacción en dos diferentes blancos (RE y B1). 41
- Figura 4.** Charla con los padres de familia de los niños usuarios de los restaurantes escolares. 75
- Figura 5.** A) Salón donde se realizó el seminario. B) Grupo de la Dra. Patricia Conrad (primera a la izquierda) y la Dra. Karen Shapiro (primera a la derecha). 80

Lista de tablas

Tabla 1. Prevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en la población colombiana, en donde se evaluaron 9139 individuos, de los cuales, 1890 pertenecían a la población infantil.	18
Tabla 2. Estudios de <i>Toxoplasma gondii</i> realizados para la obtención y detección de ooquistes a partir de matrices de alimento vegetal entre el año 2012 al 2016.	21
Tabla 3. Muestras de alimentos y superficies vivas e inertes recolectadas en 10 restaurantes escolares de 10 comunas en la ciudad de Armenia.	24
Tabla 4. Frecuencia de ADN de <i>T. gondii</i> encontrado en muestras de alimentos (Carne, huevo, vegetales, agua y jugo) y en superficies vivas e inertes.	37
Tabla 5. Frecuencia de ADN de <i>T. gondii</i> encontrado en muestras de alimentos (Carne, huevo, vegetales, agua y jugo) y en superficies vivas e inertes por restaurante escolar en la ciudad de Armenia.	38
Tabla 6. Distribución de muestras de alimentos y superficies vivas e inertes positivas obtenidas en los restaurantes escolares.	39
Tabla 7. Detección de 7 diluciones seriadas 1:5 de ADN de <i>T. gondii</i> a partir de 5000 ooquistes para la secuencia RE y B1 en qPCR.	40
Tabla 8. Resultados obtenidos en medio concentrado inoculado.	43
Tabla 9. Muestras de ADN de <i>T. gondii</i> , extraído a partir de 1, 5, 10 y 50 ooquistes utilizando el estuche de Wizard (Promega) y Qiagen), amplificadas por PCR convencional para la secuencia B1, por triplicado. Las muestras no amplificadas fueron repetidas agregando concentraciones de 200 ^a ; 400 ^b y 800 ^c ng/μL de BSA.	45
Tabla 10. Prueba de Ji cuadrado para encontrar o no correlación entre las variables encuestadas y presencia o ausencia de ADN de <i>T. gondii</i> por PCR para la secuencia B1.	48

Tabla 11. Coeficiente V de Cramer para la presencia o ausencia de ADN de *T. gondii* y variables encuestadas correlacionadas por la prueba Ji cuadrada.

..... 50

1. Introducción

Los alimentos son una fuente de infección de parásitos intestinales que pueden provocar diferentes enfermedades y síntomas. Entre estos parásitos podemos encontrar al *Toxoplasma gondii*, clasificado entre los apicomplejos del grupo Alveolata del súper grupo SAR: “Sarcocystis, Alveolata y Rizharia” (1), un parásito con distribución mundial y muy exitoso, puesto que puede infectar a todos los animales de sangre caliente tales como aves y mamíferos hasta ahora conocidos, e incluso, se han encontrado siendo transportados por animales invertebrados (Figura 1) (2). La organización mundial de la salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ubicaron al parásito *Toxoplasma gondii* en el cuarto puesto entre los 24 parásitos más peligrosos para los humanos transmitidos por fuentes de alimento (3,4) debido a su amplia forma de transmisión, resistencia, impacto en la salud de la población humana e impacto socio-económico.

La prevalencia global de toxoplasmosis se encuentra estimada en 30% de la población mundial. Sin embargo, la distribución de la exposición al parásito varía de 0 a 100% (5). La población más vulnerable para generar infecciones graves por de *T. gondii* son personas con SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia humana), otros individuos inmunocomprometidos y neonatos ya que causa aborto o malformación congénita (6). Además, podemos encontrar que la población infantil puede resultar afectada por este parásito debido a la inmadurez inmunológica, mala nutrición y malos hábitos de higiene (7). Encontrando, seroprevalencias en niños escolares alrededor del mundo, entre el 10% al 61,3% (8–15), quienes se pueden infectar por el agua, alimentos, carne mal cocida, exposición a suelo contaminado (16), por contacto con gatos (5) y sus malos hábitos higiénicos y de juego con agua o en el agua, y el suelo (8).

En Colombia, se han realizado estudios en alimentos cárnicos crudos donde se han encontrado un 32,4% (17) y un 52,7% de muestras positivas para ADN de *T. gondii* (18). Mientras que, en muestras de agua se identificó 58,7% (19). Sin embargo, en Colombia, no se han realizado estudios que intenten encontrar la presencia de este parásito en alimentos vegetales.

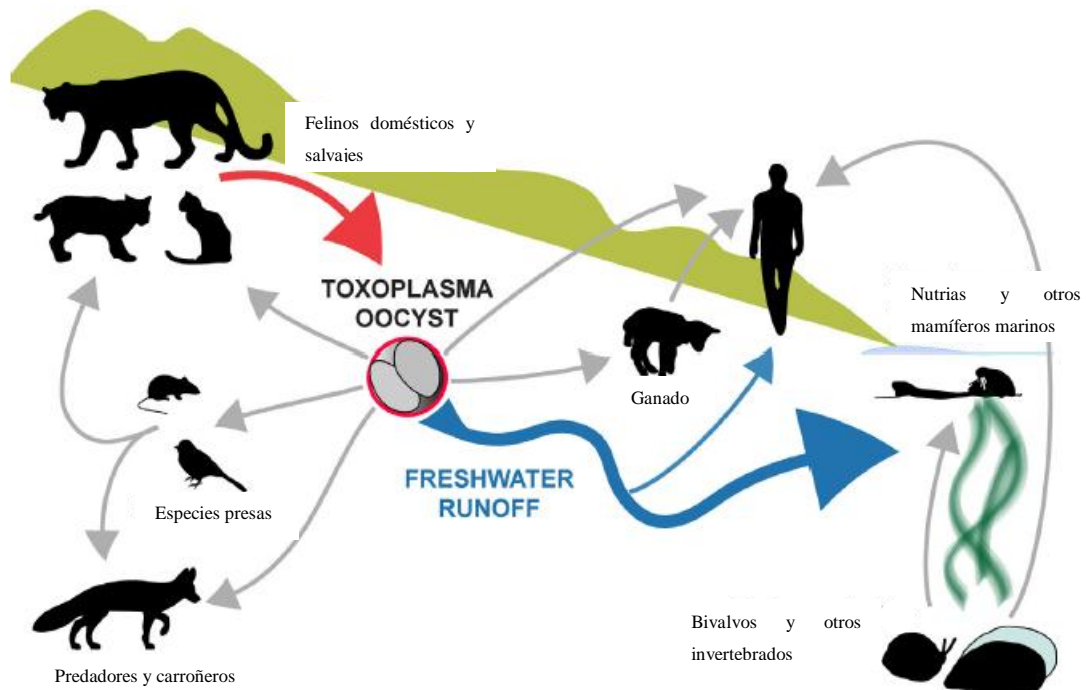


Figura 1. Rutas de transmisión de oocistos de *Toxoplasma gondii* en diferentes hospederos. Transporte de oocistos de *T. gondii* a través de corrientes de agua (flecha azul) en el ambiente y por medio de felinos domésticos y salvajes (flecha roja). Las flechas grises indicando posibles rutas de transmisión. Modificado de Vanwormer *et al.*, 2013 (2).

2. Objetivos

Objetivo general.

Establecer el porcentaje de muestras de alimentos, agua y superficies vivas e inertes con presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* y la asociación con datos epidemiológicos en restaurantes escolares en la ciudad de Armenia, Colombia.

Objetivos específicos

- Identificar el porcentaje de muestras positivas para ADN de *Toxoplasma gondii* presente en alimentos, agua y superficies vivas e inertes en restaurantes escolares de la ciudad de Armenia.
- Correlacionar la frecuencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en alimentos, agua y superficies vivas e inertes con los datos epidemiológicos obtenidos.

3. Antecedentes

Wolf, Cown y Page, en 1939, describieron la infección congénita por *T. gondii* en niños, y luego encontraron que esto ocurría en otras especies de animales (20). Weinman y Chandler, 1954, sugirieron que la transmisión podría ocurrir a través de la ingestión de carne medio cocida, luego, Jacob y colaboradores, 1960, dieron evidencia para soportar esta idea demostrando la resistencia de ooquistes de *T. gondii* a enzimas proteolíticas (20).

En 1970, Dubey y colaboradores, hacen una descripción de ooquistes expulsados por felinos, en su morfología y en su infectividad, encontrando que este juega el papel principal en la epidemiología de la toxoplasmosis. Además, en 1976, Dubey y Frenkel realizaron el primer estudio a fondo del desarrollo del tejido quístico y bradizoitos, y describieron su ontogenia y morfología, además, encontraron que los gatos excretan ooquistes con un corto periodo de tiempo (de 3 a 10 días) después de la ingestión de tejido quístico o bradizoitos, mientras que si ingerían taquizoitos y ooquistes, el periodo era más largo (≥ 18 días) (20).

La toxoplasmosis animal fue descrita por primera vez en Colombia en 1944 (21) seis años antes de que Roca y Esguerra diagnosticaran el primer caso en humano, mientras que Lleras y Anderson en 1944, identificaron *T. gondii* en un perro y un marsupial (22). Luego, en el año de 1982 se realizó un estudio nacional de salud pública, encontrando que la prevalencia de este parásito en la población colombiana era de 47% en 9139 individuos evaluados, en donde 1980 de estos pertenecían a la población infantil, encontrando una prevalencia de 32% sin existir una diferencia amplia entre género (22) (Tabla 1).

Tabla 1. Prevalencia de *Toxoplasma gondii* en la población colombiana, en donde se evaluaron 9139 individuos, de los cuales, 1890 pertenecían a la población infantil.

Población	Prevalencia	Tamaño muestral
En total hombres y mujeres	47,1%	9139
Hombres	47,9%	
Mujeres	46,3%	
Población infantil (0-9 años)	32%	1890
Niños	32,6%	
Niñas	31,9%	

Tomado de Cañón-Franco *et al.*, 2014 (22)

La OMS y la FAO ubicaron al parásito *Toxoplasma gondii* en el cuarto puesto entre los 24 parásitos más peligrosos para los humanos transmitidos por fuentes de alimento basados en 1) el número de enfermedades transmitidas por alimentos, 2) distribución global de fuentes de alimento infectadas, 3) severidad de la morbilidad, 4) casos de fatalidad, 5) potencial de aumento en la tasa de enfermedad, 6) importancia de la vía parásito/alimento para el comercio y 7) impacto socio-económico (3,4).

En los alimentos cárnicos, *Toxoplasma gondii* ha sido encontrado en carne de oveja, en la cual se ha llegado a encontrar una seroprevalencia de hasta 92% en ciertos países Europeos; en la carne de cerdo se ha encontrado una seroprevalencia entre 6,8% y 0,38% dependiendo de la región geográfica, cultura y sistemas de producción; en la carne de cabra se ha encontrado una seroprevalencia alta que se acerca al 77%; en carne de res puede llegar al 92%; en carne de aves de corral puede encontrarse entre el 65% y 81%; en carne de caballo, en ciertas regiones del mundo, supera el 90%; mientras que la carne de animales de caza, estudios serológicos han indicado entre

13% y 39,2% en corzo, entre 8% y 38% en jabalíes y un 22% en canguros (Figura 2) (23).

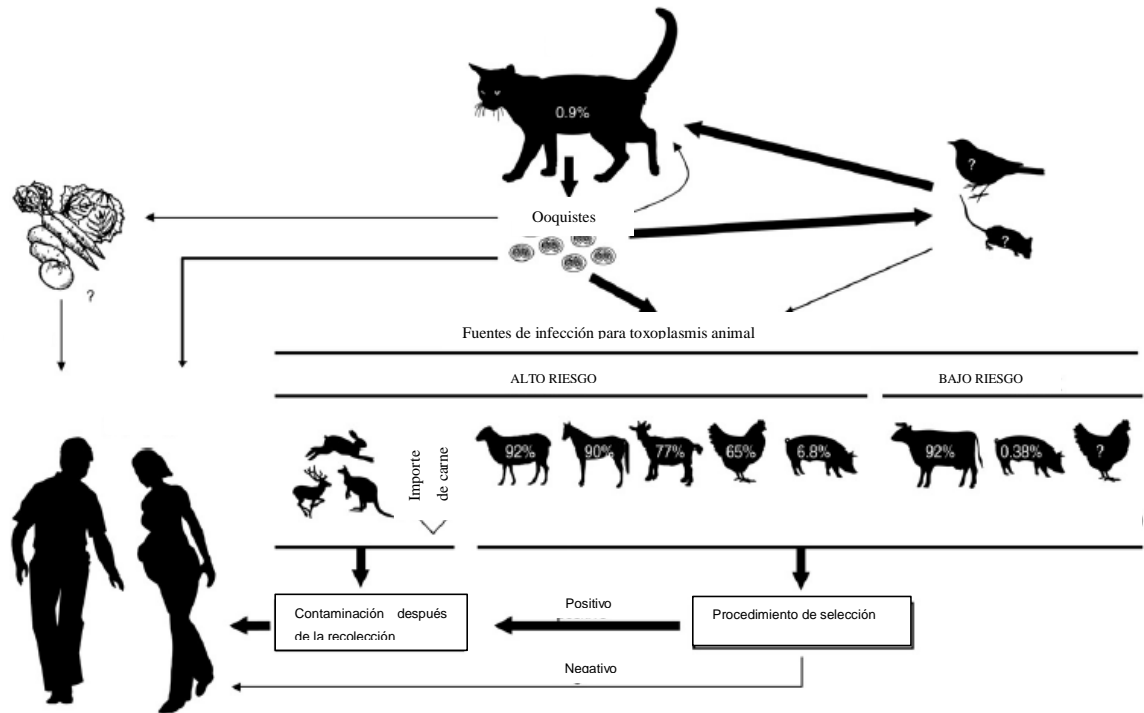


Figura 2. Reporte de seroprevalencia de *T. gondii* para diferentes especies de animales y porcentaje de excreción de ooquistes a partir de félidos. Los porcentajes indican la seroprevalencia observada por especies animales y el porcentaje de gatos derramamiento de ooquistes activamente. Las flechas representan la ruta de transmisión. Modificado de Kijlstra *et al.*, 2008 (23).

En la actualidad, en Colombia se han realizado tres estudios que evalúan la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en carne de cerdo, de res y de pollo mediante la técnica de amplificación de la secuencia B1 de *Toxoplasma gondii*, entre los cuales encontramos dos realizados en el eje cafetero y uno realizado en la ciudad de Sincelejo. Así, en el año 2007 en el eje cafetero se evaluaron 180 muestras de carne, encontrando que el 52,7% eran positivas (18). Más tarde, en el 2014, en la ciudad de Sincelejo se evaluaron 120

muestras de las cuales el 32% fueron positivas (24). El más reciente estudio, desarrollado en el 2015, se evaluaron 180 muestras encontrando un 43% positivas (25).

Además de evaluar la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de carne de consumo humano, también se ha evaluado en muestras de agua. Triviño-Valencia y colaboradores en el 2015 (19) encontraron en 46 muestras de agua cruda, de planta de tratamiento y en la red de distribución, cada una de 10 litros, un 58,6% (27/46) de muestras positivas por amplificación por PCR anidada de la secuencia B1 de *Toxoplasma gondii*. Un año más tarde, se indicó un método eficiente de detección de protozoos en agua con formalina éter, mostrando un porcentaje de recuperación entre el 75,5% a 90% de ooquistes de *Toxoplasma gondii* con un límite de detección de 2,8 y un límite de cuantificación de 9,4 (26).

Hasta la fecha, pocos estudios se han realizado concernientes a la contaminación de frutas frescas y vegetales con *Toxoplasma gondii*. La primera detección de este parásito en este tipo de muestras se realizó en el 2012, en donde evaluaron 216 frutas y vegetales encontrando 9,7% positivas luego de la amplificación de la secuencia B1 de *Toxoplasma gondii* por RTq PCR y una carga de hasta 20 ooquistes en una de las muestras (27) (Tabla 2). En 2016, surgieron 4 trabajos relacionados con la detección de *Toxoplasma gondii* y otros parásitos como *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium spp.* y *Giardia* en matrices de vegetales y frutas mediante la técnica de recuperación con glicina 1M a un pH de 5,5 y homogenización (28) y la amplificación de secuencias por RTq PCR para SporoSag (ARNm), qPCR para B1 y RE (ADN) y LAMP para B1 (ADN) de *Toxoplasma gondii*; encontrando límites de detección entre 1 y 10 ooquistes (29–35) (Tabla 2).

Tabla 2. Estudios de *Toxoplasma gondii* realizados para la obtención y detección de ooquistes a partir de matrices de alimento vegetal entre el año 2012 al 2016.

Referencia	Método de obtención de ooquistes	Método de detección	Muestra	Positivas/Total muestras (%)	Límite de detección
Lass et al., 2012 (27)	Floculación con solución CaCO ₃ y Centrifugación	qPCR B1	Lechuga	9/50 (18%)	100 Ooquistes
			Zanahoria	9/46 (19,5%)	
			Rábanos	3/60 (5%)	
			Fresas	0/60 (0%)	10000 Ooquistes
Marchioro et al., 2016 (32)	Solución Tween 80 al 1%, agitada manualmente, filtrado por membrana de celulosa y centrifugación	PCR B1 y 529 pb	Lechuga lisa	1/62 (0,6%)	10 y ≥100 Ooquistes/μL
			Lechuga iceberg	4/106 (3,7%)	
			Achioria	2/40 (5%)	
			Perejil	1/5 (20%)	
			Rúcula	1/7 (14,3%)	
Zangari de Souza et al., 2016 (36)	Solución Tween 80 al 1%, agitación manual por 1 minuto, filtrado por membrana de celulosa y centrifugación.	PCR B1 y 529 pb	Fresas		1000 ooquistes
			Lechuga		
Hohweyer et al., 2016(29)	Agitación (Shaker) y Glicina 1M pH 5.5 e IMS	RTq PCR SporoSAG (mRNA)	Albahaca	35%	1 Ooquiste/g
			Frambuesas	2,50%	1 Ooquiste/g

Travaillé et al., 2016 (30)	Homogenizador, Glicina 1M pH 5.5 y Centrifugación	RTq PCR SporoSAG (mRNA)	Albahaca		3 Ooquistes/g
Lalonde et al., 2016 (31)	Homogenizador, Glicina 1M pH 5,5; Glicina 1 M pH 3,5; Wash Buffer y Centrifugación	qPCR para Eimeria papillata	Mora		3 Ooquistes/g
			Arándano		3 Ooquistes/g
			Arándanos agríos		3 Ooquistes/g
			Frambuesas		3 Ooquistes/g
			Fresas		3 Ooquistes/g
			Hierbas de hoja verde		5-9 Ooquistes/g
			Tomillo		5-9 Ooquistes/g
			Cebolla verde		5-9 Ooquistes/g
Lalonde et al., 2016 (34)	Homogenizador, Glicina 1M pH 5.5 y Centrifugación (Flotación de Sucrosa)	qPCR para región universal de coccidios 18S rDNA	Espinaca	3/1171 (0,26%)	
			Lechuga	0	
			Lechuga de hoja romana	0	
			Col rizada	0	
			Rúcula	0	
			Acelga	0	
			Diente de león	0	
			Brócoli	0	
			Mezcla	0	

4. Materiales y métodos

4.1. Lugar de estudio y toma de muestras

Se seleccionaron al azar 10 restaurantes escolares de instituciones educativas públicas de 46 existentes, según base datos de la secretaría de educación de Armenia, siendo 1 restaurante por comuna (división territorial de la cabecera municipal o zona urbana de la ciudad) de 10 que tiene la ciudad. Se tomó un número de identificación para cada comuna y se solicitó la participación de las/los manipuladores de los alimentos. Posteriormente, dentro de cada restaurante se realizó la selección de los sujetos de estudio con muestreo aleatorio simple con reemplazo en días elegidos al azar entre la semana activa o de funcionamiento de los restaurantes. Adicionalmente, se llenaron encuestas relacionadas con los procedimientos llevados a cabo en los restaurantes para la preparación y almacenamiento de los alimentos, instalaciones físicas y condiciones de saneamiento (anexo 1).

Con el consentimiento informado institucional firmado por las autoridades de cada institución educativa (Anexo 2), se recolectaron 213 muestras en total de la siguiente manera: nueve muestras de 50 gramos de carne de pollo, doce de 50 gramos de carne de res, nueve de huevo, treinta de 200 mL de agua para preparar jugo, diez de 4L de agua de grifo, treinta de 200 mL de jugo, tres de 200 gramos de lechuga, tres de 200 gramos de repollo, nueve de 200 gramos de zanahoria, nueve de 200 gramos de pepino, seis de 200 gramos de tomate, treinta y uno de superficies vivas (palma de mano de operarias) en 5 mL de solución salina al 0,9% y cincuenta y dos de superficies inertes (cuchillo, cuchilla de licuadora y tablas de picar) en 5 mL de solución salina al 0,9% (Tabla 3). El número de muestras de superficies vivas e inertes varió dependiendo del número de manipuladores que estuvieran en los restaurantes escolares y los utensilios que fueran usados

durante la preparación de los alimentos. Las muestras fueron transportadas en diferentes recipientes y en nevera portátil en condiciones de refrigeración, dada por pilas de hielo, hasta el laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío. El procesamiento se realizó el mismo día de la toma de muestras (37). Todas las muestras fueron tomadas por triplicado.

Tabla 3. Muestras de alimentos y superficies vivas e inertes recolectadas en 10 restaurantes escolares de 10 comunas en la ciudad de Armenia.

Muestra	Cantidad x3	Restaurantes	Total muestras tomadas y procesadas	Total cantidad procesada
Carne de res	50 g	4	12	450 g
Carne de pollo	50 g	3	9	450 g
Huevo	1 UND	3	9	9 UND
Agua (Preparación de Jugos)	200 mL	10	30	30000 mL
Agua de grifo	1000 mL	10	10	40000 mL
Jugo	200 mL	10	30	30000
Lechuga	200 g	1	3	600 g
Repollo	200 g	1	3	600 g
Pepino	100 g	3	9	300 g
Zanahoria	100 g	3	9	300 g
Tomate	100 g	2	6	600 g
Superficies vivas (manos)	5 mL	10	31	155 mL
Superficies inertes (cuchillo, tabla de picar, licuadora)	5 mL	10	52	260 mL
Total			213	

4.2. Procesamiento de muestras vegetales para la detección de ADN de *Toxoplasma gondii*.

El método utilizado para el procesamiento de las muestras vegetales se llevó a cabo bajo el protocolo estandarizado en la línea de *Giardiasis y parasitosis intestinales*, la cual consistió en tomar 40 gramos de muestra vegetal (lechuga y zanahoria) y se agregaron 200 mL de solución extractante glicina 1M con un pH 5,5. Luego, se homogenizó en un BagMixer 400W (Interscience-Francia) a una velocidad de 2 (6 golpes/segundo) por 30 segundos en 5 repeticiones. Se tomó el sobrenadante, y por medio de centrifugaciones a 1600 gravedades por 5 minutos a 4°C, se concentraron las muestras. El botón de sedimentación resultante, de aproximadamente 7,5 mL, fue utilizado para realizar la técnica de formalina/éter (55,56) en la cual se agregó un volumen, igual al obtenido en el botón de sedimentación, de solución de formalina al 10% y 3 mL de éter. Se centrifugo a 1000 g por 2 minutos y se decantaron las tres capas de la superficie hasta dejar la capa inferior o sedimento (aproximadamente 1 mL). Para otras muestras vegetales (pepino, repollo y tomate) se tomaron 40 gramos y se agregaron 200 mL de solución extractante de solución de lavado (PBS 1X, 100 µL de Tween 80 y 10 g de ácido sulfámico) con un pH de 3,5. Posteriormente, se homogenizaron las muestras en un BagMixer 400W (Interscience-Francia) a una velocidad de 3 (8 golpes/segundo) por 30 segundos en 5 repeticiones. Se tomó el sobrenadante, y por medio de centrifugaciones a 1600 gravedades por 5 minutos a 4°C, se concentraron las muestras. El botón de sedimentación resultante, de aproximadamente 7,5 mL, fue utilizado para realizar la técnica de Formalina/éter y obtener 1 mL de sedimento.

4.3. Procesamiento de muestras de agua para la detección de ADN de *Toxoplasma gondii*.

El procesamiento de las muestras de agua se realizó bajo el protocolo propuesto y estandarizado por Lora y colaboradores en el 2016 (26). Este, consistió en concentrar las muestras de agua bajo consecutivas centrifugaciones a 1600 gravedades por minuto por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, y a los botones de sedimentación resultantes, de aproximadamente 7,5 mL, se les aplicó la técnica de Formalina/éter en la cual se agregó un volumen igual de solución de formalina al 10% y 3 mL de éter, se centrifugó a 1000 g por 2 minutos y se decantan las tres capas de la superficie hasta dejar la capa inferior o sedimento de aproximadamente 1mL.

4.4. Procesamiento de muestras de jugo para la detección de ADN de *T. gondii*.

En el procedimiento para obtener ooquistes de *T. gondii* se dividió la muestra de jugo dos partes iguales (100 mL) y se trasladaron a bolsas con filtro de BagMixer. A cada volumen se le agregó 100 mL de solución de lavado a un pH de 7,5 (PBS 1X, 100 µL de Tween 80 y 10 g de ácido sulfámico). Posteriormente, se homogenizaron en el equipo BagMixer 400W (Interscience-Francia) con un “Gap” de 10, una velocidad de 2 (6 golpes/segundo) por 40 segundos y 5 ciclos con 1 minuto de reposo en hielo. Luego, las soluciones fueron unidas y concentradas por centrifugación hasta obtener aproximadamente 5 mL. Finalmente, se le realizó el proceso de formalina/éter (explicada anteriormente).

4.5. Procesamiento de superficies vivas e inertes.

Las muestras obtenidas de superficies vivas (palma de manos de operadores) e inertes (cuchillo, cuchillas de licuadoras, tablas de picar, rallador de vegetales) fueron procesadas con la técnica de formalina/éter. Así, a los 5 mL de solución salina con muestra se les agregó 5 mL de solución formalina al 10% y 3 mL de éter. Se centrifugó a 1000 g por 2 minutos y se decantaron las tres capas de la superficie hasta dejar la capa inferior o sedimento (aproximadamente 1 mL).

4.6. Extracción de ADN.

Los protocolos para la extracción de ADN han sido estandarizados y reportados previamente en la línea de Giardiasis y parasitosis intestinales del grupo de estudio en parasitología molecular GEPAMOL (18,19,26). Así, se describen a continuación:

Extracción de ADN utilizando el estuche de Wizard Genomics de Promega (USA).

Este método de extracción de ADN se utilizó principalmente para la extracción de ADN a partir de ooquistes de *T. gondii* mediante lisis mecánica con perlas de silicato de zirconio y lisis química con DNAzol (Invitrogen) en muestras de agua de grifo, agua hervida, superficies vivas e inertes. Los botones de sedimentación obtenidos con el proceso de la técnica formalina/éter fueron lavados por 3 repeticiones en tubos Eppendorf de 2 ml con 300 µl de tampón fosfato salino 1X, se centrifugaron a 4500 g por 10 minutos y vortex por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se dejó aproximadamente 300 µl de muestra, a la cual se agregó 600 µl de DNAzol (Invitrogen), 10 µl de alcohol isoamílico (Fisher Scientific) y 0,3 g de perlas de zirconio con un diámetro de 0,5 mm (BiosPec). Las muestras fueron agitadas en 5 repeticiones en un Mini-BeadBeater (BioSpec) a máxima velocidad por

1 minuto y se intercalaron con 1 minuto en hielo. Luego, se trasladó el sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 2 ml. Posteriormente se utilizó el estuche de extracción de Wizard Genomic Promega para la lisis nuclear y purificación de acuerdo con el protocolo del fabricante hasta agregar 80 μ L de solución de rehidratación y refrigerar a 4 °C durante toda la noche para almacenar luego a -80°C.

Extracción de ADN utilizando el estuche de Qiagen (Alemania).

Este método de extracción de ADN fue utilizado principalmente para la extracción de ADN a partir de ooquistes de *T. gondii* mediante lisis mecánica con perlas de silicato de zirconio y lisis química con proteinasa K y buffer AL del estuche Qiagen en muestras vegetales y de jugo. Los botones de sedimentación obtenidos con el proceso de la técnica de formalina/éter fueron lavados por 3 repeticiones en tubos Eppendorf de 2 ml con 300 μ l de tampón fosfato salino 1X, se centrifugaron a 4500 g por 10 minutos y vortex por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se dejó aproximadamente 200 μ l de muestra. Se agregaron aproximadamente 200 μ L de Buffer AL, 20 μ L de proteinasa K y 0,3 g de perlas de zirconio con un diámetro de 0,5 mm (BiosPec). Se incubó por 10 minutos a 56°C. Luego, las muestras fueron agitadas en 5 repeticiones en un Mini-BeadBeater (BioSpec) a máxima velocidad por 1 minuto y se intercalaron con 1 minuto en hielo. Se agregó 200 μ L de etanol al 100%, se mezcló con Vortex y se realizó un spin. Luego, se siguió el protocolo propuesto por el estuche de Qiagen para la purificación hasta agregar 100 μ L de buffer AE y conservar a -80°C.

Extracción de ADN utilizando el estuche de Wizard Genomics de Promega (USA) en muestras de carne.

Primero, se realizó un rompimiento mecánico con bisturí en una caja de cultivo a partir de 50 g del tejido hasta obtener 5 g en pequeñas porciones de cada muestra; luego, se realizó la lisis química y mecánica con 2 ml de solución tampón de lisis suministrado en el estuche (Wizard Genomics de

Promega) y 50 µl de proteinasa K y ejerciendo presión física en un mortero. Se maceró durante 10 minutos y, luego, se dejó reposar por 5 minutos. La muestra obtenida se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos y, posteriormente, se incubó a 37 °C por 30 minutos. Se adicionaron 250 µL de PBS; se centrifugó a 1.000g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se utilizó el estuche de extracción de Wizard Genomic Promega para la lisis nuclear y purificación de acuerdo al protocolo del fabricante hasta agregar 80 µL de solución de rehidratación y refrigerar a 4 °C durante toda la noche para almacenar luego a -80°C.

4.7. Detección de ADN de *Toxoplasma gondii* por PCR en tiempo real utilizando la secuencia repetitiva RE y B1

Para la detección de ADN de *Toxoplasma gondii* por PCR en tiempo real (qPCR) en muestras de ADN extraídas de agua de grifo, muestras de agua hervida usada para preparación de jugos, vegetales, carne cruda, huevo y jugos (no siendo utilizada en muestras de ADN obtenidas de superficies vivas e inertes) se siguió el protocolo estandarizado por el grupo en estudio en parasitología molecular GEPAMOL (38). Para esto, se amplificó la región repetitiva RE (39) utilizando los siguientes cebadores: cebador sentido: 5´ GCC ACA GAA GGG ACA GAA GT 3´ 0,5 µL y el cebador reverso 5´ ACC CTC GCC TTC ATC TAC AG 3´ 0,5 µL y la sonda 5´ 6-FAM TAC AGA CGC GAT GCC GCT CC MGB NFQ 3´ 0,25 µL, con el estuche Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (11730-017) 12,5 µL, 5,75 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de ADN plantilla (40). Como control se utilizó ADN de *T. gondii* cepa RH o cepa ME49 de una concentración máxima de 10.000 parásitos por mililitro.

La PCR en tiempo real se realizó en el termociclador PCR en tiempo real Applied Biosystems Step One Real Time PCR, con la siguiente programación

en el software StepOne Plus: 50°C por 2 minutos (enzima UDC para eliminar contaminantes), 95 °C por dos minutos y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C por 30 segundos.

Por otro lado, se diseñaron un par de cebadores y sonda para una secuencia de aproximadamente 107 pares de bases del gen B1 (AF179871.1), usando la herramienta “GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design” existente en la página web www.genscript.com. Así, se obtuvo un cebador sentido 5' TCCCGCTGGCAAATACAGGT 3', un cebador reverso 5' CGGCAGCGTCTCTTCCTCTT 3' y una sonda 5' 6-FAM TGCGGCAATGTGCCACCTCGCCT NFQ 3'. Las condiciones de qPCR fueron las mismas anteriormente descritas para la secuencia RE de *T. gondii*.

4.8. Detección de ADN de *Toxoplasma gondii* por PCR convencional anidada para la secuencia B1

Para la detección de ADN se aplicó como estrategia la amplificación de la secuencia B1, la cual es específica de *T. gondii* y se encuentra repetida (41) en el genoma del parásito, a través de la técnica PCR anidada (73). Con esta técnica se buscó detectar el ADN de *T. gondii* en muestras de agua de grifo, muestras de agua hervida usada para preparación de jugos, vegetales, carne cruda, huevo, jugos y superficies vivas e inertes. Así, como ha sido descrita previamente (19,41–43) para la primera amplificación se empleó los oligonucleótidos 694 a 714 (OligoN1) Toxo N1: 5' - GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG - 3' y 887 a 868 (Oligo C1) Toxo C1: 5' - TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC - 3'. En la PCR anidada se utilizaron los oligonucleótidos 757 a 776 (Oligo N2) Toxo N2: 5' - TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG - 3' y 853 a 831 (Oligo C2) Toxo C2: 5' - GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC - 3'. Para cada muestra se realizó la mezcla de la siguiente manera: 12,5 µl de GoTaq Green Master Mix de Promega, 7,5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de

BSA a una concentración de 400 ng/ μ l, 1,5 μ l de cebador y 1 μ l de muestra de ADN, para un volumen final de 25 μ l. Para la primera amplificación se realizaron 40 ciclos cada uno con temperatura de desnaturalización de 94° C por 1 minuto, temperatura de anillamiento de 53° C por 1 minuto y temperatura de extensión de 72° C por 1 minuto. Para la PCR anidada, 14 ciclos cada uno con temperatura de desnaturalización de 94° C por 1 minuto, temperatura de anillamiento de 53° C por 30 segundos, y temperatura de extensión de 72° C por 30 segundos en un termociclador TECHNE. Así, el producto final esperado con el gen B1 fue de 97 pares de bases, teniendo en cuenta, que todas las muestras que resultaron positivas fueron sometidas a una nueva PCR por triplicado para confirmar resultados. Así, se consideraba verdadero positivo si al realizar nuevamente la PCR la muestra se encontraba produciendo amplificación. Finalmente, las muestras fueron secuenciadas bajo las condiciones de un termociclador BigDye® usando el servicio automático normal de Macrogen (Corea) en el secuenciador de ADN 3730XL utilizando los mismos cebadores de amplificación.

4.9. Visualización de los productos amplificados por electroforesis

Los productos amplificados fueron observados en un gel de agarosa al 1,5% hecho con 1,5 gramos de la misma en 100 ml de solución tampón TBE 1X agregados en un recipiente que será calentado hasta su completa disolución. Luego de que entró en ebullición, se retiró el frasco del calentamiento y se dejó enfriar hasta una temperatura manipulable, no menor a los 37°C, y se agregaron 3 μ l de Safe Viewer (Invitrogene). Se sirvió lentamente la solución en una bandeja de corrido por uno de los extremos con peines de 12 o 20 pozos y se dejó polimerizar. Luego, se llenó el tanque de la cámara de electroforesis con Buffer TBE 1X hasta cubrir el gel. En el primer pozo se agregó 1 μ l de marcador de peso (50 o 100 pares de bases) de Invitrogen

mezclado con 3 µl de buffer carga al 2X (Blue Juice Invitrogene). En el segundo pozo se agregaron 6 µl de un control positivo de ADN de *T. gondii* RH (obtenido a partir de células de *T. gondii* cultivadas en el laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas por el grupo GEPAMOL), en el tercer pozo se agregaron 6 µl de un control negativo de la PCR, en el cuarto pozo se agregaron 6 µl de un control negativo de extracción de ADN y en el resto de pozos se agregaron 6 µl de las muestras del producto de PCR. Se conectaron los electrodos de la cámara electroforética (THERMO SCIENTIFIC) a la fuente de poder (BIORED POWER PAC BASIC), se graduó el voltaje a 100 Voltios y se dejó correr entre 30 y 40 minutos.

4.10. Estandarización de técnicas.

La estandarización de técnicas fue requerida ya que en nuestro grupo no se había trabajado con material vegetal para la detección de ADN de *T. gondii* mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Así, seleccionar los mejores procesos de detección de ADN de *T. gondii* luego de coleccionar y procesar las muestras de alimento, agua y superficies vivas e inertes.

Estandarización de la curva de amplificación en qPCR para la secuencia RE y B1 de T. gondii.

Se contaron aproximadamente 10.000 ooquistes, con la ayuda de un hemocitómetro en diez repeticiones, de *T. gondii* de la cepa ME49 (tipo clonal II) donados por el Dr. Dubey (USDA, Beltsville). Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN con el estuche de Qiagen y perlas de silicato de zirconio (Método especificado anteriormente) y se cuantificó el ADN obtenido con un espectrofotómetro EPOCH (Biotek-EE.UU). Se realizó una dilución 1:2 (aproximadamente ADN de 10.000 ooquistes) y luego 1:5 consecutivamente por 6 repeticiones (ADN de 1000; 200; 40; 8; 1,6 y 0,32 ooquistes aproximadamente). Luego, se realizaron las amplificaciones utilizando una qPCR en tiempo real en el equipo Applied Biosystems

seleccionando en el software StepOne Plus v2.3 la opción de diseñar un experimento. Después, en el software, se seleccionó que el tipo de experimento sería Cuantificación-Curva Estándar, para detectar la secuencia blanco se seleccionó TaqMan reagents, y una velocidad rápida (40 minutos). Luego, se caracterizaron los dos blancos: RE y B1; con reportero FAM, Quencher en NFQ-MGB (Non fluorescent quencher-minor Groove binder), posteriormente se asignó la ubicación de las muestras y los blancos por defecto, las condiciones de PCR en tiempo real y los volúmenes de cada reactivo para cada reacción para ambas secuencias fueron las mismas descritas en la sección precedente.

Límite de detección y evaluación de inhibición de la PCR convencional para la secuencia B1 y PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE de T. gondii asociado a lechuga (Lactuca sativa var. Iceberg) y repollo (Brassica oleracea var. Capitata).

El límite de detección y la evaluación de inhibición de amplificación para cada uno de los blancos en PCR y PCR en tiempo real se realizó inoculando 1, 5, 10 y 50 ooquistes de *T. gondii* de la cepa ME49 donados por el Dr. Dubey (USDA, Beltsville) en 300 µL de solución salina al 0,9% y 200 µL de solución concentrada de lechuga y repollo (solución obtenida del proceso de muestras vegetales, descrito en el numeral 4.2) libre de ADN de *T. gondii*. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN de cada tubo utilizando dos métodos estandarizados por la línea y utilizando el estuche de extracción de Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kits-Alemania) y el estuche de extracción de Wizard Genomics de Promega (USA) descritos en el numeral 4.6. Posteriormente, el ADN fue utilizado para ser amplificado en triplicado por PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 y en triplicado por PCR convencional para la secuencia B1 (procesos descritos anteriormente en 4.7 y 4.8), en esta última, se agregó BSA en concentraciones de 200, 400 y 800 ng/µl para mejorar el rendimiento de amplificación. Finalmente, se realizó una

electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para visualizar los amplificadores obtenidos en el caso de la PCR para la secuencia B1 (como se describió en el numeral 4.9).

4.11. Evaluación de inhibición en la PCR en tiempo real a partir de muestras positivas por PCR anidada.

Con el fin de evaluar si existía algún tipo de inhibición en la amplificación de muestras por PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1, se llevó a cabo una PCR en tiempo real para ambas secuencias en donde el ADN plantilla provenía de 2,5 μ L de ADN control (ME49) de aproximadamente 2 ooquistes por μ L y 2,5 μ L de ADN de muestra (previamente encontrada positiva por PCR convencional para la secuencia B1). Luego de obtener los resultados de amplificación en tiempo real, se montaron las muestras que resultaron negativas en gel de agarosa al 1,5%, en donde se mezclaba 4 μ L del resultado de la amplificación con 3 μ L de Buffer carga, y se hizo una electroforesis para visualizar si existía o no amplificación (ver 4.13).

4.12. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis descriptivo del total de la muestra, las encuestas y condiciones de los restaurantes. Se estimó la prevalencia de ADN del parásito en cada alimento y restaurante con intervalos de confianza al 95% (IC: 95%). Luego, se realizó un análisis bivariado considerando como variable dependiente la presencia del ADN del parásito en los alimentos y como variables independientes las condiciones de los restaurantes evaluados y respuestas dadas en las encuestas estimando Ji cuadrado para determinar la significancia estadística con un nivel de confianza del 95%. Así

mismo, se aplicó la prueba de Coeficiente V de Cramer para comparar el grado de asociación.

5. Resultados

5.1. Muestras amplificadas PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE y por PCR convencional para la secuencia B1 de *T. gondii*.

Muestras amplificadas por PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE de T. gondii.

No se encontraron muestras amplificadas por PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 de *T. gondii* de 130 muestras evaluadas (agua de grifo, muestras de agua hervida usada para preparación de jugos, vegetales, carne cruda, huevo y jugos). En cada reacción tanto el doble control positivo como el doble control negativo funcionaron correctamente.

Muestras amplificadas por PCR convencional para la secuencia B1 de T. gondii.

Luego de realizar la reacción de PCR para las 213 muestras obtenidas en los restaurantes escolares, y obtener correctos resultados para los controles positivos y negativos, se encontraron 13/213 (6,1%) amplificaciones positivas del total recolectadas. Luego, en promedio, se encontró 0,81 (IC 95% [0,160785 - 1,46421]) de muestras positivas por tipo de muestra. Obteniendo una 1/12 (8,3%) muestra positiva en carne de res proveniente del restaurante 2, 1/9 (11,1%) muestra positiva en vegetal de pepino del restaurante 10, 2/10 (20%) en muestras de agua de grifo del restaurante 3 y 4, 2/30 (6,7%) en muestras de agua hervida usada para preparar jugo y 1/12 (8,3%) en muestras de jugo de guayaba en el restaurante 3, 3/52 (5,8%) muestras de superficies inertes en los restaurantes 3, 4 y 8 provenientes de rallador de vegetales, cuchillo para cortar vegetales y tabla de picar vegetales respectivamente; y, 3/31 (9,7%) muestras de superficies vivas de los

restaurantes 3, 9 y 10 (Tabla 4). Así, se encontraron muestras positivas en 6 de los 10 restaurantes muestreados, encontrando en promedio 1,6 (IC 95%: [0,129 - 2,470]) de muestras positivas por restaurante. Así, el restaurante 3 obtuvo el mayor número de muestras positivas al tener 5/13 (38,5%%) de estas, seguido por el restaurante 10 con 3/13 (23,1%). Mientras que, en los restaurantes 1, 5, 6 y 7 no se encontraron amplificaciones para la secuencia B1 de *T. gondii* (Tabla 5). El 5/13 (38,4%) de las muestras positivas se presentaron en matrices relacionadas directamente con el agua (agua del grifo, agua hervida para la preparación de jugo y el jugo de guayaba), 3/13 (23,07%) se presentaron en superficies vivas, 3/13 (23,07%) en superficies inertes, 1/13 (7,6%) en carne de res Y 1/13 (7,6%) en muestra de vegetal de pepino (Tabla 6).

Tabla 4. Frecuencia de ADN de *T. gondii* encontrado en muestras de alimentos (Carne, huevo, vegetales, agua y jugo) y en superficies vivas e inertes.

Tipo de Muestra	No. Muestras PCR B1 Positivas	Total Muestras	% Positivas	IC 95%
Carne de pollo	0	9	0,0%	-
Carne de res	1	12	8,3%	3,7% - 23,9%
Huevo	0	9	0,0%	-
Agua de grifo	2	10	20,0%	13,4% - 27,8%
Agua (Preparación de jugos)	2	30	6,7%	5%% - 8,3%
Lechuga	0	3	0,0%	-
Repollo	0	3	0,0%	-
Pepino	1	9	11,1%	4,2% - 17,9%
Zanahoria	0	9	0,0%	-
Tomate	0	6	0,0%	-

Jugo de banana	0	6	0,0%	-
Jugo de guayaba	1	12	8,3%	3,7% - 23,9%
Jugo de mango	0	6	0,0%	-
Jugo de tomate de árbol	0	6	0,0%	-
Superficies inertes (Cuchillo, tabla de picar, cuchilla licuadora)	3	52	5,8%	4,9% - 6,6%
Superficies vivas (manos)	3	31	9,7%	7,8% - 11,5%

Tabla 5. Frecuencia de ADN de *T. gondii* encontrado en muestras de alimentos (Carne, huevo, vegetales, agua y jugo) y en superficies vivas e inertes por restaurante escolar en la ciudad de Armenia.

Restaurante	No. Muestras PCR B1 Positivas	Total Muestras	Porcentaje Positivas %	IC 95%
1	0	24	0%	-
2	1	22	4,5%	2,6% - 6,3%
3	5	25	20%	16,8% - 23,1%
4	2	21	9,5%	0% - 22%
5	0	20	0%	-
6	0	19	0%	-
7	0	18	0%	-
8	1	23	4,3%	2,5% - 6%
9	1	20	5%	2,8% - 7,1%
10	3	21	15%	11,8% - 18,3%

Tabla 6. Distribución de muestras de alimentos y superficies vivas e inertes positivas obtenidas en los restaurantes escolares.

Restaurantes escolares							
Tipo de muestra	2	3	4	8	9	10	n/N (%)
Carne de res	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	1/13 (7,6%)
Vegetal pepin	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	1/13 (7,6%)
Agua de grifo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	2/13 (15,4%)
Agua hervida para jugo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	2/13 (15,4%)
Jugo de guayaba	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	1/13 (7,6%)
Superficie Inerte	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	2/13 (15,4%)
Superficie Viva	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	4/13 (30,8%)
n/N (%)	1/13 (7,6%)	5/13 (38,5%)	2/13 (15,4%)	1/13 (7,6%)	1/13 (7,6%)	3/13 (23%)	13/13 (100%)

5.2. Estandarización de técnicas.

Estandarización de la curva de amplificación en qPCR para la secuencia RE y B1 de T. gondii.

Luego de realizar la cuantificación de ADN a partir de 10.000 ooquistes de *T. gondii* extraído con el estuche de Qiagen, se encontró, una concentración de ADN de 1,464 ng/μL (1.464.000 fg/μL) cuantificada por espectrofotometría en el equipo EPOCH (Biotek-EE.UU). Posteriormente se hizo una dilución 1:2 para obtener una concentración aproximada de 732.000 fg/μL (equivalente a aproximadamente 5.000 ooquistes) y se hicieron 6 diluciones seriadas 1:5 hasta obtener una concentración mínima de 9,376 fg/μL (Tabla 7). Posteriormente, fue sometido a amplificación por qPCR para la secuencia RE y B1 de *T. gondii*. Cada dilución de ADN fue amplificado por triplicado,

obteniendo un C_t mínimo de 25,53 para la secuencia RE de ADN de aproximadamente 5.000 ooquistes y un C_t máximo de 34,83 de ADN de aproximadamente 8 ooquistes (Tabla 7). Mientras que, para la secuencia B1 se obtuvo un C_t mínimo de 30,59 de aproximadamente 5.000 ooquistes y un C_t máximo de 36,88 de aproximadamente 8 ooquistes (Tabla 7 y Figura 3). Adicionalmente, se obtuvo un R^2 de 0,88 y una eficiencia de 83,6% para la secuencia RE y un R^2 de 0,81 y una eficiencia >100% para la secuencia B1.

Tabla 7. Detección de 7 diluciones seriadas 1:5 de ADN de *T. gondii* a partir de 5000 ooquistes para la secuencia RE y B1 en qPCR.

N. ooquistes inoculados	N. ooquistes por reacción	Concentración de ADN (fg/ μ L)	$\bar{X}C_t$ RE	$\bar{X}C_t$ B1
5000	250	732000	25,53	30,59
1000	50	29000	28,03	31,43
200	10	5860	30,77	32,89
40	2	1172	34,98	36,54 ^a
8	0,4	234,4	34,83 ^a	36,88 ^a
1,6	0,08	46,88	ND	ND
0,32	0,016	9,376	ND	ND

C_t : Ciclo que sobrepasa el umbral

ND: No detectado

a: Una única amplificación del triplicado

\bar{X} : Promedio

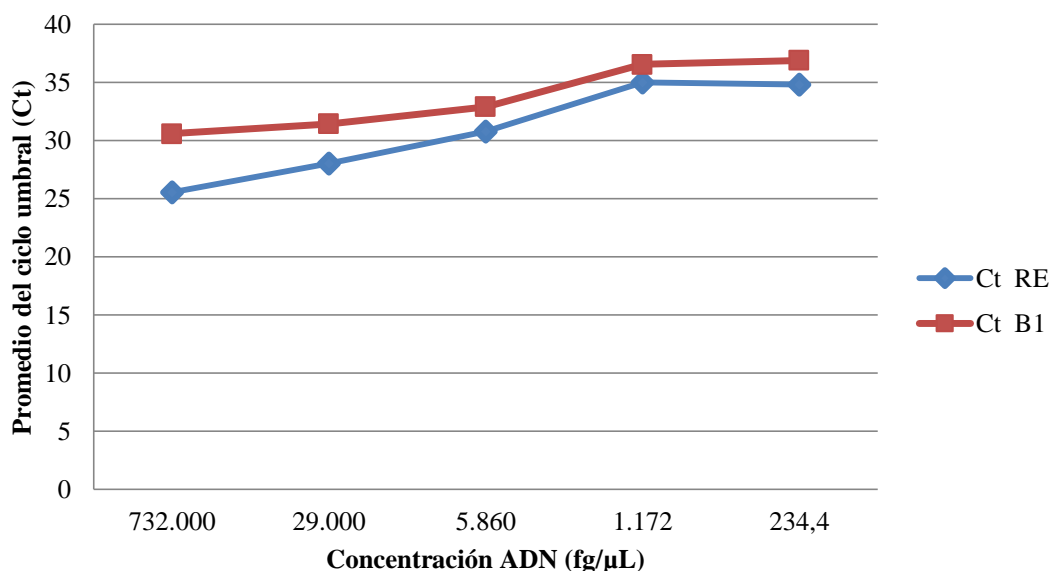


Figura 3. Comparación de la secuencia RE y B1 amplificadas. Promedio del ciclo umbral (Ct: *Cycle threshold*) para diferentes concentraciones de ADN de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en PCR en tiempo real por reacción en dos diferentes blancos (RE y B1).

Límite de detección de la PCR convencional para la secuencia B1 y PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE de T. gondii.

Al realizar la extracción de ADN de *T. gondii* con el estuche de Wizard y amplificar, por triplicado, la secuencia RE por medio de PCR en tiempo real, se encontraron amplificaciones a partir de 1 ooquiste con un C_t de 35,7. Además, se obtuvieron muestras positivas en todos los triplicados a partir de 1, 5, 10 y 50 ooquistes (Tabla 8). Luego, al realizar la extracción de ADN con el estuche de Qiagen, se lograron similares resultados, pero esta vez, el C_t obtenido a partir de 1 ooquiste, fue de 34,5. También, se obtuvo muestras positivas en todos los triplicados a partir de 1, 5, 10 y 50 ooquistes (Tabla 8).

Al realizar la extracción de ADN de *T. gondii* con el estuche de Wizard y amplificar, por triplicado, la secuencia B1 por medio de PCR en tiempo real, se encontraron amplificaciones a partir de 5 ooquistes con un C_t de 37,7.

Además, se obtuvo muestras positivas en todos los triplicados a partir de 10 y 50 ooquistes (Tabla 8). Luego, al realizar la extracción de ADN con el estuche de Qiagen, se obtuvieron amplificaciones a partir de 1 ooquiste, con un C_t de 36. Adicionalmente, se obtuvo muestras positivas en todos los triplicados a partir de 1, 5, 10 y 50 ooquistes (Tabla 8).

*Evaluación de inhibición de PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 asociada a lechuga (*Latuca sativa* var. *iceberg*) y repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) utilizando para la extracción de ADN el estuche de Wizard.*

Para la secuencia RE de *T. gondii* se encontraron amplificaciones por PCR en tiempo real a partir de ADN extraído de un ooquiste con el estuche de Wizard en medio concentrado de lechuga y repollo, aunque solo se obtuvo en una muestra positiva del triplicado realizado. Por otro lado, cuando se puso a prueba la reacción con la secuencia B1 se encontraron amplificaciones a partir de cinco ooquistes tanto en medio concentrado de lechuga como en repollo. Sin embargo, existió una muestra de 10 ooquistes inoculados en medio concentrado de lechuga en la cual no se obtuvo amplificación (Tabla 8).

*Evaluación de inhibición de PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 asociada a lechuga (*Latuca sativa* var. *iceberg*) y repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) utilizando para la extracción de ADN el estuche de Qiagen.*

Para la secuencia RE de *T. gondii* se encontraron amplificaciones a partir de ADN, extraído con el estuche de Qiagen, de 1 ooquiste por PCR en tiempo real en medio concentrado de lechuga y repollo con cada uno de su triplicado positivo. Por otro lado, cuando se puso a prueba la reacción con la secuencia B1 se encontraron amplificaciones a partir de un ooquiste para la secuencia RE y a partir de cinco ooquistes para la secuencia B1, aunque, en esta

prueba, todos los triplicados fueron positivos. Sin embargo, existió una muestra de 10 ooquistes inoculados en medio concentrado de lechuga en la cual no se obtuvo amplificación (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados obtenidos en medio concentrado inoculado.

Medio concentrado	No. De ooquistes inoculados	Cantidad aproximada ADN fg	Estuche Qiagen		Estuche Wizard	
			C _t RE	C _t B1	C _t RE	C _t B1
Solución salina 0,9%	1	146,5	34,5	36	35,7	ND
	5	732,5	30	32,5	34,9	37,7 ^a
	10	1465	32,8	35	32,1	35,7
	50	7.325	27,9	32,3	31,5	36
Lechuga	1	146,5	32,8	36,4	35,9 ^a	ND
	5	732,5	29,9	33,6	31,9	34,7
	10	1465	31,1	34,3	33,2	ND
	50	7.325	30,3	35,2 ^a	32,9	34,4
Repollo	1	146,5	35,9	ND	37 ^a	ND
	5	732,5	30,4	33,3	33,8	33,3
	10	1465	31	35,4	35,7	36,2
	50	7.325	31,3	31,3	30,9	36
Control RH	5000 células		26,4	28,6	26,4	28,04

Límite de detección y evaluación de inhibición de la PCR convencional para la secuencia B1 T. gondii a partir de ADN extraído con el estuche de Wizard y Qiagen.

Al realizar la extracción de ADN utilizando el estuche de Wizard Genomics de Promega (USA), las amplificaciones de la secuencia B1 (aproximadamente 96 pb) empezaron a ser visualizadas, en gel de agarosa al 1,5% luego de la electroforesis, a partir de la extracción de ADN de cinco ooquistes de *T. gondii* inoculados en 200 µL de PBS 1X. Lo mismo ocurrió, cuando la extracción de ADN se realizó con el estuche de extracción de ADN Qiagen

(Tabla 9). Por otro lado, cuando se realizó la evaluación de inhibición de la amplificación en medio concentrado de lechuga, se logró visualizar amplificaciones a partir de cinco ooquistes con ambos estuche de extracción. Luego, en medio concentrado de repollo, únicamente se logró obtener amplificaciones desde este mismo número con el estuche de Qiagen, pues con el estuche Wizard las amplificaciones se visualizaron a partir de 10 ooquistes. Sin embargo, cuando se adicionó BSA a la reacción de PCR en concentraciones de este a 200, 400 y 800 ng/ μ L, las muestras no amplificadas se lograron visualizar indicando que el límite de detección podía ser aumentada a un ooquiste en solución salina y un ooquiste en medio concentrado de lechuga cuando se utilizó el estuche de Qiagen y a un ooquiste en medio concentrado de repollo cuando se utilizó el estuche de Wizard. Así mismo, muestras que previamente habían sido reportadas negativas (75% de muestras con estuche Wizard y 83% de muestras obtenidas con Qiagen), lograron ser amplificadas (Tabla 9). Así, la concentración de 400 ng/ μ L de BSA permitió mejorar el límite de detección y permitió la amplificación de un mayor número de muestras reportadas negativas, por lo cual, esta concentración fue utilizada para todas las reacciones de PCR anidada para la secuencia B1 de *T. gondii*. El control positivo usualmente utilizado fue ADN de *T. gondii* de la cepa RH a partir de aproximadamente 10.000 parásitos por mililitro.

Tabla 9. Ooquistes de *T. gondii* cepa ME49 inoculados y ADN extraído a partir de 1, 5, 10 y 50 ooquistes utilizando el estuche de Wizard (Promega) y Qiagen), amplificadas por PCR clásica para la secuencia B1.

No. De ooquistes	Concentración aproximada de ADN (fg/ μ L)	Medio	PCR B1	
			Wizard	Qiagen
1	29,3	Solución salina	-	^b +
1	29,3	Lechuga	-	^c +
1	29,3	Repollo	^a +	-
5	146,5	Solución salina	+	+
5	146,5	Lechuga	+	+
5	146,5	Repollo	-	+
10	293	Solución salina	+	^c +
10	293	Lechuga	+	^{b,c} +
10	293	Repollo	+	-
50	1.465	Solución salina	+	+
50	1.465	Lechuga	+	+
50	1.465	Repollo	^{a,b} +	+

Muestras positivas luego de agregar BSA en concentraciones de **(a)** 200; **(b)** 400 y **(c)** 800 ng/ μ L.

5.3. Evaluación de inhibición de la PCR en tiempo real asociado a muestras.

Con el fin de evaluar si existía o no inhibición en la reacción de PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 dada en muestras de los restaurantes escolares que resultaron positivas por PCR convencional para la secuencia B1 y negativas por PCR en tiempo real.

Todas las muestras positivas (obtenidas de los restaurantes escolares) por PCR convencional anidada para la secuencia B1 de *T. gondii*, con excepción de la muestra de carne, resultaron positivas por PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1, sin una diferencia significativa entre los Cts de los amplificadores (RE Cts: $30,8 \pm 0,7$; B1 Cts: $34 \pm 1,1$). La muestra de ADN de carne que fue sometida a amplificación por PCR en tiempo real fue montada en electroforesis en gel de agarosa sin lograr visualizar ningún tipo de amplificado.

5.4. Encuestas para manipuladores de alimentos y evaluación de aspectos higiénicos y sanitarios.

Análisis descriptivo de encuestas realizadas a manipuladoras/es.

Se llenaron un total de 28 encuestas por los manipuladores/as de los restaurantes escolares. El 100% de los encuestados contestaron lavarse más de tres veces las manos durante la preparación de alimentos. El 100% se lava las manos después de la manipulación de productos cárnicos. El 64,3% limpian y desinfectan las superficies con hipoclorito y jabón, mientras que el 35,7% los hacen con solo jabón. El 64,3% contestaron limpiar y desinfectar los implementos de cocina con hipoclorito y jabón, el 32,1% con solo jabón y el 3,6% con solo hipoclorito. El 46,4% dijeron cambiar la esponja del lavaplatos mensualmente, el 21,4% una vez a la semana, el 21,4% cada

vez que fuese necesario y el 10,8% más de una vez por semana. El 100% contestaron que las neveras son lavadas semanalmente. El 85,7% realizan la limpieza de la cocina antes y después de procesar los alimentos, mientras que el 14,3% después de procesar los alimentos. El 100% usan tabla de picar de plástico para los vegetales. De la misma manera ocurrió para los alimentos cárnicos. El 60,7% indicaron utilizar tablas de picar diferentes para los vegetales y la carne, mientras que el 29,3% indicaron usar la misma tabla de picar. El 89,3% de los encuestados indicaron lavar los vegetales con agua cruda o de grifo, mientras que el 10,7% utilizaban el hipoclorito diluido en agua para lavarlos. El 100% indicaron utilizar la fruta sin procesar para la preparación de jugos. El 100% utiliza agua hervida para la preparación de los jugos. El 67,9% almacenan los vegetales a una temperatura menor o igual a 18 °C, mientras que el 32,1% los almacenan a una temperatura mayor a 18 °C (temperatura tomada con termómetro de sonda). El 53,6% almacenan la carne a una temperatura menor o igual a -10 °C, mientras que el 46,4% a una temperatura mayor a -10 °C (temperatura tomada con termómetro de sonda). El 89,3% utilizan gorro y tapabocas como implementos de bioseguridad, mientras que el 10,7% utilizan guantes, gorro y tapabocas. El 89,3% indicaron que el material de los recipientes de almacenamiento de los alimentos era de plástico y el 10,7% indicaron que el material era de aluminio. El 57,1% indicaron que existía tanque de reserva en el restaurante, mientras que el 42,9% indicaron no contar con tanque de reserva. El 67,9% indicaron que los mesones de la cocina eran de cemento, 21,4% de acero inoxidable y el 10,7% de baldosa. El 78,6% indicaron que el suelo de la cocina era de cemento, mientras que el 21,4% indicaron que era de baldosa. El 81,5% de los encuestados contestaron recibir capacitación 2 o más veces al año y el 18,5% menos de 2 veces al año. El 78,6% tenían uno o más años de experiencia laboral y el 21,4% menos de un año de experiencia laboral. Finalmente, el 50% de los encuestados indicaron haber alcanzado secundaria, el 46,4% primaria y el 3,6% ninguna escolaridad alcanzada.

5.5. Análisis estadísticos.

Correlación de variables encuestadas en comparación con la presencia de ADN de T. gondii.

Luego de cruzar todas las respuestas (cuando existía diferentes tipos de respuesta por cada pregunta) obtenidas en las encuestas de los manipuladores con la prevalencia de ADN de *T. gondii* obtenida en los alimentos no se encontró alguna correlación estadísticamente significativa. De igual modo, no se encontró al cruzar el tipo de alimento o muestra obtenida con la prevalencia de ADN de *T. gondii*. Sin embargo, cuando se cruzaron las variables de “material del piso de la cocina”, “experiencia laboral de los manipuladores” y “restaurantes”, con la prevalencia, se encontró una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con $p = 0,01$; $p = 0,0006$; y, $p = 0,027$ respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba de Ji cuadrado para encontrar o no correlación entre las variables encuestadas y presencia o ausencia de ADN de *T. gondii* por PCR para la secuencia B1.

Variables	vs	Muestras PCR B1	P-Valor X² (95%)	Presenta (p<0,05) o No presenta (p>0,05) correlación
Material del piso de la cocina	vs	Muestras PCR B1	0,01	Correlación
Experiencia laboral de los manipuladores	vs	Muestras PCR B1	0,0006	Correlación
Utiliza diferente tabla de picar para vegetales y carne	vs	Muestras PCR B1	0,85	No correlación
Materiales de limpieza y desinfección de superficies	vs	Muestras PCR B1	0,06	No correlación

Materiales de limpieza y desinfección de implementos de cocina	vs	Muestras PCR B1	0,27	No correlación
Frecuencia con la que cambia la esponja del lavaplatos	vs	Muestras PCR B1	0,09	No correlación
Momento de realización de la limpieza de la cocina	vs	Muestras PCR B1	0,25	No correlación
Agua con la que lava los vegetales	vs	Muestras PCR B1	0,25	No correlación
Temperatura de almacenamiento de vegetales (°C)	vs	Muestras PCR B1	0,62	No correlación
Temperatura de almacenamiento cárnico	vs	Muestras PCR B1	0,2	No correlación
Implementos de bioseguridad que utiliza	vs	Muestras PCR B1	0,18	No correlación
Material de recipientes para almacenar la comida preparada	vs	Muestras PCR B1	0,18	No correlación
Tanque de reserva	vs	Muestras PCR B1	0,71	No correlación
Material de los mesones de la cocina	vs	Muestras PCR B1	0,78	No correlación
Frecuencia con la que recibe capacitación al año	vs	Muestras PCR B1	0,92	No correlación
Escolaridad alcanzada	vs	Muestras PCR B1	0,49	No correlación
Tipo de muestra	vs	Muestras PCR B1	0,59	No correlación

Al realizar la prueba para el Coeficiente V de Cramer, en las variables que poseían correlación según la prueba Ji cuadrado con la presencia o ausencia de ADN de *T. gondii*, se encontró que el grado de asociación fue bajo, entre

0,16 a 0,29; donde el valor más cercano a 1 indica alto grado de asociación (Tabla 11).

Tabla 11. Coeficiente V de Cramer para la presencia o ausencia de ADN de *T. gondii* y variables encuestadas correlacionadas por la prueba Ji cuadrada.

PCR B1 vs	V Cramer
Material del piso de la cocina	0,1606
Experiencia laboral de los manipuladores	0,2357

6. Discusión

Este es el primer estudio en detectar la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de alimentos, en la superficie de la palma de la mano de operarios o manipuladores y en superficies inertes, relacionados con la preparación de alimentos, en este caso rallador, cuchillo para cortar vegetales y tabla de picar vegetales, de restaurantes escolares. Recientemente se reportó la presencia de ADN de *Toxoplasma* en cajeros automáticos y queda por establecer su potencial contaminante (44). En total 13 (6,1%) muestras de ADN resultaron positivas por PCR convencional para la secuencia B1, y de estas, 7/13 (53,8%) pertenecían a alimentos, 3/13 (23,07%) de superficies vivas y 3/13 (23,07%) superficies inertes. Este resultado indica un potencial riesgo para los usuarios de los restaurantes escolares, la población infantil, ya que, los alimentos son una de las principales y mayores fuentes de transmisión de la infección de *T. gondii* (45).

Cuando se evaluó la presencia de inhibidores que pudieran estar inhibiendo el proceso de PCR en tiempo real para la secuencia RE y B1 de *T. gondii*, se encontró que las muestras de ADN extraídas de carne, probablemente se encuentran inhibiendo la actividad de la polimerasa o la polimerasa y las sondas. En experimentos por PCR en tiempo real para evaluar la presencia de inhibidores que se obtienen en la extracción de ADN de carne de res, se ha encontrado que con el estuche de Wizard se obtiene una alta presencia de inhibidores en comparación con la extracción de ADN realizada con el estuche de Qiagen (46). En ese mismo estudio, en la extracción de ADN realizada con ambos estuches, se utilizaron entre 20 mg a 25 mg de tejido, mientras que, en nuestro estudio, se emplearon 5 g (5.000 mg) para la

extracción de ADN con el estuche de Wizard. Lo cual, podría indicar aún mayor presencia de inhibidores.

En carne de res se encontraron 1/12 (8,3%) muestras positivas, lo cual se considera bajo en comparación con las 16/20 (80%) encontradas en la ciudad de Armenia en el año 2007 (18), las 11/40 (27,5%) en Sincelejo en el año 2014 (24), las 22/60 (36,6%) en el eje cafetero en el año 2015 (25) y 14/40 (35%) en Armenia en el año 2015 (17). Aunque, las reses son descritas como pobres hospederos de *T. gondii* y de limitada importancia en la epidemiología de la toxoplasmosis (47), una baja prevalencia no es observada en Europa y Sur América (48), incluso, según Opsteegh y colaboradores (49), proponen un modelo en el cual la carne de res infectada es responsable del 67,6% de infección humana por consumo de carne. La PCR es una útil manera de identificar la presencia de ADN de *T. gondii* en carne (probablemente tejido quístico), además, evaluar una mayor cantidad de tejido y concentrar el ADN del parásito podría aumentar la probabilidad de encontrar amplificaciones por PCR (50).

De acuerdo a la opinión de varios autores, para evitar la viabilidad de *T. gondii* en tejido de carne de cerdo, res, ternero y cordero se deben cocinar los cortes por lo menos a 65,5°C por tres minutos; mientras que, la carne molida a 71,1°C o más, y la carne de aves a 73,9°C o más (51). Los procedimientos en la cocina involucran una combinación de tratamientos que podrían ser implementados para evitar la infectividad por parte de la carne como procedimientos de congelación a -20°C, que es una de las opciones de manejo del riesgo más práctica (23,52).

El mayor número de muestras positivas por PCR pertenecían a muestras de agua 5/13 (38,4%), así 2/30 (6,6%) de agua hervida para la preparación de jugos, 2/20 (20%) agua de grifo y 1/12 (8,3%) de jugo. De forma particular, en los restaurantes donde se encontraron muestras positivas para jugo

(restaurante 3), siendo este el primer reporte de detección de ADN de *T. gondii* en jugo de guayaba, se encontraron muestras positivas para agua hervida y agua de grifo, lo cual podría sugerir una posible ruta de contaminación. Comparando con estudios realizados en la región, la prevalencia encontrada en muestras en agua de grifo de 2/10 (20%) es menor que la encontrada por Triviño y colaboradores, en el 2016 (19), en muestras de agua de grifo de los hogares en la ciudad de (37,5%). Algo muy particular, fue haber encontrado muestras positivas en agua hervida, y aunque es probable que al alcanzar temperaturas mayores a 60°C por al menos un minuto (53) y que la PCR no puede demostrar la infectividad, es un buen indicador del nivel de exposición de agua para consumo humano a protozoos parásitos (54).

Aunque el nivel de contaminación no es usualmente conocido, algunas medidas pueden ayudar a prevenir la infección de *T. gondii* a través del agua. Las personas deberían de evitar la ingestión de agua sin tratar, incluso, durante actividades de recreación. Si esta agua no tratada es fuente principal de consumo, se debe filtrar con filtros con poros no mayores a 1 µm o hervir el agua para eliminar el parásito. Los tratamientos con cloro no inactivan *T. gondii*. Sin embargo, la tintura de yodo al 2% puede inactivar el parásito al ser expuesto por 3 horas. Cuando existen gatos alrededor de las fuentes de agua, el acceso debe ser restringido (55).

Estudios realizados con el fin de detectar *T. gondii* en matrices de vegetales y frutas para consumo humano han sido realizados desde Lass y colaboradores en el 2012 (27), y luego en el año 2016 (32,34), considerándose reciente este tema en particular. En el presente trabajo, se encontró 1/9 (11,1%) muestra positiva por PCR convencional para la secuencia B1 en vegetal de pepino y 1/30 (3,3%) del total de vegetales muestreados (zanahoria, lechuga, pepino y tomate). Considerándose un porcentaje menor al encontrado por Lass y colaboradores (27) quienes encontraron 9/50 (18%) en lechuga y 9/46 (19,5%) en zanahoria; y mayor al

encontrado por Lalonde y colaboradores (34), en donde de 1171 muestras vegetales encontraron solo 3 (0,26%). De igual manera, Marchioro y colaboradores (32) encontraron un porcentaje menor, al encontrado en nuestro estudio, de 1/62 (0,6%) en lechuga lisa y 4/106 (3,7%) en lechuga variedad iceberg. Aunque en ninguno de estos estudios se detectó ADN de *T. gondii* en muestras vegetales de pepino.

Según El-Tras y colaboradores (52), agregar agua caliente a 65°C por 1 minuto en los vegetales, deja inviable los ooquistes de *T. gondii*, sin embargo, los vegetales resultan parcialmente marchitados y pierden textura. Por otro lado, en este mismo estudio, utilizar solución de vinagre (300 mL por 1 L de agua, pH 4,2) a 45°C es una efectiva alternativa para dejar inviables estos parásitos sin afectar la textura de los vegetales.

Se tomó la decisión de evaluar las muestras de huevo porque estos pueden ser considerados una potencial fuente de infección de *T. gondii*. Experimentalmente, infección inducida en gallinas resultó en el aislamiento de *T. gondii* en huevos crudos (56). Sin embargo, huevos de aves de corral criadas muestran ser virtualmente libres de *T. gondii*, y los taquizoitos son susceptibles a calentamiento y concentraciones de sales; por lo tanto, cualquier tipo de preparación podría eliminar los taquizoitos (5). Pero, en este estudio, no se encontró ninguna muestra de huevo positiva para ADN de *T. gondii*.

Las muestras de superficies inertes positivas por PCR, rallador de vegetales, cuchillo para cortar vegetales y tabla de picar vegetales, representaron un 1,4% del total de muestras obtenidas, el 5,8% de las muestras inertes en total obtenidas y un 23,07% de las muestras positivas para ADN de *T. gondii*. Un estudio mostró, que quienes lavaban los cuchillos infrecuentemente podrían incrementar el riesgo de infección. (57). El tratamiento térmico es el método más seguro de inactivar el parásito, mientras que la seguridad

alimentaria depende en gran medida de los manipuladores de los alimentos (23). Se ha demostrado un que seguir medidas de prevención tales como lavar las manos luego de manipular la carne cruda, lavar los utensilios que tienen contacto con la carne cruda, lavar las frutas y vegetales antes de ser consumidos y evitar contacto con herramientas o utensilios contaminados con heces de gatos disminuye el riesgo de infección (58). Sin embargo, al encuestar los manipuladores, se encontró, que aunque el 100% de estos se lavaban las manos luego de manipular productos cárnicos, los métodos de desinfección utilizados, como el uso del jabón, no serían suficientemente eficientes contra el parásito y cerca del 30% indicó usar la misma tabla de picar al manipular productos cárnicos y vegetales. Adicionalmente, cerca del 90% utilizaba agua cruda para lavar los vegetales, lo cual, podría permitir una contaminación cruzada entre agua, vegetales y utensilios de manipulación de estos. Así, podría ser probable, que en el restaurante 3 y 10 al tener agua de grifo contaminada, agua con la cual se lavan los vegetales y utensilios de cocina, pueda estar relacionado con el hecho de que las superficies inertes o utensilio de cocina, que tuvieron contacto con estos vegetales, resultaran contaminados.

En este estudio, las superficies vivas PCR B1 positivas tuvieron el segundo mayor porcentaje entre las muestras con presencia de ADN del parásito, con 3/13 (23,07%), 3/31 (9,7%) del total de muestras de superficies vivas obtenidas y representan el 1,4% de las 213 muestras totales obtenidas. Aunque el contacto con carne cruda o no procesada se sospecha es una de las principales fuentes de infección que lleva a contaminación de las manos (23), dos de estas muestras positivas provienen de restaurantes en donde la proteína del menú del día era huevo y no productos cárnicos, por lo cual, la contaminación cruzada podría provenir de otra fuente como el agua, ya que en estos restaurantes, se encontraron muestras positivas en esta matriz. El-Tras y colaboradores en el 2012 (52) encontraron que existía diferencia

estadísticamente significativa entre la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres amas de casa que utilizaban guantes para cocinar y quienes no utilizaban guantes, teniendo un menor porcentaje quienes usaban guantes. En las encuestas obtenidas, encontramos que el 89,3% de las/los manipuladores no utilizaban guantes para cocinar, mientras que, solo el 10,7% si los utilizaban, en relación a esto, en donde se utilizaron guantes no se encontraron muestras positivas en ninguna de las muestras tomadas. Por lo cual, la adecuada utilización de guantes (lavándolos o cambiándolos después de manipular cada tipo de alimento) podría, no solo proteger a manipuladores de alimentos contra la contaminación e infección de *T. gondii* al manipular alimentos cárnicos (59,60), sino también, contra otras fuentes de contaminación como el agua de grifo y los vegetales crudos o no tratados.

Luego de realizar el análisis estadístico con Ji cuadrado se encontró una correlación con “el tipo de suelo” existente en la cocina de los restaurantes escolares. El 80% de los restaurantes escolares tenían el material de piso de la cocina en baldosa y se encontraron muestras positivas para ADN de *T. gondii* en 50% de estos. Mientras que, en el 20% de los restaurantes restantes, donde el material del piso de la cocina era cemento o concreto, se encontró muestras positivas en el 100% de estos. El suelo es uno de los principales reservorios de transmisión de *T. gondii*. Las heces de los gatos pierden su olor, color y consistencia, y otras características, en aproximadamente dos semanas en la mayoría de tipos de suelo; sin embargo, ooquistes viables pueden ser recuperados 18 meses después (61). Esto, podría provocar que no se evidencie el ambiente contaminado, pues, la materia fecal de los gatos en suelo de tierra compacta puede ser relativamente invisible debido al similar color entre la tierra y las heces. En contraste, en suelo de tierra suelta, los gatos pueden cubrir el depósito fecal, y en suelo de madera, o lisos, las heces pueden ser notadas y removidas (62). Por lo tanto, el contacto con el suelo es una aproximación de posible

ingestión de ooquistes. Así, la seroprevalencia en humanos ha sido asociada con suelo de tierra (62) y en cocinas con suelo en material de cemento o concreto (61). También, encontramos que tal contaminación también puede extenderse a través del suelo u otras superficies a través del caminado aerolizando partículas infecciosas a una altura en la que sería posible la respiración y contacto de los humanos (63). Por lo cual, Rashid y colaboradores (63), sugieren que la desinfección efectiva y limpieza de suelos y de suela de zapatos podrían impactar directamente en la generación de estos aerosoles. Sin embargo, se ha demostrado que utilizar hipoclorito de sodio al 5,25%, altas concentraciones de cloro y ozono no son totalmente efectivos para inactivar los ooquistes de *T. gondii* (64,65). Por lo cual, nuevos métodos de desinfección deben ser analizados.

La correlación estadísticamente significativa por Ji cuadrado entre la presencia/ausencia de ADN de *T. gondii* y la experiencia laboral de las/los manipuladores, podría estar relacionada con el hecho de falta de capacitación para la preparación de alimentos de los manipuladores. En Colombia, se ha indicado que de 1.522 manipuladores, solo el 64% han recibido capacitación, y que el no recibirla, puede influir en actividades en la cocina como no tapar el agua una vez hervida, no lavar las hortalizas y frutas con agua potable, lo cual sucedió con el 90% de los encuestados en nuestro estudio; malas prácticas de manufactura (en el mismo lugar colocar materias primas y productos terminados), no rotular los recipientes para almacenar alimentos o materias primas, no almacenar la carne en porciones, no descongelar lentamente, dejar alimentos cocidos a temperatura ambiente por más de una hora sin protección, el no uso de uniformes adecuado, no usar guantes para lavar utensilios y equipos (66). Además, El uso de mezclas inadecuadas para desinfección, como la de agua, cloro y jabón, en la que se inactiva tanto el poder detergente del jabón como el desinfectante del cloro, evidencia el poco conocimiento de los procesos de limpieza, y la manera

empírica y sin verificación en que se realizan, y responde a la poca capacitación de los manipuladores (66).

En la actualidad, 2017, un estudio realizado en Polonia, dio útiles resultados concernientes a la detección de ADN de *T. gondii* en muestras de aire ambiental, a través de la aplicación de dos técnicas moleculares: PCR en tiempo real y ensayo LAMP; y microscopía óptica. Así, se encontraron 2/71(3%) muestras positivas y en una de estas se lograron identificar ooquistes, generando nuevos conocimientos en epidemiología y posibles rutas de transmisión vía respiratoria. Esto indicaría que ooquistes de *T. gondii* podrían flotar en el viento y contaminar el aire. Esto crea un potencial riesgo para niños jugando en arena o adultos trabajando en un huerto, no solo por el contacto con el suelo, sino también por el aire contaminado respirado (67).

Los resultados obtenidos en la estandarización de la curva de amplificación por PCR en tiempo real de la presente investigación utilizando ADN control de *T. gondii* extraído a partir de ooquistes (ME49) mostraron que la secuencia RE resultó ser más sensible en comparación con la secuencia B1, lo cual, ha sido reportado previamente (38,39,68). Según Taylor y colaboradores (69), dependiendo de la polimerasa, se pueden encontrar porcentajes de eficiencia entre -50,8% a 337,3% y R^2 entre 0,57 a 0,99. Otros factores que pueden provocar que los valores de eficiencia den por debajo o por encima del 100% está relacionada con la calidad de la muestra o problemas de pipeteo (70). Así, encontramos que los resultados obtenidos pueden ser una aproximación como modelo de cuantificación (de ooquistes de *Toxoplasma gondii*).

En este estudio fue necesario probar ambos blancos de amplificación ya que también existen reportes de que la secuencia B1 puede ser mejor blanco de amplificación que RE (38,71,72). Además, se ha indicado que el 4,8% de

cepas del parásito aisladas a partir de muestras humanas, parte o toda la región repetitiva RE se encuentra removida o ausente (71).

Por otro lado, cuando se realizaron las pruebas de límite de detección y evaluación de inhibición de amplificación inoculando 1, 5, 10 y 50 ooquistes en solución salina y en muestras concentradas de lechuga y repollo, en donde el ADN fue extraído con dos estuches diferentes (Qiagen y Wizard), se encontró, que para realizar PCR en tiempo real, ambos funcionaron. Con límites de detección desde 1 y 5 ooquistes de *T. gnodii*. Además, el método de extracción con el estuche Qiagen tuvo resultados de límites de detección menores dados a que en el proceso de purificación de ADN con el estuche Qiagen se utiliza una columna con una membrana de gel de sílice que reduce la inhibición en la reacción de PCR en tiempo real o PCR y permite mayor sensibilidad y una estimación más precisa de concentración de ADN (73). Así, a pesar de que con el estuche de Wizard, según las mediciones por espectrofotometría se logran mayores concentraciones de ADN pueden quedar impurezas que interfieren en las mediciones (46).

La evaluación de inhibición de amplificación fue realizada en la matriz vegetal, ya que estos inhibidores pueden afectar directamente la ADN polimerasa, cambiando la composición del tampón, o uniéndose a los ácidos nucleicos.(74). Así, en las plantas se pueden encontrar sustancias inhibitorias tales como polisacáridos, pectina, polifenoles, xilano, dextrano y sulfato de dextrano (75). Además, matrices como el agua, sedimentos acuosos y suelos, que pueden estar en contacto con los vegetales y pueden contener sustancias húmicas en donde son conocidas como causa principal de que las amplificaciones fallen por su actividad inhibitoria en PCR en tiempo real y PCR, probablemente, inhibiendo la actividad de la polimerasa y produciendo efectos negativos en la actividad de fluorescencia producida por intercalantes (74).

Al evaluar el límite de detección e inhibición de la amplificación de la PCR convencional para la secuencia B1 de *T. gondii*, se encontró que esta podría detectar desde un ooquiste inoculado en solución salina y en muestras concentradas de lechuga y repollo en presencia de BSA (*Bovine Serum Albumine: Albúmina Sérica Bovina*) en diferentes concentraciones, y, así mismo, se logró amplificación en muestras que habían tenido resultados previos negativos. Jiang y colaboradores en el 2005, encontraron que un facilitador de PCR como el BSA en muestras de ADN de origen ambiental, mejoró el rendimiento de amplificación, indicando que los inhibidores residuales de PCR estaban presentes en ADN, así se demostró que 400 ng/ μ L de BSA permite disminuir altamente el impacto de los inhibidores en las amplificaciones de PCR (76), la misma concentración que en nuestro estudio resultó ser la más efectiva en la producción de amplificadas. El BSA es una proteína activa en sangre con buena capacidad de unión de conocidos inhibidores como bilirrubina y ácidos grasos, ácido húmico y ácido fulmínico (69,74,75), ácido tánico, heces, melanina, cloruro de hierro, hemina (75). Sidstedt y colaboradores en el 2015 (74) mostraron que el BSA tiene grandes efectos en el ácido húmico que causa inhibición en la amplificación, probablemente, protegiendo las moléculas de ADN polimerasa al unirse a moléculas de ácido húmico. Sin embargo, no encontraron efecto de BSA en la disminución de fluorescencia por parte de ácido húmico.

Al realizar una comparación entre PCR anidada convencional para la secuencia B1 y PCR en tiempo real para la secuencia B1 y RE, encontramos que la PCR convencional es más sensible que la PCR en tiempo real. En los experimentos realizados se encontraron amplificaciones por PCR convencional desde 29,3 fg de ADN por reacción en presencia de BSA. Mientras que, con qPCR se encontraron a partir de 146,5-732,5 fg de ADN por reacción. Aunque, estas mínimas concentraciones de ADN detectadas son difíciles de reproducir, la PCR convencional continúa siendo más

sensible. Similares resultados se han encontrado en estudios comparativos de PCR anidada convencional y PCR en tiempo real tanto en la detección de organismos como *Mycobacterium tuberculosis* (77) y de *Histomonas meleagridis* (78), como, *T. gondii* (79–81). Por otro lado, existen otros estudios con resultados diferentes, donde la PCR en tiempo real resultó ser más sensible que la PCR convencional anidada (82–84). Bastien y colaboradores, 2008 (85), indican que esta variación en la sensibilidad de las técnicas no solo es debida a la selección de cebadores o el método de extracción de ADN, sino también, a los aspectos que tienen que ver con la optimización de las técnicas. Así, el total del volumen de la reacción, las concentraciones de los reactivos y el volumen de ADN plantilla empleado, juegan una función vital en la sensibilidad de la prueba, incluso, el tipo de polimerasa y sus propiedades (74) pueden también afectar esta característica en la reacción la reacción.

7. Conclusiones

En este estudio se detectó la presencia de ADN de *T. gondii* en muestras de carne de res (8,3%), agua de grifo (20%), agua hervida (6,6%) y el primero en detectar este ADN en pepino (11,1%), jugo (8,3%), superficies vivas (9,7% palma de mano de manipuladores) y superficies inertes (5,8% rallador de vegetales, cuchillo para picar vegetales y tabla de picar vegetales).

El material del piso de las cocinas de los restaurantes escolares y la experiencia laboral de los manipuladores se encontraron asociados, de manera estadísticamente significativa $P < 0,05$ (0,01 y 0,0006 respectivamente), con las muestras positivas para ADN de *T. gondii*.

También, la muestra positiva en carne de res en nuestro estudio indica que los usuarios del restaurante escolar podrían encontrarse en riesgo de infección por esta vía tal como ha sido reportado previamente.

El blanco RE por PCR en tiempo real y el estuche de extracción Qiagen obtienen resultados más sensibles, cuando se aplica en la matriz vegetal se cambia profundamente el desempeño de la prueba y la técnica PCR convencional para la secuencia B1 con Qiagen y utilizando la BSA obtiene un menor límite de detección.

Los niños de primaria en las escuelas son un grupo importante de investigación. Puesto que pueden ser vulnerables a adquirir el parásito *T. gondii* debido a sus hábitos de jugar en el agua o con el agua, en el suelo, alimentos crudos, contacto con mascotas, que incluyen perros, gatos y aves, alimentos y consumo de agua no tratada. Considerar que los niños se encuentran en riesgo de infección, e iniciar actividades de prevención en esta población podría permitir que, en términos de salud pública, el riesgo sea minimizado.

8. Recomendaciones

- En los experimentos que buscan detectar el ADN de *T. gondii* a través de PCR o PCR en tiempo real para secuencia RE deberían realizarse a la par con otras secuencias como B1, ya que, podría darse el caso que la secuencia RE se encuentre parcial o totalmente ausente.
- Utilizar otros marcadores de PCR, distintos a RE y B1, podrían permitir subtipificar el ADN o encontrar genotipos de *T. gondii*.
- Utilizar el BSA en concentraciones de 400ng/ μ L en los procesos de PCR convencional que se realicen.

9. Bibliografía

1. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59(5):429–93.
2. Vanwormer E, Fritz H, Shapiro K, Mazet JAK, Conrad PA. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human – animal – environment interface. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(3):217–31.
3. FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/, World Health Organization]. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. *Microbiological Risk Assessment Series No. 23.* Rome; 2014. 302 p.
4. Robertson LJ, van der Giessen JWB, Batz MB, Kojima M, Cahill S. Have foodborne parasites finally become a global concern? *Trends Parasitol.* 2013;29(3):101–3.
5. Bahia-oliveira L, Gomez-marin J, Shapiro K. *Toxoplasma gondii*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros. *Glob Water Pathog Proj* <http://www.waterpathogens.org> (R Fayer W Jakubowski, Part 3 Protists) <http://www.waterpathogens.org/book/toxoplasma-gondii> Michigan State Univ E Lansing, MI, [UNESCOgens.org/book/toxoplasma-gondii](http://unesco.org/book/toxoplasma-gondii) M. 2017;
6. Sullivan J, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;10(1):54–6.
7. Quihui-Cota L, Valencia ME, Crompton DWT, Phillips S, Hagan P, Diaz-Camacho SP, et al. Prevalence and intensity of intestinal

- parasiticinfections in relation to nutritional status in Mexican schoolchildren. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(11):653–9.
8. Xin K, Liu H, Wang H, Yao Z. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Among Primary School Children in Shandong Province , China. *Korean J Parasitol.* 2015;53(4):489–92.
 9. Giraldi N, Vidotto O, Navarro IT, Ogawa L, Kobylka E. Toxoplasma antibody and stool parasites in public school children, Rolândia, Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(3):215–9.
 10. Ali Z, Mohammad Hossein M, Khadijeh D. Toxoplasma chorioretinitis in primary school children. *Med Sci Monit.* 2007;13(4):201–6.
 11. Fu C, Chuang T, Lin H, Wu C, Liu Y. *Toxoplasma gondii* Infection : Seroprevalence and Associated Risk Factors among Primary School Children in the Capital Area of the Republic of the Marshall Islands. *Jpn J Infect.* 2014;(1):405–10.
 12. Mizgajska-wiktor H, Jarosz W, Andrzejewska I, Krzykała M, Kozłowska M. Differences in some developmental features between *Toxoplasma gondii* - seropositive and seronegative school children. *Folia Parasitol* 60. 2013;5:416–24.
 13. Sharif M, Daryani A, Barzegar G, Nasrolahei M. A seroepidemiological survey for toxoplasmosis among schoolchildren of Sari , Northern Iran. *Trop Biomed.* 2010;27(2):220–5.
 14. Fan C, Lee L, Liao C, Huang Y, Lee Y, Chang Y, et al. *Toxoplasma gondii* infection : relationship between seroprevalence and risk factors among primary schoolchildren in the capital areas of Democratic Republic of São Tomé and Príncipe , West Africa. *Parasit Vectors.* 2012;1–7.

15. Brasileira S, Tropical DM, Gyang VP, Akinwale OP, Lee Y. *Toxoplasma gondii* infection : seroprevalence and associated risk factors among primary schoolchildren in Lagos City , Southern Nigeria. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(1):56–63.
16. Slifko TR, Smith H V., Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol. 2000;30(12–13):1379–93.
17. Alvarez C, Vargas M, Herrera C, Uribe-huertas LD, Lora F, Gómez-marín JE. Striking divergence in *Toxoplasma* ROP16 nucleotide sequences from human and meat samples. J Infect Dis. 2015;211(2):1–8.
18. Lora-suarez F, Aricapa J, Pérez J, Arias L, Idarraga S, Mier D, et al. 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. 2007;11(3):117–23.
19. Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga JD, Gomez-Marin JE. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. Parasitol Res. 2016;115(5):1789–97.
20. Diseases AP. The gistory of *Toxoplasma gondii* —The first 100 years. Eukaryot Microbiol. 2008;55(6):467–75.
21. Patiño L, Zuleta J De, Toro G. *Toxoplasma* (Cavlae) en Colombia. Rev la Fac Med. 1944;24(8):737–42.
22. Cañón-Franco WA, López-Orozco N, Gómez-Marín JE, Dubey JP. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. Parasit Vectors. 2014;7:427.
23. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis

- transmitted by meat. *Int J Parasitol.* 2008;38(12):1359–70.
24. Campo-Portacio DM, Discuviche-Rebolledo MA, Blanco-Tuiran PJ, Montero-Perez YM, Orozco-Mendez KE, Assia-Mercado YM. Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen B1 en carnes de consumo humano. *Infectio.* 2014;18(3):93–9.
 25. Franco-hernandez EN, Acosta A, Cortés-vecino J, Gómez-marín JE. Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. *Parasitol Res.* 2015;115(2):691–695.
 26. Lora-suarez F, Rivera R, Triviño-valencia J, Gomez-marin JE. Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Res.* 2016;
 27. Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Myjak P. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:1101–8.
 28. Cook N, Paton CA, Wilkinson N, Nichols RAB, Barker K, Smith H V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries . Part 1: Development and optimization of methods. *Int J Food Microbiol.* 2006;109(3):215–21.
 29. Hohweyer J, Cazeaux C, Travaillé E, Languet E, Dumètre A, Aubert D, et al. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.* 2016;57(March):36–44.
 30. Travaillé E, Stéphanie L, Gargala G, Aubert D, Guyot K, Dumètre A, et al. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts , *Cryptosporidium spp* . and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control.* 2016;59:359–65.

31. Lalonde LF, Gajadhar AA. Optimization and validation of methods for isolation and real-time PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits. *Food Waterborne Parasitol.* 2016;2:1–7.
32. Marchioro AA, Tiyo BT, Colli CM, Souza CZ De. First detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the fresh leafs of vegetables in South America. *VECTOR-BORNE ZOONOTIC Dis.* 2016;XX(XX):2–4.
33. Lalle M, Possenti A, Dubey JP, Pozio E. Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiol.* 2018;70:137–42.
34. Lalonde LF, Gajadhar AA. Detection of *Cyclospora cayetanensis* , *Cryptosporidium spp* ., and *Toxoplasma gondii* on imported leafy green vegetables in Canadian survey. *Food Waterborne Parasitol.* 2016;2:8–14.
35. Chandra V, Torres M, Ortega YR. Efficacy of wash solutions in recovering *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Toxoplasma gondii* from basil. *J FOOD Prod.* 2014;77(8):1348–54.
36. de Souza CZ, Rafael K, Sanders AP, Tiyo BT, Marchioro AA, Colli CM, et al. An alternative method to recover *Toxoplasma gondii* from greenery and fruits. *Int J Environ Health Res.* 2016;26(5–6):600–5.
37. Botero P, Tibaduiza C. Instructivo para toma de muestras y análisis de productos alimenticios y bebidas alcohólicas en puertos. Subdirección Aliment y Bebidas Alcohólicas INVIMA. 2003;1–18.
38. Cardona N, Basto N, Parra B, Zea AF, Pardo CA, Bonelo A, et al. Detection of *Toxoplasma* DNA in the peripheral blood of HIV-positive patients with neuro-opportunistic infections by a Real-Time PCR assay.

- J Neuroparasitology. 2011;2:1–6.
39. Homan WL, Vercammen M, Braekeleer J De, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR p. Int J Parasitol. 2000;30:69–75.
 40. Torres E, Rivera R, Carndona N, Sanchez V, Lora F, Gómez-Marín J. Evaluation of IgG anti-Toxoplasma avidity and polymerase chain reaction in the postnatal diagnosis of congenital Toxoplasmosis. Pediatr Infect Dis. 2013;32(6):6–8.
 41. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989;27(8):1787–92.
 42. Mason S, Quinnell RJ, Smith JE. Detection of *Toxoplasma gondii* in lambs via PCR screening and serological follow-up. Vet Parasitol. 2010;169(3–4):258–63.
 43. Ponce N, Gomez-Marín JE. 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. 2003;7:8–14.
 44. Bik HM, Maritz JM, Luong A, Dominguez-bello MG, Carlton M. Microbial Community Patterns Associated with Automated Teller Machine Keypads in New York City. City Msph. 2016;1(6):1–18.
 45. Jones JL, Dubey JP. Foodborne toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 2012;55(6):845–51.
 46. Yalçınkaya B, Yumbul E, Moziog E, Akgoz M. Comparison of DNA

- extraction methods for meat analysis. *Food Chem J.* 2016;221:1253–7.
47. Kijlstra A, Jongert E. Toxoplasma-safe meat: close to reality? *Trends Parasitol.* 2009;25(1):18–22.
 48. Belluco S, Mancin M, Conficoni D, Simonato G, Pietrobelli M, Ricci A. Investigating the determinants of *Toxoplasma gondii* prevalence in meat: a systematic review and meta-regression. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153856.
 49. Opsteegh M, Prickaerts S, Frankena K, Evers EG. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2011;150(2–3):103–14.
 50. Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, den Hartog L, De Craeye S, Bokken G, et al. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol.* 2010;139(3):193–201.
 51. Pereira KS, Franco RMB, Leal DAG. Transmission of toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by foods. 1st ed. Vol. 60, *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier Inc.; 2010. 1-19 p.
 52. El-tras WF, Tayel AA, El-kady NN. Source diversity of *Toxoplasma gondii* infection. *J Food Saf.* 2012;32:1–6.
 53. Dumètre A, Dardé ML. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(5):651–61.
 54. Rousseau A, Carbona S La, Dumètre A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-binet S, et al. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts / oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium spp.*, and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite.* 2018;14:1–21.

55. Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Exp Parasitol.* 2010;124(1):10–25.
56. Jacobs L, Melton ML. Toxoplasmosis in chickens. *J Parasitol.* 2015;52(6):1158–62.
57. Kapperud G, Jenum PA, Stray-pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnancy. *Am J Epidemiol.* 1996;144(4):405–12.
58. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30(12–13):1217–58.
59. Shuhaiber S, Koren G, Boskovic R, Einarson TR, Soldin OP, Einarson A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among veterinary staff in Ontario, Canada (2002): Implications for teratogenic risk. *BioMed Cent.* 2003;5:3–7.
60. Kravetz JD, Federman DG. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy : Knowledge of risk factors. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005;13(September):161–5.
61. Frenkel J, Ruiz A. Endemicity of toxoplasmosis in costa rica. *Am J Epidemiol.* 1981;113(3):254–69.
62. Etheredge GD, Michael G, Muehlenbein MP, Frenkel JK. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. *176 Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.* 2004;16(3):176–86.
63. Rashid T, Vonville H, Hasan I. Mechanisms for floor surfaces or environmental ground contamination to cause human infection : a systematic review. *Epidemiol Infect.* 2016;145(2):347–57.

64. Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. Characterization of the New Fecal Form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 1970;56(3):447–56.
65. Wainwright KE, Miller MA, Barr BC, Gardner IA, Melli AC, Packham AE, et al. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. J Parasitol. 2007;93(4):925–31.
66. Flórez AC, Rincón C, Garzón P, Vargas N, Enríquez C. Factores relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes de cinco ciudades de Colombia , 2007. Infectio. 2008;12(4):255–66.
67. Lass A, Szostakowska B, Korzeniewski K. The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental air samples using gelatine filters , real-time PCR and loop-mediated isothermal (LAMP) assays : qualitative and quantitative analysis. Parasitology. 2017;1–11.
68. Costa MESM, Oliveira CBS, Andrade JM de A, Medeiros TA, Neto VFA, Lanza DCF. An alternative nested-PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* strains based on GRA7 gene sequences. Acta Trop. 2016;159:120–4.
69. Taylor P, Albers CN, Jensen A, Bælum J, Jacobsen CS. Inhibition of DNA polymerases used in qPCR by structurally different soil-derived humic substances. Geomicrobiol J. 2013;30:37–41.
70. Biosystems A. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. Gene Expr. 2013;2009:1–70.
71. Mousavi M, Saravani R, Sekandarpour S. Detection of *Toxoplasma gondii* in diabetic patients using the nested PCR assay via RE and B1 genes. Jundishapur J Microbiol. 2016;9(2):7–12.

72. Wahab T, Edvinsson B, Palm D, Lindh J. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol. 2010;48(2):591–2.
73. Mckee AM, Spear SF, Pierson TW. The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy , precision , and inhibition of environmental DNA samples. Biol Conserv. 2015;183:70–6.
74. Sidstedt M, Jansson L, Nilsson E, Noppa L, Forsman M, Rådström P, et al. Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. Anal Biochem. 2015;487:30–7.
75. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. Appl Microbiol. 2012;113:1014–46.
76. Jiang J, Alderisio KA, Singh A, Xiao L, Icrobiol APPL ENM. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. 2005;71(3):1135–41.
77. Seo AN, Park HJ, Lee HS, Park JO, Sam CME. Performance characteristics of nested polymerase chain reaction vs real-time polymerase chain reaction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded human tissues. Am J Clin Pathol. 2014;142:384–90.
78. Hafez AHM, Hauck R, Lüschoff D, McDougald L. Comparison of the specificity and sensitivity of PCR , nested PCR , and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis comparison of the specificity and sensitivity of PCR , nested PCR , and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis. AVIAN Dis 49366–370,. 2005;49(3):366–70.

79. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, et al. Comparison between two Real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed*. 2006;77:75–80.
80. Montoya A, Miró G, Mateo M, Ramírez C, Fuentes I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol*. 2009;160(1–2):159–62.
81. Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, et al. Communication Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. *J Med Microbiol*. 2018;53(2004):629–32.
82. Dinoop KP, Parija SC, Mandal J, Swaminathan RP, Narayanan P. Comparison of nested-multiplex , Taqman & SYBR Green real-time PCR in diagnosis of amoebic liver abscess in a tertiary health care institute in India. *Indian J Med Res*. 2016;143:49–56.
83. Kubis P, Materniak M, Ku J. Comparison of nested PCR and qPCR for the detection and quantitation of BoHV6 DNA. *J Virol Methods*. 2013;194:94–101.
84. Wells B, Shaw H, Innocent G, Guido S, Hotchkiss E, Parigi M, et al. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Res*. 2015;87:175–81.
85. Pcr C, Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):1897–900.

9. Trabajo con la comunidad.

Se realizaron charlas en las instituciones con los padres de familia de los niños usuarios de los restaurantes escolares (Figura 4). En estas charlas, se explicó detenidamente la importancia del presente proyecto. Así, con la ayuda de un folleto (Anexo 3), se habló sobre la importancia del parásito *Toxoplasma gondii*, de su ciclo de vida, de las enfermedades y síntomas que puede causar, de quienes podrían ser asintomáticos, de las poblaciones más afectadas por el parásito, de las fuentes de infección y su importancia en los alimentos, el agua y los hábitos higiénicos de los niños y de juego y de la importancia de los gatos. Finalmente, se aclararon dudas y algunos mitos sobre el parásito.



Figura 4. Charla con los padres de familia de los niños usuarios de los restaurantes escolares.

10. Socialización en eventos científicos

- Ponencia en el Simposio de Trabajos de Investigación ACCB- Universidad del Quindío: “Detección de ADN de *Toxoplasma gondii* en muestras de carnes para consumo humano obtenidas en restaurantes escolares de la ciudad de Armenia, Quindío, Colombia”



- Ponencia en el 52 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas: Comparación de tres condiciones de extracción de ADN a partir de carne para consumo humano (Pollo, Res y Cerdo)



52°
CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas
CAPITULO VALLE
SANTIAGO DE CALI 9 al 13 de Octubre de 2017

"Ciencias Biológicas para el Desarrollo de un Nuevo País"

LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS CAPÍTULO VALLE

CERTIFICA QUE EL GRUPO DE INVESTIGADORES:

**Alejandro Zamora Vélez, Fabiana Lora, Julio César Luna,
Jorge Enrique Gómez-Marín**

Han participado con el trabajo de Investigación

**Comparación de tres condiciones de extracción de ADN
a partir de carne para consumo humano (Pollo, Res y Cerdo).**

En el 52 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas

Realizado en Santiago de Cali del 9 al 13 de Octubre de 2017



DRA. LINA JOHANNA MORENO GIRALDO
PRESIDENTE 52 CONGRESO
NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIANA MARCELA RIVERA JIMENEZ
SECRETARIA 52 CONGRESO
NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



- Ponencia en el congreso internacional de la Sociedad Americana de Microbiología, que se realizará el mes de Junio de 2018, titulada: “Presence of *Toxoplasma gondii* DNA in food and water of school restaurants in Armenia, Quindio, Colombia”

FRIDAY - 931 - Presence of *Toxoplasma gondii* Dna in Food and Water Od Sch. Restaurants in Armenia, Quindio, Colombia

[View session detail](#)

Author Block: O. A. Zamora Velez, F. M. Lora Suarez, **J. E. Gómez Marin**; GEPAMOL, Quindio Univ., Armenia, Colombia

Disclosure Block: **O.A. Zamora Velez:** None. **F.M. Lora Suarez:** None. **J.E. Gómez Marin:** None.

Background: *Toxoplasma gondii* is an important foodborne parasite. It can be transmitted via encysted bradyzoites in meat and by oocysts contaminating vegetables or water, where the children are one of the most affected populations. In present work our aim was to evaluate the overall exposure of food, water and surface to DNA of *T. gondii* at three school restaurants randomly selected in the city of Armenia, Quindio (Colombia), by using conventional PCR. **Methods:** We collected and analyzed samples of food (meat and vegetables), water (from faucet and boiled water ready to drink or use for preparing food) and living (hand surface of operators) and inert (kitchen bench) surfaces. Meat samples were cut into 5 g pieces. The vegetables were treated with glycine or wash solution (tween 0.1% and sulfamic acid 1%) and mixed through stomacher. The DNA from the samples was extracted by using Qiagen and Wizard kit. **Results:** The *T. gondii* DNA was detected by using conventional nested PCR for B1 sequence. We found by using conventional PCR: 1 of 6 (16.6%) samples positive in meat; 1 of 10 positive samples (10%) in living surfaces; 1 of 10 samples (10%) positive at inert surfaces; 1 of 9 samples (11.11%) positive in boiled water and 1 of 3 positive (33.3%) in water samples taken at faucet. **Conclusions:** The use of the conventional PCR for B1 sequence could be a good way to detect DNA from *T. gondii*. This is the first study in Colombia that report *T. gondii* DNA in food and water samples in school restaurants and the first in evaluating this parasite in vegetables and living and inert surfaces samples. The findings indicates that there exist many potential sources for *Toxoplasma* infection in food and water in school restaurants in Colombia. Funded by Colciencias Grant Number: 11137253376

- Ponencia en el II Congreso Internacional de Zoonosis y IX Congreso Argentino de Zoonosis realizado durante el mes de Junio de 2018. Títulada: “Factores higiénico sanitarios asociados a presencia de AND de *T. gondii* en alimentos y agua en restaurantes escolares de Armenia, Quindío, Colombia”.



Asociación Argentina de Zoonosis
Organiza

**II Congreso Internacional de Zoonosis
IX Congreso Argentino de Zoonosis**
“Alimentos y Zoonosis: Desafíos del Siglo XXI”
5 al 7 de junio de 2018

Certificamos que

Luna Ramírez Julio César, Zamora Vélez Alejandro, Lora Fabiana, Jesús Alfredo Cortes Vecino, Pinzón Magda Ivón, Hernández Natalia, Muñoz Deicy, Gómez Marín Jorge Enrique

han presentado en calidad de **Autores** el trabajo:

“FACTORES HIGIÉNICO SANITARIOS ASOCIADOS A PRESENCIA DE ADN DE TOXOPLASMA GONDII EN ALIMENTOS Y AGUA EN RESTAURANTES ESCOLARES DE ARMENIA, QUINDÍO, COLOMBIA”


Dr. Ricardo Rodríguez
Presidente


Dr. Pablo Martino
Secretario


Dr. Ricardo Durlach
Secretario Científico

- Pasantía en la Universidad de Davis, California, Estados Unidos. Con el apoyo y supervisión de la Dra. Karen Shapiro, Dra. Minji Kim, Dra. Andrea Packham y Dra. Patricia Conrad, realizada entre el 3 de Noviembre al 8 de Diciembre del año 2017 (Anexos 4 y 5). Durante esta estadía, se realizó un corto seminario sobre los avances del presente trabajo de grado (Figura 5).



Figura 5. A) Salón donde se realizó el seminario. B) Grupo de la Dra. Patricia Conrad (primera a la izquierda) y la Dra. Karen Shapiro (primera a la derecha).

11. Anexos

Anexo 1.

ENCUESTA MANIPULADORES ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Proyecto 772 COLCIENCIAS

Identificación de protozoos patógenos en comedores infantiles en la ciudad de Armenia

Encuesta No _____ Fecha: _____

Código: _____ Material Manipulado: _____

Nombre: _____

Número de identificación: _____

Fecha de nacimiento: _____

Teléfono: _____

Dirección: _____

Por favor marque con una X las casillas que correspondan y deje en blanco los espacios que no correspondan.

• **Frecuencia del lavado de manos durante la preparación de alimentos:** Una vez ___ Dos veces ___ Tres veces ___ Más de tres veces ___

• **Se lava las manos después de la manipulación de productos cárnicos:** Si ___ No ___

• **Materiales de limpieza y desinfección de superficies:** Hipoclorito ___ Jabón ___ otros ___ Cuáles ? _____

• **Materiales de limpieza y desinfección de de implementos de cocina:** Hipoclorito ___ Jabón ___ otros ___ Cuáles ? _____

• **Frecuencia con la que cambia la esponja del lavaplatos:** Mensualmente ___ Cada 2 meses ___ Cada 3 o más meses ___

• **Frecuencia de lavado de la nevera:** Semanalmente ___ Quincenalmente ___ Mensualmente ___ Más de un mes ___

- **Momento de realización de la limpieza de la cocina:** Antes de procesar los alimentos___ Después de procesar los alimentos___ Antes y después de procesar los alimentos___

MANIPULACIÓN

- **Material de la tabla de picar vegetales:** Plástico___ Madera___ Otros___
Cuáles?_____
- **Material de la tabla de picar carne:** Plástico___ Madera___ Otros___
Cuáles?_____
- **Utiliza diferente tabla de picar para vegetales y para carnes:** Si___ No___
- **Agua con la que lava los vegetales:** Agua hervida___ Agua cruda___ Agua con hipoclorito___ Agua con sal___ Agua con limón___ Otros___
Cuáles?_____
- **Tipo de fruta utilizada en los jugos:** Pulpa de fruta empacada___ Fruta completa sin procesar___ Otros___ Cuáles?_____
- **Agua que utilizan para la preparación de los jugos:** De la llave (sin hervir)___ Hervida___ Embazada (botella o bolsa)___ Filtrada (ozono):___ De río/quebrada:___
- **Temperatura de almacenamiento de los vegetales:** Temperatura Ambiente___ 4 °C___ -20 4 °C Otra___ Cual?___
- **Temperatura de almacenamiento de la carne:** Temperatura Ambiente___ 4°C___ -20°C___ Otra___ Cual?___
- **Implementos de bioseguridad que utiliza:** Guantes___ Tapabocas___ Gorro___
Otros___ Cuáles? _____
- **Material de recipientes para almacenar la comida preparada:** Plastico___ Aluminio___ Cerámica___
Otros___ Cuáles?_____
- **Procedencia de los alimentos:** Plaza de mercado___ Supermercado___ Mercado ambulante___ Otros ___ Cuáles?_____

INFRAESTRUCTURA

Tanque de reserva: Si___ No___

- **Veces al año en que se le realiza limpieza y mantenimiento:** Ninguna___ 1 vez___ Más de una vez___

• **Material de los mesones de la cocina:** Cemento___ Acero inoxidable___
Baldosa___ Madera___ Otro___ Cual _____

• **Material de las paredes y techo de la cocina:** Madera___ Bahareque___ Ladrillo-
cemento___ Plástico-cartón___ Otro___Cuál?_____

• **Piso de la cocina:** Baldosa___ Madera___ Cemento___ Tierra_____
Otro___ Cual?_____

TRAYECTORIA ACADÉMICA Y LABORAL

• **Frecuencia con la que recibe capacitación al año:** 1 vez al año___ 2 veces al
año___

Más de dos veces al año___ No recibe capacitación___

• **Experiencia laboral de los manipuladores:** Menos de un año___ Un año___ Mas
de un año___

• **Escolaridad alcanzada:** Primaria___ Secundaria___ Universitaria___

Anexo 2.

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA INSTITUCIONES Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio sobre la identificación de protozoos patógenos en comedores infantiles en la ciudad de Armenia:

Investigadores responsables:

Jorge Enrique Gómez Marín MD. PhD
 Fabiana María Lora Suarez Lic. Biol. MSc
 Elizabeth Torres Morales Bact. MSc
 Katherine Rodríguez Marín B.S.c
 Estefanía Buitrago López B.S.c
 Alejandro Zamora Vélez B.S.c
 Gloria Deicy Muñoz B.S.c

Invitación a participar

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario de consentimiento y discuta con el investigador cualquier inquietud que tenga o palabra que no entienda. El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar - o no-, en una investigación en ciencias biomédicas.

Lo invitamos para que permita que la institución haga parte de la participación en el proyecto de investigación: Hacia la identificación de parásitos presentes en nuestra población infantil que asiste a comedores escolares, el cual, tiene como título "Identificación de protozoos patógenos en comedores infantiles en la ciudad de Armenia". El cual será llevado a cabo por el Grupo de Investigación en Parasitología Molecular (GEPAMOL), por la línea de investigación en Giardiasis y parásitos intestinales de la Universidad del Quindío.

Aspectos importantes sobre los estudios de investigación:

- Los estudios de investigación en ciencias biomédicas buscan ganar conocimiento científico que puede ser útil al sector salud u otras personas en el futuro.
- La participación es voluntaria. Puede rehusarse a participar, o puede retirar su consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo.
- Si usted quiere que su institución participe en este estudio es necesario firmar este consentimiento. El cual se realizará por duplicado para que usted reciba una copia de él.
- Usted puede preguntarle al investigador principal, Jorge Enrique Gómez Marín o a cualquier otro miembro del grupo de investigadores todas las dudas que tenga acerca de este estudio y puede realizarlo en cualquier momento de su ejecución. Podrá comunicarse

directamente al siguiente teléfono (036) 7359370 o mediante correo electrónico gepamol3@uniquindio.edu.co (Horario de atención Lunes a viernes en horario de oficina).

¿Para qué se está realizando este estudio?

Esta investigación tiene como objetivo identificar la frecuencia de ADN y de formas quísticas de protozoos patógenos (ooquistes de *Cryptosporidium* sp, *Toxoplasma gondii* y quistes de *Giardia* sp y *Blastocystis* sp) presentes en niños y en alimentos de los restaurantes escolares de la ciudad de Armenia. Los resultados obtenidos a partir del estudio aportarán a los conocimientos fundamentales sobre la situación actual de presencia de parásitos en los comedores infantiles, lo cual será la base para el desarrollo de planes de mejoramiento y monitoreo que impactarán a futuro en el mejoramiento de condiciones sanitarias y prevención.

¿Que procedimiento se le realizará?

En este estudio tomaran 3 muestras de carne cruda (50g c/u), 3 muestras de jugo (200 ml c/u), tres muestras de ensalada (200 g c/u), tres muestras de agua con la que se preparan los jugos (200 g c/u). Todas las muestras serán tomadas del recipiente de preparación y serán almacenadas en frascos de vidrio de 250 ml (muestras líquidas) y de carne en bolsas de plástico (para alimentos sólidos), previamente esterilizadas. Además se tomarán muestras de superficies: 3 de superficies inertes (licuadora, instrumentación que este en contacto directo con alimentos) mediante el método de hisopado. Estas últimas serán guardadas en solución salina estéril para su posterior análisis en el laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Quindío. La toma de muestras será realizada por un investigador capacitado del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío.

¿Cuánto tiempo dura la participación?

La participación inicia desde el momento en que se realiza la toma de la muestra y durante los tres años de vigencia del proyecto.

¿Cuáles son los posibles beneficios para su institución y la sociedad derivados de esta investigación?

Los resultados del estudio podrían contribuir al desarrollo de planes de mejoramiento y monitoreo de las condiciones sanitarias de los restaurantes escolares, de modo que a largo plazo su institución estaría aportando al beneficio de la población en general. Los resultados de la investigación y el análisis de la misma se organizarán en un formato de artículo científico, al cual tendrá acceso en el momento en que lo desee, una vez se entregue el informe final del proyecto. Además se realizará una capacitación acerca de métodos de higiene para la manipulación de alimento de forma gratuita posterior a la toma de muestras.

¿La institución presentará alguna afectación negativa por participar en el estudio?

La participación de la institución en el estudio no afectará en ninguna medida su integridad, todos los procedimientos serán realizados por personal experto en el área y los resultados

serán manejados con confidencialidad, además, los resultados encontrados en este estudio no darán lugar a ninguna medida sancionatoria o disciplinaria.

Sus derechos como participante:

Si usted decide participar en este estudio y luego cambia de opinión, tiene el derecho a retirarlo del estudio en cualquier momento sin ninguna consecuencia desfavorable. Así mismo puede hacer las preguntas que considere importantes.

Confidencialidad de sus datos:

Si acepta participar en el presente estudio, los resultados obtenidos serán confidencialmente manejados por el grupo de investigación GEPAMOL y archivo del Centro de Investigaciones Biomédicas y no será reportado a ninguna autoridad sanitaria, por lo tanto no tendrá lugar a ninguna medida sancionatoria o disciplinaria.

¿Qué debe hacer si decide terminar la participación de su institución en el estudio?

La participación es voluntaria y usted puede negarse a participar, o retirarse del estudio en cualquier momento. Si usted decide suspender la participación de su institución en el estudio, puede llamar al teléfono (036) 7359370 o mediante correo electrónico gepamol2@uniquindio.edu.co (Horario de atención Lunes a viernes en horario de oficina).

¿Qué debe hacer si tiene preguntas acerca de este estudio?

Usted tiene la oportunidad de preguntar y obtener todas las respuestas a sus preguntas sobre esta investigación antes de firmar el consentimiento. Si usted posteriormente tiene otras preguntas relacionadas con la investigación, puede llamar al investigador Jorge Enrique Gómez Marin, al teléfono (036) 7359370 o mediante correo electrónico gepamol2@uniquindio.edu.co (Horario de atención Lunes a viernes en horario de oficina).

CONSENTIMIENTO INFORMADO PERSONAL

Me han explicado verbalmente y he leído la información proporcionada previamente. Yo _____ con cédula de ciudadanía No _____, en calidad de (cargo) _____ de la institución _____ acepto, que la institución participe en este estudio. En constancia, firmo este documento de Consentimiento informado, en presencia de uno de los investigadores del estudio y dos testigos, en la ciudad de Armenia el día ____ del mes de _____ del año _____.

Nombre completo, firma y documento de identidad de la persona que autoriza la participación de la institución.

Nombre: _____
 Firma: _____
 Cédula de Ciudadanía #: _____ de: _____

INVESTIGADOR Y TESTIGOS

Nombre completo, firma y documento de identidad del INVESTIGADOR

Nombre: _____
 Firma: _____
 Cédula de Ciudadanía #: _____ de: _____

Nombre completo, firma y documento de identidad del TESTIGO NÚMERO 1

Nombre: _____
 Firma: _____
 Cédula de Ciudadanía #: _____ de: _____ Dirección: _____
 Relación o parentesco: _____

Nombre completo, firma y documento de identidad del TESTIGO NÚMERO 2

Nombre: _____
 Firma: _____
 Cédula de Ciudadanía #: _____ de: _____ Dirección: _____
 Relación o parentesco: _____

Anexo 3.

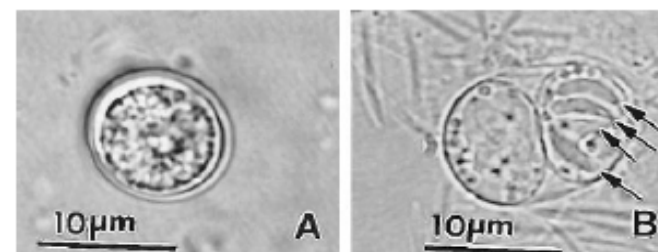
Toxoplasmosis

La Toxoplasmosis es una enfermedad infecciosa causada por este parásito que **no posee cura ni vacuna en la actualidad**. En los humanos la mayoría de infecciones son asintomáticas. Mientras que las sintomáticas pueden estar dadas por aumento de tamaño de los ganglios con consistencia dura y dolorosa y disminución brusca de la visión e incluso puede provocar ceguera. Por otro lado, en enfermos con alteraciones inmunológicas, la toxoplasmosis puede presentarse como una enfermedad diseminada siendo altamente peligrosa. Además, los neonatos cuyas madres son infectadas por primera vez durante su embarazo pueden adquirir la infección y desarrollar síntomas como **hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, pérdida sicomotor, pérdida progresiva o total de la visión**. Sin embargo, la probabilidad de que el neonato sea infectado disminuye cuando se lleva poco tiempo de embarazo mientras que la severidad de los aumenta.

Diagnóstico

Muestra de sangre necesarias para:

- Inmunoensayo enzimático (ELISA IgG e IgM).
- PCR, qPCR para evidenciar presencia de ADN del parásito.
- Test de Aidez IgG para discriminar infecciones recientes.



Toxoplasma gondii y Toxoplasmosis

Alejandro Zamora Vélez
Estudiante del Programa de
Maestría en Ciencias
Biomédicas

oazamorav@uqvirtual.edu.co
3146187117

Centro de Investigaciones Biomédicas
Carrera 15, Calle 12 Norte
Tel: 7359300 ext 292



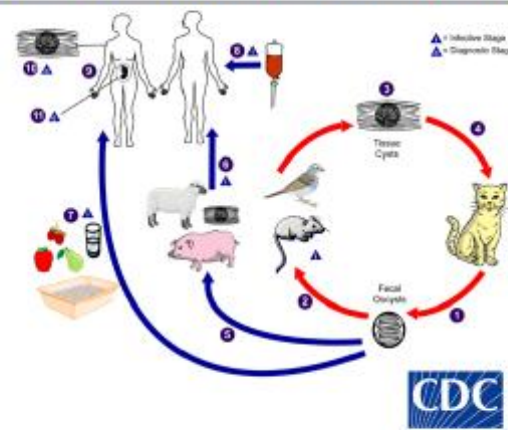
Toxoplasma gondii

Es un protozoo parásito que puede infectar un amplio número de aves y mamíferos incluyendo al humano.



Entre los mamíferos encontramos de vital importancia a los felinos, entre ellos los gatos, ya que en estos se producen los ooquistes que son excretados en las heces. Estos ooquistes son una forma del parásito supremamente resistente y tienen un papel clave en la transmisión a nuevos hospederos.

Posibles Rutas de Transmisión



Posibles fuentes de infección:

- Vegetales.
- Carne (Pollo, res, cerdo, etc).
- Agua.
- Leche cruda.
- Huevos.
- Suelo.
- Trasplantes.
- Contacto con mascotas (gatos).
- Trasplacentaria (madre a hijo).



Anexo 4.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, DAVIS

BERKELEY - DAVIS - IRVINE - LOS ANGELES - MERCED - RIVERSIDE - SAN DIEGO - SAN FRANCISCO
 SANTA CRUZ



SANTA BARBARA -

SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
 DEPARTMENT OF VETERINARY PATHOLOGY,
 MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY
 TELEPHONE (530) 752-1385
 FAX (530) 754-8124

ONE SHIELDS AVENUE
 DAVIS, CALIFORNIA 95616-8739

December 8th, 2017

Alejandro Zamora
 Grupo GEPAMOL Clasificación A1 Colciencias 2017
 Universidad del Quindío
 Avenida Bolívar 12N
 Armenia (Q)
 COLOMBIA

Dear Mr. Alejandro Zamora,

In this letter I confirm your attendance as a visiting researcher observing laboratory tasks relevant to detection of protozoal pathogens in food matrices and water, training on methods for extracting DNA from protozoan parasites, amplifying DNA via PCR, and running products using gel electrophoresis (November 6th – December 8th, 2017). It was a pleasure to welcome you at UC Davis.

Sincerely,

Signature of Supervisor or Hiring Representative

Karen Shapiro, DVM MPVM PhD
 School of Veterinary Medicine
 Department of Pathology, Microbiology, and Immunology
 One Shields Avenue, 4206 VM3A
 University of California
 Davis, CA 95616-5270

**Anexo 5.**

UC DAVIS
UNIVERSITY OF CALIFORNIA



Activities Report in UC Davis

Ovidio Alejandro Zamora Vélez

November 6th – December 8th

IMS (Immunomagnetic separation)

For this process a Dynabeads GC-Combo kit was used. It contained Dynabeads anti-*Cryptosporidium*, Dynabeads anti-*Giardia*, Buffer A and Buffer B.

1. To a flat-sided L-10 tube (special glass test tube) (Figure 1), add 1 mL 10X Buffer A, and 1 mL of 10X Buffer B.



Figure 1. Flat-slided L-10 tube.

2. To transfer the sample concentrate to the L-10 tube containing the buffer. Label the tube (Briefly, making vortex to mix the sample).
3. Vortex the Dynabeads anti-*Cryptosporidium* vial for 10 sec.
4. Thoroughly resuspend the beads by inverting the vial. Add 100 uL Dynabeads anti-*Cryptosporidium* to the L-10 tube.
5. Vortex the Dynabeads anti-*Giardia* vial for 10 sec.
6. Thoroughly resuspend the beads by inverting the vial. Add 100 uL Dynabeads anti-*Giardia* to the L-10 tube.
7. Affix the L-10 tube to a rotating mixer and rotate at 15-20 rpm for 1 hour at room temperature 8 (Figure 2).



Figure 2. Rotating mixer with L-10 tubes.

8. After rotating for at least 1 hour, remove tube from mixer and place in the MPC-1 or MPC-6 with the flat side of the tube facing towards the magnet (Figure 1).
9. Place the magnet side downwards (tube is horizontal and above the magnet) (Figure 1).
10. Gently rock the tube end to end approximately 90°, tilting the cap-end and base-end of the tube up and down in turn. Continue the tilting action for 2 minutes.

11. Return the magnet to the upright position. Immediately remove the cap and pour off all the supernatant (This supernatant will be taken to find another parasites using filter membrane).
12. Remove the tube from magnet and resuspend sample in 0.4 mL 1X Buffer A. Mix gently to resuspend all material in the tube.
13. Transfer all the liquid from L-10 tube to a labelled 1.5 mL microcentrifuge tube.
14. Repeat steps 12-13 two more times.
15. Place the microcentrifuge tube into the MPC-S, with magnetic strip in place in the vertical position (Figure 3).

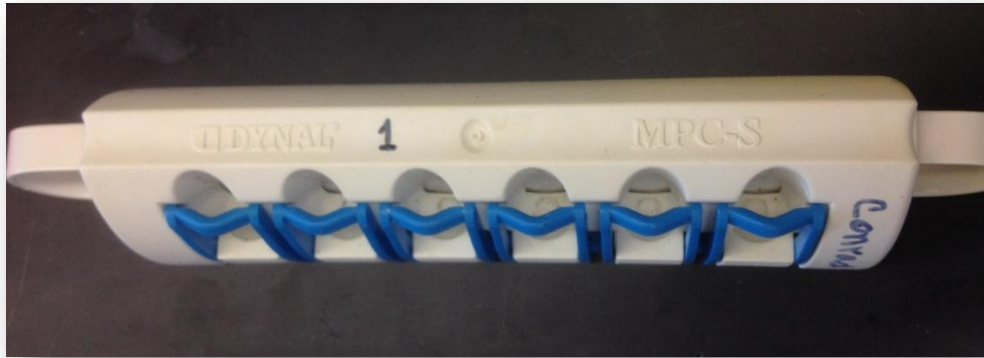


Figure 3. MPC-S: Magnetic particle concentrator.

16. Without removing the microcentrifuge tube from MPC-S, gently tilt the tube back and forth 180°. Continue for 1minute with approximately one 180°-tilt per sec (Figure 4).

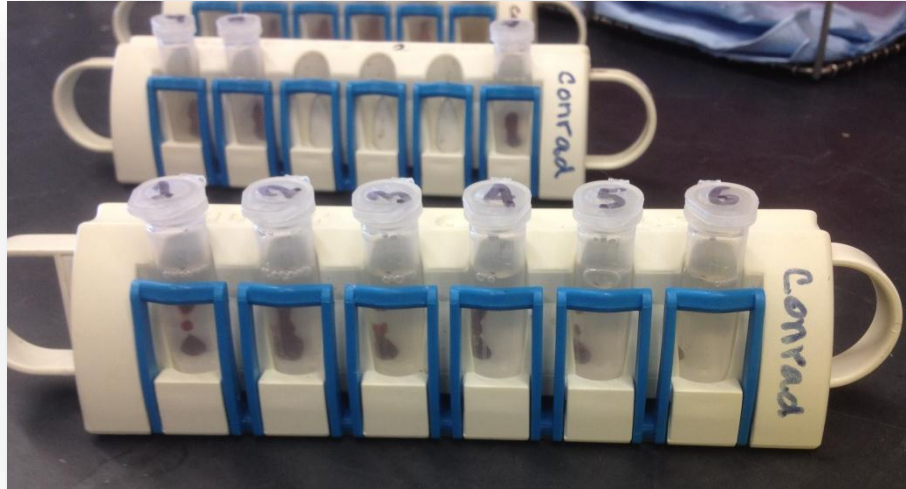


Figure 4. MPC-S concentrating the beads from the sample in the tubes.

17. Immediately aspirate the supernatant from the tube and cap held in the MPC-S- If more than one samples being processed, conduct three 180° back-and-forth motions before removing the supernatant from each tube.
18. Remove magnetic strip from MPC-S.
19. Add 50 uL of 0.1 M hydrochloric acid (HCl) to the microcentrifuge tube and vortex for 10 sec.
20. Place the tube in MPC-S without magnetic strip in place and allow to stand in a vertical position for at least 10 minutes at room temperature.
21. Vortex for 10 sec.
22. Ensure that all the sample is at the base of the tube. Place microcentrifuge tube in MPC-S.
23. Insert the magnetic strip in the MPC-S in the tilted position and allow the tube to stand undisturbed for a minimum of 10 sec and maximum of 2 minutes before proceeding.
24. Take the 50 uL from the tube and put in a slide (Figure 5).
25. Repeat 19, 20, 21, 22, 23.
26. Take the 50 uL and add in the same slide from each sample.
27. Is already to make stain.

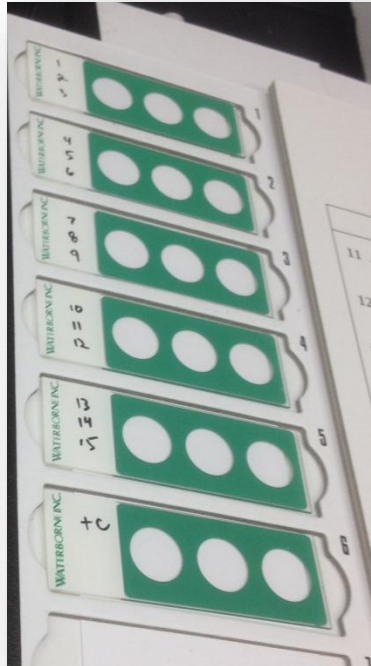


Figure 5. Slides used to see in fluorescence microscope the separate parasites from the sample.

Oysters experiment

The oysters experiment was made in two ways: Partial Homogenization and Completely Homogenization.

1. Open the oysters inserting a knife oyster near the hinge. After, slide the knife around the oyster and open it (Figure 6).

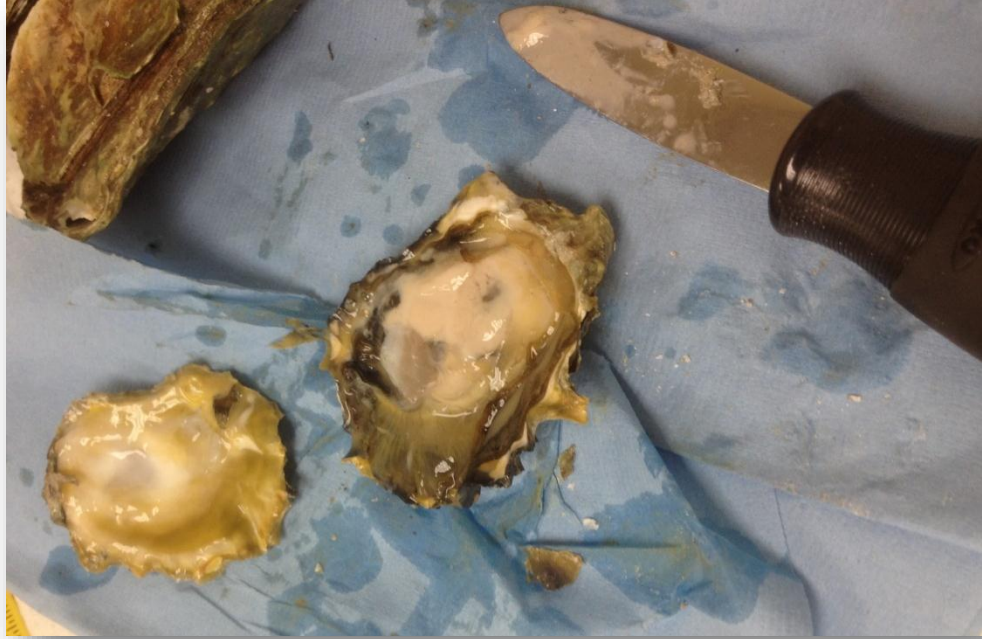


Figure 6. Oyster opened using a special knife.

2. Cut and take the digestive gland and gills tissues (Figure 7). Also, take hemolymph with a needle puncture in the heart.
3. To spike make cuts in cross way on the tissue and add the parasites. Leave overnight.
4. Put the digestive gland and gills tissues in homogenizer tube (Figure 8) using tweezers and adding 10 mL of Tween 80 0.1%-
5. To make the partial homogenization, introduce the homogenizer stick and press for 3 times and pass through a metallic filter (Figure 9).
6. To make completely homogenization, introduce the homogenizer stick a lot of times until to obtain a homogeneous liquid and pass through a metallic filter (Figure 9).
7. After, to make 4 times washes with 10 mL of Tween 80 0.1% in the homogenizer tube and pass through a metallic filter.

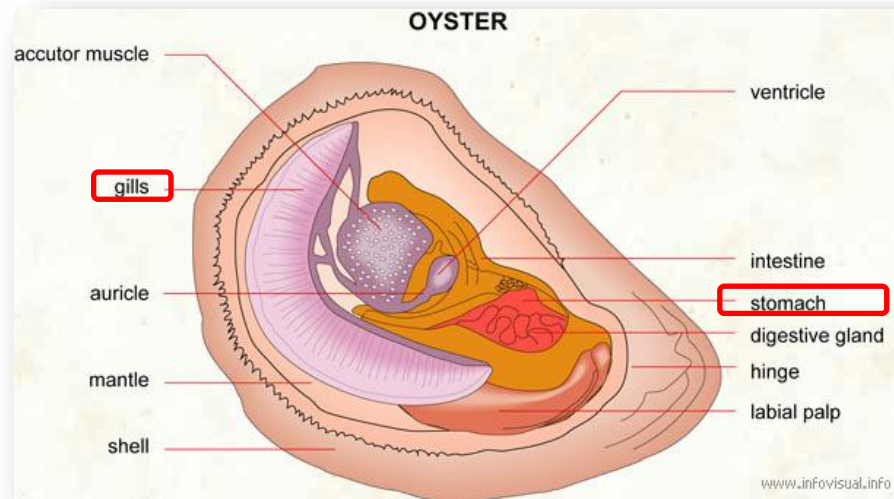


Figure 8. Parts from an Oyster. <https://infovisual.info/en/biology-animal/oyster>



Figure 8. Glass homogenizer used to obtain parasites in oysters experiment.

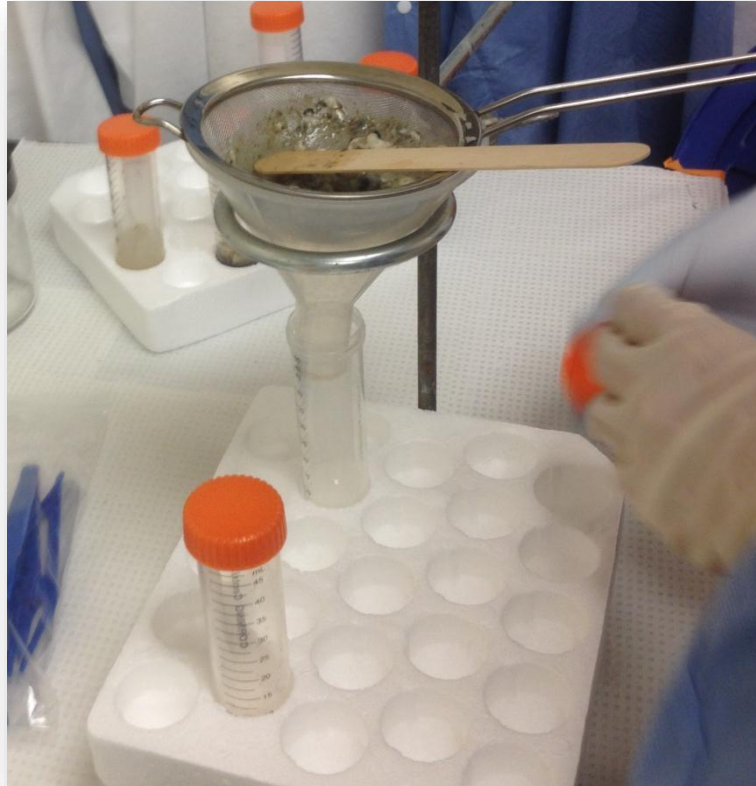


Figure 9. The oysters tissue are passing through metallic filter and filling a 50 mL centrifuge tube.

8. Collect all the solution in a 50 mL centrifuge tube (Figure 9).
9. To concentrate the samples centrifuging the tubes at 3000 rpm x 13-15 minutes.
10. Discard the supernatant and leaving around 10 mL of concentrated solution for other experiments like IMS or DNA extraction.

Process to obtain oocysts from cat feces

1. Take 5 grams from cat fecal sample.
2. Add Tween 80 0.1% solution until the sample is soft mixing with a sterile stick.

3. Pass through the solution in a metallic filter. It is important to pass the entire sample through the filter helping with a stick.
4. Add more Tween 80 0.1% to obtain 50 mL.
5. Transfer all de solution in a 50 mL centrifuge tube.
6. Centrifuge at 1250 g (3000 rpm) x 10 minutes. This first centrifugation is to wash the sample.
7. Discard all the supernatant.
 - Remove all the Tween solution because it could not to leave the oocysts float.
 - It is likely the oocysts stay in the top of the pellet.
8. Add 10 mL of NaCl 1.18 gravity. Mix and transfer to a new 15 mL centrifuge tube.
9. Add NaCl 1.18 gravity until the top of the tube in overflow way (Figure 10).



Figure 10. Cover slip on the top from a 15 mL centrifuge tube with diluted fecal sample. It is making superficial tension.

10. Put a cover slip on the top of the tube. This step has to make carefully, it is important the superficial tension.
11. Centrifuge at 1250 g (3000 rpm) x 10 minutes.
12. Take the cover slip and put on a slide glass and seeing in microscope.

Recovery of *Toxoplasma gondii* oocysts from spinach sample.

This process is confidential. The Dr. Karen and her group are writing the paper and the data is not published.

1. Take 10 grams of spinach or green leaf (Figure 11).
2. Spike approximately 10 oocysts (using dilution calculus) in 5 uL on the surface leaves. This spike has to be in drops in different points from the leaves.
3. Let dry for 2 hours.
4. Take the leaves and introduce them in a whirl-pak bag.
5. Add 100 mL of Tween 80 0.1%.
6. Close the bag very well (Figure 12).
7. Massage the bag slowly and carefully with both hands and fingers for two minutes (Figure 13).



Figure 11. 10 grams of spinach approximately.



Figure 12. Whirl pack-bag closed with spinach sample and 100 mL of Tween 80 at 0.1%.



Figure 13. Massage over the whirl pack-bag with spinach sample.

8. Transfer the solution to a 50 mL centrifuge tube using pippete.
9. Centrifuge at 3000 rpm (1250 g) x 15 minutes.
10. Leave around 10 mL of concentrate.
11. Transfer to a new 15 mL centrifuge tube.
12. Centrifuge at 3000 rpm (125 g) x 15 minutes.
13. Discard supernatant until to obtain 1 mL.
14. Use this 1 mL for DNA extraction, microscopy or other experiment.

IFAT (Immunofluorescence antibody test)

1. Pull antigen slides from freezer and thaw to room temp.
2. Turn table top incubator on and warm to 37°C.
3. Serially diluite sample in doubling dilutions beginning with 1:40 for serum and 1:5 for CSF in PBS, pH 7.4.
4. Apply 10-15 uL of each dilution to wells on the 12 wells antigen slide (Figure 14). Reserve the last 2 wells on at least one slide for the positive and negative controls.
5. Incubate in a moist chamber at 37°C for 1 hour.
6. Rinse slides with tap water and then wash 3 times, for each 5 minutes in PBS.
7. Tap slides and blot to remove excess moisture.
8. Apply 10-15 uL of appropriate species-specific secondary antibody (conjugated to FITC) at pre-determinates dilution (currently, 1:100 in PBS for IgG and 1:50 for IgM). Can add a tiny (~1 uL) amount of Evan's Blue counter stain to antibody dilution tube to help rule out background.



Figure 14. Wells antigen slide.

9. Incubate in a moist chamber at 37°C for 1 hour.

10. Rinse slides with tap water and wash slides 3 times, for 5 minutes each in PBS.
11. Tap, blot, and allow slides to air-dry in the dark.
12. Apply 5 uL mounting media (0.715 g NaHCO₃, 0.016 g Na₂CO₃, 10 mL di H₂O, QS to 100 mL w/glycerol; pH 8-9) to each well and cover slip.
13. Examine at 200X using a fluorescence microscope.

Preparing Antigen Slides

1. Harvesting tachyzoites from cell culture and spin 3000 rpm for 10 minutes at room temperature.
2. Hard pour to discard sup and add 2.5 mL PBS to resuspend pellet.
3. Needle pass (22ga) 3X in 3 mL syringe.
4. Filter through a PD-10 Sephadex Column (yields less cell debris) or 5 um serynge-tip filter.
5. Add 20-50 mL of PBS resuspending pellet to proper concentration using a turbidity test.
6. Add 10 uL of suspension to each well on a 12 well slide and let dry in bio hood.
7. Fix each well with 10% neutral buffered formalin for 10 minutes, rinse briefly in PBS, and air dry fume hood.
8. Store in slide boxes in -80°C freezer for long term.

Acknowledge

This amazing experience was possible thanks to Master in Biomedical Sciences Program (Quindio University), Health Sciences Faculty (Quindio University), COLCIENCIAS and School of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathology, Microbiology and Immunology in UC Davis.

Thanks to all the people who supported to me and oriented to me: Dr. Jorge Enrique Gómez Marin, Dr. Olga Alicia Nieto, Fr. Fabiana Lora, Dr. Karen Shapiro, Dr. Minji Kim, Dr. Andrea Packham and Dr. Patricia Conrad.



UNIVERSIDAD
DEL QUINDÍO

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA
SUSTENTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

FECHA: 14 de Junio de 2018
ESTUDIANTE: OVIDIO ALEJANDRO ZAMORA VELEZ
DIRECTOR DEL TRABAJO: Doctora FABIANA MARIA LORA SUAREZ

TITULO DEL TRABAJO:

"DETECCIÓN DE ADN DE *Toxoplasma Gondii* EN RESTAURANTES ESCOLARES DE LA CIUDAD DE ARMENIA, QUINDÍO, COLOMBIA".

EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN:

APLAZADO _____ APROBADO X _____
MERITORIO X _____ LAUREADO _____

Jurado 1

Doctor

JUAN CARLOS SEPÚLVEDA ARIAS

Universidad Tecnológica de Pereira
Risaralda.

Jurado 2

Doctora

NELSY LOANGO CHAMORO

Universidad del Quindío
Armenia

Jurado 3

Doctor

LEONARDO PADILLA SANABRIA

Universidad del Quindío
Armenia

Directora

Doctora

OLGA ALICIA NIETO CARDENAS

Universidad del Quindío