

**Evaluación del riesgo de infección por *Toxoplasma gondii*
por alimentos: factores de riesgo asociados a las
condiciones higiénico-sanitarias y de cocción de carne**

Estudiante: MSc Julio Cesar Luna Ramírez,

Tutor: PhD, MD Jorge Enrique Gómez Marín

Comité Tutorial

PhD, Magda Ivonne Pinzón Fandiño

PhD, Jesús Alfredo Cortés Vecino

Tesis de Doctorado presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias Biomédicas

Universidad del Quindío, 30 enero de 2020

**DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015.

			
SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197

Sin la publicación, la ciencia está muerta

Claremont Piel, 1915-2004, ex-editor de *Scientific American*, quien contribuyó a la reinvención de la revista y a la redefinición de la era moderna del periodismo científico, citado por Robert A. Day en "How to write and publish a scientific paper", 1998, p. 8.

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

FECHA: ENERO 30 DE 2019
 ESTUDIANTE: JULIO CESAR LUNA RAMIREZ
 DIRECTOR DEL TRABAJO: Doctor JORGE ENRIQUE GÓMEZ MARÍN

TITULO DEL TRABAJO:

**"EVALUACIÓN DEL RIESGO DE INFECCIÓN POR TOXOPLASMA GONDII POR ALIMENTOS:
FACTORES ASOCIADOS A LAS CONDICIONES HIGIÉNICO-SANITARIAS "**

EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN:

APLAZADO _____
 MERITORIO X

APROBADO X
 LAUREADO _____


 Jurado 1
 Doctora
 OLGA CARLA MARIA BLANCO, PhD.
 Fundación Universitaria Agraria de
 Colombia e Instituto Nacional de Salud
 Bogotá


 Jurado 2
 Doctor
 GUSTAVO ADOLFO VALLEJO, PhD.
 Universidad del Tolima
 Ibagué


 Jurado 3
 Doctor
 HENRY REYES PINEDA, PhD.
 Universidad del Quindío
 Armenia


 Coordinadora Doctorado
 Doctora
 OLGA ALICIA NIETO CÁRDENAS PhD
 Universidad del Quindío

1 Resumen

Los alimentos son una fuente de infección por parásitos que pueden provocar diferentes enfermedades y síntomas. Entre los más peligrosos podemos encontrar al *Toxoplasma gondii*. El propósito de este trabajo fue asociar la exposición de la población infantil al *Toxoplasma gondii* con factores higiénico-sanitarios y alimentos consumidos en restaurantes escolares en la ciudad de Armenia, Quindío. Para esto se determinó un tamaño de muestra de 170 niños de 10 colegios diferentes en la ciudad de Armenia. Se realizaron dos actividades de evaluación: a) Evaluación de condiciones higiénico-sanitarias de los restaurantes escolares y la presencia de ADN del parásito por PCR en 213 muestras (alimentos, agua y superficies) y b) se realizaron exámenes de serología para *T. gondii* en los niños y a través de encuesta una evaluación de las condiciones y prácticas de consumo de alimentos en el hogar. De manera llamativa se encontró que cuando la prueba fue positiva para *T. gondii* en el agua de grifo, en el mismo establecimiento se encontró presencia en el agua para el jugo y en superficies vivas. Este trabajo permitió evidenciar rutas de transmisión para *T. gondii* por agua hacia los alimentos en restaurantes escolares. Se encontró que los factores asociados a mayor presencia en agua y alimentos de *T. gondii* en los restaurantes fueron las condiciones higiénico-sanitarias. De estas las más relevantes son: instalaciones físicas (OR: 1,8), limpieza y desinfección (OR: 1,8) y personal manipulador de alimentos (OR: 2,0).

De otro lado, en esta tesis se desarrolló un modelo matemático para indicar recomendaciones prácticas al preparar la carne y así tener un bajo riesgo de infección por *Toxoplasma gondii*. Se encontró que el factor crítico es el grosor de la pieza y el tiempo de cocción. Además, se hicieron análisis de escenarios y se encontró que, al mejorar las condiciones higiénico-sanitarias de los restaurantes escolares, se puede reducir la prevalencia en un 13,0%, lo cual

equivale a 3.646 casos menos de niños infectados. La probabilidad de consumir carnes con quistes viables depende del tipo de preparación. Cuando se prepara bien cocida, se puede reducir la probabilidad de infección en un 13,5% en comparación cuando se prepara jugosa o menos cocida.

2 Abstract

Food is a source of infection of parasites that can cause different diseases and symptoms. Among the most dangerous foodborne parasites, we can find *Toxoplasma gondii*. The purpose of this work was to associate the exposure of the child population to *Toxoplasma gondii* with the hygienic-sanitary factors and food consumed in school restaurants in the city of Armenia, Quindío.

A sample size was determined of 170 children from 10 schools. Two evaluation activities were carried out: a) Evaluation of hygienic-sanitary conditions of school restaurants and presence of parasite DNA by PCR method in 213 samples (food, water and surfaces) and b) serological tests were performed for *T. gondii* in children and one questionnaire was applied to evaluate the conditions and practices of food consumption at home. The total number of children evaluated with a serological test was 117. Strikingly, it was found that when the test was positive for *T. gondii* in tap water, in the same establishment, water for the juice and living surfaces were also positive. When home habits were analyzed, it was found that the consumption of undercooked meat is significant (OR of 36). This work allowed to show transmission routes for *T. gondii* by water to food in school restaurants. The factors associated with greater presence in water and food of *T. gondii* in restaurants were the hygienic-sanitary conditions, from these, the most relevant were: conditions of infrastructure of restaurants (OR: 1.8), cleaning and disinfection (OR: 1.8) and food handling personnel (OR: 2.0).

Also, in this thesis we developed a mathematical model that was experimentally and theoretically evaluated. This model indicated important practical recommendations for preparing meat with a low risk for *Toxoplasma gondii* infection. We found that one critical component of obtaining safe cooking

temperatures at the center of the piece (65 °C) is the thickness of the piece. This model indicates an important practical recommendation to obtaining a low risk for *Toxoplasma gondii* infection when cooking meat. Also, simulation of the effect of preventive measures were done and it was found that improving the hygienic-sanitary conditions of school restaurants can reduce the prevalence by 13,0%, that it is equivalent to a reduction in 3,646 new cases of infected children. When well-cooked meat was prepared, the probability of infection can be reduced by 13,5%.

3 Agradecimiento

Agradezco a Dios por poner en mi ayuda a un gran número de personas que han ayudado en este proceso de formación.

De manera muy especial al Profesor Jorge Enrique Gómez Marín por su incasable colaboración, por paciencia y sus enseñanzas.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Magda Ivonne Pinzón Fandiño y Jesús Alfredo Cortés Vecino por su acompañamiento y colaboración,

Agradezco a mi familia por su apoyo y comprensión, por todos los momentos en los cuales se tuvieron que restringir por mi ausencia

Agradezco a todos los compañeros del grupo GEPAMOL por sus enseñanzas, colaboración y apoyo, en especial a la línea de parásitos a su líder la profesora Fabiana María Lora y sus integrantes: Alejandro Zamora, Deicy Muñoz, Natalia Hernández, Valeria Pinto y Estefanía Buitrago

Agradezco a la Universidad del Quindío y a Colciencias por la financiación del proyecto, numero 1111372553376

4 Tabla de contenido

	Items	Página
1	Resumen	III
2	Abstract	V
3	Agradecimiento	VII
4	Tabla de contenido	VIII
5	Lista de figuras	XII
6	Lista de tablas	XIV
7	Lista de anexos	XVI
8	Lista de símbolos y abreviaciones con su respectiva explicación	XVII
9	Introducción	19
9.1	<i>Toxoplasma</i> y toxoplasmosis	19
9.1.1	Biología y Taxonomía	21
9.1.2	Prevalencia	29
9.1.3	Consecuencia de la <i>Toxoplasmosis</i>	33
9.1.4	Factores de riesgo	33
9.1.5	Diagnóstico y métodos de identificación	35
9.2	<i>Toxoplasma</i> en alimentos	39
9.2.1	Carnes	39
9.2.2	Leches	40
9.2.3	Agua	41
9.2.4	Vegetales	42
9.2.5	Tratamiento de Inactivación para <i>T. gondii</i>	42
9.2.5.1	Métodos físicos	44
9.2.5.2	Tecnologías emergentes	45
9.2.5.3	Métodos químicos y bioquímicos	47
10	Antecedentes	48

11	Pregunta de investigación	53
12	Objetivos	54
13	Materiales y métodos	55
13.1	Modelo general	55
13.1.1	Determinación del tamaño de la muestra	56
13.1.2	Aspectos bioéticos	57
13.2	Etapa 1 Evaluación del riesgo de infección por <i>Toxoplasma</i> en restaurantes escolares	57
13.2.1	Evaluación de la presencia de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en alimentos y superficies por PCR	58
13.2.1.1	Toma de muestra de alimentos y superficies	58
13.2.1.2	Método de extracción de ADN	59
13.2.1.3	PCR para <i>Toxoplasma</i>	60
13.2.2	Evaluación de la Prevalencia (IgG e IgM anti- <i>Toxoplasma</i>)	61
13.2.3	inspección higiénico-sanitario de restaurante escolares	62
13.2.4	hábitos y prácticas en el hogar	63
13.2.5	Análisis estadístico descriptivo y univariado	64
13.3	Etapa 2 Modelo de cocción segura de la carne	65
13.3.1	Determinación de propiedades termodinámicas.	66
13.3.2	curvas de penetración de calor	67
13.3.3	evaluación del modelo de cocción	69
13.3.3.1	Evaluación teórica	69
13.3.3.2	Evaluación experimental	69
13.3.4	Determinación del Tiempo de Muerte térmica de <i>Toxoplasma gondii</i>	70
13.3.5	Análisis de letalidad del <i>T. gondii</i> , evaluación de la cocción	70
13.3.6	Simulación de Montecarlo	71

14	Resultados	73
	Capítulo I. Evaluación del riesgo	73
14.1	Capítulo I. Evaluación del riesgo de infección por <i>Toxoplasma</i> en restaurantes escolares	73
14.1.1	Evaluación de la presencia de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en restaurantes por PCR	73
14.1.2	Evaluación de la prevalencia (IgG e IgM)	75
14.1.3	Inspección higiénico-sanitaria de restaurantes escolares	76
14.1.4	Hábitos y prácticas en el hogar	77
14.1.5	Análisis bivariado	78
	Capitulo II Modelo de cocción segura para carne	81
14.2	Evaluación de las alternativas para temperaturas de cocción	81
14.2.1	Determinación de propiedades termodinámicas	81
14.2.2	curvas de penetración de calor	82
14.2.3	evaluación del modelo de cocción	83
14.2.4	Determinación del Tiempo de Muerte térmica de <i>Toxoplasma gondii</i>	86
14.2.5	Análisis de letalidad del <i>T. gondii</i> y evaluación de la cocción	87
14.2.6	Simulación de Montecarlo	89
14.2.7	Analisis de escenarios	91
15	Discusión de los resultados	92
15.1	Discusión de los resultados individuales	92
15.1.1	Presencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en alimentos, agua y superficie	92
15.1.2	Serología	97
15.2	Análisis multivariado	101

15.2.1	Factores de riesgo asociados a la prevalencia de toxoplasmosis para niños que asisten a restaurantes escolares según las prácticas y hábitos en el hogar	101
15.2.2	Factores de riesgo asociados a la prevalencia de toxoplasmosis para niños que asisten a restaurantes escolares con la presencia de ADN <i>Toxoplasma gondii</i> en alimentos, agua o superficie	103
15.2.3	Análisis estratificado	104
15.2.4	Discusión general	107
16	Conclusiones	109
17	Recomendaciones	111
18	Referencias bibliográficas	112
19	Anexos	130

5 Lista de figuras

Numeración	Título	pagina
Ilustración 1	ciclo de vida <i>Toxoplasma gondii</i> CDC 2017	28
Ilustración 2	<i>Estado global de la seroprevalencia de Toxoplasma gondii (Pappas 2019) El rojo oscuro equivale a una prevalencia superior al 60%, el rojo claro equivale al 40–60%, el amarillo al 20–40%, el azul al 10–20% y el verde equivale a una prevalencia <10%. El blanco es igual a la ausencia de datos.</i>	30
Ilustración 3	Estudios de serología de la infección de <i>T gondii</i> en humanos y animales en Colombia (1944-2014)	32
Ilustración 4	Principales rutas de transmisión de enfermedades por alimentos WHO 2015	34
Ilustración 5	comportamiento serológico de la Infección para <i>T. gondii</i> según los anticuerpos evaluados	37
Ilustración 6	Métodos de inactivación de <i>Toxoplasma gondii</i> modificado de Mirza 2018	43
Ilustración 7	Representación esquemática de los componentes del análisis de riesgo según las definiciones del Codex Alimentarios Elementos que componen el análisis de riesgo	55
Ilustración 8	Temperatura en el centro geométrico de un cilindro de largo infinito (Singh 2009)	68
Ilustración 9	Calificación Promedio de cada colegio en la inspección higiénico- sanitaria	77
Ilustración 10	Perfil de temperatura calculado según de cocción de carne de cerdo de 0,012m de espesor	83

Ilustración 11	Comparación de los perfiles de temperatura de la cocción de lomo de cerdo de los datos calculado vs los reportados por otros autores	84
Ilustración 12	Perfil experimenta de temperatura de cocción de lomos de cerdo de 4,5 cm de espesor	85
Ilustración 13	Comparación de los perfiles de temperatura Calculados vs los experimentales	86
Ilustración 14	% de iteraciones que cumplen la destrucción de <i>Toxoplasma gondii</i> cuando la carne de cerdo se cocina hasta 65°C, según temperatura y espesor	90

6 Lista de Tablas

Numeración	Título	pagina
Tabla 1	Clasificación Taxonómica <i>Toxoplasma gondii</i> . Taxonomía (ADL et al, 2012).	22
Tabla 2	Utilidad de las pruebas diagnósticas para <i>Toxoplasma gondii</i>	38
Tabla 3	Prevalencia de muestras positivas de ADN por PCR anidada convencional, que amplificó la secuencia repetida B1 de <i>T. gondii</i> de alimentos, agua, jugo y superficies inertes y vivas recolectadas en restaurantes escolares de Armenia durante el año 2018	74
Tabla 4	Prevalencia de anticuerpos IgG e IgM contra <i>T.</i> <i>gondii</i> según lo determinado por el ensayo ELISA en niños que asistieron a los restaurantes escolares de Armenia durante el año 2018	76
Tabla 5	Resultados de la prueba y existencia de la enfermedad	79
Tabla 6	Composición carne de cerdo (lomo) por 100 gramos, cantidad en gramos. Tomado software Nutrix ®	81
Tabla 7	Propiedades termodinámicas carne de cerdo (lomo). Tomado software Termin ®	82
Tabla 8	Tiempo de Destrucción Térmica (valor D) de <i>T.</i> <i>gondii</i> en minutos a diferentes Temperaturas	87
Tabla 9	Calculo para determinar la Letalidad (sumatorio de tiempo)	88

Tabla 10	resultados de cocción de temperatura de lomo de cerdo a 100 y 170°C	89
Tabla 11	Factores de riesgo asociados a la presencia de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> incrementando según el cumplimiento de las condiciones higiénico sanitarias del restaurante escolar	92
Tabla 12	Factores de riesgo asociados a la prevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> con la calificación del restaurante escolar	98
Tabla 13	factores de riesgo asociados a la prevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> incrementando el valor mínimo cumplimiento del restaurante escolar	99
Tabla 14	Factores de riesgo asociados a la prevalencia de anticuerpo IgM para <i>Toxoplasma gondii</i> según las condiciones higiénicas del restaure escolar	100
Tabla 15	factores de riesgo asociados a la prevalencia de <i>Toxoplasma</i> incrementando el valor mínimo cumplimiento del restaurante escolar	102
Tabla 16	Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Toxoplasmosis para niños que asisten a restaurantes escolares con la presencia de ADN <i>Toxoplasma gondii</i> en alimentos, agua o superficies	103
Tabla 17	Análisis estratificado para condiciones socio-económica y edad según los resultados de prevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en población infantil que asiste a restaurantes escolares	104

7 Lista de anexos

Numeración	Título del Anexo	pagina
Anexo 1	Consentimientos	131
Anexo 2	Formato para la inspección sanitaria para el restaurante escolar	142
Anexo 3	Estado Antropométrico de los niños evaluados	143
Anexo 4	edad de los niños con muestra positiva para anticuerpos positivos para <i>Toxoplasma gondii</i>	145
Anexo 5	Calificación de las condiciones higiénico-sanitaria de los	149
Anexo 6	Muestra de alimentos evaluados por colegio y reporte de presencia de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en la muestra	152
Anexo 7	Curvas de Tiempo de Destrucción térmica para el <i>Toxoplasma gondii</i> a 49, 52, 58 y 64°C	153
Anexo 8	Análisis de destrucción térmica para cultivo mesofílico	156
Anexo 9	Curvas para evaluación de pruebas diagnósticas	160
Anexo 10	Análisis estadístico	167
Anexo 11	Artículos publicados	171
Anexo 12	Análisis de escenarios	200

8 Lista de símbolos y abreviaciones con su respectiva explicación

Sigla	Definición
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Center for Disease Control and Prevention)
WHO	OMS organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
UERIA	Unidad de Evaluación de Riesgo de Inocuidad de Alimentos, Ministerio de Protección Social, Instituto Nacional de Salud,
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)
QMRA	Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiano (Quantitative Microbial Risk Assessment)
PCR	técnica de diagnóstico directo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Sigla en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IgG	Nivel inmunoglobulinas, o anticuerpos en la sangre, moléculas que interviene en el proceso de defensa. La IgG brinda protección permanente frente a la enfermedad y es específica para cada microorganismo

IgM	Es la primer Inmunoglobulina o anticuerpo que se produce cuando es la primera vez que entra en contacto con un tipo determinado de microorganismo
IgA	Inmunoglobilinas que están relacionada con defensa local
IFI	Inmunofluorescencia indirecta, técnica de inmuno reacción que hace uso de anticuerpos unido químicamente a sustancias fluorescente para mostrar la presencia de una determinada molécula
SNC	Sistema Nervioso Central
C_p	capacidad calorífica
K	conductividad térmica
ρ	Densidad
α	difusividad térmica.
ϕ	fracciones de los componentes, los macro-nutrientes de los alimentos utilizados para estos cálculos son: agua, carbohidratos, proteínas, grasa y cenizas
Valor D	tiempo de destrucción térmica o tiempo necesario para destruir el 90% de los parásitos presentes
Valor z	indica el incremento en la temperatura, medida en número de grados necesario para que el valor D se reduzca a la décima parte del inicial
ROC	Curva de operación del receptor
OR	La razón de probabilidad u Odds Ratio
HPP	Procesamiento a Altas presiones (High Pressure Processing)

9 Introducción

9.1 *Toxoplasma* y toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad ampliamente distribuida en todo el mundo, siendo una de las zoonosis parasitarias más comunes, ya que se cree que un tercio de la población humana del mundo está infectada (Galván et al, 2017, Hill et al, 2009). Afecta a prácticamente todos los vertebrados de sangre caliente (homotermos), mamíferos y aves, en todos los continentes. La toxoplasmosis se debe al *Toxoplasma gondii*, descubierto en su forma de taquizoíto en los tejidos de un roedor (*Ctenodactylus gondii*), en Túnez, por Nicolle y Manceaux en 1908 y simultáneamente en Brasil en un conejo de laboratorio por Splendore. (Blaga et al, 2015).

La toxoplasmosis es una enfermedad compleja que cubre un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde una forma asintomática a infecciones diseminadas en el paciente inmunosuprimido. Recientemente el uso de bioterapias aumentó el número de pacientes que pueden presentar manifestaciones cerebrales y oculares. En ocasiones se pueden observar casos de miositis, miocarditis o neumonitis en personas inmunocompetentes llegando incluso a ser fatales o requerir de soporte ventilatorio en unidades de cuidado intensivo (Gómez et al, 2017).

Existen tres manifestaciones de la toxoplasmosis clínica (Despommier et al, 2016):

- a) **Toxoplasmosis congénita:** La infección congénita varía de asintomática a grave daño al sistema nervioso central (SNC) y muerte del feto. La transmisión generalmente ocurre cuando una mujer embarazada adquiere una infección primaria durante el embarazo. La transmisión al feto es más baja cuando se produce una infección aguda

durante el primer trimestre. Esta transmisión aumenta con la edad gestacional del feto. El daño fetal es más grave y es más probable cuando se produce una infección al inicio del embarazo. Cuando se presenta más adelante en el embarazo constituye la mayoría de las toxoplasmosis congénitas y la mayoría de los niños afectados se encuentran asintomáticos. Sin embargo, pueden mostrar las consecuencias patológicas menos graves de la infección varios meses o años después. El 10% de los casos presentan la tríada clásica de coriorretinitis, hidrocefalia y calcificaciones intracraneales (Montoya 2008). También, en este estadio de infección puede manifestarse como subclínica o como una enfermedad neonatal grave o una enfermedad en los primeros meses de vida o más tarde como una recaída (estas recaídas ocurren como manifestaciones oculares como coriorretinitis que puede llegar a cegueras). Otras manifestaciones son las calcificaciones cerebrales, hidrocefalia o convulsiones (Wilson et al, 1980, Despommier et al, 2016).

- b) **Toxoplasmosis adquirida aguda en el paciente inmunocompetente:** la mayoría de las infecciones adquiridas son asintomáticas. La toxoplasmosis aguda sintomática en el individuo inmunocompetente a menudo se caracteriza por una linfadenopatía generalizada, con un agrandamiento predominante de los ganglios cervicales, a veces asociado con una fiebre de bajo grado. La enfermedad imita la mononucleosis infecciosa. En raras ocasiones, la toxoplasmosis adquirida en adultos es grave e involucra órganos y sistemas vitales importantes. Estos pacientes pueden sufrir miocarditis y encefalitis. La coriorretinitis en la toxoplasmosis adquirida es rara, pero *T. gondii* es uno de los patógenos más comunes que causan esta uveítis posterior en huéspedes inmunocompetentes (Despommie et al, 2016).

c) **Toxoplasmosis en el paciente inmunocomprometido:** la encefalitis debida a *T. gondii* es una de las causas de la enfermedad del SNC en pacientes con SIDA. La toxoplasmosis en este contexto se debe a la reactivación de *T. gondii* latente adquirida previamente. Los pacientes con VIH que presentan recuentos de linfocitos CD4 + <100 mm³ tienen un riesgo significativo. Puede presentar daños cerebrales visualizando en imágenes como múltiples lesiones. Pero también ocurre manifestación extracerebral como en pulmón (se manifiesta como una neumonitis intersticial), el tracto gastrointestinal, el hígado o el corazón, La toxoplasmosis cutánea se presenta como una erupción macular en las palmas y plantas de los pies. También se ha descrito una forma inusual de toxoplasmosis adquirida en receptores de trasplantes de órganos de donantes infectados con *T. gondii*. Así como toxoplasmosis recurrente severa en pacientes sometidos a supresión inmunitaria durante el trasplante de médula ósea (Despommie et al, 2016).

9.1.1 Biología y Taxonomía

Clasificación Taxonómica

La clasificación inicial del género *Toxoplasma* se basó en el tipo de hospedero. Así se reportaron nueve especies: *T. alencari*, *T. bahiensis*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. gondii*, *T. hammondi*, *T. pardalis*, *T. ranae* y *T. serpai*. Posteriormente, en los años 30 se observó que los ciclos biológicos y las características inmunológicas de todas estas especies eran idénticos, por lo que se les agrupó bajo una misma especie: *T. gondii* (Gómez et al, 2004). *T. gondii* se incluye dentro del Phylum *Apicomplexa*, Clase *Sporozoea*, Subclase *Coccidia*, Orden *Eucoccidida*, Suborden *Eimeriina*, Familia *Sarcocystidae* y Subfamilia *Toxoplasmatinae* (Grandía et al. 2013)

Según Adl en 2012, en la clasificación revisada de los eucariotas sería: Protisto, Alveolata, Apicomplexa, Conoidasida, Coccidia, Eimerionina (Adl et al, 2012)

Tabla 1. Clasificación Taxonómica *Toxoplasma gondii* (Adl et al, 2012).

Clasificación taxonómica	
Reino	<i>Protista</i>
Supergrupo	<i>Sar</i>
Primer Rango	<i>Alveolata</i>
Segundo grupo	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Conoidasida</i>
Orden	<i>Coccidia</i>
Familia	<i>Eimeriorina</i>
Genero	<i>Toxoplasma</i>
Especie	<i>gondii</i> (único)

Morfología

Existen tres estadios infecciosos de *T. gondii* para todos los hospederos: taquizoítos (individualmente o en grupos y con multiplicación rápida), bradizoítos (en quistes tisulares y con multiplicación lenta) y esporozoítos (en ooquistes esporulados como forma resistente al medio ambiente) (Gómez C et al, 2017 y Grandía et al, 2013).

Ooquiste y esporozoíto

Los ooquistes sin esporular son subesféricos a esféricos y miden de 10 a 12 μm de diámetro, mientras que los esporulados son subesféricos a elipsoidales y miden de 11 a 13 μm de diámetro. Cada ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales de 6 a 8 μm y cada uno de estos contiene cuatro esporozoítos en su interior. Los esporozoítos miden 2 x 6-8 μm con un núcleo subterminal y presentan abundantes micronemas, roptrias, gránulos de amilopectina y lípidos. El número de lípidos es superior al presente en los taquizoítos y bradizoítos (Jones et al, 2010 y Grandía et al, 2013).

La etapa de ooquistes contiene los esporozoitos infecciosos. La ingestión de esta etapa conduce a la infección en mamíferos y aves. Los esporozoitos se liberan mediante la exposición del oocisto a enzimas digestivas en el intestino delgado. Los parásitos liberados penetran en la pared intestinal y son captados por macrófagos. *T. gondii* ahora puede seguir la vía extraintestinal. Una vez dentro de una célula, los organismos se denominan taquizoítos. (Despommie et al, 2016)

Taquizoíto

Miden aproximadamente 2 x 6 μm y tienen forma de media luna, con un extremo anterior conoidal y un extremo posterior redondeado. En su estructura contienen diversas organelas como mitocondrias, complejo de Golgi, ribosomas, roptrias, retículo endoplasmático rugoso y liso, cuerpos de inclusión, película protectora, microtúbulos subpeliculares, anillos apicales, anillos polares, conoide, micronemas, microporo, gránulos densos, gránulos de amilopectina (a veces ausentes) y apicoplasto. El núcleo está situado hacia el área central de la célula y contiene agregados de cromatina y un nucleolo central (Dubey et al, 2010).

En esta etapa reside en su propia vacuola parasitófora. Las células infectadas no pueden destruir los taquizoítos, debido al hecho de que *T. gondii* inhibe el proceso de fusión entre los vasos lisosomales y este nicho intracelular especializado. La replicación ocurre dentro de los macrófagos y los parásitos se transportan pasivamente a todas las partes del cuerpo. Se producen aproximadamente de 8 a 20 taquizoitos dentro de cada célula infectada. Los macrófagos finalmente sucumben a la infección, liberando taquizoitos en los tejidos circundantes. Las células absorben los parásitos liberados adyacentes al sitio de liberación. *T. gondii* se puede replicar hasta que se presenta la respuesta inmune protectora. Una respuesta inmune efectiva, mediada por IL-12 e IFN- γ , e involucra monocitos, células dendríticas, neutrófilos, células T y

células NK, limita la tasa de división del parásito. Se cree que los anticuerpos no desempeñan un papel en el control de esta fase de la infección. Al parecer, la inmunidad protectora no provoca la muerte del parásito. Más bien, en respuesta a los mecanismos de defensa del huésped, los taquizoitos se ven obligados a diferenciarse en una segunda etapa asexual conocida como bradizoíto (Despommie et al, 2016)

Bradizoíto

Esta forma se divide por endogenia y luego se organiza en un quiste tisular. Los mecanismos efectores de IFN- γ dependientes del óxido nítrico mantienen este estado de latencia (Despommie et al, 2016). Estas formas se encuentran dentro de los quistes tisulares de diverso tamaño. Los quistes pequeños (jóvenes) miden 5 μm de diámetro y contienen sólo dos bradizoitos, y los quistes grandes (viejos) contienen cientos de organismos en su interior. Los quistes tisulares en cerebro son esféricos, de hasta 70 μm de diámetro, mientras que los intramusculares son elongados y de hasta 100 μm de largo. La pared elástica y delgada encierra cientos de bradizoitos con forma de media luna, cada uno de aproximadamente 7 x 1,5 μm de tamaño (Jones y Dubey, 2010).

La estructura del bradizoitos difiere levemente del taquizoíto; sin embargo, a diferencia del esporozoíto y del taquizoíto, carece de lípidos y el número de roptrias y gránulos densos es inferior, mientras que el número de micronemas y gránulos de amilopectina es superior. Los bradizoitos son más delgados, tienen un núcleo posterior y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas (Dubey et al, 2010).

Ciclo Biológico

El ciclo biológico comprende tres fases: la enteroepitelial (en hospederos definitivos), la extraintestinal (en hospederos intermediarios y definitivos) y la

esporogónica, que ocurre en el medio ambiente (Dubey et al, 2010). Después de la ingestión de ooquistes o quistes tisulares por los hospederos definitivos, la pared de estos es disuelta por las enzimas proteolíticas durante la digestión. Los esporozoítos y bradizoítos son liberados y penetran el epitelio intestinal, donde desarrollan numerosas generaciones en los cinco tipos o estadios asexuales de la fase enteroepitelial (A, B, C, D y E). El ciclo sexual (gametogonia) se inicia dos días después de la ingestión de los quistes y los merozoítos inician la formación de los gametos de 3 a 15 días de la infección. Los microgametos masculinos penetran los macrogametos femeninos para formar los cigotos, los que más tarde se transforman en ooquistes y salen al lumen intestinal y al ambiente con las heces del felino (Dubey et al, 2006; 2010).

En la fase extraintestinal, tanto de hospederos definitivos como intermediarios, estas formas infectivas llegan simultáneamente a la lámina propia del intestino, multiplicándose en el endotelio vascular, fibroblastos, células mononucleares y leucocitos segmentados, y como resultado se forman los taquizoítos, y a partir de estos los bradizoítos. Estos últimos permanecen dentro de quistes tisulares en diferentes órganos, estableciéndose la fase crónica de la enfermedad (Dubey, 2006; 2010). Para algunos autores, los taquizoítos ingeridos por vía oral pueden morir debido a su baja resistencia al jugo gástrico; sin embargo, es probable que algunos de ellos penetren en la mucosa bucofaríngea y desencadenen las fases mencionadas anteriormente (Dubey et al, 2005).

En la fase esporogónica, los ooquistes no esporulados, bajo condiciones adecuadas, se transforman en ooquistes esporulados entre 1 a 5 días, formándose cuatro esporozoítos a partir de los dos presentes inicialmente, convirtiéndose en un estadio totalmente infeccioso (Dubey et al, 2010).

En hospedero definitivo (2, 3, 4 de la Ilustración 1)

Los gatos domésticos y otras especies felinas pueden infectarse con *T. gondii* ya sea ingiriendo ooquistes infecciosos del ambiente o ingiriendo quistes de tejidos de huéspedes intermedios. Por ejemplo, los gatos pueden ingerir quistes de tejidos cuando se alimentan de restos de comida que contienen carne o vísceras de ganado o animales de caza. Los gatos que pueden cazar pequeños mamíferos o aves infectadas con *T. gondii* y al alimentarse se pueden infectarse. Dependiendo de la especie hospedadora, el área geográfica y la estación del año, hasta el 73% de los roedores pequeños y hasta el 71% de las aves silvestres pueden infectarse con *T. gondii* (Tenter et al, 2001), (Despommie et al, 2016)

El ciclo suele implicar gatos y roedores o aves. Estas especies adquieren la etapa del quiste del tejido asexual del parásito al ingerir alimentos o agua contaminada con heces de gato que contienen ooquistes. Aunque las heces son probablemente la principal fuente de ooquistes infecciosos. Los felinos pueden adquirir la infección de formas diferentes:

- a) ingerir ooquistes heces de gato contaminadas,
- b) ingerir los quistes de tejido albergados por presas infectadas cuando
Los gatos que pueden cazar pequeños mamíferos o aves infectadas con *T. gondii* y al alimentarse se pueden infectarse (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ardillas, pájaros),
- c) ingerir quistes de tejidos cuando son alimentados sus propietarios en forma de trozos de carnes picadas (especialmente de cerdo y cordero).
- d) los gatos pueden ingerir quistes de tejidos cuando se alimentan de restos de comida que contienen carne o vísceras de ganado o animales de caza (Despommie et al, 2016)

Ciclo de hospedero intermedio (1, 5, 6 de la Ilustración 1)

La etapa de ooquistes contiene los esporozoitos infecciosos. La ingestión de esta etapa conduce a la infección en mamíferos y aves. Los esporozoitos se liberan mediante la exposición del oocisto a enzimas digestivas en el intestino delgado. Los parásitos liberados penetran en la pared intestinal y siguen la vía extraintestinal. *T. gondii* a diferencia de otros parásitos entra a la célula de manera activa y no por fagocitosis. Una vez dentro de una célula los taquizoítos conforman su propia vacuola parasitófora, que lo aísla del resto de la célula y le permite absorber nutrientes por difusión a través de la membrana de la vacuola. Al ingresar de manera activa (y no por fagocitosis) las células infectadas no pueden destruir los taquizoítos. La replicación ocurre dentro de las células y los parásitos se transportan pasivamente a todas las partes del cuerpo y posteriormente son liberados en los tejidos circundantes, los cuales absorben los parásitos liberados adyacentes al sitio de. *T. gondii* se somete a otra ronda de replicación hasta que se obtienen las respuestas inmunitarias protectoras. Una respuesta inmune efectiva limita la tasa de división del parásito (respuesta mediada por IL-12, IFN- γ , monocitos, células dendríticas, neutrófilos, células T y células NK). Al parecer, la inmunidad protectora no provoca la muerte del parásito. Más bien, en respuesta a los mecanismos de defensa del huésped, los taquizoitos se ven obligados a diferenciarse en una segunda etapa asexual conocida como bradizoíto. El cual se organiza en un quiste tisular donde los bradizoitos permanecen latentes en los tejidos mientras las defensas del huésped permanezcan activas.

Aunque todos los tejidos pueden albergar quistes de tejidos, el cerebro, el riñón, el corazón y el hígado son sitios favorecidos para la supervivencia a largo plazo de los quistes de tejidos. Los huéspedes intermedios pueden infectarse con ooquistes como quistes tisulares contenidos en la carne de otra especie que son huésped intermedio esta última ruta de transmisión es más común entre carnívoros y carroñeros. Forma en la cual es más común de adquisición para los humanos cuando se consume carne insuficientemente

cocida. El cordero, la carne de res y el cerdo son las carnes más comunes implicadas en la transmisión en todo el mundo. La transmisión congénita se produce durante la infección de la madre, cuando los taquizoitos atraviesan la placenta. El papel de los anticuerpos específicos para limitar la infección de la madre y no el feto aún no se ha definido, mientras que las células T, IFN- γ y CD8 + parecen ser necesarias para prevenir la infección congénita en modelos de ratón (Despommie et al, 2016).

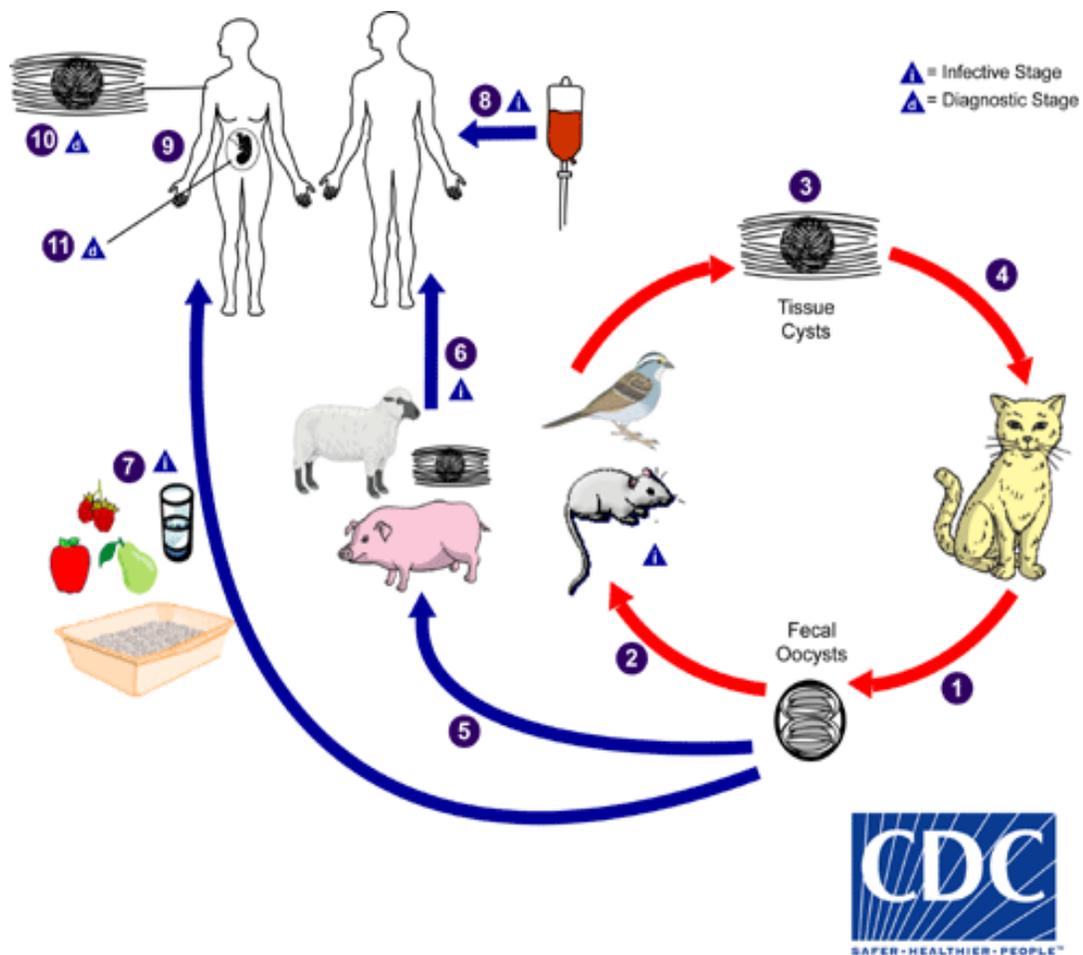


Ilustración 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (CDC, 2017).

9.1.2 Prevalencia

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que causa la toxoplasmosis, una infección asintomática y de resolución espontánea en la mayoría de los casos, pero que también puede producir complicaciones serias que resultan en gran morbilidad y mortalidad en los fetos con infección congénita y en individuos con compromiso inmunológico, ya sea por una infección primaria o por reactivación de infecciones. Los mecanismos conocidos de transmisión del agente incluyen las vías clásicas, como la ingestión de carne cruda o mal cocida y la de agua o alimentos contaminados con el parásito, así como la transmisión transplacentaria y las vías alternas, como el trasplante de órganos y la transfusión sanguínea. (Ramírez et al, 2019)

Esta zoonosis de amplia distribución geográfica se considera un riesgo para la salud global. Se estima que aproximadamente el 25 %, de la población mundial estaría infectada con el parásito y, aunque las prevalencias varían ampliamente de región a región, las más altas se han encontrado en Latinoamérica y en los países del África tropical, hecho que se relaciona con factores climáticos como la humedad y la temperatura cálida, los cuales favorecen la supervivencia del parásito en el ambiente. La gran variabilidad de la prevalencia entre las poblaciones también se asocia con factores antropogénicos, como los hábitos de alimentación, los aspectos socioeconómicos y los sistemas sanitarios.

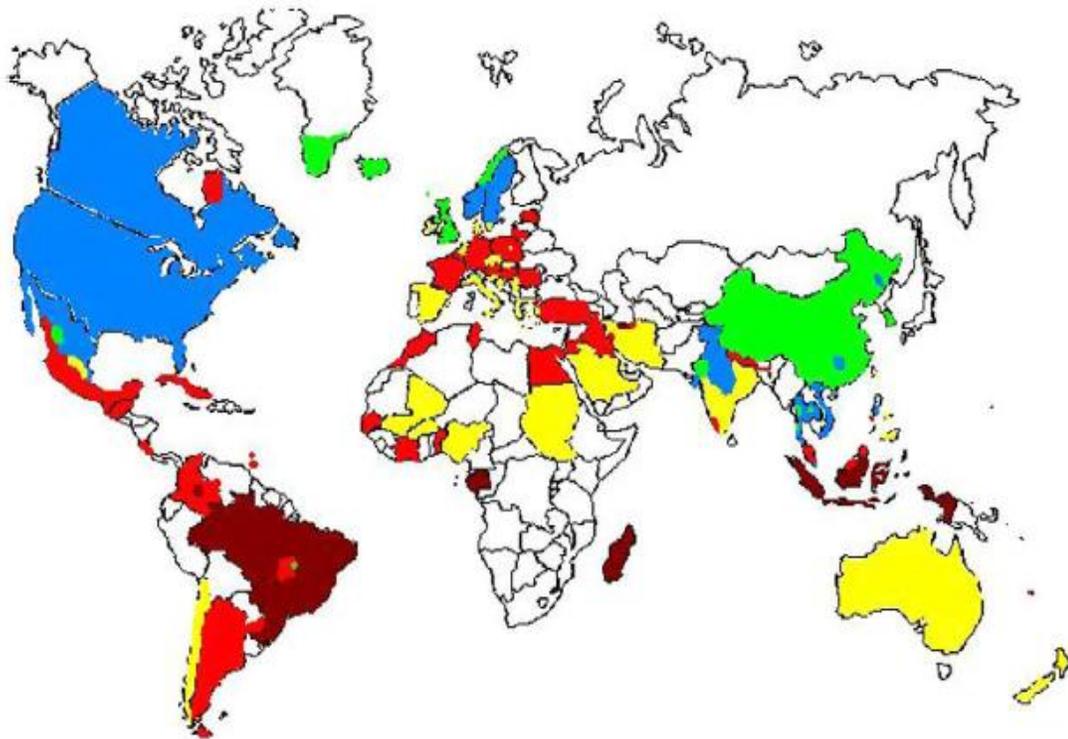


Ilustración 2. Estado global de la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii*. El rojo oscuro equivale a una prevalencia superior al 60%, el rojo claro equivale al 40–60%, el amarillo al 20–40%, el azul al 10–20% y el verde equivale a una prevalencia <10%. El blanco es igual a la ausencia de datos. (Pappas et al, 2019)

En Latinoamérica se encuentran tasas de seroprevalencia significativamente altas, donde estudios comparativos entre ciudades de Brasil muestran que la población rural y amerindia tienen prevalencias mayores que la población urbana, correlacionado a las prácticas sanitarias, hábitos de comer y de beber (uso de aguas contaminadas). Las condiciones climáticas de la región de la selva tropical pueden permitir la supervivencia de los ooquistes del parásito. En Guatemala se tiene una prevalencia proyectada de 37,8% en población menor de 101 años. En México se tienen datos similares a los de América datos cercanos al 19,2%. Para los datos de los Estados Unidos los últimos reportes muestran que ha venido disminuyendo está relacionada con estado socio económico. Para Canadá los reportes muestran una prevalencia entre 16, al 18%.

Para Europa existen regiones como Grecia con valores de seroprevalencia mayores, a diferencia de otros países del este de Europa. Para Francia se reportan prevalencias del 59%. En otros países como Estonia, República Checa Lituania se reportan valores altos superiores al 50%. Países como Suecia reportan el 23%, pero países como Islandia, Dinamarca, Islas Feroe y Groenlandia reportan valores bajos cercanos al 9,8%.

En Asia, existen focos de alta prevalencia en oriente medio (Turquía, Irán, Irak Kuwait) prevalencias cercanas al 25%, pero en países sur oeste las prevalencias son mayores (países como Tailandia, Vietnam, Indonesia, Malasia entre 11 al 60% esto principalmente a diferencia raciales y a su origen. El origen chino tiene una baja prevalencia y las prevalencias mayores están asociadas con prácticas y hábitos como tener gatos como mascotas. En estudios anteriores las prevalencias más bajas se han reportado en China con el 1%. Para India se ha reportados valores muy variables que van 9,4 al 48%.

Para África existe un seguimiento limitado la población en general la prevalencia es 58%. Como factores de riesgo se presentó en Nigeria el consumo de roedores y el contacto con el suelo (Pappas 2009).

Para Colombia, según el Estudio Nacional de Salud realizado en 1980, se reportó una seroprevalencia de *T. gondii* para la población general del 47% (para hombres 47,9% y mujeres 46,3%). La población de mayor riesgo fueron las mujeres embarazadas con 63% y en la población infantil de 0 a 9 años se reportó una prevalencia del 32%, lo que indica contacto temprano con el parásito en la población. Como factores de riesgo se presentó mayor prevalencia en manipuladores en plantas de sacrificio, características socio-culturales, bajo nivel educativo, y la ingestión de animales salvajes (Cañón et al, 2014)

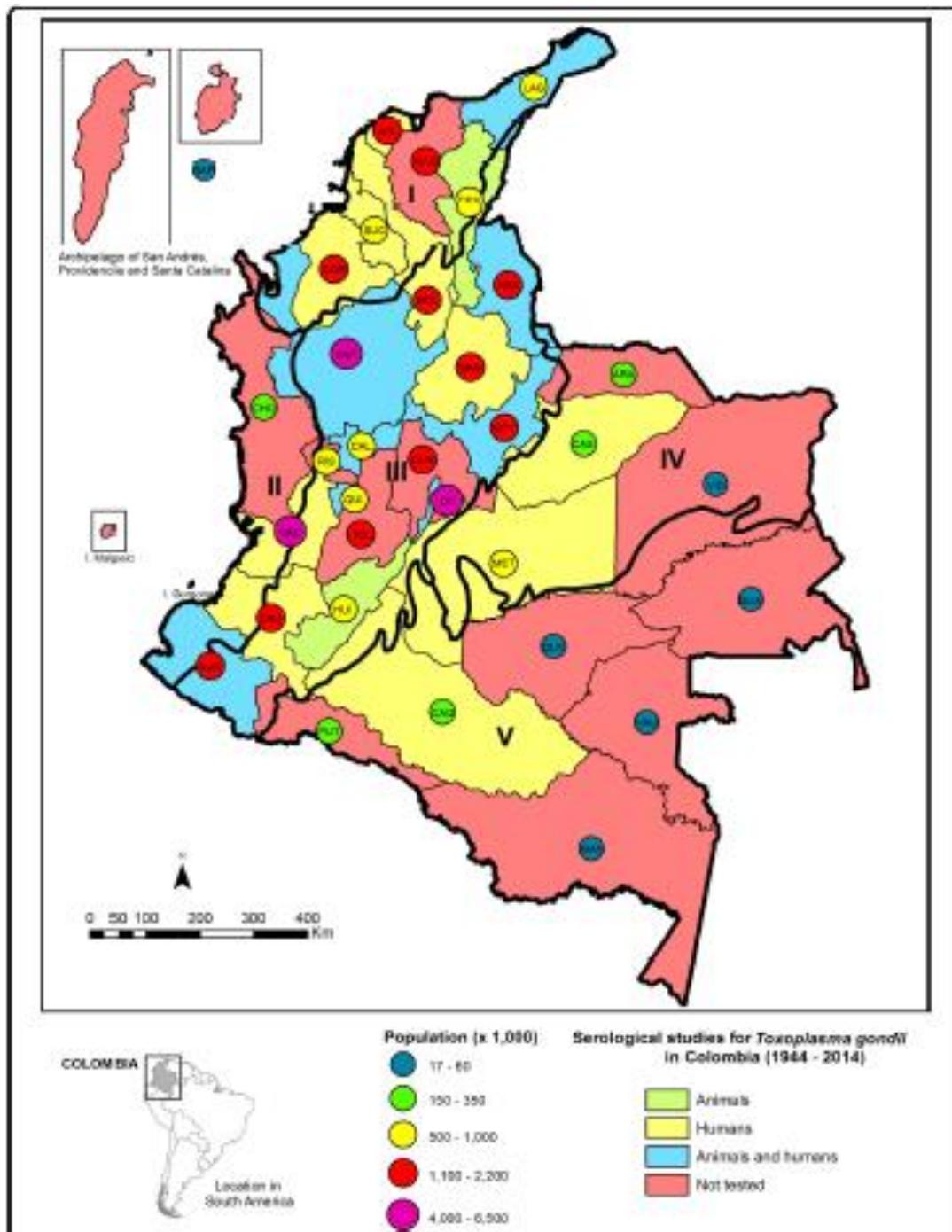


Ilustración 3 Estudios de serología de la infección de *T gondii* en humanos y animales en Colombia, 1944-2014 (Cañón 2014)

9.1.3 Consecuencias de la Toxoplasmosis

Tres géneros intestinal protozoos (*Cryptosporidium*, *Entamoeba* y *Giardia*) se considera una prioridad, ya que eran propensos a dar lugar a una alta carga de la enfermedad, y la frecuencia de las citas de estos parásitos se había aumentado marcadamente entre 1990 y 2008. *Toxoplasma gondii* también se considera de alta prioridad debido a la posibilidad secuelas graves. Para algunas enfermedades, como la toxoplasmosis, muchos de los casos incidentes no tienen secuelas, es decir, son sub-clínicas donde la probabilidad de muerte neonatal es de 0,7% (0,4% -1,2%); coriorretinitis en primer año de vida probabilidad es de 13% (12% -15%); coriorretinitis tardía con una probabilidad; probabilidad calcificación intracraneal 11% (7.9% -12%); hidrocefalia probabilidad 2,0% (1,0% -3,0%); anomalías del Sistema Nervioso Central 2,9% (0% -6,0%). Mortalidad: con una probabilidad de 0,7% (0,4% -1,2%), ya que estas son las proporciones de casos que mueren en el periodo neonatal. Además, hay aproximadamente 2,4% (2,3% -6,3%) pérdida fetal (mortinatos) después de 24 semanas, pero estos no fueron asignados como casos fatales (FAO 2014, WHO 2015).

9.1.4 Factores de riesgo para humanos

Según La Organización Mundial de la Salud para la gestión del riesgo, se pueden definir varios puntos a lo largo de la cadena productiva (producción primaria, procesamiento, comercialización o preparación). Sin embargo, el comité de expertos definió que las principales rutas de transmisión atribuidas a la incidencia de las enfermedades en humanos eran las rutas de alimentos y agua, aunque la transmisión puede cambiar de fuente o de vehículo; respecto al agua, toma relevancia la consumida por vía dietaria o la usada para riego, lavado y limpieza de alimentos y como ingrediente, y esta al ser contaminadas por un reservorio animal se convierten en enfermedades zoonoticas. No es claro que no existe una forma correcta de delinear la ruta de transmisión por alimentos. La atribución puede involucrar varios factores:

los alimentos en cuestión, los sistemas de producción, la ocurrencia geográfica del peligro, saneamiento e higiene de la región, patrones de consumo ver ilustración 4 (WHO 2015).

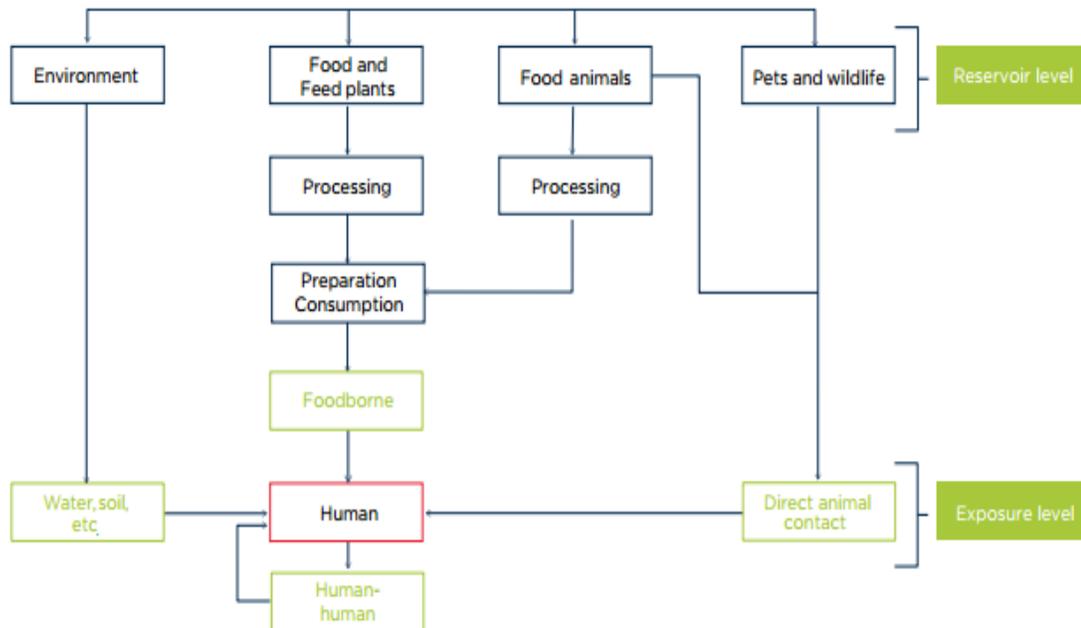


Ilustración 4. Principales rutas de transmisión (en inglés) de enfermedades por alimentos WHO 2015

Son numerosos los estudios sobre factores de riesgo en la infección por *T. gondii*, en su mayor parte basados en encuestas epidemiológicas asociadas a estudios serológicos y análisis estadísticos de *Odds Ratio* (OR). Recientemente se han detectado nuevos factores como trasplantes de órganos, y de origen alimentario moluscos por su carácter filtrador. Los factores de riesgo tradicionales son:

Para Francia encontró que los factores de riesgo son higiene de manos, consumo de carnes poco cocidas, tener gato como mascotas, consumo de vegetales crudo (Baril et al, 1999). En España niños con casas patio o áreas no urbanizadas con presencia de gatos (Del castillo et al, 1998).

En Estados Unidos los factores de riesgo atribuidos en las madres que tuvieron niños con infección congénita fueron carnes crudas y en un estudio posterior en el 78% la primo infección se atribuyó a aguas de bebidas o en verduras (Boyer et al, 2005, Jones et al, 2009).

En Noruega los factores de riesgo fueron el consumo de carne poco cocida sin especificar la especie, consumir vegetales no lavados, lavar los cuchillos con poca frecuencia (Kapperud et al, 1996)

En Brasil predomina el consumo de hielo o lavar vegetales con agua sin tratar, consumo de carne de pollo poco cocida (Sroka et al, 2010), las recomendaciones principales para evitar el contagio son: evitar el consumo de aguas no tratadas, frutas y verduras peladas o bien lavadas, lavar utensilios de cocina con agua caliente, evitar el consumo de carne crudas, no consumir leches sin pasteurizar, utilizar guantes para trabajos de jardinería, mantener controlados los gatos en la casa, en la producción de animales para consumo implementar Buenas Prácticas Pecuarias con énfasis en mantenimiento alejado de gatos o roedores de las áreas y zonas de fuente de agua (Calero et al, 2016).

9.1.5 Diagnóstico y métodos de identificación

El diagnóstico de la toxoplasmosis humana puede hacerse por métodos directos o indirectos. Los métodos directos se basan en la demostración de formas parasitarias completas o su material genético en fluidos o tejidos corporales. Los métodos indirectos para el diagnóstico de la toxoplasmosis se basan en la demostración de la presencia de anticuerpos IgM, IgG o IgA específicos contra el parásito.

Métodos directos

La primera técnica para el diagnóstico de la toxoplasmosis fue la coloración de Sabin y Feldman. Se basa en la visualización de taquizoitos provenientes del líquido peritoneal de ratones inoculados con suero u otros especímenes corporales del paciente. Esta se considera la prueba de referencia para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana; no obstante, su uso está restringido a pocos centros en el mundo porque requiere disponibilidad de animales de laboratorio y personal altamente entrenado en las técnicas de coloración, la interpretación de los resultados y las normas de bioseguridad. El uso de la prueba de Sabin y Feldman se limita en la actualidad como estándar de referencia en investigaciones para el desarrollo y evaluación de nuevas técnicas diagnósticas. Otra técnica de diagnóstico directo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que se determina la presencia del ADN de *T. gondii* en muestras de fluidos y tejidos corporales. Es muy útil para el diagnóstico de la infección congénita a partir de líquido amniótico, sangre u orina del neonato. La realización de esta prueba en humor vítreo o en humor acuoso permite el diagnóstico de casos inespecíficos y de difícil manejo de toxoplasmosis ocular. También es aplicable para el diagnóstico de encefalitis toxoplásmica en los pacientes con SIDA, a partir de líquido cefalorraquídeo, o para la identificación de la primoinfección en individuos infectados con VIH mediante la evaluación de cualquier espécimen corporal.

Métodos indirectos

Para los métodos indirectos que buscan determinar anticuerpos IgG, IgM e IgA generalmente se emplea la técnica de ELISA en placas sensibilizadas con antígenos totales o fracciones de parásitos. La sensibilidad y la especificidad de estos métodos son mayores de 90%. Estas pruebas se encuentran disponibles como estuches comerciales y son de fácil aplicación por el personal de laboratorio. Recientemente se desarrollaron unas pruebas de ELISA en las que se determina la avidéz de los anticuerpos IgG, con lo cual se incrementa la especificidad del resultado. Se ha observado que la afinidad

de los anticuerpos específicos tipo IgG es más baja al inicio de la infección y va aumentando con el tiempo, lo cual ayuda a diferenciar las infecciones adquiridas en forma reciente de las más avanzadas. También se ha evaluado la utilidad de determinar la inmunidad de células T específicas contra antígenos del *T. gondii* en el diagnóstico de enfermedad congénita.

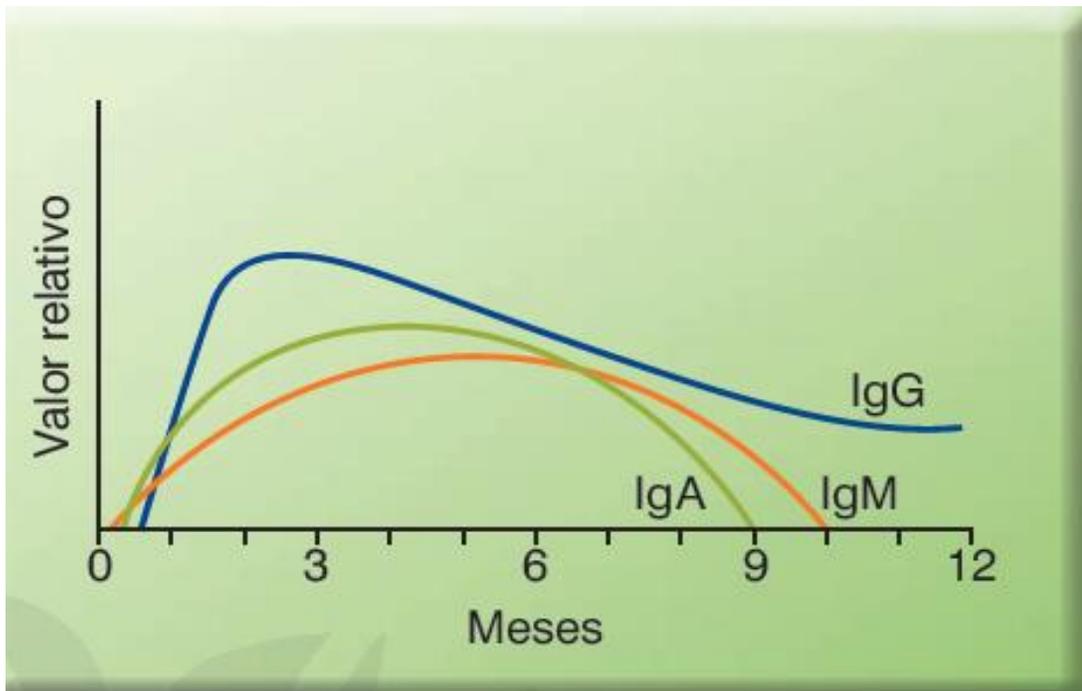


Ilustración 5. comportamiento serológico de la Infección para *T. gondii* según los anticuerpos evaluados (Giraldo et al, 2008)

La toxoplasmosis aguda en individuos inmunocompetentes usualmente tiene manifestaciones inespecíficas y un curso benigno, así que habitualmente esta fase de la infección pasa sin que se realice el diagnóstico por el laboratorio; sin embargo, en caso de sospecha clínica pueden medirse los títulos de IgM específica. El diagnóstico de la primoinfección cobra importancia en las mujeres gestantes porque sirve para definir la conducta terapéutica con la madre y con el recién nacido (Giraldo et al, 2008).

La fase crónica de la infección en individuos con inmunidad preservada no requiere diagnóstico puesto que no ocasiona signo clínico alguno. Puede hacerse la determinación de anticuerpos IgG específicos en estudios de prevalencia de la infección, en mujeres en edad reproductiva con el objeto de establecer el riesgo de toxoplasmosis congénita a futuro y en donantes potenciales de órganos para adoptar las conductas profilácticas apropiadas en el receptor del trasplante. El diagnóstico de la toxoplasmosis también puede requerir algunas pruebas complementarias de acuerdo con los órganos afectados, así, por ejemplo, para la encefalitis toxoplásmica se utiliza la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética nuclear, y para la toxoplasmosis ocular se utiliza la evaluación exhaustiva del fondo de ojo realizada por un especialista bien entrenado. Las principales indicaciones de las pruebas diagnósticas para *T. gondii* se describen en la tabla 2 (Giraldo et al, 2008).

Tabla 2. Utilidad de las pruebas diagnósticas para *Toxoplasma gondii*

Escenario clínico	Prueba diagnóstica
Hospedero inmuno-competente	Anticuerpos IgG e IgM
Hospedero inmunocomprometido	Serología (IgG e IgM). Si hay sospecha de reactivación, se debe tomar una nueva muestra e idealmente hacer PCR
Madres gestantes	Anticuerpos IgG para verificar inmunidad previa y riesgo. En caso de sospecha de infección aguda, anticuerpos IgG e IgM, seguidos de IgG de avididad si la IgM es positiva. Si la IgM es negativa, descarta la infección aguda en los dos primeros trimestres
Toxoplasmosis congénita	Serología (IgG, IgM e IgA) en el recién nacido y en la madre. PCR de muestras del recién nacido (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo)
Toxoplasmosis ocular	Serología (IgG e IgM). PCR de humor vítreo y acuoso

9.2 *Toxoplasma* en alimentos

9.2.1 Carnes

Se ha encontrado que el ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras son los animales susceptibles a la contaminación *T. gondii* por la ingestión de ooquistes, y que después de la infección experimental se pueden aislar de sus tejidos. En la actualidad, los sistemas de producción modernos han eliminado prácticamente la infección por *T. gondii* en cerdos. Sin embargo, los sistemas de producción cada vez más populares con mayor riesgo de exposición a *T. gondii* puede provocar un resurgimiento de la carne de cerdo como fuente de carne infecciosa.

Los productos cárnicos a menudo se pueden hacer mediante mezclas de diferentes cortes de carnes, órganos o carnes de diferentes especies de animales, normalmente se utilizan los animales más viejos para productos cárnicos curados y se sabe que el *T. gondii* la prevalencia se incrementa con la edad del animal. Según estudios en Brasil y el Reino Unido se ha detectado la presencia de organismos viables de *T. gondii* en uno de cada 67 muestras de carne curada analizadas las cuales correspondieron a la mezcla de carne de vacuno con otros tipos de carne. Además, esto podría explicar los hallazgos epidemiológicos observados que vinculan el consumo de carne cruda a la infección por *T. gondii* en los seres humanos.

Los programas de prevención han demostrado ser muy eficaz, se podría afirmar que la incidencia podría reducirse de 1,43% a 0,09%, malos hábitos pueden generar contaminación cruzada (Kiljtra et al, 2008; Opsteegh et al, 2016).

En pollos no hay datos recientes, sin embargo, puede esperarse que las aves de corral que se mantienen en espacio abierto tienen una mayor probabilidad

de estar infectados con el parásito. En pollos criados al aire libre la seroprevalencia se ha incrementado hasta un 65% y se ha reportado la presencia del parásito en el 81% de los animales. Por lo que se recomienda el consumo de carne de pollo bien cocida.

Las condiciones ambientales en Colombia son adecuadas para que se lleve el ciclo biológico del *Toxoplasma gondii* y se ha encontrado niveles de prevalencia en carnes de animales más altos que en otros países. Según estudios realizados utilizando la técnica de IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) se encontraron los siguientes resultados de muestras positivas para *Toxoplasma gondii*: para porcino 15,3%, aves 15,6%, para equinos 21,1% y para bovinos 35,3%. Para el caso de los bovinos se encontró que existe varios factores que afectan la prevalencia como: edad, raza, el sistema de producción. Para la edad, la prevalencia aumenta en la medida que esta se incrementa, para la raza, la normando presenta más número de individuos positivos y según el sistema de producción se presenta mayor número de individuos positivos en bovinos de ceba que los productores de leche (Pérez et al, 2008; Tovar et al, 2014). Otros trabajos en Colombia que utilizan la técnica de detección del gen B1 por PCR también encontraron valores similares el 43% de las muestras de carne fueron positivas: 55% en pollo, 37% en res y 40% en carne de cerdo (Lora et al, 2007; Franco et al, 2016).

9.2.2 Leches

Existe una 80% de prevalencia en leche provenientes de animales infectados, se puede encontrar en alimentos procesado sin tratamiento térmico. Se sigue que por la dieta de los animales es por material vegetal que puede estar contaminado con ooquiste expulsados por gatos, comúnmente encontrados libre en las explotaciones pecuarias (Pérez et al, 2008). El consumo de leche y productos lácteos de cabra cruda se ha relacionado con

casos de toxoplasmosis en los seres humanos, aunque la leche de vaca no pasteurizada no se asoció con infecciones de *T. gondii* (Mancianti et al, 2013; Calero et al; 2016; Mirza et al, 2018)

9.2.3 Agua

Estudios recientes han asociado la infección aguda con consumo de agua no tratada o del acueducto, en la investigación de un brote de toxoplasmosis en Columbia Británica (Canadá) donde se observó que al realizar un mapeo de los casos que existía una asociación significativa entre la infección aguda y la residencia en el área de un sistema de distribución de agua (López et al, 2005)

En Brasil, ha experimentado varios brotes transmitidos por ooquistes, en agua no tratada como la fuente común de exposición, donde varios factores que contribuyen a los patrones de transmisión de ooquistes incluyen: 1) los altos niveles de contaminación ambiental con ooquistes; 2) presencia de diversos genotipos de *T. gondii* y rica biodiversidad felina en áreas periurbanas, rurales y forestales; y 3) la falta de control de los gatos domésticos que viven en zonas urbanas y periurbanas. Combinadas, estas características implican que la exposición a los ooquistes probablemente contribuya a la alta prevalencia de la infección por *T. gondii* en muchas poblaciones en Brasil (De Moura 2006, Shapiro 2019).

En Armenia, un estudio realizado mostró que los factores de riesgo relacionados son: comer carne cruda o a medio cocer, beber bebidas hechas con agua sin hervir (OR: 4,5, IC95 % 1,18 – 17,79, p=0,019). En contraste, beber agua de bolsa, botella o botellón fue un factor protector con un OR: 0,24, IC95% 0,06 – 0,95; p=0,02 (López et al, 2005; Triviño et al, 2016; Lora et al, 2016)

9.2.4 Vegetales

Se pensaría que las personas vegetarianas tendrían una menor probabilidad de infectarse con *Toxoplasma gondii*, sin embargo, esto no es así, lo cual muestra la importancia de la presencia de ooquistes en el agua y especialmente, la contaminación de alimentos, como verduras. Se ha demostrado que el consumir verduras crudas, fue un factor de riesgo en Francia y en Estados Unidos, siendo el *T. gondii* como uno de los patógenos que más muertes causa por su transmisión alimentaria (Pérez et al, 2011; Robertson et al, 2016; Triviño et al, 2016).

Los quistes esporulados sobreviven durante largos periodos de tiempo en condiciones ambientales moderadas (por ejemplo, suelos húmedos durante meses o años). Los ooquistes en el suelo propagarse por varios mecanismos como insecto o lombrices y pasar de allí a las plantas (de igual forma los ooquistes sobreviven en frutas y vegetales durante largo tiempos). Y los rumiantes o los humanos pueden adquirir el *Toxoplasma* por esta fuente (Dubey et al, 2004).

9.2.5 Tratamientos de inactivación para *T. gondii*

Los estudios han indicado que quistes de *T. gondii* en la carne son susceptibles a diversos procedimientos físicos tales como tratamiento térmico, la congelación, la irradiación, alta presión, acidez y soluciones que mejoran. Pocos estudios han evaluado los efectos sobre la carne de animales infectados de forma natural. Ver ilustración 6 (Calero 2016 Mirza 2018).

Los ooquistes de *T. gondii* son altamente resistentes a la influencia ambiental y se inactivan rápidamente después de la exposición a agentes químicos, temperaturas extremas, irradiación, y otros métodos físicos. Se ha encontrado que la pared del ooquiste es una bicapa, siendo la capa externa más delgada que la capa interna. Los resultados experimentales han demostrado que las capas no están estrechamente unidas entre sí y que la capa exterior se puede quitar fácilmente con agentes químicos. Los métodos físicos pueden desnaturalizar las proteínas y causar la inactivación o la muerte de *T. gondii*. La inactivación de los quistes parásitos en tejidos animales y ooquistes en el medio ambiente es esencial para prevenir la infección por *T. gondii* en el hombre y los animales. Los estudios de algunos tratamientos físicos, químicos han reportado efectos beneficiosos. Dentro de los tratamientos físico se encuentran: pasteurización, esterilización cocción, congelación, alta presiones, radiaciones ionizantes. Dentro de los tratamientos químicos se encuentra: curado, desinfección. (Bayarri et al, 2012; Dumetre et al, 2013)

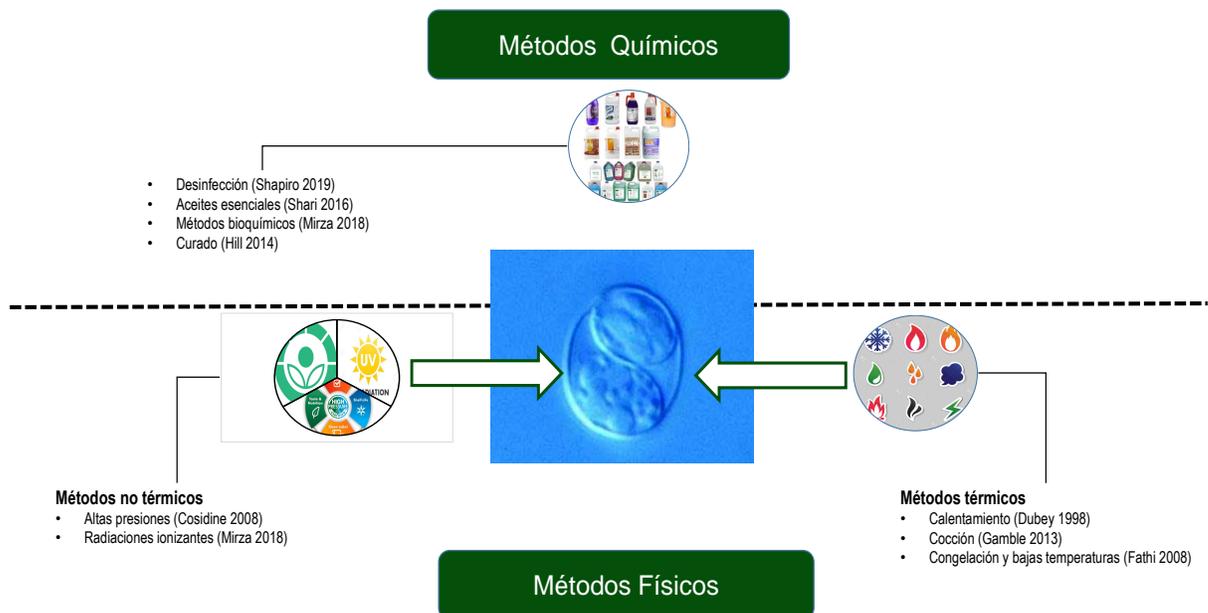


Ilustración 6. Métodos de Inactivación *Toxoplasma gondii* modificado de Mirza 2018

9.2.5.1 Métodos Físicos

Tratamiento térmico (pasteurización o esterilización)

El procesamiento de calor es un método importante para prolongar la vida de almacenamiento de los productos alimenticios. El propósito básico del tratamiento térmico en los alimentos es reducir o destruir todos los microorganismos presentes. La esterilización comercial a 121°C es lo suficientemente intensa para inactivar la mayoría de los microorganismos resistentes al calor. El *T. gondii* es susceptible a la inactivación por calor y los estudios han demostrado que el calentamiento puede destruir los ooquistes de *T. gondii* de cepas tanto no esporuladas como esporuladas.

Dubey 1998 informó sobre el efecto destructivo del calentamiento en quistes de tejidos. Otro estudio demostró que el calentamiento a 58 °C era suficiente para inactivar todos los ooquistes. Wainwright et al. 2010 indicaron que los ooquistes de *T. gondii* no siempre se pueden inactivar cuando se exponen a un mínimo de 60 °C durante 1 min y que el tiempo de calentamiento del agua, el tiempo de enfriamiento y el volumen del agua tratada deben. Los autores también reportan que se necesitan tiempos más cortos y temperaturas más bajas para destruir los taquizoitos, en comparación con los bradizoitos, y se requieren largos tratamientos más intensos para los ooquistes que se encuentran en vegetales contaminados o en el tejido intestinal de los felinos.

Cocción

El principal factor de control para la prevención de la infección por *T. gondii* en el consumo de carne es la cocción adecuada y la prevención de la contaminación cruzada mediante la separación de la carne cocida y la carne cruda o poco cocida Hill et al. 2004 mostraron que *T. gondii* muere en 5.6 minutos a 49 °C, en 44 segundos a 55 °C y en 6 segundos a 61 °C si la

temperatura se distribuye y mantiene de manera uniforme a lo largo de la carne (Gamble et al, 2013).

Congelación

La congelación de alimentos por parte de los consumidores es común en muchos países, pero un factor importante de las actitudes de los consumidores hacia la congelación es la percepción de la reducción de cualidades sensoriales. Los estudios han demostrado que la congelación puede inactivar los quistes tisulares de *T. gondii*. Cuando se realiza durante dos días a -20 °C. La congelación de alimentos por parte de los consumidores es común en muchos países, pero un factor importante de las actitudes de los consumidores hacia la congelación es la percepción de la reducción de cualidades sensoriales. Los estudios han demostrado que la congelación puede inactivar los quistes tisulares de *T. gondii*. Cuando se realiza durante dos días a -20 ° C (Fathi et al, 2008; Gamble et al, 2013)

9.2.5.2 Tecnologías emergentes

Procesamiento a alta presión

La tecnología HPP (*High Pressure Processing* siglas en inglés) es un método relativamente nuevo, no térmico, que somete los productos alimenticios a presiones hasta 1000 MPa para inactivar o matar los microorganismos que se encuentran presentes en los alimentos, el cual se realiza en tiempos relativamente cortos. Los estudios de la efectividad del HPP sobre los quistes tisulares de *T. gondii* en condiciones de laboratorio muestran la sensibilidad de los parásitos y logran su destrucción a presiones relativamente bajas 340–550 MPa (Cosidine et al, 2008; Mirza et al, 2018)

Irradiación ionizante

El IR es un proceso de pasteurización de alimentos no térmico que reduce, inactiva o elimina el deterioro de microorganismos patógenos, insectos, hongos y otras plagas, y retrasa el deterioro de los alimentos. Los IR puede utilizar rayos gamma de fuentes radioisotópicas como cobalto-60 o cesio-137, electrones, rayos X de rayos beta, aceleradores de haz de electrones o rayos. Se ha evaluado la irradiación para determinar la inactivación o muerte de quistes tisulares de *T. gondii* en la carne y se vuelve inviable por la irradiación en dosis de 0,4 a 1 kGy. Se ha demostrado que la irradiación con UV desactiva los taquizoitos de *T. gondii*, pero los protocolos recientemente publicados son basados en la exposición prolongada (es decir, hasta 60 min) a la radiación UV. (Mirza et al, 2018)

9.2.5.3 Métodos Químicos y bioquímicos.

Se han utilizado varias estrategias complementarias para controlar la contaminación de los alimentos, que incluyen una gama de tratamientos químicos y bioquímicos. Los principales agentes utilizados son los ácidos orgánicos y sus sales, disolventes y otros compuestos oxidantes, formaldehído, desinfectantes, alcoholes, enzimas, aditivos alimentarios y aceites esenciales de plantas o mezclas para lograr efectos sinérgicos. (Betancourt et al, 2004; Sharif et al, 2016 y Mirza et al, 2018)

Curado

Los tratamientos de curado se utilizan para conservar la carne mediante la adición de una combinación de sal, nitratos, nitritos o Sacarosa y ahumado a baja temperatura. Los estudios indican que los quistes tisulares de *T. gondii* se eliminan durante el curado con sal, aunque la inactivación de estos quistes depende del tiempo de maduración, la temperatura de almacenamiento y la concentración de sal en el proceso de curado. Trabajos como el de Hill en 2004 mostraron que la inyección e inmersión durante 8 h con soluciones de

NaCl al 2,0% o más de sal y 1,4% lactato en lomos de cerdo que contenían quistes infecciosos del tejido impidió la transmisión de *T. gondii*. (Hill et al, 2004). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para evaluar la seguridad de los productos cárnicos curados en diferentes condiciones de curado con respecto al tiempo y la sal y la concentración de nitritos (Dubey et al, 1997; Gamble et al, 2013)

Desinfección

En la actualidad, los productos químicos más utilizados en la potabilización de agua o procesamiento de alimentos son cloro y ozono, los cuales son agentes oxidantes fuertes que pueden causar la muerte celular mediante la inhibición de la actividad enzimática, el daño a las células al modificar los componentes celulares, las alteraciones en la permeabilidad de las células o el daño al ADN y al ARN.

Wainwright et al. 2004 indicaron que ni el hipoclorito de sodio ni el ozono inactivaron eficazmente los ooquistes de *T. gondii*, Finch et al.1993 Encontraron que una fuerte concentración de amoníaco (28%) mató a todos los ooquistes de *T. gondii* en 10 minutos y una tintura fuerte de yodo lo hizo en 30 minutos o 1% a 10% de formaldehído durante 24 horas eliminó todos los ooquistes o ácido peracético durante 48 h, con etanol durante 24 h o con metanol durante 12 h eliminó los ooquistes (Shapiro et al, 2019; Kijlstra et al, 2008).

10 Antecedentes

Existen varios trabajos sobre evaluación de riesgo de infección con *Toxoplasma gondii*. Pero esto se ha centrado principalmente en la cadena productiva del cerdo y como medida de control esta es la cocción, aquí se presentan resúmenes de algunos de ellos.

Según Opsteegh et al, 2011. *Toxoplasma gondii* es un importante patógeno de transmisión alimentaria, y la causa de una alta carga de morbilidad debida a la toxoplasmosis congénita en los Países Bajos. El objetivo de este estudio fue cuantificar la contribución relativa de ovino, bovino y porcino productos a las infecciones de *T. gondii* en humanos utilizando la metodología de Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiano (*Quantitative Microbial Risk Assessment* – QMRA-). Los datos de concentración y tamaño de las porciones fueron utilizados para estimar el número de bradizoítos presentes en alimentos no procesados contaminados consumidos por el hombre. Los factores de reducción para la salazón, la congelación y cocción se estimaron con en base experimentos publicados en ratones, los cuales se utilizaron posteriormente para estimar el número de bradizoítos en porciones procesadas. La relación dosis-respuesta para la infección por *T. gondii* en ratones se utilizó para estimar la probabilidad de infección humana por el consumo de estas porciones procesados inicialmente infectadas. Al multiplicar estas probabilidades con la prevalencia de *T. gondii* por especies de ganado y el número de porciones que se consumen al año, se calculó el número de personas susceptibles de ser infectadas por año en Holanda y la subpoblación de mujeres embarazadas susceptibles. Los resultados de QMRA predicen un alto número de infecciones por año con carne como la fuente más importante. Aunque muchas incertidumbres estaban presentes en los datos y el número de infecciones congénitas predichas por el modelo fue casi veinte veces mayor

que el número estimado sobre la base de la incidencia en los recién nacidos, la utilidad del asesoramiento para calentar a fondo la carne es confirmado por nuestros resultados. El cuarenta por ciento de todas las infecciones predichas se debe al consumo de productos cárnicos sin calefacción, el análisis de sensibilidad indica que la temperatura de calentamiento tiene la mayor influencia en el número previsto de infecciones. Los resultados también demuestran que, incluso con una baja prevalencia en el ganado, el consumo de carne sigue siendo una fuente importante de infección. El desarrollo de este modelo ha ayudado a identificar importantes lagunas de conocimiento y dio lugar a las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones: recoger datos de procesamiento de efecto de acuerdo con el procesamiento de estilo de consumo y poder tener información de las temperaturas de cocción específicas de productos, investigar la presencia y concentración de bradizoítos viables en el ganado bovino, determinar el efecto de picado de carne sobre las concentraciones bradyzoito utilizando tamaños de lote reales, y obtener una estimación de la proporción de carne que ha sido congelado antes de la compra. Con datos más precisos este modelo QMRA ayudará a la toma de decisiones sobre las estrategias de intervención para reducir la carga de morbilidad por infecciones *T gondii* en los Países Bajos

Crotta et al, 2017. Los productos de origen animal se encuentran en etapas tempranas. La complejidad biológica del ciclo de vida de *T. gondii* y comprensión limitada de varios aspectos fundamentales de la interacción huésped / parásito, requiere la adopción de numerosos supuestos críticos y significantes simplificaciones. Este trabajo presento un modelo cuantitativo hipotético para la evaluación de la exposición humana a *T. gondii* a través de productos cárnicos. El modelo ha sido conceptualizado para captar la dinámica que conduce a la presencia de parásitos en la carne y, con fines ilustrativos, se utiliza para estimar la probabilidad de que al menos un quiste viable ocurra en 100 g de carne de cerdo fresca en Inglaterra. Los datos disponibles,

incluidos los resultados de una encuesta serológica en cerdos criados en Inglaterra, se utilizaron como punto de partida para implementar un modelo probabilístico y evaluar el destino del parásito a lo largo de la cadena alimentaria. Las distribuciones de incertidumbre se incluyeron para describir y explicar la falta de conocimiento cuando era necesario. Para cuantificar el impacto de los insumos claves del modelo se realizaron análisis de sensibilidad y escenarios. La probabilidad global de 100 g de un tejido comestible hipotético que contiene al menos 1 quiste fue de 5,54%. El análisis de sensibilidad indicó que las variables que ejercían mayor efecto sobre la media de salida eran el número de quistes y el número de bradizoitos por quiste. En los escenarios mejores y peores, la probabilidad de que una sola porción de carne fresca de cerdo contenga al menos 1 quiste viable resultó en 1,14% y 9,97%, indicando que la incertidumbre y la falta de datos que rodean los parámetros clave de entrada del modelo impiden una estimación precisa de *T. gondii* a través del consumo de productos cárnicos. El modelo hipotético conceptualizado es coherente con el conocimiento actual de la biología del parásito. Los modelos de simulación identifican claramente los principales vacíos en nuestro conocimiento de la interacción huésped-parásito que, cuando esté cargada, apoyará las evaluaciones cuantitativas y muchas estimaciones precisas necesarias del riesgo de exposición humana.

Guo et al, 2017. *Toxoplasma gondii* es uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos en los Estados Unidos. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) informaron que *T. gondii* representa el 24% de las muertes debidas a enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos. El consumo de productos de carne de cerdo poco cocidos en los que *T. gondii* se ha enquistado se identificó como una importante vía de exposición humana. Sin embargo, se dispone de poca evaluación cuantitativa del riesgo para diferentes productos de carne de cerdo en función de la calidad microbiana en el matadero, durante el proceso de

producción, y debido a las prácticas de manejo del consumidor. El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo de evaluación cuantitativa de riesgo microbiano (QMRA) para predecir el riesgo de salud pública asociado con el consumo de cerdo fresco en los Estados Unidos. La prevalencia de *T. gondii* en cerdos se obtuvo a través de un metanálisis de los datos existentes y se calculó la concentración de la etapa de vida infecciosa (bradizoitos) para cada corte de cerdo de un cerdo infectado. Se desarrollaron modelos de regresión logística y regresión log-lineal para predecir la reducción de *T. gondii* durante el procesamiento posterior y la preparación del consumidor, respectivamente. Se utilizó un modelo de dosis-respuesta exponencial derivado del ratón para predecir el riesgo de infección en humanos. La probabilidad media estimada de infección para productos de carne de cerdo frescos varía entre 3,2% y 9,5%, lo que corresponde a un consumo previsto aproximadamente 94.600 nuevas infecciones anuales en la población de los EE.UU. debido a la ingesta de cerdo fresco. Aproximadamente 957 nuevas infecciones por año se estimaron en mujeres embarazadas, lo que corresponde a 277 casos de toxoplasmosis congénita por año debido a la ingesta de cerdo fresco. En el contexto de los datos disponibles, el análisis de sensibilidad sugirió que la cocción es el parámetro más importante que afecta el riesgo para la salud humana. Este estudio proporciona una base científica para el manejo del riesgo y también podría servir como modelo basal para cuantificar el riesgo de infección de *T. gondii* y otros parásitos asociados con productos cárnicos

Huifanga 2019. Una de las principales rutas de transmisión a los humanos es el consumo de carne cruda o poco cocida que contiene quistes de *T. gondii* viables. En China, la falta de información cuantitativa sobre el riesgo de incidencia de infección debido al consumo de carne dificulta la implementación de estrategias de prevención para reducir la carga de toxoplasmosis. Su propósito fue estimar la atribución relativa e diferentes tipos de carnes a las infecciones humanas por *T. gondii*. Los datos sobre la prevalencia en el

ganado y el consumo se obtuvieron de China. Sin embargo, faltó información sobre los hábitos de preparación. Los datos de consumo promedio estaban disponibles como cantidades de consumo promedio por día recolectados durante tres días. En general, la carne de cerdo y pollo contribuyeron más al número estimado de infecciones que para la carne de res. La temperatura de cocción se identifica como uno de los parámetros que más afectó la tasa de incidencia en el modelo QMRA. el análisis de escenarios demostró que es importante conocer el tamaño de la porción y la frecuencia de consumo además de las cantidades consumidas totales para calcular la incidencia de la infección. Debido a la incertidumbre presente en los datos de entrada y la tasa de incidencia sobreestimadas. Los resultados simplemente dan una indicación de la importancia relativa de los diferentes tipos de carne. Sin embargo, el modelo QMRA identificó brechas de conocimiento clave para futuras investigaciones y posteriormente respaldar decisiones rentables para reducir la carga de enfermedad de la toxoplasmosis humana.

11 Pregunta de investigación

¿Qué factores de riesgo para infección *por Toxoplasma gondii* se encuentran asociados a la preparación de alimentos?

¿Cuales son los factores de riesgos asociados a la infección con *Toxoplasma gondii* por consumo de alimentos en restaurantes escolares y proponer un modelo de cocción?

12 Objetivos

Objetivo General:

Evaluar los factores asociados al riesgo de la infección con *Toxoplasma gondii* por consumo de alimentos en restaurantes escolares. Y proponer un modelo

Objetivos específicos

Objetivos específico 1:

Correlacionar los factores higiénicos sanitarios (condiciones locativas, prácticas de proceso, prácticas de saneamiento y personal manipulador de alimento) con prevalencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en alimentos por PCR.

Objetivos específicos 2:

Establecer los factores de riesgo en preparación de alimentos asociados a la infección de niños en restaurantes escolares

Objetivo específico 3:

Diseñar un modelo teórico para evaluar la cocción seguro de la carne de cerdo que incluye: el tiempo, la temperatura de la cocción, el grosor de la pieza de carne

13 Materiales y métodos

13.1 Modelo general

Este proyecto se realizó utilizando la guía de la FAO / OMS para el Análisis de Riesgos a evaluación cuantitativa del riesgo (FAO / OMS 1995; Pérez et al, 2006; OMS / FAO 2009; FAO / OMS 2010; UERIA 2011). El Análisis de Riesgos se compone de 3 elementos: Evaluación del Riesgo, Gestión del Riesgo y Comunicación del riesgo (ver ilustración 7). La evaluación de riesgo es la evaluación científica de un conocido o potencial efecto adverso contra la salud resultado de la exposición humana a un peligro transmitido por los alimentos.

Elementos que componen el análisis de Riesgo



Ilustración 7 Representación esquemática de los componentes del análisis de riesgo según las definiciones del Codex Alimentarios Elementos que componen el análisis de riesgo

La propuesta de metodología se realizó en dos etapas las cuales son: evaluación del riesgo y evaluación de alternativas

Etapas 1 Evaluación del riesgo de infección por *Toxoplasma* en restaurantes escolares

La evaluación del riesgo contempla cuatro etapas identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo. (Ver 13.2)

Etapas 2 Modelo de cocción segura de la carne

Como uno de los factores de riesgo toxoplasmosis es el consumo de carne mal cocida por lo que se propuso determina el punto de cocción necesario para consumir una carne de cerdo segura. Este modelo también puede ser reproducible para otros tipos de carne (ver 13.3)

13.1.1 Determinación del tamaño de la muestra

El estudio se realizó en la ciudad de Armenia es la capital del "Departamento del Quindío". Esta zona se encuentra dentro de la cordillera central de Colombia a una altitud de 1.480 metros. Armenia tiene 301,226 habitantes, según las proyecciones y los resultados de los últimos datos censal generales en 2005 (DANE, 2018). La ciudad de la ciudad de Armenia se divide en 10 zonas administrativas, llamadas "comunas" y tiene 46 restaurantes de escuelas públicas, la población infantil matriculada es de 18,003 niños. Pero Los objetivos del estudio fueron los usuarios de los restaurantes de la escuela pública (12,277 niños de 4 a 12 años de edad que asisten al restaurante escolar).

Para realizar el cálculo de tamaño de la muestra se tuvo conseguir con anterioridad la siguiente información: tamaño de la población, según la

Secretaria de Educación de Armenia para el 2017 los niños entre las edades de 5 a 10 años de edad son 12,277. Según datos del estudio nacional de toxoplasmosis (Cañón-Franco et al., 2014) La prevalencia esperada de anticuerpos anti-*Toxoplasma* positivos en niños en para edades de 5 a 12 años en Colombia es de 30%. Con un margen de error aceptable del 5% y un nivel de confianza de 90%. Según esta información se requiere 302 niños son necesario para obtener inferencias sobre la prevalencia en esta población. Datos obtenidos del software Epi info v 7.2

Para el propósito del estudio, un restaurante fue seleccionado aleatoriamente por cada comuna hasta obtener diez restaurantes de escuelas públicas. A los cuales se les realizaron tres evaluaciones. a) Inspección higiénico-sanitaria, b) evaluación de la presencia de *Toxoplasma gondii* en: agua, alimentos y superficie c) examen serológico para niños (IgG e IgM).

Antes de la recolección de la muestra se realizaron reuniones colectivas con padres y tutores de niños y solicitamos el permiso voluntario para el muestreo de sangre venosa infantil, los padres que estuvieron de acuerdo autorizaron firmando un consentimiento informado (ver anexo 1).

13.1.2 Aspectos bioéticos

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío (Acta 35 del 14 de mayo 2012). Todos los padres de hijos aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado. También se obtuvo el consentimiento institucional de los restaurantes de las escuelas. Los resultados clínicamente relevantes fueron devueltos a los pacientes.

13.2 Etapa 1 evaluación del riesgo de infección por *Toxoplasma* en restaurantes escolares

La evaluación del riesgo contempla cuatro etapas identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.

La identificación de peligros incluye identificación de alimentos implicados, fuentes de contaminación, prevalencia de alimentos, factores intrínsecos y extrínsecos que pueden impedir o no la supervivencia. La caracterización del peligro es la estimación de la gravedad y efectos adversos para la salud causados por consumo de alimentos con la presencia de *Toxoplasma gondii*. Estas 2 dos etapas iniciales se realizaron a través de análisis de información concerniente a la toxoplasmosis.

Para la evaluación de la exposición se realizaron 4 actividades: a) Evaluación de la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en alimentos y superficies por PCR, b) Evaluación de la Prevalencia (IgG e IgM) c) inspección higiénico-sanitario de restaurante escolares y d) análisis estadístico descriptivo y bivariado.

13.2.1 Evaluación de la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en alimentos y superficies por PCR

Los días del muestreo fueron elegidos al azar y todas las muestras de alimentos y agua fueron tomadas por triplicado. Las muestras de alimentos correspondían a las que se prepararon en el restaurante en el día de la recogida.

13.2.1.1 Toma de muestra de alimentos y superficies

Se tomaron doce muestras de carne cruda de ternera y nueve de carne cruda de pollo (50 gramos cada una), nueve de huevo crudo y sin lavar, tres de lechuga, tres de col, nueve de pepino, nueve de zanahoria y seis de tomate (200 gramos de verdura cruda principal de la ensalada antes de mezclar).

Treinta muestras de agua utilizadas para preparar el jugo (200 mL cada uno), diez muestras de agua del grifo (4 L cada una), seis de jugo de plátano, doce de jugo de guayaba, seis de jugo de mango y seis de jugo de tomate de árbol (200 mL cada uno), 52 muestras de superficies inertes tomadas con un hisopo y solución salina 0,9% m/v. El número de muestras por colegio varió dependiendo del número de utilidades o suministros utilizados en la preparación de alimentos al momento de la toma de muestra. Treinta y una de las superficies vivas fueron recolectadas usando un hisopo en solución salina 0,9% (palma de manos de manipuladores de alimentos). En total, se recogieron 213 muestras de alimentos y superficies vivas e inertes, de los restaurantes de la escuela pública.

13.2.1.2 Método de extracción de ADN

El kit de extracción de sangre y tejido de DNeasy (QIAGEN, Alemania) con lisis mecánica con perlas de circonio fue aplicado para la extracción de ADN en vegetales y jugos después de la agitación en un pedal de 400W (Interscience-France) a la velocidad de 260 rpm, cinco veces por 30 s con glicina 1M pH 5,5 (Cook et al., 2007) y solución de lavado (PBS 1X, 100 μ L de Tween 80 y 10 g de ácido sulgámico) a pH 7,5, respectivamente, y aplicando el método de concentración de formalina-éter para eluatos de agua (también para muestras de superficies inertes y vivas) como se describe previamente (Lora-Suarez et al, 2016; Triviño-Valencia et al, 2016).

Las muestras de carne fueron procesadas para su análisis como se ha descrito anteriormente (Álvarez et al., 2015; Franco-Hernández et al., 2015). Brevemente, la carne se cortó hasta obtener piezas de 5 g aproximadamente, luego fueron molidas en un mortero con 2 ml de solución de lisis del kit de extracción de ADN de Wizard Genomics (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y 50 μ l de proteinasa K durante 10 min y luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente fue incubada a 37 ° c

durante 30 min. Después de esto, se agregaron 250 μ L de tampón de solución salina pH 7,4 y la muestra se centrifugó a 1,000 g durante 10 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se desechó después de esto. Las proteínas celulares fueron removidas usando los reactivos y procedimientos del kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y el ADN genómico se concentró añadiendo 80 μ l de solución de rehidratación y almacenado primero a 4 ° C durante la noche y luego se congela a -80 ° C hasta su uso. Los ooquistes de la cepa *Toxoplasma* ME49 (tipo II), CAT 19, TX 586 recolectados en junio, 2014 y amablemente donados por el Dr. Dubey (USDA, Beltsville) fueron utilizados como controles del procedimiento de extracción de ADN.

13.2.1.3 PCR para *Toxoplasma*

Para amplificar el ADN de *Toxoplasma*, se usó PCR anidada convencional como se describió anteriormente por Franco-Hernández et al. (2015); Triviño-Valencia et al. (2016); Zamora-Vélez et al. (2016). Brevemente, esta prueba amplificó un fragmento de 97-BP del gen B1 de *Toxoplasma*, que es de forma tandemly matriz 35-Fold-repetitivo (Genebank Accesion números AF179871). Los imprimadores para la primera PCR fueron *Toxo* N1 (694 a 714 NT): 5 '-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3' y *Toxo* C1 (887 a 868 NT): 5'-TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC-3'. El segundo PCR se realizó con los imprimadores *Toxo* N2 (757 a 776 NT): 5 '-TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG-3' y *Toxo* C2 (853 a 831 NT): 5 '-GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC-3'.

Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen Corporation (EEUU). El primer Protocolo de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización durante 5 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de amplificación, un ciclo consistente en 1 min a 94 °C para la desnaturalización del ADN, 1 min de recocido a 53 °C y 1 min de extensión a 72 °C. Posteriormente, se realizó

un paso adicional de 10 min de extensión final a 72 ° C. La segunda PCR se realizó con el producto de la primera amplificación y consistió en una etapa inicial de desnaturalización durante 5 min a 94 °C, seguida de 14 ciclos de amplificación, un ciclo consistente en 1 min a 94 °C para la desnaturalización del ADN, 1 min de recocido a 53 °C y extensión a 72 °C por 30 s. A continuación, se realizó un paso adicional de 10 min de extensión final a 72 °C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis de gel de agarosa al 2%. Los resultados del PCR se expresaron como positivos o negativos. El control positivo fue el ADN de las cepas de control de *Toxoplasma* y el control negativo fue agua destilada en presencia de cebadores. El control de la contaminación durante la extracción del ADN también se incluyó y consistió en un tubo sin plantilla, pero conteniendo todos los reactivos para la extracción del ADN. Con el fin de evitar la posible contaminación, se utilizaron varias medidas, como el espacio separado para la instalación de PCRs (sala de pre-PCR) y las puntas de filtro separadas y pipetas, así como varios controles negativos (sin ADN, controles de contaminación por extracción de ADN). Controles positivos de diferentes cepas de *T. gondii* también se utilizaron con el fin de localizar cualquier posible contaminación. Todas las amplificaciones de PCR se realizaron en la máquina Termocicladora aplicada Biosystems veriti (termo Fisher Scientific, USA).

13.2.2 Evaluación de la Prevalencia (IgG e IgM anti-*Toxoplasma*)

Se evaluaron 311 niños entre 4 a 12 años de edad a los cuales se les tomó muestra de muestras de sangre venosa periférica de 5 mililitros cada una. Un técnico de laboratorio tomó las muestras de sangre de los niños en presencia de sus padres. Todas las muestras de suero se analizaron para los títulos de anticuerpos anti-*Toxoplasma* IgG e IgM mediante el uso de ensayos comerciales ELFA y siguiendo la recomendación del fabricante (bioMerieux,

Marcy L'Etoile, Francia) en un sistema de ensayo de diagnóstico inmune mini vidas (bioMerieux, Inc, Carolina del norte, EE.UU.)

13.2.3 Inspección higiénico-sanitario de restaurante escolares

Para evaluar las condiciones higiénico-sanitaria de los restaurantes de la escuela pública se aplicó el instrumento de la lista de verificación para la inspección de los restaurantes del Instituto nacional colombiano para la resolución de control de alimentos y medicamentos 2674 de 2013 (INVIMA, Bogotá, Colombia, <https://www.invima.gov.co/resoluciones-en-alimentos/resolucion-2674-2013-pdf/detail.html>) que incluyó cinco temas con 26 artículos:

- I) instalaciones físicas: incluyendo materiales de los mesones, paredes, techos pisos de las cocinas
- II) condiciones de proceso: materiales de utensilios (recipiente, equipos, tablas de picar carne o vegetales), si utiliza la misma tabla para picar carnes o vegetales, temperatura de conservación de alimentos, procedencia de los alimentos, tipo de frutas utilizada;
- III) condiciones de saneamiento que contempla dos aspectos abastecimiento de agua: al cual se incluyó: suministro de agua, condiciones de almacenamiento y transporte, tanque de reserva de agua, número de veces al año que realiza la limpieza, agua con que lava los vegetales y agua para preparar jugo; El otro aspecto fue limpieza y desinfección que incluyó: frecuencia del lavado de manos, si lava las manos después de manipular alimentos, sustancias utilizadas en la limpieza y desinfección para superficies e implementos, frecuencia con que cambia la esponja, frecuencia de lavado de la nevera, momento al realizar la limpieza de la cocina
- IV) personal manipulador de alimentos, incluyendo el uso de elementos de bioseguridad, frecuencia que recibe la capacitación, experiencia laboral y nivel de formación.

Este instrumento presenta una escala para calificar según las prácticas de buenas prácticas de manufactura (2 = completo, 1 = parcial, o 0 = sin cumplimiento). Con base en estas puntuaciones, se estableció finalmente el porcentaje de cumplimiento de las condiciones dentro de cada una de las cinco condiciones. Un porcentaje del 100% indicó que el restaurante cumplía con todos los elementos dentro de cada tema, los porcentajes más bajos indicaron el cumplimiento parcial de las condiciones dentro de cada tema. El instrumento para la inspección higiénico-sanitaria se muestra en el anexo 2.

13.2.4 Hábitos y prácticas en el hogar.

En el momento de las reuniones preparatorias con los padres de familia se realizaron dos actividades previas con autorización de los padres. La primera para determinar estado antropométrico de los niños (se evaluaron 167 niños), con ayuda de los técnicos del Centro de Investigaciones Biomédicas se realizaron las mediciones de: masa, talla y edad y se determinó el índice de masa corporal IMC o estado antropométrico. La segunda fue una evaluación de hábitos y prácticas en el hogar (se encuestaron 167 familias), donde se les preguntó aspecto como: escolaridad de la madre, si la madre se hizo prueba de toxoplasmosis, consume agua hervida, si prepara jugo con agua hervida, si lava vegetales o frutas con agua hervida, si utiliza la misma tabla de picar para vegetales y carnes, consume carne de cerdo, res o pollo, si la consume bien cocida, si tiene contacto con gatos, si el gato es menor de 6 meses, si tiene perro u otra mascotas en el hogar, número de veces que come fuera, la fruta o vegetales que consume donde los compra y como es su presentación, estado de salud del niño (si el niños en los últimos 6 meses ha tenido: fiebre, dolor de garganta, erupciones, presencia de ganglios, o diarrea).

13.2.5 Análisis estadístico descriptivo y univariado

Los resultados se expresaron como la mediana [min-max] para variables continuas y N (%) para variables categóricas. Las diferencias en las proporciones se analizaron utilizando la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher según sea el caso. Las estadísticas de Mantel-Haenszel se utilizaron para probar la independencia entre una variable de factor y una variable de respuesta condicionada a patrones de covariables definidas por una o más variables de capa (control). Las diferencias en los medios se compararon con la prueba t de Student o con una prueba no paramétrica si no presentan una distribución normal

Se estableció el valor predictivo positivo y negativo de las puntuaciones de los cumplimientos de las condiciones de higiénico-sanitarias para los restaurantes (obtenidos por el instrumento de inspección de seguridad alimentaria) que ayudaran a identificar restaurantes con resultados positivos de PCR de *Toxoplasma* en alimentos y superficies, se calculó una curva de operación del receptor (ROC). El software SPSS (versión 14,0, Lead Technologies Inc, USA) se usó para analizar las pruebas estadísticas. Los valores por debajo de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Para determinar la fuerza de un factor de riesgo (hábitos o prácticas en el hogar, condiciones higiénico-sanitarias de los colegios, presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en alimentos, agua o superficie) y que estos estén asociados a la causa que se presume como la infección *Toxoplasma gondii*. Se realizaron medidas de asociación a la probabilidad que un niño se infecte expresada como *Odds Ratio*, el cual se interpreta de la siguiente manera: cuando el valor es superior a 1 se presume como asociación positiva o factor de riesgo, cuando el valor es inferior a 1 como asociación negativa o factor de protección y cuando sea igual a 1 no hay asociación (Cerdeira et al, 2013). Las diferencias en las proporciones se analizaron utilizando la prueba de Chi-

cuadrado o la prueba exacta de Fisher se consideran estadísticamente significativos cuando el $P < 0,05$ que (Díaz et al, 2011).

Para determinar la asociación entre los aspectos higiénico-sanitarios de los restaurantes escolares se determinó primero el porcentaje mínimo que debe cumplir utilizando la metodología de la evaluación de las pruebas diagnósticas, para esto se construyeron las curvas características: curvas ROC, Sensibilidad (o sea la proporción de verdaderos positivos como la probabilidad que el punto de corte del puntaje indica que el restaurante va a tener pruebas positivas para ADN del *Toxoplasma*), Especificidad (o sea la proporción de verdaderos negativos como la probabilidad que el puntaje por debajo del punto de corte dé negativo cuando el restaurante no presente ADN de *Toxoplasma*). También se usaron como índices de evaluación sus complementarios, para indicar correctamente restaurantes con positividad para ADN de *Toxoplasma* el Valor Predictivo Positivo o sea la proporción de restaurantes con resultados “positivos” que verdaderamente presentan ADN de *Toxoplasma* positivo y el Valor Predictivo Negativo, que es la proporción de restaurante con resultados “negativos” que verdaderamente tiene pruebas de ADN tiene pruebas de ADN negativo para *Toxoplasma*. (Valle et al, 2017)

13.3 Etapa 2 evaluación de las alternativas de cocción que aseguran la inocuidad de la carne

La recomendación para la cocción de carne es que la temperatura de la carne llegue a 65°C (USDA 2003, 2008, 2011, Gómez et al, 2012). Para poder determinar la letalidad sobre *Toxoplasma gondii* y requieren realizar seis etapas, las dos primeras enfocadas en la determinación perfil de temperatura a) determinación de propiedades termodinámicas de lomos de cerdo, b) determinación de las curvas de penetración de calor o del perfil de temperaturas del lomo (como va cambiando la temperatura en el interior de la pieza según el tipo de cocción), las cuatro siguientes enfocadas en la

destrucción del *T. gondii* por efecto del tratamiento térmico en cocción de lomos, estas son: c) evaluación de la cocción (teórica y experimental), d) determinación del tiempo de muerte térmica (D) a diferentes temperaturas y e) análisis de letalidad del *T. gondii*. La última etapa tiene como propósito validar el modelo para lo cual se realizó e) simulación de Montecarlo

13.3.1 Determinación de propiedades termodinámicas.

Para realizar las curvas de perfil de temperatura se debe determinar primero los valores de las propiedades termodinámicas del producto, las cuales son: capacidad calorífica C_p , conductividad térmica K , densidad ρ y difusividad térmica α . Para lo cual se desarrolló un aplicativo e Excel que calcula las propiedades calcularon como una termodinámica de mezclas, según las ecuaciones de propiedades físicas de alimentos de (Choi et al, 1986). Donde las fracciones de los componentes son (ϕ) , los macro-nutrientes de los alimentos utilizados para estos cálculos son: agua, carbohidratos, proteínas, grasa y cenizas. Las constantes se determinan entonces por las ecuaciones (Orego et al, 2003; Rao et al, 2005):

$$\text{Capacidad calorífica} \quad C_p = \sum_{n=1}^{\infty} (C_{p_i} * \phi_i) \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{Conductividad térmica} \quad K = \sum_{n=1}^{\infty} (K_i * \phi_i) \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Densidad} \quad \rho = \sum_{n=1}^{\infty} (\rho_i * \phi_i) \quad \text{Eq. 3}$$

$$\text{La difusividad } (\alpha) \text{ por las constantes calculad} \quad \alpha = \frac{k}{\rho C_p} \quad \text{Eq. 4}$$

Para determinar los componentes agua, carbohidratos, proteínas, grasa y cenizas se utilizó el software Nutrix ® el cual trabaja con las tablas de composición de alimentos colombianos, y se le incluyo los valores desviación estándar reportados de cada macro-nutriente en cada alimento (especie y

corte), para el análisis de incertidumbre de la medición se utilizó el concepto de incertidumbre combinada.

$$U = \sqrt{\sum_{i=0}^{i=n} U_i^2 * \phi_i} \quad \text{Eq. 5}$$

Con lo anterior comentado los calores reportados se expresan $C_p \pm U$, $K \pm U$, $\rho \pm U$ y $\alpha \pm U$

13.3.2 Curvas de penetración de calor

Para este se construyó un aplicativo que construye las curvas de penetración de calor (perfil de temperatura) y posteriormente se hizo su evaluación

Diseño del aplicativo

Para esta actividad se utilizaron los conceptos de transferencia de calor en régimen no estacionario donde se determina la temperatura en el medio de los trozos de carnes (o punto frío) que pueden estar sometidas a cocción. La evolución de la temperatura con el tiempo, T (posición, t), es la solución de la ecuación diferencial

$$\frac{\delta T}{\delta \theta} = \frac{k}{\rho c p} \left(\frac{\delta^2 T}{\delta x^2} \right) = \alpha \left(\frac{\delta^2 T}{\delta x^2} \right) \quad \text{Eq.6}$$

Debido a la complejidad de estas soluciones se utilizan métodos gráficos para su solución donde X es la dimensión que ubica el punto que se desea analizar (punto frío para este caso) que va desde la superficie al centro del corte de carne y θ es el tiempo de la cocción α es la difusividad del producto sumergido en el fluido en un tiempo t .

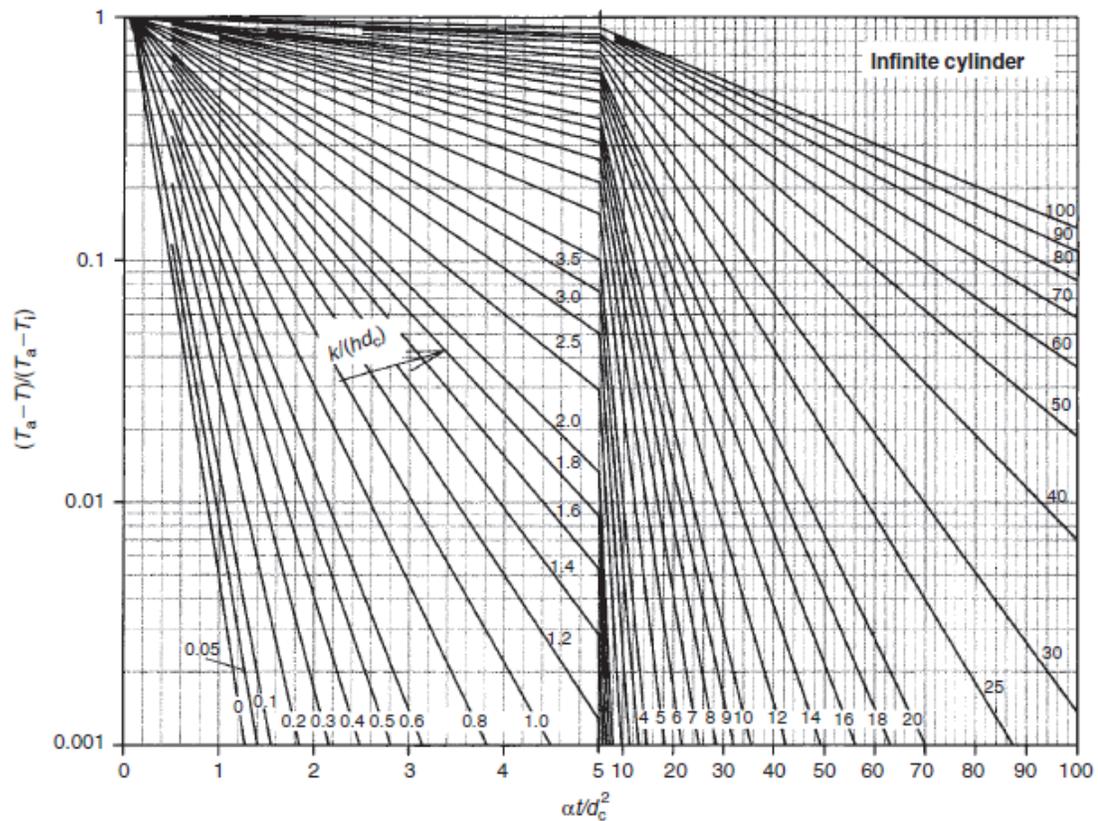


Ilustración 8 Temperatura en el centro geométrico de un cilindro de largo infinito porque la evaluación se realiza lomo de forma cilíndrica (Singh et al, 2009)

En las figuras mencionadas el eje Y u ordenada es:

$$\theta = \frac{T - T_a}{T_0 - T_a} = \frac{T_a - T}{T_a - T_0} \quad \text{Eq. 7}$$

El eje de las X o abscisa es:

$$F_0 = \frac{k}{\rho c p} \left(\frac{\theta}{L^2} \right) = \alpha \left(\frac{\theta}{L^2} \right) \quad \text{Eq. 8}$$

Y la pendiente de la grafía es el número de BIOT

$$Bi = \frac{hL}{K} \quad \text{Eq. 9}$$

Con la información anterior se diseñó un aplicativo en Excel el cual va calculando la temperatura al interior de la pieza de carne en la medida que se va calentando, la curva del perfil de temperatura depende de variables de la

carne como: el espesor, tipo de espécimen (cerdo pollo, o res), tipo de corte, temperatura inicial) y las condiciones de la cocción como: del tipo de preparación, temperatura del medio calefactor. El modelo presenta la curva de perfil de temperatura en el interior de del lomo de cerdo u otro tipo corte de carne seleccionada. Como un gráfico de calentamiento para placas infinitas. (Ibarz et al, 2005; Singh et al, 2009)

13.3.3 Evaluación del modelo de cocción

La evaluación se hizo de 2 forma diferentes una teórica y una experimental

13.3.3.1 Evaluación teórica.

Se realizó una comparación entre las curvas propuestas por Swart et al, 2015 y Franssen et al, 2017 con las curvas propuestas por el modelo propuesto, teniendo en cuenta las mismas características: espesor, especie (cerdo), tipo de corte (lomo), temperatura inicial y temperatura del medio calefactor.

13.3.3.2 Evaluación experimental.

Para hacer esta evaluación se realizan los calentamientos de lomos de carne de cerdo, donde el largo del lomo es 10 veces mayor que el radio con el fin asumir que el lomo es como un cilindro infinito y permita hacer el cálculo del calentamiento uni-direccional. Se realizaron calentamientos en hornos de convección de lomos de cerdos a tres temperaturas diferentes (100, 130 y 150°C), para realizar los perfiles de temperaturas se tomaron 4 piezas de lomo de cerdo a cada una de ellas se les coloco un sensor de temperatura en el punto frio (punto medio de la pieza) y para registra la temperatura del medio calefactor se dejó un sensor en el punto medio del horno.

El sistema propuesto consiste en la implementación de cinco sensores que registran la temperatura de las piezas de carne y la temperatura del horno que en conjunto con una tarjeta Arduino y un algoritmo desarrollado, tiene una

adquisición de datos en un PC por medio de una comunicación serial. Los sensores de temperatura son termopilas tipo K adaptadas a un módulo MAX6675 y posteriormente conectadas al módulo de acondicionamiento y el sistema de adquisición de datos la conexión arduinos a computador, presenta la información de temperatura de cada uno de los puntos de evaluación en tiempo real (se hace registro de las temperaturas cada 2 segundos). Después con la información se construye las curvas de temperatura y se comprara con la gráfica generadas por el modelo matemático propuesto.

13.3.4 Determinación del tiempo de muerte térmica de *Toxoplasma gondii*

La determinación de los valores D correspondientes a cada temperatura (tiempo de destrucción térmica o tiempo necesario para destruir el 90% de los parásitos presentes) se realizó haciendo el análisis como una cinética de orden 1 a partir de los datos del trabajo realizado por (Dubbey et al, 1990; Fathi et al, 2008), donde se determinó la reducción de la probabilidad de infección a diferentes temperaturas, Con los valores de a diferentes temperaturas se determinó el valor z (z indica el incremento en la temperatura, medida en número de grados necesario para que el valor D se reduzca a la décima parte del inicial). Con este valor se puede determinar la destrucción térmica a cualquier otra temperatura e inferir como se reduce o la probabilidad de infección cuando se realiza un tratamiento térmico (cocción de carne).

13.3.5 Análisis de letalidad del *T. gondii*, evaluación de la cocción

La cocción es la forma más común implementada en los hogares de reducir la presencia de peligros biológicos como es el caso de la exposición a *T. gondii* en el cerdo fresco infectado. Sin embargo, otro tipo de tratamiento como bajas temperaturas, uso marinado pueden no ser suficientes para inactivar los bradizoítos de *T. gondii*. Por lo que se supone que la cocción es el único factor asociado con la reducción / inactivación de *T. gondii* en las cocinas caseras.

Para calcular la letalidad se multiplica los valores D a las temperaturas reportada en la curva de perfil de temperatura (los valores D se calcularon con D1 y z) por el tiempo que la pieza de carne está a esa temperatura (para cada ensayo se hicieron 20 divisiones) y se hizo la sumatoria del tiempo proyectado a la temperatura de referencia (solo se utilizaron los datos para el cálculo cuando la temperatura interna de la carne fuera superior de 50°C), para él % de cumplimiento se hizo la relación del tiempo proyectado al que se sometió el microorganismo indicador a un tratamiento similar al de la temperatura de referencia (T1) sobre el tiempo que debería estar el microorganismo para garantizar que el alimento se considere seguro F₀ (el valor F representa la letalidad microbiana integrada o como valor conocido de cocción (Rao et al, 2005), tiempo equivalente a la temperatura de referencia. Utilizando las curvas de penetración de calor en función del tiempo se evaluó la reducción la probabilidad de infección asumiendo como el efecto de la letalidad en el parasito por la cocción.

$$F(\text{tratamiento}) = \sum_{n=1}^{\infty} L\theta_i = \int_0^i L(T)d\theta = \int_0^i D10^{\frac{T-t}{z}} \theta$$

13.3.6 Simulación de Montecarlo

Para realizar la validación, se realizó una simulación de Montecarlo, utilizando el programa Crystal Ball (Oracle® Crystal Ball versión 11.1.2.4, año 2017) donde se interrelacionan, las curvas de penetración de calor según las condiciones de preparación (tiempo, espesor, tipo de preparación, propiedades termodinámicas), temperatura al interior de la carne, y la % de cumplimientos de recomendación del tratamiento térmico (% de ciclos logarítmicos reducidos con respecto al valor recomendado). Y se realizó un análisis de las propiedades termodinámicas y las variables de preparación.

Para realizar las simulaciones de Montecarlo se hicieron 18 simulaciones con 3 repeticiones con 10.000 iteraciones cada uno, las simulaciones tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: carne de cerdo (lomo de cerdo), Dos temperaturas diferentes de los medios (100 ° C y 170 ° C), temperatura inicial de la carne 5°C, tres espesores diferentes (2, 4 y 6 cm). Para la variabilidad de los datos se utilizaron desviaciones estándar reportadas para el software Termin para propiedades termodinámicas, para las temperaturas (del medio y de la carne) el espesor se permitió una variabilidad de 2% de los datos.

Resultados

Capítulo I. Evaluación del riesgo

14.1 Capítulo I. Evaluación del riesgo de infección por *Toxoplasma* en restaurantes escolares

14.1.1 Evaluación de la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en restaurantes por PCR

Se encontraron 13 muestras de 213 (6,1%) de las muestras positivas por PCR para el ADN de *T. gondii*. La prevalencia por tipo de alimento fue mayor en muestras de agua y menor en vegetales y frutas (ver Tabla 3). Es de notar que cuando las muestras positivas para jugo de fruta (jugo de guayaba) fueron en los mismos restaurantes donde se encontró la muestra de agua para la preparación de jugo positiva. Cuando analizamos si hubo una mayor presencia estadísticamente significativa de acuerdo con la naturaleza de la muestra, el agua tuvo una frecuencia significativamente mayor de resultados positivos de PCR (17% en agua frente a 3,5% para el resto de las muestras, prueba exacta de Fisher $p = 0.004$).

En el 60% (6/10) de los restaurantes de las escuelas públicas había al menos una muestra positiva de PCR para *Toxoplasma*. La frecuencia más alta fue en el restaurante III, con 5/22 (22,7%) muestras positivas, seguido por el restaurante X con 3/21 (14,3%) y el restaurante IV con 2/21 (9,5%). También se detectaron muestras positivas de ADN en los restaurantes II, IV, VIII y IX (Tabla 4). Al realizar la prueba estadística de Mantel Haenzel para determinar que variable es más responsable de las diferencias entre los restaurantes se encontró que el agua tiene mayor significancia estadística ($p = 0,003$)

Tabla 3 Prevalencia de muestras positivas de ADN por PCR anidada convencional, que amplificó la secuencia repetida B1 de *T. gondii* de alimentos, agua, jugo y superficies inertes y vivas recolectadas en restaurantes escolares de Armenia durante el año 2018

Tipo de muestra	Numero de muestras	Código del restaure donde se encontró muestra positiva	Numero de muestra positivas (%de total)
Carne de pollo cruda	9	-	0 (0,0%)
Carne de res cruda	12	II	1 (8,3%)
Huevo	9	-	0 (0,0%)
Agua del grifo	10	III, IV	2 (20,0%)
Agua para el jugo	30	III, X	2 (6,7%)
Lechuga	3	-	0 (0,0%)
Repollo	3	-	0 (0,0%)
Pepino cohombro	9	X	1 (11,1%)
Zanahoria	9	-	0 (0,0%)
Tomate	6		0 (0,0%)
Jugo de banano	6	-	0 (0,0%)
jugo guayaba	12	III, X	2 (6,7%)
Jugo de mango	6	-	0 (0,0%)
Jugo de tomate de árbol	6	-	0 (0,0%)
Superficies inertes	53	III, VIII	2 (3,8%)
Superficies vivas (manos)	30	III, IX, X	3 (10,0%)
Total	213		13 (6,1%)

14.1.2 Evaluación de la prevalencia (IgG e IgM)

En total, se recogieron 311 muestras de suero de niños. Se encontraron 101 (32,5%) niños con IgG anti-*T. gondii* positivo y 12 (3,9%) con IgM anti-*T. gondii* positivo positivas de gondii (Tabla 4). En una escuela (número VII), no fue posible recolectar muestras de suero de niños porque el director de la escuela se negó a permitir el muestreo. La prevalencia más baja de IgG fue en la escuela IX, con 8,4%, que fue estadísticamente significativa en comparación con las otras escuelas ($p = 0.001$).

Se encontró que los niños con edades inferiores a los 5 años no presentan prueba positiva para IgG para *anti T gondii*, después de los 5 años presentan IgG positivos, las edades de los niños con mayor número de niños positivos están entre los 6, 7 y 8 años (48,49 y 53 respectivamente), entre los porcentaje de cada edad el que mayor proporción presenta son los niños de 11 años (3 de 4 , 75%) y después los niños de 5 años (7 de 17 41,2%), cuando se calcula el porcentaje acumulado de los 5 años el porcentaje acumulado es muy similar (30,1%) y, para las edades inferiores se mantiene en 0%. Cuando se verifica el índice antropométrico con respecto a la prueba para IgG, se observa que los niños con índice antropométrico de peso adecuado o menor presentan mayor porcentaje de prueba positiva para anti *T. gondii*; para las edades de 5 años 33,3%, para la edad de 6 años el 25,0% y para los 7 años 40,0%. Para los niños superior a peso adecuado presentan porcentajes menores de positividad para *T. gondii* en comparación con los de su misma edad e índice antropométrico inferior lo que podría sugerir que las condiciones antropométricas pueden ser un factor protector (para la edad de 5 años 8,3%, para la edad de 6 años 6,3% y para los 7 años 6,7%. Ver anexos 3 y 4)

La frecuencia de positividad de *T. gondii* por PCR por restaurante se correlacionó inversamente con la frecuencia de IgG anti-*T. gondii* en los niños que comieron en el restaurante ($r^2 = -0.059$; Prueba de Pearson: $p = 0.0124$).

La positividad de IgM anti-*T. gondii* no se correlacionó con la positividad de la PCR ($r_2 = 0.4448$; Prueba de Pearson: $p=0,4123$).

Tabla 4 Prevalencia de anticuerpos IgG e IgM contra *T. gondii* según lo determinado por el ensayo ELISA en niños que asistieron a los restaurantes escolares de Armenia durante el año 2018

restaurante	I	II	III	IV	V	VI	VIII	IX	X	Total
Proporción de niños con IgG anticuerpos para <i>Toxoplasma</i> n/N (%)	7/10 (70%)	4/8 (50%)	2/4 (50%)	14/38 (36.8%)	1/2 (50%)	20/55 (36.4%)	14/56 (25%)	4/48 (8.3%)	35/90 (38.9%)	101/311 (32.5%)
Proporción de niños con IgM anticuerpos para <i>Toxoplasma</i> n/N (%)	2/10 (20%)	0/8 (0%)	1/4 (25%)	3/38 (7.9%)	0/2 (0%)	2/54 (3.7%)	0/56 (0%)	1/48(2.1%)	3/90 (3.3%)	12/311 (3.9%)

14.1.3 Inspección higiénico-sanitaria de restaurantes escolares

En promedio la calificación de los restaurantes escolares fue 56,8% (máximo 64,2% y mínimo de 50,3%). Los colegios que tuvieron la calificación menor fueron el III y II (50,3 y 52,1% respectivamente). Ver ilustración 7

El criterio más crítico de incumplimiento fue el relacionado con las instalaciones físicas con un promedio de 23,1% (máximo 50,0% y mínimo de 0,0%). Esto fue debido a que los mesones de la cocina son en cemento, las paredes y techos no están cubierto en material lavable (visible ladrillo y cemento) y el material del piso es en cemento. La otra característica crítica fue el abastecimiento de agua (perteneciente al ítem de condiciones de saneamiento) para la cual la calificación promedio de los colegios fue de 47,5% (máximo 100,0% y mínimo de 16,7%). Las menores calificaciones estuvieron relacionadas a que el restaurante no cuenta con tanque de reserva de agua, a que el tanque de reserva del colegio se lava máximo una vez al año, también

porque las frutas o los vegetales se lavan con el agua del grifo y que para preparar el jugo se utiliza agua filtrada (proveniente del grifo). Ver anexo 4

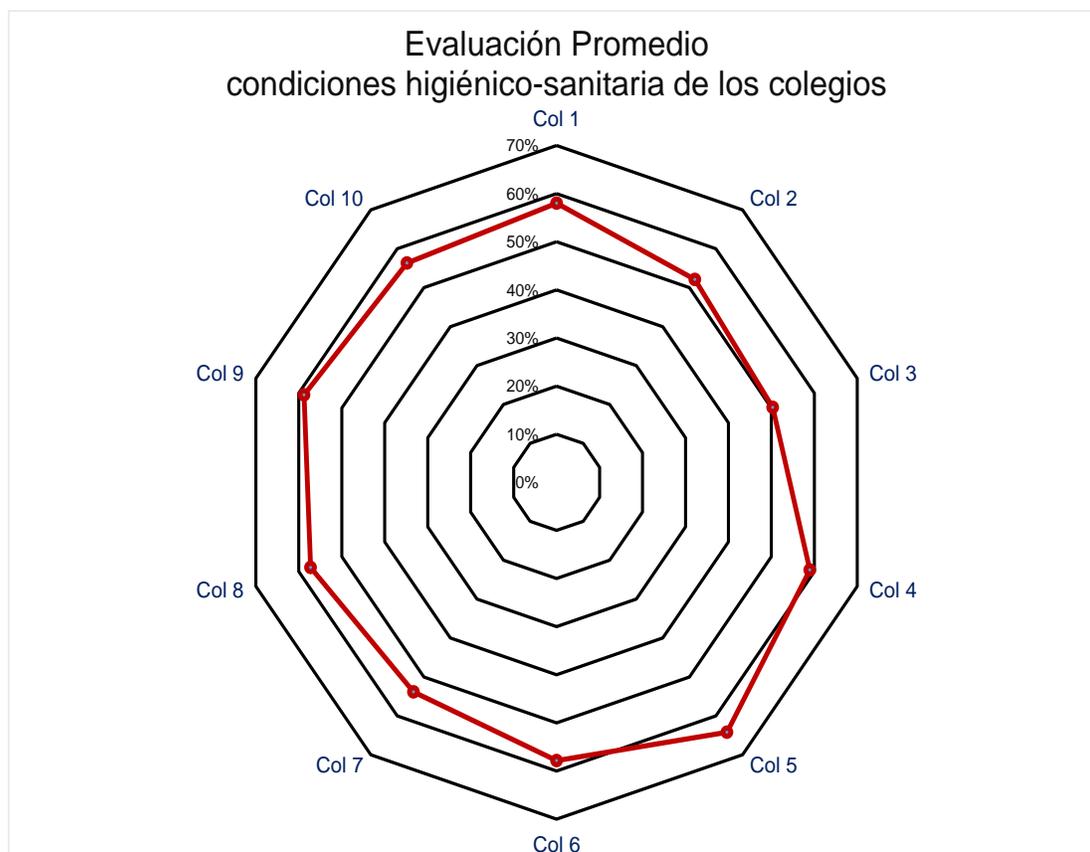


Ilustración 9 Calificación Promedio de cada colegio en la inspección higiénico-sanitaria

14.1.4 Hábitos y prácticas en el hogar

En 163 niños se pudo evaluar de masa, peso y su estado antropométrico para su edad. Esto niños presentaron un Índice de Masa Corporal (IMC) de 16,4 con un promedio de masa de 22,96 Kg y de talla 1,18 metros. Según el estado antropométrico el 55% de los niños están en peso adecuado, el 16,88% están en sobrepeso, 11,88% en riesgo de delgadez, 12,50% en obesidad y 3,75% en delgadez (ver anexo 3). En 311 niños con examen para anticuerpos para

Toxoplasma gondii la edad promedio es 7,4 años, y el 69,9% consumen el refrigerio que les da el colegio.

De las familias encuestadas de estos 163 niños, el 57,1% de las madres dijeron que se le realizó examen serológico para *T. gondii* durante el embarazo, el 54,6% consumen agua hervida en la casa, el 89% lavan las frutas sin agua hervida, el 42,3% preparan jugo con agua sin hervir. Cuando se les preguntó por el contacto por animales el 44,2% han tenido contacto con gato el 33,1% tienen perro en la casa y el 16% tienen animales diferentes a gatos o perro. La compra de alimentos principalmente se realiza en supermercados: el 76,7% en supermercado y el 37,4 % en plaza de mercado, el 39,9% utiliza fruta empacada y el 3,7% utiliza vegetales congelados. El 99,4% de estos niños consumen carne de los cuales: el 81,6% de res, 67,5% de cerdo, 76,1% aves, 56,4% pescado. El 94,5% dicen que prefieren consumir la carne bien cocida. En las prácticas utilizadas en la casa para la preparación de alimento: el 80,4% utilizan la misma tabla para picar carnes y vegetales, el 8,6% utilizan agua hervida para el lavado de frutas o alimento, el 71,8% utiliza la fruta completa para preparar jugos.

De los niños encuestados durante las 2 semanas anteriores al examen presentaron los siguientes síntomas: el 19% presentaron fiebre, 14,1% dolor de garganta, 1,8% erupción, 3,1% presento ganglios y el 23,9% durante los últimos 6 meses presentaron diarrea.

14.1.5 Análisis bivariado

Para determinar la clasificación mínima que debe cumplir un restaurante escolar frente a un criterio establecido se utilizó el concepto de evaluación de pruebas diagnóstica. Por tal razón la primera evaluación fue la determinación de la sensibilidad (que indica la capacidad de detectar restaurantes con riesgo para presentar pruebas positivas de PCR para *Toxoplasma* positivas) y la

especificidad (la probabilidad que identifique un restaurante sin riesgo) (Díaz et al, 2011; Ochoa et al, 2006). Con base en estas dos últimas definiciones se estableció el punto de corte y se estableció como punto de corte para definir que hay riesgo el porcentaje en el que se cruzaron las dos curvas (para los Valores Predictivos Negativos VPN pasa de 0% a 100% y los Valores Predictivos Positivos PVP pasan de 100% a 32%)

Estas características se pueden estimar a partir de tablas de contingencia de 2x2 (criterios restaurantes con presencia de pruebas de PCR positivas). A partir de estos resultados se construyeron las gráficas respectivas para cada uno de los aspectos evaluados en la inspección higiénico-sanitaria. Para cada uno se establecieron como mínimo 10 valores dependiendo de cada calificación

Tabla 5 Resultados de la prueba y existencia de la infección

		Criterios de verdad		Total
		IgG +	IgG -	
Prueba diagnostica	Calificación ≤ criterio	A	B	N (+)
	Calificación > al criterio	C	D	N (-)
Total		a+c	b+d	N= N(+) + N(-)

De acuerdo con los resultados se encontró que los aspectos de limpieza y desinfección e instalaciones físicas, pueden ser los criterios de mayor relevancia para evaluar las condiciones higiénico-sanitarias. Similar a lo reportado por Forero 2017 que los factores de riesgo asociados a la contaminación son condiciones de saneamiento e infraestructura física.

Cuando se utiliza como criterio la presencia de anticuerpos anti *T. gondii* (IgG) y como criterio de la prueba la calificación de los aspectos higiénico-sanitarios se encontró que se puede utilizar como punto de corte las siguientes calificaciones: instalaciones físicas 25%, condiciones de proceso 60%, personal manipulador 67%, condiciones de saneamiento 59%, abastamiento de agua 25%, limpieza y desinfección 75%. Situación que muestra que cuando un restaurante escolar tiene una calificación inferior tiene una alta probabilidad que los niños que asisten al restaurante escolar se infecten.

Igualmente, cuando se utilizó como criterio PCR positivos para ADN de *Toxoplasma gondii* y como criterio de la prueba la calificación los aspectos higiénico-sanitarios se encontró que se puede utilizar como punto de corte las siguientes calificaciones: instalaciones físicas 15%, condiciones de proceso 50%, personal manipulador 50%, condiciones de saneamiento 30%, abastamiento de agua 15%, limpieza y desinfección 30%. Situación que muestra que cuando un restaurante escolar tiene una calificación inferior tiene una alta probabilidad que los alimentos suministrados en el restaurante escolar se infecten.

Capítulo II Modelo de cocción segura para carne

14.2 Evaluación de las alternativas para temperaturas de cocción

14.2.1 Determinación de propiedades termodinámicas.

Utilizando el concepto de termodinámica de mezcla, las propiedades físicas de alimentos se pueden determinar si se conocen las fracciones de los componentes los macronutrientes (ϕ). El software Nutrix[®] presenta la composición de alimentos o mezcla de estos utilizando las tablas de composición de alimentos colombianos. Para el lomo de cerdo (ver tabla 6)

Tabla 6 Composición carne de cerdo (lomo) por 100 gramos, cantidad en gramos. Tomado software Nutrix[®]

Composición carne de cerdo (lomo) por 100 gramos	
Humedad	67,80
Proteína	27,10
Grasa	3,60
Carbohidratos	0,30
Cenizas	1,20

Utilizando el software Termin[®] se determinaron las propiedades termodinámicas utilizando las ecuaciones de (Choi et al, 1986). Con los valores de composición y la incertidumbre reportada por el software Nutrix. Los valores de las propiedades termodinámicas se presentan en la tabla 7

Tabla 7 Propiedades termodinámicas carne de cerdo (lomo). Tomado software Termin®

Propiedades termodinámicas carne de cerdo (lomo)		
Propiedad	valor	Unidades
Capacidad calorífica C_p	$3,34 \pm ,10$	KJ / Kg °K
Conductividad K	$0,47 \pm 0,01$	Wat / m °K
Densidad ρ	$1105 \pm 33,15$	Kg / m ³
Difusividad térmica α	0,00013	m ² / s

Para determinar las propiedades termodinámicas C_p , K , ρ y α se utiliza la formula propuestas por Choi 1986 utilizando el concepto de termodinámica de mezclas. Bajo ese criterio se diseñó un aplicativo en ambiente Excel con una base de datos que reporta las fracciones de los componentes (ϕ) para toma: agua, carbohidratos, proteína grasa y ceniza. La base de datos fue construida de la tabla de composición de alimentos colombianos 2015

14.2.2 Curvas de penetración de calor

Para poder realizar las curvas de perfil de tempera se utiliza las propiedades termodinámicas y el modelo diseñado y se determina la temperatura de la pieza de carne en función del tiempo y se realizó la gráfica denominada perfil de temperatura.

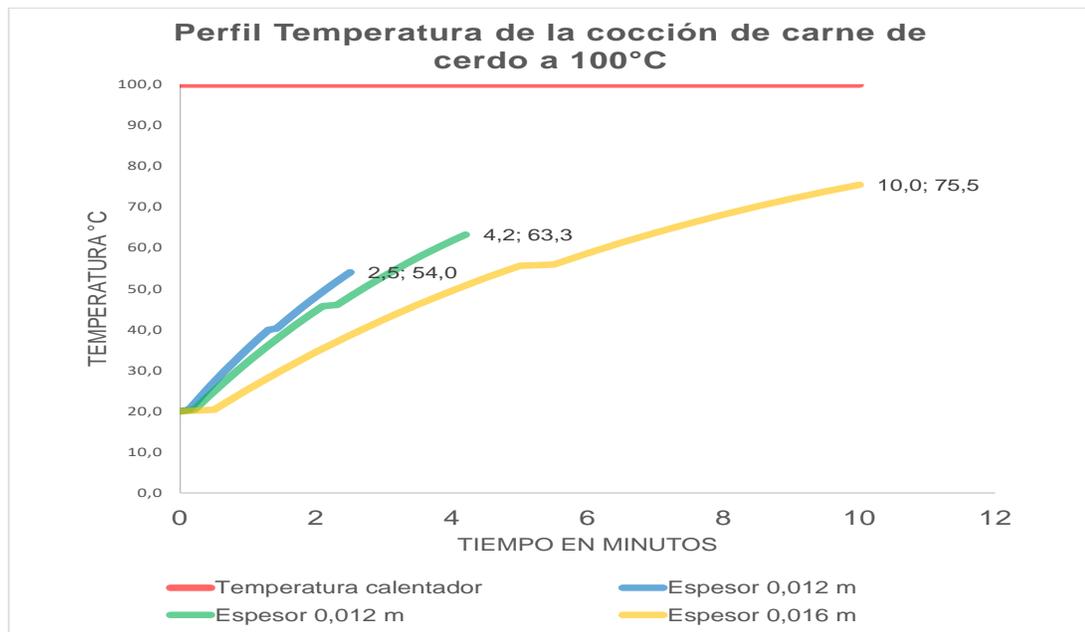


Ilustración 10 Perfil de temperatura calculado según la cocción de carne de cerdo de 0,012 m de espesos. Incluir en el pie de figura la notación de colores de las curvas

14.2.3 Evaluación del modelo de cocción

Los resultados obtenidos se compararon con los presentados por Swart en 2015 para diferentes escenarios de la cocción de carne de cerdo y como se ve en la ilustración 2 se ve que son similares. Si se calienta una pieza con una temperatura inicial de 0,0125 m de espesor, después de 2,5 minutos logra una temperatura final de 54°C o después de 4,2 se logra una temperatura interna de 63°C, los datos comparativos se presentan en la ilustración 11.

Perfil de Temperatura del modelo vs modelos de cocción

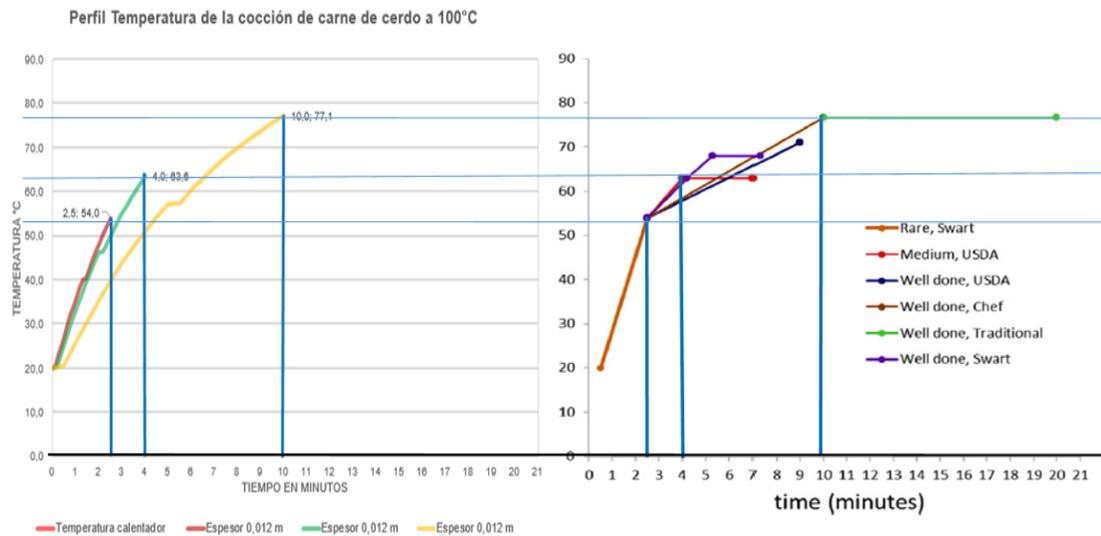


Ilustración 11 Comparación de los perfiles de temperatura de la cocción de lomo de cerdo de los datos calculado de vs a los reportados por otros autores

Para la evaluación experimental se realizaron 5 ensayos de calentamiento en dos piezas de lomo de cerdo a las cuales se les coloca un sensor de temperatura en punto medio de la carne, el espesor promedio de las piezas fue de 4,5 cm, con una temperatura inicial de 20°C. Se hizo un calentamiento en horno a 120°C, se hizo un registro de 4 temperaturas (dos en el interior de las piezas de carne y dos en diferentes puntos de la cámara). El registro de la temperatura se hizo en promedio cada 2,98 segundos. Estos resultados se pueden exportar del módulo a través de un archivo plano los cuales se pasan a una hoja de Excel para sus cálculos. Utilizando los conceptos de cartas de control, la desviación estándar de las temperaturas reportadas entre los sensores es 1,16°C en la cámara y de 0,66°C en las piezas de lomo de cerdo.

Con el promedio de los datos se realizó la gráfica de perfil de temperatura la cual se presenta en la ilustración 12

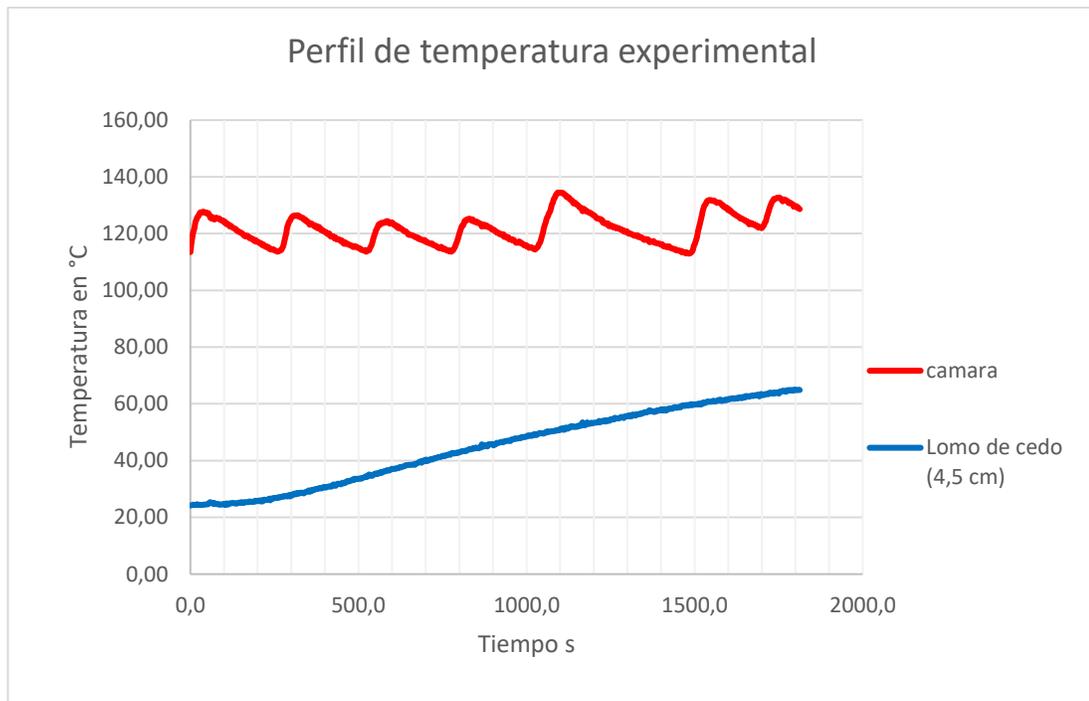


Ilustración 12 Perfil experimental de temperatura de cocción de lomos de cerdo de 4,5 cm de espesor

Posteriormente se determinaron las propiedades termodinámicas de las piezas y se hizo el cálculo del perfil de temperatura en el centro de la pieza según las mismas condiciones de los ensayos y estos resultados se compararon con los resultados experimentales. En la ilustración 13 se puede observar que el perfil de temperatura calculado es coincidente con perfil de temperatura experimental

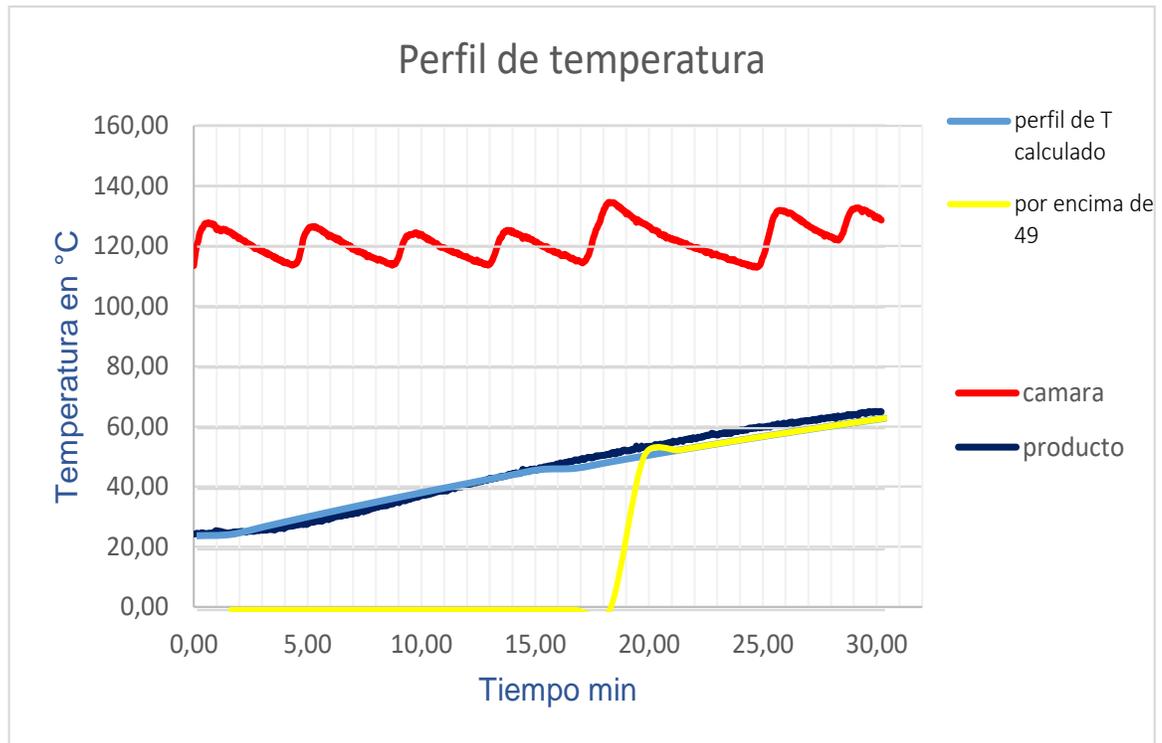


Ilustración 13 Comparación de los perfiles de temperatura Calculados vs los experimentales

Las temperaturas en piezas de lomo de cerdo (según la ilustración 11). Según los mismos parámetros, estimamos que se requieren 30 minutos para alcanzar una temperatura final de 65 °C en el centro de la pieza cuando esta tiene 4,5 cm de espesor y se calienta a 130 °C y la pieza a partir de los 20 minutos empieza a tener temperaturas letales para el *Toxoplasma gondii* (superiores a 49°C)

14.2.4 Determinación del Tiempo de Muerte térmica de *Toxoplasma gondii*

Para determinar el tiempo de muerte térmica se calcularon las cinéticas de destrucción térmica a diferentes temperaturas con base en los datos

reportados por Dubbey en 1990. El valor D es el tiempo necesario (en minutos) para reducir un ciclo logarítmico (ver tabla 8).

En el anexo 6 se presentan las cinéticas a 49°C, 52°C 58°C y 64°C Se realizó un análisis de regresión y se determinó el tiempo de muerte térmica D, así como la determinación del valor z ver (anexo 6), a los cuales se hace el análisis de regresión y se encontró que $D_{49^{\circ}\text{C}} = 8,3$ minuto y $z = 7^{\circ}\text{C}$,

Tabla 8 Tiempo de Destrucción Térmica (valor D) de *T. gondii* en minutos a diferentes Temperaturas

Temperatura °C	Valor D en minutos
49	8,3
52	3,2
58	0,5
64	0,07

Con esta información se puede determinar el Tiempo de Destrucción Térmica D a otras temperaturas utilizando la siguiente ecuación, donde T es la temperatura de referencia 49°C, t es la temperatura a la que se realiza el tratamiento térmico y z para el *T. gondii* es 7°C

$$D = D_T * 10^{\frac{T-t}{z}}$$

$$D_t = D_{49^{\circ}\text{C}} * 10^{\frac{T-t}{z}}$$

$$D_t = 8,3 * 10^{\frac{49-t}{7}}$$

14.2.5 Análisis de letalidad del *T. gondii* y evaluación de la cocción

Para el análisis de letalidad se hizo a sumatoria de la reducción en viabilidad del parásito a cada temperatura y el tiempo reportado en el tratamiento térmico, según los perfiles de temperatura. Solo se tiene en cuenta las

temperaturas superiores a 49°C. En la ilustración 13 la que se representada en la línea de color amarillo.

$$F(\text{tratamiento}) = \sum_{n=1}^{\infty} L\theta_i = \int_0^i L(T)d\theta = \int_0^i 10^{\frac{T-t}{z}} \theta$$

Y se calcula el tiempo que está expuesta la pieza de carne a un tratamiento similar al de 49°C, que si dura 8,3 minutos la probabilidad de infección se reduce hasta el 10% (reduce un ciclo logarítmico) que si dura 16,6 minutos la probabilidad de infección se reduce hasta el 1% (reduce dos ciclos logarítmicos) y que si dura 24,9 minutos la probabilidad de infección se reduce hasta el 0,1% (reduce tres ciclos logarítmicos) condición recomendada por el trabajo de Dubey 1998. Para hacer el cálculo se hace la sumatoria de los tiempos ajustados de las temperaturas superiores a 49°C

Tabla 9 Calculo para determinar la Letalidad (sumatorio de tiempo)

Tiempo en minutos	Temperatura en °C	θ	T-49	(T-49)/t	$10^{(T-49)/t}$	$L = \theta 10^{(T-49)/t}$
0,00	20,8	0,00	-28,2	-2,82	0,0014962	0,000000
1,03	21,0	1,03	-28,0	-2,8	0,0015849	0,001630
2,01	21,0	0,98	-28,0	-2,8	0,0015849	0,001551
3,02	22,3	1,01	-26,7	-2,7	0,0021135	0,002139
4,05	23,0	1,03	-26,0	-2,6	0,0025119	0,002584
5,03	24,5	0,98	-24,5	-2,4	0,0035481	0,003473
7,03	29,0	2,01	-20,0	-2,0	0,01	0,020073
9,04	35,8	2,01	-13,2	-1,3	0,0473151	0,094977
11,00	41,3	1,9	-7,8	-0,8	0,1678804	0,328636
13,01	47,3	2,0	-1,8	-0,2	0,6683439	1,341587
15,01	51,8	2,0	2,8	0,3	1,8836491	3,781106

17,02	56,5	2,0	7,5	0,8	5,6234133	11,288048
19,03	60,8	2,0	11,7	1,2	14,962357	30,034391
21,04	64,3	2,0	15,2	1,5	33,496544	67,238626
21,09	65,0	0,1	16,0	1,6	39,810717	1,981320
					sumatoria	114,3

Esto significa que cuando se logra una temperatura de 65°C, en una pieza de 4,8 cm de espesor la probabilidad de infección se reduce hasta 0,000001%

14.2.6 Simulación de Montecarlo

Después de evaluar el modelo comparando con los resultados reportados y los datos experimentales, se realizaron las determinaciones del tiempo requerido para calentar lomo de cerdo de espesor diferente y lograr una temperatura interna de 65°C, que es la temperatura recomendada para cocción de carne de cerdo

Tabla 10 Resultados de cocción de temperatura de lomo de cerdo a 100 y 170°C

Características	lomo de cerdo					
	100			170		
Espeor en cm	2	4	6	2	4	6
Temperatura externa (en °C)	100			170		
Temperatura inicial (en °C)	5	5	5	5	5	5
Temperatura final (en °C)	65	65	65	65	65	65
Tiempo de cocción (en minutos)	13,0	52,0	117,0	5,7	22,5	50,6

Utilizando la simulación de Montecarlo para analizar las condiciones de cocción mediante el uso del software Crystal Ball (Oracle, Estados Unidos). Estimamos diferentes curvas de penetración de calor modificando el tiempo de cocción, el grosor de la porción de carne y el tipo de preparación (asada

100°C o frita 170°C), se asume que la carne es segura cuando el tratamiento realizado presenta una reducción de 2 ciclos logarítmicos. Finalmente se realizó un análisis de sensibilidad. Realizando 18 simulaciones con 3 repeticiones de 10.000 iteraciones cada una. Para la variabilidad de los datos en cada iteración se utilizó la siguiente información:

- para temperaturas (desviación estándar de las temperaturas reportadas entre los sensores es 1,16°C en la cámara y de 0,66°C),
- propiedades termodinámicas según resultados de incertidumbre combinada (C_p 3,34 \pm 0,1002, K 0,47 \pm 0,0141, ρ 1105 \pm 33,15).

Se encontró que, aunque el producto llega a la temperatura interna de 65°C, no siempre se logra el tiempo necesario para reducir la probabilidad de infección a menos del 0,1%, como se muestra en la ilustración 12

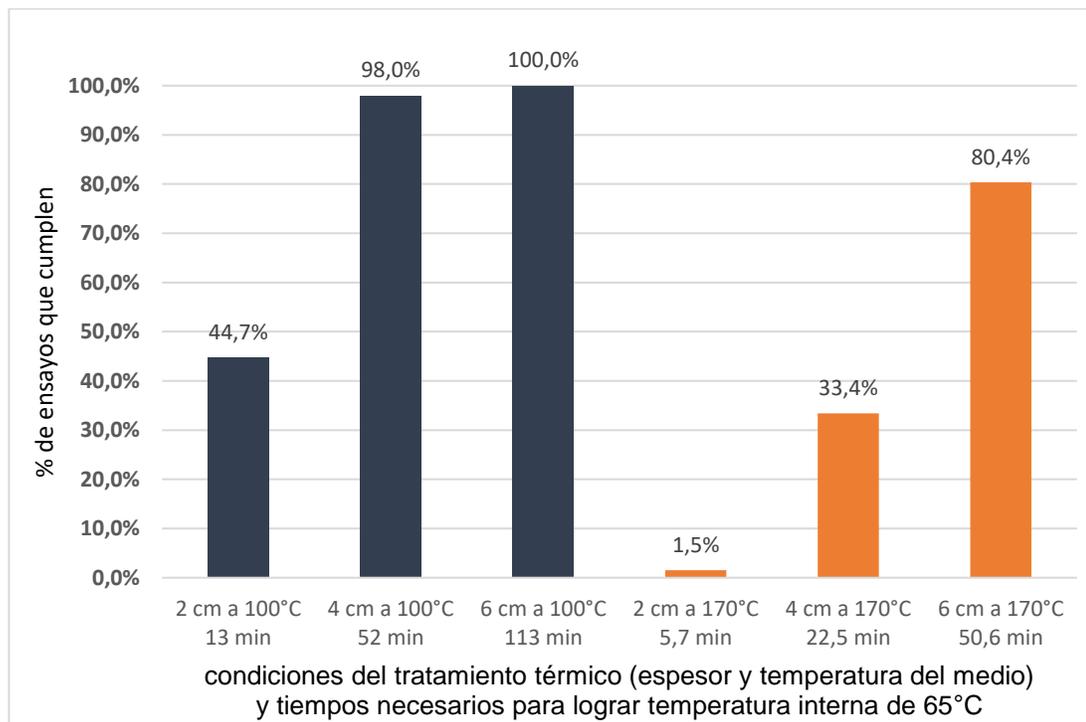


Ilustración 14 % de iteraciones que cumplen la destrucción de *Toxoplasma gondii* cuando la carne de cerdo se cocina hasta 65°C, según temperatura y temperatura

Según el análisis de sensibilidad el factor que más afecta es capacidad calorífica de la pieza de carne es la capacidad calorífica con un aporte de 31,1% posteriormente la densidad con aporte del 30,3%. Los cuales se ven más afectados por la composición y por la variabilidad reportada para el lomo de cerdo.

14.2.7 Análisis de escenarios

Se realizaron dos análisis de escenarios a través de un modelo QMRA (ver anexo 12).

1. Para predecir el número de casos de niños infectados con *T. gondii* asociados con el consumo de cerdo según el tipo de preparación. La probabilidad de consumir carnes con quistes viables depende del tipo de preparación y que si se consumen carnes jugosas la probabilidad de infectarse es del 13,51%, medio de 3,91%, tres cuartos 0,03% y bien cocida 0,00%. Lo que muestra que el parásito si se ve afectado por la temperatura y que se recomienda que se consuma carne bien cocidas.

2. Para predecir el número de casos de niños infectados con *T. gondii* asociados con el consumo de cerdo según el tipo de preparación. La probabilidad de consumir carnes con quistes viables depende del tipo de preparación y que si se consumen carnes jugosas la probabilidad de infectarse es del 13,51%, medio de 3,91%, tres cuartos 0,03% y bien cocida 0,00%. Lo que muestra que el parásito si se ve afectado por la temperatura y que se recomienda que se consuma carne bien cocidas

15 Discusión de los resultados

15.1 Discusión de resultados individuales

15.1.1 Presencia de *Toxoplasma gondii* en alimentos, agua y superficies

En la tabla 11 se presenta la asociación de las condiciones higiénico-sanitarias de los restaurantes escolares asumidos como factores de riesgo, asociadas a la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en alimentos

Tabla 11 Factores de riesgo asociados a la presencia de ADN de *Toxoplasma* incrementando según el cumplimiento de las condiciones higiénico sanitarias del restaurante escolar

Factor de Riesgo	Presencia de ADN de <i>Toxoplasma</i> según las condiciones sanitaria positivo vs negativos n/N (%)	OR	IC 95%	P valor
Condiciones higiénicas				
Instalaciones físicas con calificación \leq 25%	8/149 (5,4%) vs 5/59 (7,8%)	0,67	0,2 –2,1	0,4947
Condiciones de proceso con calificación \leq 60%	5/82 (6,1%) vs 8/123 (6,1%)	1,00	0,3 –3,2	0,4947
Condiciones de proceso con calificación \leq 70%	12/135 (8,2%) vs 1/65 (1,5%)	5,78	0,9 -36,3	0,0609
Condiciones de saneamiento con calificación \leq 59%	10/104 (9,6%) vs 55/197 (27,2%)	1,75	1,1 –2,8	0,0241

Condiciones de saneamiento con calificación $\leq 70\%$	8/12 (66,7%) vs 3/109 (2,81%)	5,78	1,1–13,0	0,0365
Abastecimiento de agua con calificación $\leq 26\%$	5/82 (6,1%) vs 8/123 (6,1%)	1,00	0,3 – 3,2	0,9978
Abastecimiento de agua con calificación $\leq 51\%$	12/147 (8,2%) vs 1/66 (1,5%)	5,78	0,9 -36,3	0,0609
Limpieza y desinfección con calificación $\leq 75\%$	6/68 (8,8%) vs 7/145 (4,8%)	1,91	0,6 –5,8	0,2561
Personal manipulador con calificación $\leq 67\%$	4/67 (6,0%) vs 9/146 (6,2%)	0,97	0,3 – 3,3	0,9562
Calificación promedio $< 51\%$	5/17 (22,7%) vs 8/183 (4,22%)	6,73	2,3–20,0	0,0006

En este trabajo se encontró que en el 50% de los restaurantes escolares muestran la presencia de ADN de *Toxoplasma* en agua, alimentos, superficies inertes o vivas. Esta presencia podría correlacionarse con un menor cumplimiento de las condiciones higiénico-sanitarias del restaurante. Esto es evidente cuando se analizan que valores de calificación inferior al 51% muestran 6,7 veces más posibilidad de encontrar alimentos con la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii*.

Esta situación aumenta el riesgo de infección en los niños, como puede deducirse al revisar la calificación de condiciones higiene de los restaurantes y se encuentra que, si esta es inferior al promedio, los niños tienen 8,9 veces más la probabilidad de presentar IgM anti-*Toxoplasma* (como indicador de infección aguda) que los niños que asisten a colegios con calificación superior.

De igual forma cuando las condiciones de saneamiento (que incluye abastecimiento de agua y limpieza y desinfección) presentan calificaciones

menores o igual a 70%, también se convierte en un factor de riesgo que aumenta la infección de acuerdo con los resultados. Cada uno de los criterios es importante pues, por ejemplo, se encontró que los restaurantes 3 y 4 a pesar de contar con tanque de almacenamiento de agua, hubo presencia de ADN de *T. gondii*, lo cual puede estar relacionado con la frecuencia de limpieza del tanque que fue superior a 6 meses. De hecho, cuando se evaluó el abastecimiento de agua, se tuvo en cuenta lo dispuesto en la resolución 2674 de 2013, la cual recomienda que el agua utilizada debe ser potable, estar almacenadas en tanque que no generen contaminación y deben ser fácil accesos y con limpieza periódica menor a dos meses.

Además, se encontró que cuando el agua proveniente del grifo en el restaurante tiene la presencia de ADN para *Toxoplasma* también se encuentra en el mismo restaurante en el agua para el jugo, jugo y las superficies vivas e inertes. En consecuencia, el conjunto de los resultados muestra que los colegios con porcentajes bajos de puntaje en las condiciones de abastecimiento de agua están correlacionados con mayor presencia de ADN de *T. gondii*. Esto sugiere que el agua es una fuente importante de contaminación en esos restaurantes, lo cual es entendible dado que se utiliza en todas las etapas de preparación de alimentos, tales como adecuación, preparación, limpieza y desinfección de los alimentos, equipos y utensilios, las áreas de trabajo y la higiene de manos del personal manipulador. La presencia de *T. gondii* en superficies inerte se ha informado recientemente como hallazgo en estudios de metagenómica en teclado de cajeros automáticos en la ciudad de Nueva York (Bik 2016), así como en personas que manipulan alimentos (Montealegre 2008, El Tras 2011)

Adicional a los factores que se encuentran relacionado con presencia de ADN en alimentos, agua y superficie de los restaurantes, se realizó un análisis bivariado estratificado para evaluar como influían los aspectos higiénico-

sanitarios de los restaurantes en la frecuencia de infección crónica (IgG anti-*Toxoplasma* positiva) e infección aguda (presencia de IgM anti-*Toxoplasma* positiva) en los niños que tomaban alimentos en estos restaurantes. Este análisis encontró que los aspectos higiénico-sanitarios que son factores de riesgo aumentando el riesgo de infección crónica en los niños fueron: instalaciones físicas, condiciones de saneamiento, abastecimiento de agua, limpieza y desinfección y personal manipulador.

En cambio, se encontró que el bajo o no cumplimiento de condiciones de proceso, era un factor protector. Esto puede ser debido que en la inspección se preguntaba por el material de utensilios, recipientes y tabla de picar y cuando este es de material plástico se calificó que cumplía con lo dispuesto en el artículo 9 literal 1 de la resolución 2674, que dice que los utensilios empleados deben estar fabricados en materiales resistentes al uso y la corrosión, así como a la utilización frecuente de agentes de limpieza y desinfección. Pero estos con el tiempo y por los materiales utilizados en su limpieza, hacen que el material se vuelva poroso y se convierta en un foco de contaminación cruzada. Por esta razón consideramos que se recomiende el uso de otros materiales como acero inoxidable o que se cambie con mayor frecuencia el material plástico. Esto amerita que se realicen estudios adicionales para evaluar las recomendaciones sobre este tema.

De acuerdo con el análisis bivariado, y luego de evaluar puntos de corte para diferentes aspectos higiénico-sanitarios, se encontró que son factores de riesgo para aumentar el riesgo de infección por *Toxoplasma* en los niños los siguientes puntajes: instalaciones físicas $\leq 25\%$, condiciones de saneamiento $\leq 59\%$, limpieza y desinfección $\leq 75\%$ y una calificación promedio $\leq 51\%$. Ha sido reportado que el cumplimiento de condiciones higiénicas y sanitarias lleva a prevención de la contaminación cruzada y de la infección por *T. gondii* (Mirza 2018 y Shapiro 2019).

Los puntos de corte seleccionados no siempre al incrementarlos se aumenta la probabilidad de riesgo o la significancia para infecciones en los niños especialmente de la fase aguda (IgM específica positiva), debido principalmente a la baja prevalencia que en el caso de IgM anti-*Toxoplasma gondii* fue de 3,8%. También, por ejemplo, en condiciones de proceso al incrementar el punto de corte de $\leq 60\%$ a $\leq 70\%$ se incrementa el Valor de OR, pero se pierde significancia estadística (pasa de $p = 0,007$ a $p = 0,140$). Para el abastecimiento de agua no se pudo hacer el análisis porque no hay niños positivos con valores inferiores a 26%. En condiciones de saneamiento al incrementar de $\leq 60\%$ a $\leq 70\%$ se incrementa el calor de OR de 1,75 a 5,78 y es más significativa la prueba estadística ($p = 0,024$ a $p = 0,037$).

Las condiciones de saneamiento (limpieza y desinfección y abastecimiento de agua) puede desempeñar un papel importante en la prevención de infección por *T. gondii*. Nuestros resultados muestran que esta es una condición importante de seguridad alimentaria que debe ser controlada en los restaurantes. La transmisión del parásito puede prevenirse con la prevención de la contaminación cruzada en las cocinas y las medidas de propagación (Jeffrey et al, 2012). Armenia tiene una prevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* en la población general superior al 50% (Cañón-Franco et al, 2014). Este estudio confirma que esta alta prevalencia existe desde la infancia y sugiere que los restaurantes escolares pueden contribuir a esta infección temprana. Una mayor prevalencia de IgG e IgM anti-*Toxoplasma* se asoció con restaurantes con menor cumplimiento de los procedimientos de desinfección, lo que indica que los niños que asisten a restaurantes de escuelas públicas tienen un mayor riesgo de contraer la infección como una enfermedad transmitida por alimentos. La falta de correlación entre la prevalencia de anticuerpos y los resultados de la PCR se puede explicar porque la producción de anticuerpos ocurre al menos una o dos semanas

después de la exposición a IgM y al menos cuatro semanas después de la exposición a IgG (Villard et al.2016).

Las fuentes de infección en los restaurantes escolares para niños, según el presente trabajo, podrían ser agua, jugos de frutas, carne y algunas verduras. Encontramos un 4,8% de positividad en la carne de res, y previamente, en grandes estudios sobre varios tipos de carne, encontramos que la PCR puede ser positiva en 32,4% a 52,7% de las muestras de carne (Lora-Suarez et al. 2007; Montealegre et al, 2008, Álvarez et al. 2015; Franco-Hernández et al. 2016). Además, en muestras de agua, encontramos una positividad del 20% utilizando la misma técnica (Triviño-Valencia.2016). Una muestra, de un pepino, tuvo un resultado positivo en nuestro estudio, no hay estudios previos en Colombia sobre la detección de ADN de *T. gondii* en muestras de vegetales

El instrumento de inspección de condiciones higiénico-sanitarias que aplicamos identificó el factor crítico que aumentó el riesgo de la presencia de ADN de *Toxoplasma*. Estos hallazgos respaldan la aplicación del instrumento de inspección de seguridad alimentaria como herramienta de salud pública (da Cunha et al.2016; Lee y Hedberg 2016). Los estudios futuros deberían analizar cómo la aplicación de los procedimientos puede afectar la reducción de toxoplasmosis en la población de niños en edad escolar.

15.1.2 Serología

Para IgG

En la tabla 12 se presenta la asociación de las condiciones higiénico-sanitarias de los restaurantes escolares asumidos como factores de riesgo, asociadas a niños que ya han tenido un contacto con el *Toxoplasma gondii* (infección)

Tabla 12 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de *Toxoplasma* con la calificación del restaurante escolar

Factor de Riesgo	Prevalencia en expuesto vs no expuesto n/N (%)	OR	IC 95%	P valor
Condiciones higiénicas				
Instalaciones físicas con calificación ≤ 25%	48/118 (40,7%) vs 53/193 (27,5%)	1,81	1,1 – 2,9	0,0157
Condiciones de proceso con calificación ≤ 60%	53/193 (27,4%) vs 48/118 (40,68%)	0,55	0,3 – 0,9	0,0157
Condiciones de saneamiento con calificación ≤ 59%	46/114 (40,4%) vs 55/197 (27,2%)	1,75	1,1 – 2,8	0,0241
Abastecimiento de agua con calificación ≤ 26%	48/118 (40,7%) vs 53/193 (27,5%)	1,81	1,1 – 2,9	0,0157
Limpieza y desinfección con calificación ≤ 75%	13/22 (59,1%) vs 88/289 (30,5%)	3,29	1,4 – 7,7	0,0057
Calificación promedio < 56,4%	41/102 (40,2%) vs 60/209 (28,7%)	1,67	1,0 – 2,7	0,0422

De acuerdo con el análisis bivariado se encontró que los aspectos higiénico-sanitarios que son factores de riesgo son: instalaciones físicas, condiciones de saneamiento, abastecimiento de agua, limpieza y desinfección y personal manipulador.

Cuando se hizo la evaluación de materiales de superficies en contacto con alimentos el material plástico se calificó que cumplía con lo dispuesto en el artículo 9 literal 1 de la resolución 2674, Los utensilios empleados deben estar fabricados en materiales resistentes al uso y la corrosión, así como a la utilización frecuente de agentes de limpieza y desinfección, según la

resolución 683 de 2012 en artículo 4 está permitido el uso de material plástico. Pero estos utensilios con el tiempo y los materiales utilizados en la limpieza hacen que la superficie se vuelva porosa y se convierta en un foco de contaminación cruzada. Haciendo que una baja calificación de las condiciones de proceso se convierta en un factor protector. Por lo que se recomienda el uso de otros materiales como acero inoxidable o que se cambien con mayor frecuencia.

Cuando se establece un nivel cumplimiento mayor para aspectos de condiciones de proceso, condiciones de saneamiento y abastecimiento de agua; se incrementa el factor de riesgo y la prueba se hace más significativa como se puede observar en la tabla 13.

Tabla 13 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de *Toxoplasma* incrementando el valor mínimo cumplimiento del restaurante escolar

Factor de Riesgo	Prevalencia en expuesto vs no expuesto n/N (%)	OR	IC 95%	P valor
Condiciones higiénicas				
Condiciones de proceso con calificación ≤ 60%	53/193 (27,4%) vs 48/118 (40,68%)	0,55	0,3 –0,9	0,0157
Condiciones de proceso con calificación ≤ 70%	89/291 (30,6%) vs 12/20 (60,0%)	0,29	0,1 -0,7	0,0066
Condiciones de saneamiento con calificación ≤ 59%	46/114 (40,4%) vs 55/197 (27,2%)	1,75	1,1 –2,8	0,0241
Condiciones de saneamiento con calificación ≤ 70%	8/12 (66,7%) vs 93/299 (31,1%)	4,43	1,4–13,8	0,0099
Abastecimiento de agua con calificación ≤ 26%	48/118 (240.7%) vs 53/193 (27,5%)	1,81	1,1 – 2,9	0,0157

Abastecimiento de agua con calificación \leq 51%	12/20 (60,0%) vs 89/202 (30,6%)	3,40	1,4 – 8,2	0,0066
Personal manipulador con calificación \leq 67%	46/108 (42,6%) vs 55/203 (27,1%)	1,99	1,2 – 3,3	0,0055

Para IgM

En la tabla 14 se presenta la asociación de las condiciones higiénico-sanitarias de los restaurantes escolares asumidos como factores de riesgo, asociadas a niños que ya han tenido un contacto reciente con el *Toxoplasma gondii* (incidencia)

Tabla 14 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de anticuerpo IgM para *Toxoplasma gondii* según las condiciones higiénicas del restaurante escolar

Factor de Riesgo	Prevalencia en expuesto vs no expuesto n/N (%)	OR	IC 95%	P valor
Condiciones higiénicas				
Instalaciones físicas con calificación \leq 25%	9/118 (7,6%) vs 3/193 (1,6%)	5,23	1,6–17,4	0,0070
Condiciones de proceso con calificación \leq 60%	3/193 (1,6%) vs 9/109 (7,6%)	0,19	0,1–0,6	0,0070
Condiciones de proceso con calificación \leq 70%	10/291 (3,4%) vs 2/18 (10,3%)	0,32	0,1 -1,5	0,1404
Condiciones de saneamiento con calificación \leq 59%	4/193 (2,0%) vs 8/114 (7,0%)	0,27	0,1 –0,9	0,0278
Condiciones de saneamiento con calificación \leq 70%	10/289 (3,3%) vs 2/12 (16,7%)	0,17	0,0–0,2	0,0188

Abastecimiento de agua con calificación $\leq 26\%$	0/0 (0,0%) vs 12/311 (3,9%)	NS	-	-
Abastecimiento de agua con calificación $\leq 51\%$	10/281 (3,4%) vs 2/20 (10,0%)	0,32	0,1 -1,5	0,0609
Limpieza y desinfección con calificación $\leq 75\%$	3/19 (13,6%) vs 9/280 (3,1%)	4,91	1,4-17,4	0,0135
Personal manipulador con calificación $\leq 67\%$	4/104 (3,7%) vs 8/195 (3,9%)	0,94	0,3 – 3,2	0,9176
Calificación promedio $< 51\%$	1/4 (25,0%) vs 11/1307 (3,6%)	8,97	1,3-63,0	0,0271

De acuerdo con el análisis bivariado se encontró que de los aspectos evaluados higiénico-sanitarios, son factores de riesgo: instalaciones físicas $\leq 25\%$, condiciones de saneamiento $\leq 59\%$, limpieza y desinfección $\leq 75\%$, y calificación promedio $\leq 51\%$. Esto indica que son factores de control de la infección por contaminación cruzada, lo cual fue reportado también por Mirza et al 2018 y Shapiro et al 2019

15.2 Análisis multivariado

15.2.1 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Toxoplasmosis para niños que asisten a restaurantes escolares según las prácticas y hábitos en el hogar

En la tabla 15 se presenta la asociación de las hábitos y prácticas en el hogar de los de los niños que asisten a los restaurantes escolares asumidos como factores de riesgo, asociadas a niños que ya han tenido un contacto con el *Toxoplasma gondii* (infección)

Tabla 15 Factores de riesgo prácticas y hábitos en el hogar asociados a la prevalencia de *Toxoplasma* en niño que asisten a los restaurantes escolares

Factor de Riesgo	Prevalencia en expuesto vs no expuesto n/N (%)	OR	IC 95%	P valor
Prácticas y cuidados en el hogar				
Estado nutricional (niños mayores de Z1)	14/38 (36,8%) vs 3/14 (21,4%)	2,14	0,5 – 9,0	0,2933
Niños ≤ 5 años	90/284 (31,7%) vs 7/23 (30,4%)	1,06	0,4 – 2,7	0,9009
Niños > 6 años	20/83 (24,1%) vs 77/146 (34,5%)	0,60	0,3 – 1,1	0,9009
Consume agua hervida	11/25 (44,0%) vs 9/32 (28,1%)	2,01	0,7 – 1,1	0,2127
Prepara el jugo con agua sin hervir	10/27 (37,0%) vs 10/30 (33,3%)	1,18	0,4 – 3,5	0,2127
Lava las frutas con agua sin hervir	4/10 (40,0%) vs 16/46 (34,8%)	1,25	0,3 – 5,1	0,7929
Lava los vegetales con agua sin hervir	19/50 (38,0%) vs 1/7 (14,3)	0,75	0,2 – 2,5	0,6372
Utiliza misma tabal para picar carnes y vegetales	1/26 (3,9%) vs 17/135 (12,6%)	0,83	0,3 – 2,4	0,7349
Contacto con animales	9/62 (14,5%) vs 26/76 (25,5%)	3,68	0,5– 29,8	0,2182
Consume bien cocida la carne	0/1 (0,0%) vs 20/56 (35,7%)	NS	-	-
Consume refrigerio en el colegio	6/16 (37,5%) vs 14/41 (34,2%)	1,16	0,3– 3,9	0,8116
Prueba de toxoplasmosis a la madre	5/16 (31,3%) vs 14/39 (35,9%)	0,81	0,2– 2,8	0,7420

Contacto con gatos	10/25 (40,0%) vs 9/17 (34,6%)	1,26	0,4– 4,0	0,6909
Contacto con mascotas	6/18 (33,3%) vs 14/39 (35,9%)	0,89	0,3– 2,9	0,8504
Compra alimentos en la plaza de mercado	14/36 (38,9%) vs 5/14 (35,7%)	1,15	0,3– 4,2	0,8355

Cuando se observa los factores como estado nutricional, edad menor de 5 año, consume agua hervida, prepara el jugo con agua hervida, lava las frutas con agua hervida, contacto con animales, contacto con gato. Son factores de riesgo ya que presentan valores de OR superiores a 1, pero estos factores no son significativos porque tiene valores p superiores a 0,05 y sus intervalos de confianza inicia siempre en un valor inferior a uno. Por tal razón no se pueden considerar como un factor de riesgo

15.2.2 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Toxoplasmosis para niños que asisten a restaurantes escolares con la presencia de ADN *Toxoplasma gondii* en alimentos, agua o superficie

Tabla 16 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de toxoplasmosis para niños que asisten a restaurantes escolares con la presencia de ADN *Toxoplasma gondii* en alimentos, agua o superficies

Factor de Riesgo	Prevalencia en expuesto vs no expuesto n/N (%)	OR	IC 95%	P valor
Presencia de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en alimentos				
En alimentos	41/61 (40,2%) vs 60/209 (28,7%)	1,67	1,0– 2,7	0,0422
En agua	51/133 (38,9%) vs 50/128 (28,1%)	1,59	0,9– 2,6	0,0560
En superficies	32/75 (42,67%) vs 69/236 (29,2%)	1,06	1,1– 3,1	0,0305

Según Pérez 2008, Kijlstra 2088, Mirza 2018, Shapiro 2019 existen muchas fuentes de infección en los cuales el *Toxoplasma gondii* puede estar viable. En el presente trabajo se encontró que los factores de riesgo más significativos son los alimentos, los cuales cuando están contaminados, aumentan 1,67 veces más la posibilidad de infectar a los niños y seguido de las superficies con 1,1 veces más posibilidad de infección. Aunque el agua con presencia de ADN de *Toxoplasma* no alcanzó a ser significativa para aumentar el riesgo, en el aspecto de la condiciones higiénico-sanitarias el abastecimiento de agua si lo fue.

15.2.3 Análisis estratificado

Según Pappas et al, 2009 la seroprevalencia de la toxoplasmosis está sujeta a parámetros socioeconómicos y hábitos de la población. Peres et al 2011 dice que *T. gondii* tiene una distribución cosmopolita y su seroprevalencia varía en función de la edad y de las zonas geográficas. Lo dicho anteriormente pueden ser factores de confusión y por tal razón se realizó un análisis estratificado para: condiciones socio-económicas para niños atendidos en restaurantes escolares con calificación $\leq 25\%$ en instalaciones físicas, $\leq 26\%$ para Abastecimiento de agua, $\leq 75\%$ para Limpieza y desinfección según la prevalencia anti *T. gondii* IgG

Tabla 17 Análisis estratificado para condiciones socio-económica y edad según los resultados de prevalencia de *Toxoplasma gondii* en población infantil que asiste a restaurantes escolares

Factor de riesgo	Número de niños evaluados para factor de riesgo	Odds Ratio	OR intervalo de confianza (IC 95%)	P	Riesgo atribuible
Según estrato socio-económico					
Instalaciones físicas con calificación $\leq 25\%$	311	1,81			

Sisben 1	187	1,04	0,6 – 1,9	0,8919	-0,279
Sisben > 1	124	4,28	1,8 – 10,4	0,0130	-0,550
Abastecimiento de agua ≤ 26%	311	1,81			
Sisben 1	187	1,04	0,6 – 1,9	0,8919	-0,279
Sisben > 1	124	4,28	1,8 – 10,4	0,0130	-0,550
Limpieza y desinfección ≤ 75%	311	3,30			
Sisben 1	187	3,84	0,8 – 18,3	0,0906	0,310
Sisben > 1	124	6,19	2,2 – 17,7	0,0055	-0,726
Personal manipulador de alimentos ≤ 67%	311	1,99			
Sisben 1	187	1,14	0,6 – 2,1	0,6730	-0,281
Sisben > 1	124	7,02	2,9 – 17,2	0,00002	-0,645
Según la edad					
Instalaciones físicas con calificación ≤ 25%	311	1,81			
Niños ≤ 6 años	83	3,75	1,3 – 11,2	0,0172	-0,475
Niños > 6 años	224	1,60	0,9 – 2,9	0,1138	-0,396
Condiciones de saneamiento ≤ 59%	311	1,75			
Niños ≤ 6 años	83	3,11	1,1 – 9,0	0,0172	-0,453
Niños > 6 años	224	1,17	0,6 – 2,1	0,1138	-0,311
Personal manipulador de alimentos ≤ 67%	311	1,99			
Niños ≤ 6 años	83	4,31	1,4 – 13,7	0,0129	-0,623
Niños > 6 años	224	1,55	0,9 – 2,7	0,1243	-0,398

Cuando se hace la prueba de Mantel Haenszel (Lora et al, 2002; Guilera et al, 2007; Cobo et al, 2014) en las condiciones socioeconómicas y la edad se encontró lo siguiente:

- Para estratos socio-económicos (bajo nivel socio-económico bajo SISBEN 1 y nivel socio-económico superior SISBEN > 1) se encontró lo siguiente: Para las instalaciones físicas con calificación ≤ 25% y para

abastecimiento de agua $\leq 26\%$ el OR es 1,81 y OR_{MH} es 1,52. Para las Limpieza y desinfección $\leq 75\%$ OR es 3,30 y OR_{MH} es 5,25, y para personal manipulador de alimentos $\leq 67\%$ el OR es 1,99 y OR_{MH} es 1,84.

- Para la edad. Según los datos reportados por secretaria de educación se asume que los niños ingresan al sistema entre las edades de 5 a 6 años, esta población representa el 30,7% de los niños no matriculados por tal razón el análisis estatificado se realiza para niños con edad menor o igual a 6 años (como niños que ingresan o población con exposición reciente) para los niños mayores de 6 años (como niños que existentes en el sistemas o población con exposición anterior). Se encontró lo siguiente: Para las instalaciones físicas con calificación $\leq 25\%$ el OR es 1,81 y OR_{MH} es 1,94. Condiciones de saneamiento $\leq 59\%$ OR es 1,75 y OR_{MH} es 1,55, y para personal manipulador de alimentos $\leq 67\%$ el OR es 1,99 y OR_{MH} es 1,82.

Se observa que para los aspectos evaluados con respecto al nivel socio-económico bajo existen 4 que son significativo ya que presenta valores $p < 0,05$ (los OR respectivos: instalaciones físicas 4,28, abastecimiento de agua 4,28, limpieza y desinfección 6,19 y personal manipulador 7,02, ver tabla 16), para los aspectos evaluados con respecto edad menor o igual a 6 años (con exposición reciente) existen 3 que son significativo ya que presenta valores $p < 0,05$ (los OR respectivos: instalaciones físicas 3,75, condiciones de saneamiento 3,11, y personal manipulador 4,31, ver tabla 16)

Como la diferencia relativa entre las medidas ponderadas y las medida bruta es superior a la 15% se sugiere: que el estrato socio-económico bajo (SISBEN 1) y la edad (niños con edad menor o igual a 6 años) son factores de confusión, y Se puede afirmar que los niños con SISBEN > 1 y los niños con edades menores o iguales a 6 años pueden verse infectado por las condiciones del

colegio mientras que los nivel socio-económico bajo o con edades superiores a 6 años pueden verse afectado por otra situación como las prácticas y hábitos en el hogar. En el anexo 8 se presentan las tablas del análisis estratificado

15.2.4 Discusión general

El cumplimiento de las condiciones de saneamiento (que incluye limpieza y desinfección y abastecimiento de agua) cumplen un papel importante en la prevención de la infección por *T. gondii*; ya que un menor cumplimiento de los procedimientos de limpieza y desinfección se asoció con una mayor prevalencia de anticuerpos IgG e IgM (limpieza y desinfección con calificación $\leq 75\%$ para igG presenta un OR 3,29 $p= 0,0057$ y limpieza y desinfección con calificación $\leq 75\%$ para igM presenta un OR 4,91 $p= 0,0135$), en niños que asistieron a estos restaurantes indica que esta es una condición importante de seguridad alimentaria que debe ser controlada en los restaurantes. La transición del parásito puede prevenirse con la prevención de la contaminación cruzada en las cocinas y las medidas de propagación (Jeffrey et al, 2012)

Armenia tiene una prevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* en la población general superior al 50% (Cañón-Franco 2014). Este estudio confirma que esta alta prevalencia existe desde la infancia y sugiere que los restaurantes escolares pueden contribuir a esta infección temprana (para IgG 32,5% y para IgM 3,9%). Una mayor prevalencia de IgG e IgM se asoció con restaurantes con menor cumplimiento de los procedimientos de desinfección, lo que indica que los niños que asisten a restaurantes de escuelas públicas tienen un mayor riesgo de contraer la infección como una enfermedad transmitida por alimentos. La falta de correlación entre la prevalencia de anticuerpos y los resultados de la PCR se puede explicar porque la producción de anticuerpos ocurre al menos una o dos semanas después de la exposición a IgM y al menos cuatro semanas después de la exposición a IgG (Villard et al.2016).

Las fuentes de infección en los restaurantes escolares para niños, según el presente trabajo, podrían ser agua, jugos de frutas, carne y algunas verduras. Encontramos un 4,8% de positividad en la carne de res, y previamente, en grandes estudios sobre varios tipos de carne, encontramos que la PCR puede ser positiva en 32.4% a 52.7% de las muestras de carne (Lora-Suarez et al. 2007; Montealegre et al, 2008; Álvarez et al, 2015; Franco-Hernández et al, 2016,). Además, en muestras de agua, encontramos una positividad del 20,0% utilizando la misma técnica (Triviño-Valencia.2016). Una muestra, de un pepino, tuvo un resultado positivo en nuestro estudio, no hay estudios previos en Colombia sobre la detección de ADN de *T. gondii* en muestras de vegetales. El instrumento que aplicamos identificó el factor crítico que aumentó el riesgo de la presencia de ADN de *Toxoplasma*. Estos hallazgos respaldan la aplicación del instrumento de inspección de seguridad alimentaria como herramienta de salud pública (da CUNHA et al.2016; Lee y Hedberg 2016). Los estudios futuros deberían analizar cómo la aplicación de los procedimientos puede afectar la reducción de toxoplasmosis en la población de niños en edad escolar.

En conclusión, este estudio identificó las fuentes potenciales y los puntos críticos donde las autoridades de salud pública pueden intervenir en los restaurantes escolares para reducir el riesgo de toxoplasmosis transmitida por los alimentos

16 Conclusiones

- Se encontró que con un menor cumplimiento de las condiciones higiénico-sanitarias del restaurante puede incrementar la posibilidad de brindar alimentos peligrosos, pues cuando se realiza la evaluación y su calificación es inferior al 51% existe 6,7 veces más posibilidad de encontrar alimentos con la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii*. Y si no se le da el manejo adecuado es un alimento peligroso que puede ocasionar infección en los niños
- Este estudio identificó las fuentes potenciales y los puntos críticos donde las autoridades de salud pública pueden intervenir en los restaurantes escolares para reducir el riesgo de toxoplasmosis transmitida por los alimentos, estas son la infraestructura física, la limpieza y desinfección y el abastecimiento de agua
- Se encontró que: a) el modelo matemático propuesto es coincidente con los datos experimentales y similares a otros resultados reportados. b) para lograr temperaturas seguras en la cocción de carne de cerdo (según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos es de 65°C en el interior de la pieza) un factor crítico es el grosor de la pieza. Este modelo indica recomendaciones prácticas importantes para preparar carne con un bajo riesgo de infección por *Toxoplasma gondii* prepara la carne a bajas temperatura y preferiblemente trozos gruesos. Con el fin de mantener la carne más tiempo a temperaturas que garanticen la destrucción del parásito.
- El modelo resalta que el grosor de la pieza de carne es el parámetro crítico que influye en el tiempo y la temperatura necesarios para lograr

temperaturas óptimas en el centro de la pieza. La industria alimentaria debe tener en cuenta que las propiedades termodinámicas cambian según la especie y el corte utilizado, además que estas varían de un país a otro, en consecuencia, las recomendaciones también pueden modificarse y la autoridad sanitaria de cada país debe tener en cuenta la estimación del riesgo y determinar qué recomendaciones de cocina se deben hacer al consumidor final.

- Según el análisis estratificado se encontró que el estrato socio-económico (Sisben 1) y la edad (niños mayores a 6 años de edad) son factores de confusión. y se puede inferir que los niños con edad de 5 años o menores y los niños de estrato socioeconómico 2 o más se pueden ver afectados por las condiciones del colegio para infección con *Toxoplasma gondii*. Para los otros niños pueden existir diferentes factores como las condiciones y prácticas en el hogar
- El análisis de escenario muestra que el riesgo de infección por *T. gondii* por el consumo de cerdo según su tipo de preparación. Se estimó que si se preparan las carnes bien cocidas se puede reducir de 350 a 1 nuevos casos por año en población infantil de 5 a 12 años para Armenia Quindío. Además, que se puede reducir la probabilidad de infección por consumo de carne de 13,1% a 0,00%. Y que si se mejoran las condiciones locativas se puede reducir la prevalencia el 41,8% al 28,8% lo que indica que habrían 3.646 menos infectados con *Toxoplasma gondii*

17 Recomendaciones

Se recomienda cuando se consume carne se realice una cocción adecuada (preferiblemente a 65°C o cuando el color de la pieza de carne sea café) se realice de forma lenta. Se puede hacer sellado, pero terminar la cocción a fuego lento.

Utilizar diferentes tipos de utensilios de cocina según tipo de especie, lavar muy bien los elementos y antes de usar lavar con agua hirviendo

Realizar muy bien las prácticas de limpieza y desinfección antes de iniciar a trabajar y cada vez que requiera cambio de actividad hacer la higienización nuevamente

En lo posible escaldar los vegetales antes de su consumo (sumergir en agua hirviendo durante 1 minuto) lavar con agua potable las frutas y antes de su consumo pelar preferiblemente.

Los consumidores lavarse muy bien las manos antes de consumir alimentos

En sitios de preparación de alimentos garantizar que: a) la infraestructura física en materiales lavables, no poroso b) realizar de manera adecuada la limpieza y dirección c) garantizar que el agua sea potable y lavar frecuentemente los tanques d) realizar capacitación al personal manipulador y hacer énfasis en todos los peligros biológico (parásitos, bacteria, hongos virus y priones)

18 Referencias bibliográficas

- 1) Galván R, Mondragón R. 2017. Toxoplasmosis Humana. Cap 14 Epidemiología Universidad de Guadalajara, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Pp 213-226
- 2) Hill. D and Dubey J. P. 2009. Cap 13 Food-Borne Parasites. En Vijay K. J, John N. S. 2009. Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions.. ASM Press, Washington pp 195- 217
- 3) Blaga R, Aubertb D, Perretc C, Geersb R, Djokicc V, Villenab I, Gilot-Fromontd E, Merciere A, Boireauc P; 2015; Animal reservoirs of *Toxoplasma gondii*: an update in France REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES. 477: 39-52.
- 4) Montoya JG¹, Remington JS. 2008. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin Infect Dis. 2008 Aug 15;47(4):554-66. doi: 10.1086/590149.
- 5) FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series No. 23. Rome. 302pp
- 6) Despommier DD, Griffin DO, Gwadz RW, Hotez PJ, Knirsch CA. 2016 Parasitic Diseases. 6^a ed Edition. New York Parasites Without Borders, Inc. NY. P.141

- 7) Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW. 1980. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics*. 1980 Nov; 66(5):767-74
- 8) Centers of Disease Control and Prevention 2017. Toxoplasmosis. <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>.
- 9) Gómez C, Mondragón R. 2017. Morfología Celular Cap 2, pp 11- 24. En Galván R, Mondragón R. 2017. Toxoplasmosis Humana. Universidad de Guadalajara, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. pp 237
- 10) Gómez JE. 2017. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis humana. En: GALVÁN ML, MONDRAGÓN R. Toxoplasmosis Humana. México ECORFAN S.C.; p 139-162
- 11) K. Shapiro, L. Bahia-Oliveira, B. Dixon, et al., Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food, *Food and Waterborne Parasitology*, <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>
- 12) Tenter A, Heckeroth AR, Weiss L. 2001. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 31: 217-220
- 13) Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J. , Bass, D. , Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F. , Dunthorn, M. , Hampl, V. , Heiss, A. , Hoppenrath, M. , Lara, E. , le Gall, L. , Lynn, D. H., McManus, H. , Mitchell, E. A., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J. , Rueckert, S. , Shadwick, L. , Schoch, C. L., Smirnov, A. and Spiegel, F.

- W. 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59: 429-514. doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
- 14) Dubey JP. 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd ed. Maryland: CRC Press. 319 p.
 - 15) Pappas G, Roussos N, Falagas M. 2009. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology* 39 (2009) 1385–1394
 - 16) Cortés J, Gómez J, Silva P, Arévalo L, Arévalo I, Álvarez M, Beltrán S, Corrales I, Muller E, Ruiz G, Gómez P. 2012. Guía de atención integral para la prevención, detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto y puerperio: sección toxoplasmosis en el embarazo. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*
 - 17) World Health Organization WHO. 2015 Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden, epidemiology reference group 2007-2015. Pp 268
 - 18) FAO/WHO ([Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. *Microbiological Risk Assessment Series No. 23*. Rome. 302pp
 - 19) Lappin MR, Marks A, Greene CE, Collins JK, Carman J, Reif JS, Powell CC. 1992. Serologic prevalence of selected infectious diseases in cats with uveitis. *J Am Vet Med Assoc* 201: 1005-1009.

- 20) Dubey JP. 1998. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. J Parasitol 84: 862-865
- 21) Ramírez A, Ríos Y, Galvis N, Entrena E, Mariño N, Rangel D, Araque A, Cabarique D, Murillo M, Gómez-Marín J. 2019. Seroprevalencia y detección molecular de *Toxoplasma gondii* en donantes de un banco de sangre de Cúcuta, Colombia. Biomédica 2019; 39 (Supl.2):144-56
- 22) Baril L, Ancelle, T.; Goulet, V.; Thulliez, P.; Tirard-Fleury, V.; Carme, B. 1999. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. Scand. J. Infect. Dis., 31(3): 305-309
- 23) Berger, F.; Goulet, V.; Le Strat, Y.; Desenclos, J.C. 2009. Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. Rev EpidemiolSantePublique, 57(4): 241-248.
- 24) Boyer K.M.; Holfels, E.; Roizen, N.; Swisher, C.; Mack, D.; Remington, J.; Withers, S.; Meier, P.; McLeod, R. 2005. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. Am. J. Obstet. Gynecol., 192(2): 564-571.
- 25) Del Castillo F, Deutz, A.; Fuchs, K.; Schuller, W.; Nowotny, N.; Auer, H.; Aspöck, H.; Stünzner, D.; Kerbl, U.; Klement, C.; Köfer, J. 2003. Seroepidemiological studies of zoonotic infections in hunters in southestern Austria-prevalences, risk factors, and preventive methods. Berl. Munch. Tierarztl.Wochenschr., 116(7-8): 306-311

- 26) Jones J, Dargelas, V.; Roberts, J.; Press, C.; Remington, J.S.; Montoya, J.G. 2009. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in the United States. Clin. Infect. Dis., 49: 878-84.
- 27) Calero R. 2016. Actualización sobre toxoplasmosis humana. Sanidad Animal Universidad de Extremadura. http://socivesc.es/index.php?option=com_content&view=article&id=198:actualizacion-sobre-latoxoplasmosishumana&catid=49:publicacione_socivesc&Itemid=37. 30 de mayo 2016
- 28) Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, Dumètre A, de Wit A, VanWormer E, Villena I. 2019. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food, Food and Waterborne Parasitology, <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>
- 29) Gómez C, Mondragón R. 2017 Morfología Celular Cap 2, pp 11- 24. En Galván R, Mondragón R. 2017. Toxoplasmosis Humana. Universidad de Guadalajara, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. pp 237
- 30) Gamble HR, Nas, Hill DE. 2013. *Toxoplasma*, pork safety fact sheet: National Pork Board, Des Moines, IA USA; 2013. Available from: <https://www.porkcdn.com/sites/porkorg/library/2010/04/Toxoplasma.pdf>
- 31) Gómez JE, González A, Castaño JC, Patarroyo MA. 2011. Fundamentos Básicos de medicina. Biología molecular: principios y aplicaciones Colombia, Corporación para Investigaciones Biológica. México ECORFAN S.C.; pp 748
- 32) Mancianti, F., Nardoni, S., D'Ascenzi, C., Pedonese, F., Mugnaini, L., Franco, F., and Papini, R. 2013 Seroprevalence, detection of DNA in

blood and milk, and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a goat population in Italy. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Volume 2013, Article ID 905326, 6 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/905326>

- 33) Giraldo M. 2008. Toxoplasmosis. Medicina & Laboratorio 2008; 14: 359-375. Módulo 12 (Parasitología), número 5. Editora Médica Colombiana S.A., 2008©.,359 -375
- 34) Opsteegh M, Prickaerts S, Frankena K, Evers E. 2011. Una evaluación de riesgos microbiológicos cuantitativa para la carne transmitidas por infección por *Toxoplasma gondii* en los Países Bajos. International Journal of Food Microbiology 150 (2011) 103–114
- 35) Crotta M, Limon G, Blake DP, Guitian J. 2017. Knowledge gaps in host-parasite interaction preclude accurate assessment of meat-borne exposure to *Toxoplasma gondii*. International. Journal of Food Microbiology. Pp7
- 36) Guo M, Lambertini E, Buchanan L, Dubey J, Hill D, Gamble H, Jones L, Pradhan K. 2017. Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption of fresh pork in the United States. Food Control 73 (2017) 1210 e1222
- 37) Choi Y., M. Okos. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of Foods. Food Engineering and Process Applications. 1. 93-101.
- 38) Orrego C. 2003. Procesamiento de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales

- 39) Swart, A., Berriman, A., Kosmider, R., 2015. Application of the thermal inactivation model to model risk to human health from consumption of VTEC O157 in beef burgers. Summary Report. Animal & Plant Health Agency and National Institute for Public Health and the Environment
- 40) Franssen F, Swart A, Van der Giessen J, Havelaar A, Takumi K. 2017. Parasite to patient: A quantitative risk model for *Trichinella* spp. in pork and wild boar meat. *International Journal of Food Microbiology* 241 262–275
- 41) FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud). 2010. Guía FAO/OMS para la aplicación de principios y procedimientos de análisis de riesgos en situaciones de emergencia relativas a la inocuidad de los alimentos. Rome. 56 pp
- 42) FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) 1995. Application of risk analysis to food standards. Report of the joint FAO/WHO expertconsultation. FAO/WHO, Ginebra, 47 pp.
- 43) OMS/FAO (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN). 2009. Caracterización de Riesgos de Peligros Microbiológicos en los Alimentos, DIRECTRICES. Ginebra, 149 pp
- 44) Ministerio de Protección Social, Unidad de Evaluación de Riesgo de Inocuidad de Alimentos UERIA, Instituto Nacional de Salud. 2011.

Metodología para las evaluaciones de riesgo microbiológicas. Bogotá
39 pp

- 45) Pérez F. 2006. Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano en productos Cárnicos Cocidos: Modelos de Contaminación cruzada y su impacto sobre la Gestión del Riesgo. Córdoba. 271 pp
- 46) Gómez B., Rodríguez C., Zambrano D., González N. 2012. Manual de cortes de cortes de carne de cerdo Colombiano. Centro de Investigación y transferencia de tecnología del sector porcicola Ceniporcino, Bogotá
- 47) USDA (United States Department of Agriculture). 2011. Revises Recommended Cooking Temperature for All Whole Cuts of Meat, Including Pork, to 145 °F. Volume 13, Issue
- 48) USDA (Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture). 2003. Inocuidad de la carne de cerdo, desde el criadero hasta la mesa del consumidor. Washington, D.C.
- 49) USDA (United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. 2008. Temperature rules cooking for food service
- 50) Choi Y., M. Okos. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of Foods. Food Engineering and Process Applications. 1. 93-101
- 51) Orrego C. 2003. Procesamiento de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. 322pp

- 52) Rao M, Rizvi S, Datta A. 2005. Engineering properties of foods. 3rd ed Taylor & Francis Group, Boca Raton. 761 pp
- 53) Ibarz A, Barbosa G. 2005. Cánovas OPERACIONES UNITARIAS EN LA INGENIERÍA DE ALIMENTOS. Mundi-Prensa Libros, S.A., Madrid. Pp 874
- 54) Singh RP, Heldman R. 2009. Introduction to Food Engineering, Fourth Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier 2009. Pp 864
- 55) Swart, A., Berriman, A., Kosmider, R., 2015. Application of the thermal inactivation model to model risk to human health from consumption of VTEC O157 in beef burgers. Summary Report. Animal & Plant Health Agency and National Institute for Public Health and the Environment. 20 pp
- 56) Franssen F, Swart A, Van der Giessen J, Havelaar A, Takumi K. Parasite to patient: A quantitative risk model for *Trichinella* spp. in pork and wild boar meat. International Journal of Food Microbiology 241 (2017) 262–275
- 57) Dubey J., Kotula A., Sharar A., Andrews C., and Lindsay D. 1990. Effect of High Temperature on Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork. Journal of Parasitology 76: 201-204
- 58) Fathi A. El-Nawawi, Mohamed A. Tawfik, and Raafat M. Shaapan. 2008. Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep. **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE** Volume 5, Number 5

- 59) Rao M, Rizvi S., Datta A. 2005. Engineering properties of food. 3^o edición. Taylor & Francis Group. New York , USA
- 60) Cañón-Franco, W.A., López-Orozco, N., Gómez-Marín, J.E., Dubey, J.P., 2014. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasit. Vectors* 7, 427.
- 61) Cañón-Franco, W.A., López-Orozco, N., Gómez-Marín, J.E., Dubey, J.P., 2014a. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasit. Vectors* 7, 427.
- 62) Cook, N., Nichols, R.A.B., Wilkinson, N., Paton, C.A., Barker, K., Smith, H. V., 2007. Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7388–7391.
- 63) Lora-Suarez, F., Rivera, R., Triviño-Valencia, J., Gomez-Marin, J.E., 2016. Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Res.* 100, 377–381.
- 64) Alvarez, C., de-la-Torre, A., Vargas, M., Herrera, C., Uribe-huertas, L.D., Lora, F., Gómez-marín, J.E., 2015. Striking divergence in *Toxoplasma* ROP16 nucleotide sequences from human and meat samples. *J. Infect. Dis.* 211, 1–8.
- 65) Franco-Hernandez, E.N., Acosta, A., Cortés-Vecino, J., Gómez-Marín, J.E., 2015. Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. *Parasitol. Res.*

- 66) Zamora-Vélez, A., Cuadrado-ríos, S., Triviño-valencia, J., Moncada-Giraldo, D.M., Lora, F., Gómez-Marín, J.E., 2016. Diversidad Genética Y Filogenia De *Toxoplasma gondii* a Parciales De B1 De Colombia Y Otros Países Genetic Diversity and Phylogeny of *Toxoplasma gondii* Based on B1 Partial Sequences From Colombia and Other Countries. Mag. Colomb. Assoc. Biol. Sci. 28, 8–15.
- 67) Tripepi, G., Jager, K. J., Dekker, F. W., & Zoccali, C. (2010). Stratification for Confounding – Part 1: The Mantel-Haenszel Formula. Nephron Clinical Practice, 116(4), c317–c321. doi:10.1159/000319590
- 68) Díaz J. 2011. Guía Práctica del Curso de Bioestadística Aplicada a las Ciencias de la Salud. Instituto Nacional de Gestión Sanitaria Subdirección General de Gestión Económica y Recursos Humanos Servicio de Recursos Documentales y Apoyo Institucional Alcalá, Madrid. 1355pp
- 69) Valle A. 2017. Curvas ROC (Receiver-Operating-Characteristic) y sus aplicaciones. Universidad de Sevilla, Departamento de Estadística e Investigación Operativa. 77 pp
- 70) Cerda J, Vera C, Rada G. 2013. Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. MEDICINA BASADA EN EVIDENCIAS, Rev Med Chile 2013; 141: 1329-1335
- 71) Ochoa C. 2006. Estudios sobre pruebas diagnósticas, Revisión de los artículos pediátricos de mayor impacto y de conocimiento imprescindible para el pediatra de Atención Primaria. 13 pp

- 72) MANTEROLA C. 2009. CÓMO INTERPRETAR UN ARTÍCULO SOBRE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS. Revista médica Clínica Condes - 2009; 20(5) 708 - 717]
- 73) Bik HM, Maritz JM, Luong A, et al (2016) Microbial Community Patterns Associated with Automated Teller Machine Keypads in New York City. mSphere 1:e00226-16. doi: 10.1128/mSphere.00226-16
- 74) Montealegre I, Valbuena Y, Cortes L, Flórez A, 2008 Seroprevalencia de la toxoplasmosis y factores relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos en trabajadores de plantas de beneficio animal en cinco ciudades capitales de Colombia, NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - ISSN:1794-2470 Vol.7 No. 11 ENERO - JUNIO DE 2009:. 1-110 PÁGS. 66 - 70/ 124
- 75) Franco E. 2015. Factores Asociados a la Infección por *Toxoplasma gondii* en Carne Procedente De Plantas de Beneficio Animal con Destino Nacional Universidad Nacional De Colombia Facultad de Medicina, Instituto de Salud Pública. Bogotá, Colombia, 2015
- 76) Jeffrey L. Jones¹ and J. P. Dubey². 2012. Foodborne Toxoplasmosis. Food Safety. CID 2012:55. 845-851
- 77) da Cunha DT, de Rosso VV, Stedefeldt E (2016) Should Weights and Risk Categories Be Used for Inspection Scores To Evaluate Food Safety in Restaurants? J Food Prot.
- 78) Lee P, Hedberg CW (2016) Understanding the Relationships Between Inspection Results and Risk of Foodborne Illness in Restaurants. Foodborne Pathog Dis. doi: 10.1089/fpd.2016.2137

- 79) Shapiro K, Bahia-Oliveira , Dixon B. 2019, Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food, Food and Waterborne Parasitology <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>
- 80) Mirza A, Baltork S, Sarlak Z, Pilevar Z y Hosseini H. (2018): A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods, Pathogens and Global Health
- 81) Bayarri S, Gracia MJ, Lázaro R, Pérez C, Herrera A. 2012. *Toxoplasma gondii* in meat and food safety implications-a review. Zoonosis: InTech; 2012.
- 82) Dubey J. 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85–6% NaCl solutions at 4–20 C. J Parasitol. 1997; 83 (5):946–949.
- 83) Hill, D, Sreekumar C, Gamble H, Dubey J. 2004. Effect of Commonly Used Enhancement Solutions on the Viability of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork Loin. Journal of Food Protection, Vol. 67, No. 10, 2004, Pages 2230-2233
- 84) Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C, Sleator RI. 2008. Highpressureprocessing–effects on microbial food safety and food quality. FEMS Microbiol Lett. 2008;281(1):1–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01084.x. Epub 2008 Feb 16.
- 85) Dumetre, A., Dubey, J.P., Ferguson, D.J., Bongrand, P., Azas, N., and Puech, P.H.. 2013. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 11535- 11540

- 86) Guilera G, Gómez-Benito J, Hidalgo M, Sánchez J. 2007. Un meta-análisis del procedimiento Mantel-Haenszel en la detección del DIF en ítems dicotómicos. Anuario de Psicología 2007, vol. 38, nº 3, 431-442, Facultad de Psicología
- 87) Cobo E, González J, Cortés J, Bielsa N 2014. Bioestadística para no estadísticos, Capítulo 17: Confusión: Causas relacionadas implica efectos confundidos. Universidad Politécnica de Cataluña. Pp 45
- 88) Lora F, Marin C, Loango N, Gallego M, Torres E, Gonzalez M, Castaño J and Gómez J. 2002. Giardiasis in children living in post-earthquake camps from Armenia (Colombia). BMC Public Health, <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/2/5> pp6
- 89) EL-Tras W, Tayel A and El-Kady N. 2011. Source Diversity of *Toxoplasma gondii* Infection during meal preparation jfs_336 1. Journal of Food Safety ISSN 1745-4565
- 90) Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga JD, Gomez-Marin JE (2016) Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. Parasitol Res 115:1789–1797.
- 91) Perez J, et all. 2006. Prevalencia de anticuerpos *Toxoplasma gondii* en cuatro especies en cuatro especies de consumo humano en Caldas Colombia. Biosalud, Volumen 5 enero diciembre 2006 pg 33, agosto 2006
- 92) Tovar G, León J, 2014. Prevalencia de *Toxoplasma gondii* en cerdos a nivel latinoamericano: revisión de literatura. Porcicultura Colombiana ed 191 agosto 2014. Pp 29-33

- 93) Opsteegh M, Maas M, Schares G, van der Giessen J. 2016 Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01). EFSA supporting publication 2016:EN-996. Pp294
- 94) Lora F, Aricapa H, Perez J, Idarraga S, Mier D, Gomez JE, 2007 Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. Infectio 2007; 11(3): 117-123
- 95) Franco E, Acosta A, Cortes J, Gómez JE. 2016. Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. 2015. Parasitology Research, 2016 volume 115, Issue 2 pp 691-695
- 96) Kijlstra Aize, Jongert Erik.. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. Elsevier , 2008. www.elsevier.com
- 97) López C, Díaz J y Gómez-Marín J. 2005. Factores de Riesgo en mujeres embarazadas, infectadas por *Toxoplasma gondii* en Armenia-Colombia. Revista Salud pública. 7(2): 180-190, 2005
- 98) Pérez J, Villada J, Naranjo O, Castaño S. 2011. Formas Alternas de transmisión de *Toxoplasma gondii*. Biosalud, Volumen 10 No. 2, julio - diciembre, 2011. págs. 123 – 137
- 99) Dubey J. 2004. Toxoplasmosis a waterborne zoonosis. Veterinary Parasitology 126 (2004) 57–72. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.005

- 100) Sharif M, Sarvi S, Pagheh AS, et al. The efficacy of herbal medicines against *Toxoplasma gondii* during the last 3 decades: a systematic review. *Physiol Pharmacol*. 2016;94(12):1237–1248.
- 101) Betancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol*. 2004;126(1–2):219–234.
- 102) U.S. Environmental Protection Agency. Combined sewer overflow technology fact sheet: chlorine disinfection. Washington, D.C.: Office of Water; EPA-832-F- 99-034. 1999.
- 103) Banach JL, Sampers I, Van Haute S, et al. Effect of disinfectants on preventing the cross-contamination of pathogens in fresh produce washing water. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(8):8658–8677. PubMed PMID: PMC4555240.
- 104) De Moura L, Garcia Bahia-Oliveira LM, Wada MY, et al (2006) Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis* 12:326–329. doi: 10.3201/eid1202.041115
- 105) Lora-Suarez F, Rivera R, Triviño-Valencia J, Gomez-Marin JE (2016) Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Res* 100:377–381. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.038
- 106) Robertson LJ (2016) Parasitic protozoa in salad vegetables. In: *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. pp 69–88
- 107) Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga JD, Gomez-Marin JE (2016) Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitol Res* 115:1789–1797. doi:

10.1007/s00436-016-4917-5

- 108) Wainwright K, Lagunas-Solar M, Miller M, et al. Radiofrequency-induced thermal inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Zoonoses Public Health*. 2010;57(1):74–81. Finch G, Black E, Gyürék L, et al. Ozone inactivation of *cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59 (12):4203–4210.
- 109) Huifanga D, Swarta A, Yongningb, Xiaoweib L, Jianhuac L, Mingyuanc L, Opsteegha M, van der Giessen J. 2019. Quantitative risk assessment of meat-borne *Toxoplasma gondii* infection in the mainland of China *Microbial Risk Analysis*
- 110) Forero Torres Y, Galindo Borda M, Ramírez G. 2017. Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. *Revista Chilena de Nutricion Vol. 44, Nº 4, 2017. Pp 325- 332*
- 111) Instituto Colombiano de Bienestar familiar. 2015. *Tabla de coposición de alimentos colombianos. Segunda edición 2015. Pp 320*
- 112) Ministerio de la Protección Social Colombia. RESOLUCION 683 de marzo 30 de 2012. Por medio de la cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los materiales, objetos, envases y equipamientos destinados a entrar en contacto con alimentos y bebidas para consumo humano.
- 113) Pappas G, Roussos N, Falagas M. 2009. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for

pregnancy and congenital toxoplasmosis. International Journal for Parasitology 39 (2009) 1385–1394

- 114) Pérez J, Villada Gómez J, Naranjo Pérez O, Castaño S. 2011. FORMAS ALTERNAS DE TRANSMISIÓN DE TOXOPLASMA. Biosalud ISSN 1657-9550

Anexos

Anexo 1 consentimientos

Encuestas padres de familia

ENCUESTA PADRES DE FAMILIA
UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
Proyecto 11356934687 COLCIENCIAS

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

Encuesta No _____ Fecha _____ (dd/mm/aa)

Institución: _____
Nombre: _____
Número de identificación: _____
Fecha de nacimiento: _____
Teléfono: _____
Dirección: _____

VALORACIÓN ANTROPOMÉTRICA

Edad (meses) _____ Peso (kg) _____ Altura (cm) _____

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

- Lugar de residencia: Urbana ___ Rural ___
- Escolaridad de la madre: años aprobados de la madre _____
- Su hijo/a consume agua: De la llave (sin hervir) ___ Hervida ___ Envasada (botella o bolsa) ___
Filtrada (ozono): ___ De río/quebrada: ___
- Los jugos que consume su hijo/a se preparan con agua: De la llave (sin hervir) ___ Hervida ___
Embasada (botella o bolsa) ___ Filtrada (ozono): ___ De río/quebrada: ___
- Su hijo/a lleva refrigerio (lanchera): si ___ no ___
- Si su respuesta es sí, que lleva de refrigerio?

- Agua con la que lava las frutas y vegetales: Agua hervida ___ Agua cruda ___ Agua con hipoclorito ___
Agua con sal ___ Agua con limón ___ Otros ___ Cuales? _____
- Contacto con gatos: Actualmente tiene gatos en la casa ___ Tiene visitas de gatos extraños ___
Tenía gato antes: _____
- Hace cuanto tiempo: _____ (meses)
- Edad del gato: Menos de 6 meses _____ Entre 6 meses y 8 años _____ Más de 8 años _____
- Tipo de contacto con que si hijo tiene con el gato: Los acaricia ___ Duarme con ellos ___
Le da la comida ___ Asea la caja de arena _____
- Donde hace las necesidades el gato: Fuera de la casa ___ En cualquier lugar de la casa ___
En una caja de arena _____
- Tiene otros animales en la casa: Si ___ No ___ Cuales _____
- Perros: Si ___ No ___

- Consumo de carne de su hijo/a: Res ___ Cerdo ___ Aves ___ Pescado ___ Ninguna ___
Otra ___ Cual? _____
- Cual es el tipo de carne que mas consume su hijo/a: Res ___ Cerdo ___ Aves ___
Pescado ___ Ninguna ___ Otra ___ Cual? _____
- Termino de la carne: Bien cocida ___ A medio cocer ___ Cruda ___
- Su hijo/a come fuera de su casa: Si ___ No ___ Veces/mes: _____
- Su hijo/a ha estado enfermo/a en los ultimos tres meses: Si ___ No ___ De que: _____
- Su hijo/a presentado algunos de los siguientes sintomas actualmente: Fiebra ___ Escalofrio ___
Dolor de garganta ___ Erupción ___ Ganglios ___
Otros ___ Cuales: _____
- Cuantos episodios de diarrea ha presentado su hijo/a en los ultimos 6 meses (si no ha tenido marque 0):

- Durante su embarazo, le realizaron examen de toxoplasmosis: Si ___ No ___ No recuerda ___
- Cual fue el resultado en la prueba de toxoplasmosis: IgM positivo ___ IgG positivo ___ Negativo
para ambos ___ No recuerda ___
- Realiza actividades de jardineria o agricultura: Si ___ No ___
- Utiliza guantes para esta actividad : Si ___ No ___

MANIPULACIÓN ALIMENTOS

- Material de la tabla de picar vegetales: Plastico ___ Madera ___ Otros ___ Cuales? _____
- Material de la tabla de picar carne: Plastico ___ Madera ___ Otros ___ Cuales? _____
- 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 ___ Cuales? _____
- Tipo de fruta utilizada en los jugos: Pulpa de fruta empacada ___ Fruta completa sin procesar ___
Otros ___ Cuales? _____
- 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? _____
- Procedencia de los alimentos: Plaza de mercado ___ Supermercado ___ Mercado ambulante ___ Otros
___ Cuales? _____

Consentimiento informado

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPANTES 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 Velez B.S.c
Gloria Deicy Muñoz B.S.c

Invitación a participar

Antes de tomar la decisión de permitir que su hijo/a participe 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 apruebe la participación de su hijo/a 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 de su hijo es voluntaria. Usted puede rehusarse a participar, o puede retirar su consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo.
- Si desea que su hijo 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 gepamol2@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.

Procedimiento del estudio

En este estudio tomara una única muestra de sangre de 20 mL a través de punción venosa, lo cual será realizado por un auxiliar del laboratorio clínico del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, el procedimiento representa un riesgo mínimo, además se realizará una toma de muestra coprológica, la cual será tomada por los padres en sus hogares, para ello se le proporcionará el recipiente correspondiente. La muestra de sangre será procesada para realizar pruebas serológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis y la muestra de coprológico será procesada para realizar identificación de parásitos en las heces. Los resultados arrojados por esta prueba se le entregarán al participante y en caso de ser positivos para la enfermedad, serán enviados al médico experto del Centro de Salud de la Universidad, quien realizará un diagnóstico completo y determinará si debe iniciar algún tipo de tratamiento. Si se detectan parásitos en las muestras coprológicas, se les proporcionará el tratamiento correspondiente de forma gratuita.

¿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 usted 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 usted estaría aportando al beneficio de la población en general. Además, Su participación en el estudio le proporcionará información sobre su estado serológico para la toxoplasmosis, lo cual le permitirá iniciar un tratamiento dependiendo del estadio de la enfermedad y según lo considere el médico experto del Centro de Salud de la Universidad. Si se encuentra algún patógeno en su examen coprológico usted recibirá tratamiento sin totalmente gratis. 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.

¿Usted presentará alguna afectación negativa por participar en el estudio?

Su participación en el estudio no afectará en ninguna medida su integridad personal, todos los procedimientos serán realizados por personal experto en el área y estas actividades presentan un nivel de riesgo mínimo. Los resultados de la muestra coprológica solo serán entregados personalmente y no se reportará ningún resultado a la institución. Además, los resultados encontrados en este estudio no darán lugar a ninguna medida sancionatoria o disciplinaria.

Sus derechos como participante:

Si usted decide que su hijo participe 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 que su hijo participe en el presente estudio, los resultados obtenidos serán confidencialmente manejados por el grupo de investigación GEPAMOL y archivo del Centro de Investigaciones Biomédicas.

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

La participación de su hijo es voluntaria y usted puede negarse a participar, o retirarse del estudio en cualquier momento. Si usted decide suspender la participación de su hijo 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 _____ tutor o representante legal del menor con nombre _____, con identificación No _____, voluntariamente acepto que mi hijo/a participe en este estudio. En constancia, firmo este documento de Consentimiento informado, en presencia de un investigador del estudio y dos testigos, en la ciudad de Armenia el día ____ del mes de _____ del año _____.

Nombre completo, firma y documento de identidad del tutor o padre del menor quien acepta que su hija/o participe en el estudio.

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: _____

Consentimiento para instituciones

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 Velez 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 gepamol2@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 tomarán 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 Marín, 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: _____

Autorización tratamiento de datos

AUTORIZACION TRATAMIENTO DE DATOS PERSONALES

En los términos de la Ley 1581 de 2012 manifiesto expresamente que autorizo, de manera libre, previa y voluntaria al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, a dar el tratamiento de los datos suministrados por mí a través de este formulario, para que en desarrollo de sus funciones propias como centro de investigaciones sean tratados para fines de investigativos. Mis derechos como titular del dato son los previstos en la Constitución y la ley, especialmente el derecho a conocer, actualizar, rectificar y suprimir mi información personal, así como el derecho a revocar el consentimiento otorgado para el tratamiento de datos personales. Son datos sensibles, aquellos que afectan la intimidad del Titular o cuyo uso indebido puede generar discriminación, por ejemplo la orientación política, las convicciones religiosas o filosóficas, de derechos humanos así como los datos relativos a la salud, a la vida sexual y los datos biométricos, estos serán tratados de acuerdo a la ley y de acuerdo con el Manual de Calidad del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío y con la confidencialidad propia de los mismos.

Si
No

Firma:

Nombre: _____

Cédula N°:

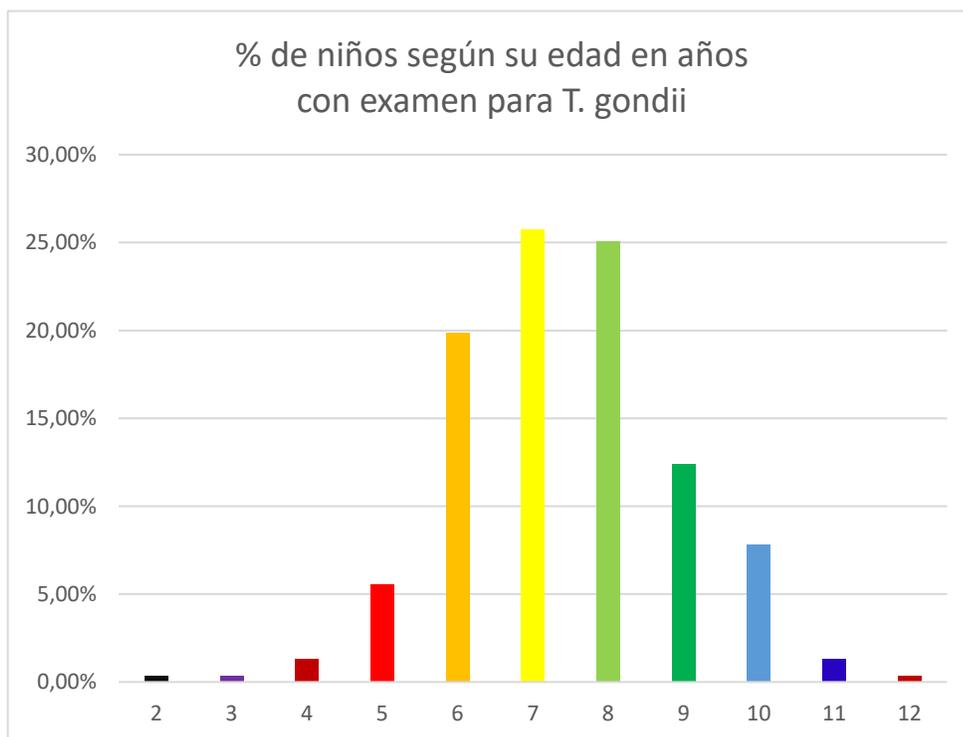
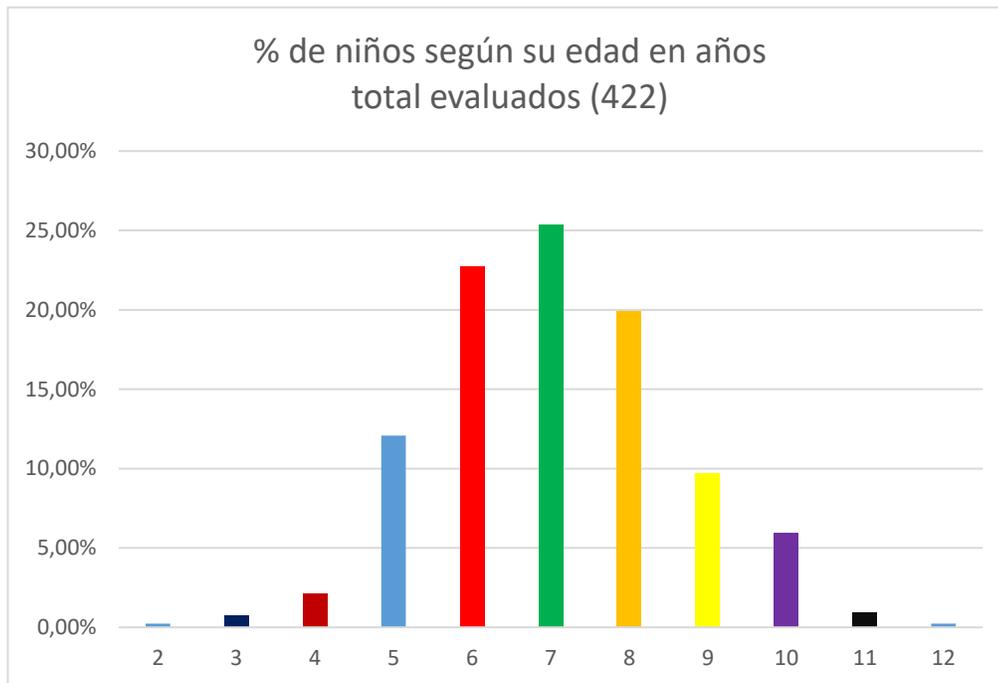
Fecha: _____ (Día/mes/año)

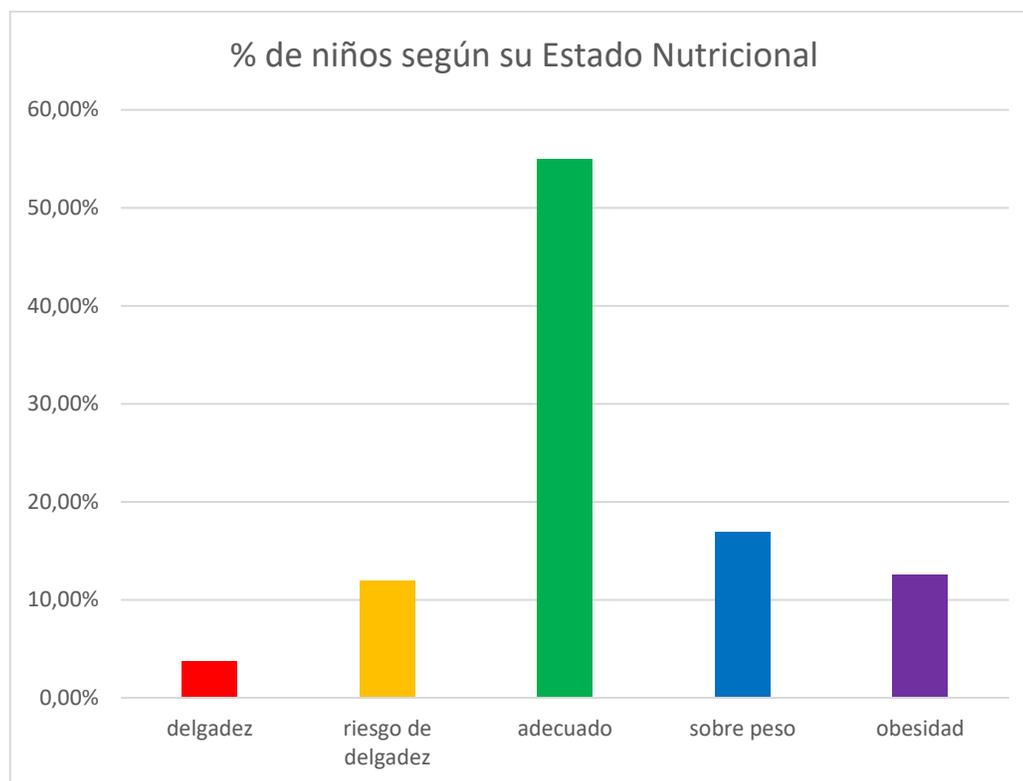
Anexo 2 Formato para la inspección sanitaria para el restaurante escolar

FORMATO DE INSPECCIÓN SANITARIA

Servicio de Alimentación – Colegios:

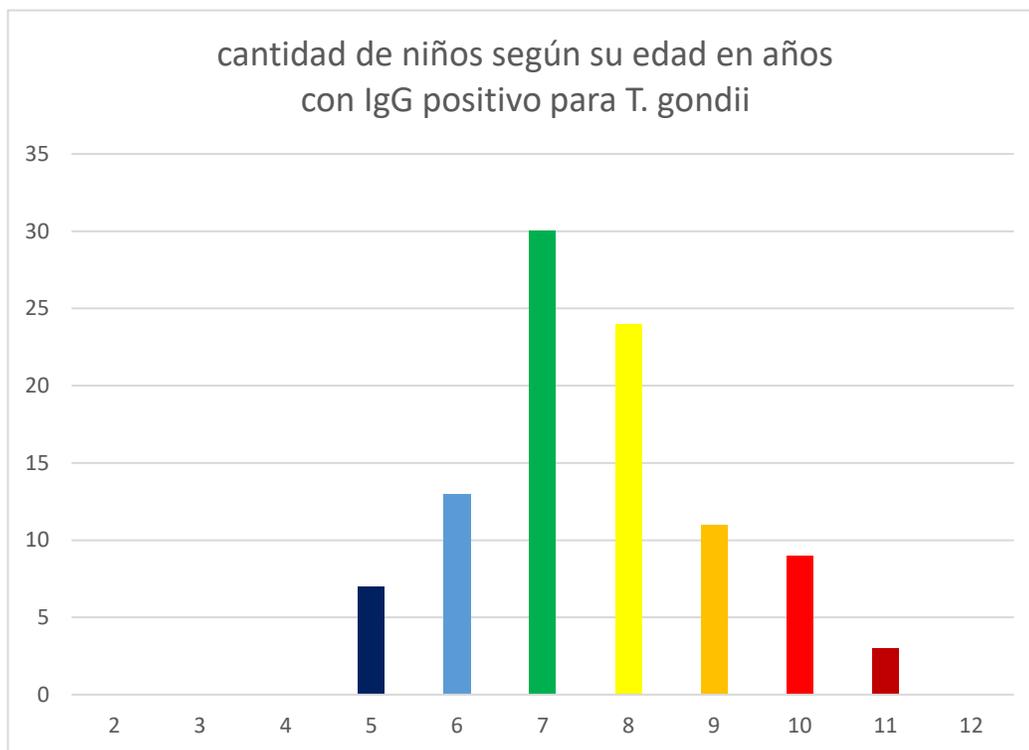
ASPECTOS A VERIFICAR	Operario 1	Operario 2	Operario 3	Operario 4	Promedio	OBSERVACIONES
Hábitos Higiénico Sanitarios						
Instalaciones físicas						
Material de los mesones de la cocina						
Material de las paredes y techo de la cocina						
Material del piso de la cocina						
Condiciones de Proceso						
Material de la tabla de picar vegetales						
Material de la tabla de picar carne						
Utiliza diferente tabla de picar para vegetales y carne						
Temperatura de almacenamiento de vegetales (°C)						
Temperatura de almacenamiento cárnico						
Procedencia de los alimentos						
Tipo de fruta utilizada en los jugos						
Material de recipientes para almacenar la comida preparada						
Condiciones de saneamiento						
Abastecimiento de agua						
Tanque de reserva de agua						
Veces al año en que se realiza limpieza y mantenimiento del tanque de reserva						
Agua con la que lava los vegetales						
Agua que utilizan para la preparación en los jugos						
Limpieza y Desinfección						
Frecuencia de lavado de manos durante la preparación						
Se lava las manos después de la manipulación de productos cárnicos						
Sustancias Utilizadas en la limpieza y desinfección de superficies						
Sustancias utilizadas en la limpieza y desinfección de implementos de cocina						
Frecuencia con la que cambia la esponja del lavaplatos						
Frecuencia con la que lava la nevera						
Momento de realización de la limpieza de la cocina						
Personal Manipulador de Alimentos						
Implementos de bioseguridad que utiliza						
Frecuencia con la que recibe capacitación al año						
Experiencia laboral de los manipuladores						
Escolaridad alcanzada						

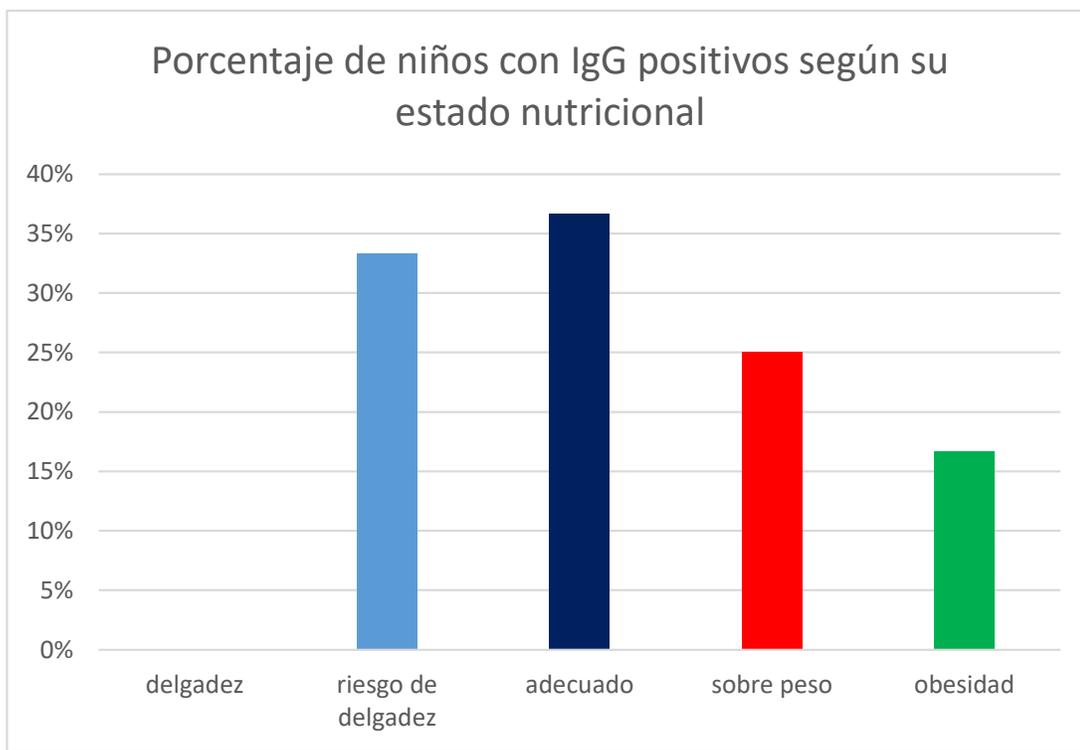
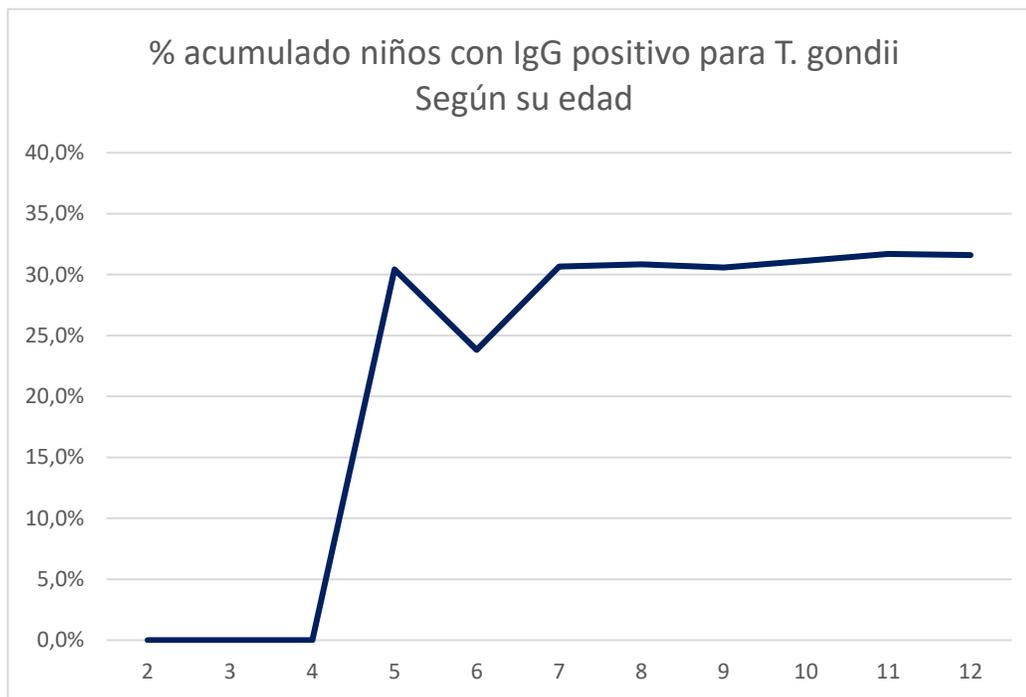
Anexos 3 Estado Antropométrico de los niños evaluados

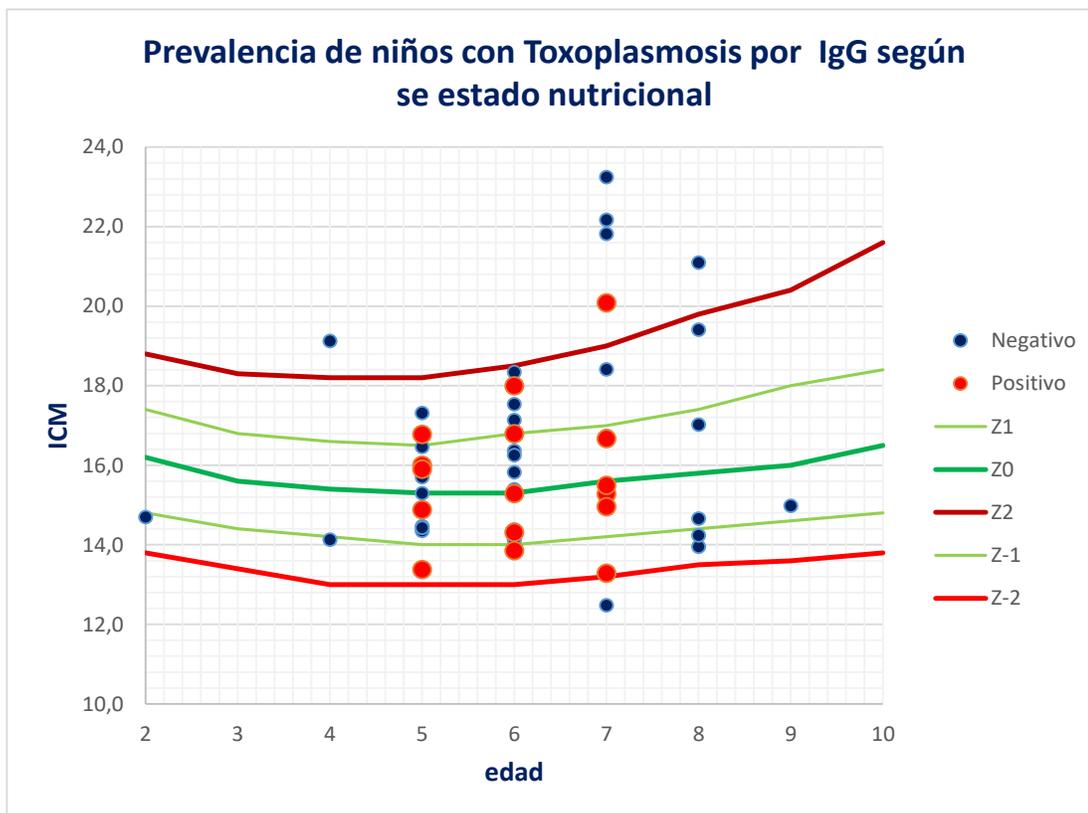


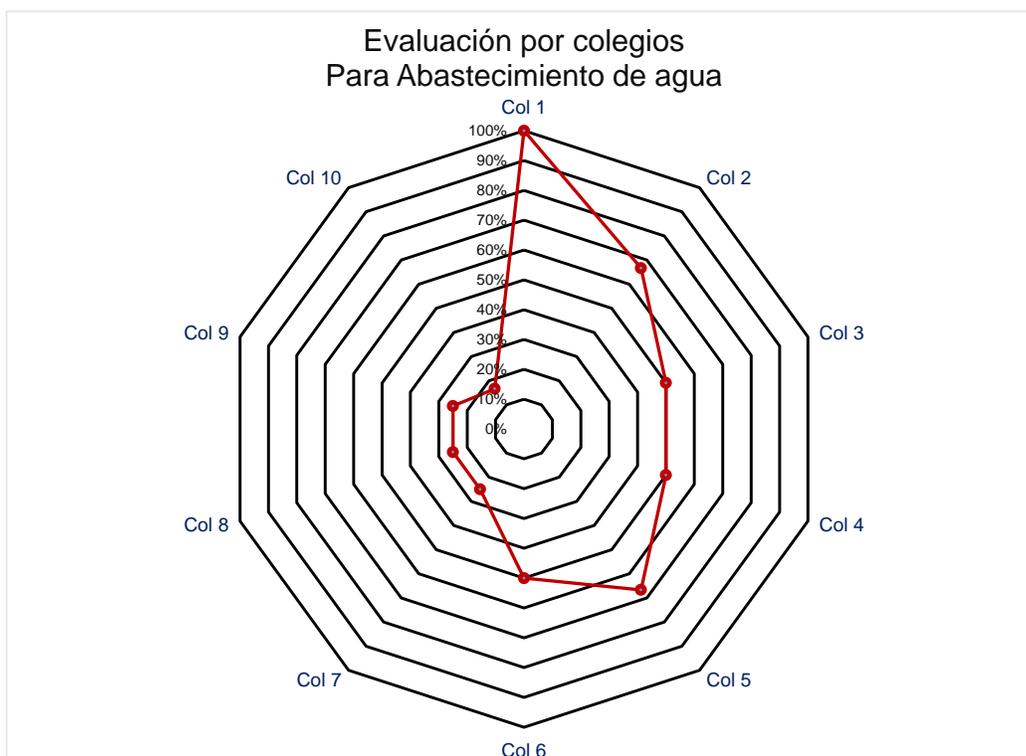
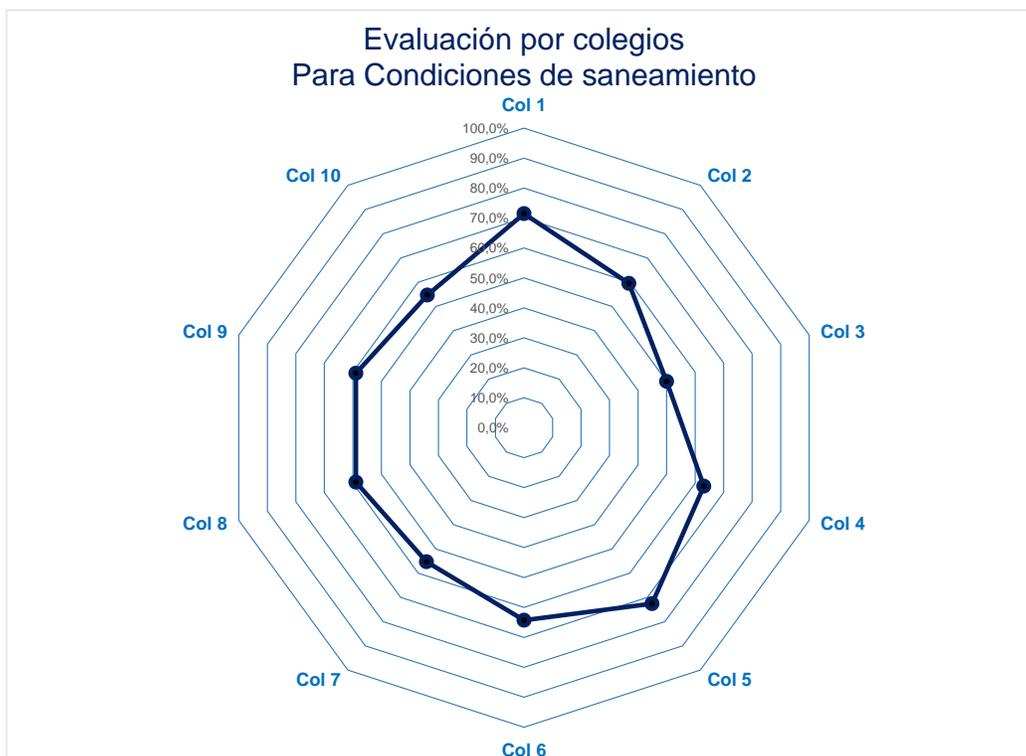
Anexos 4 edad de los niños con muestra positiva para anticuerpos positivos para *Toxoplasma gondii*

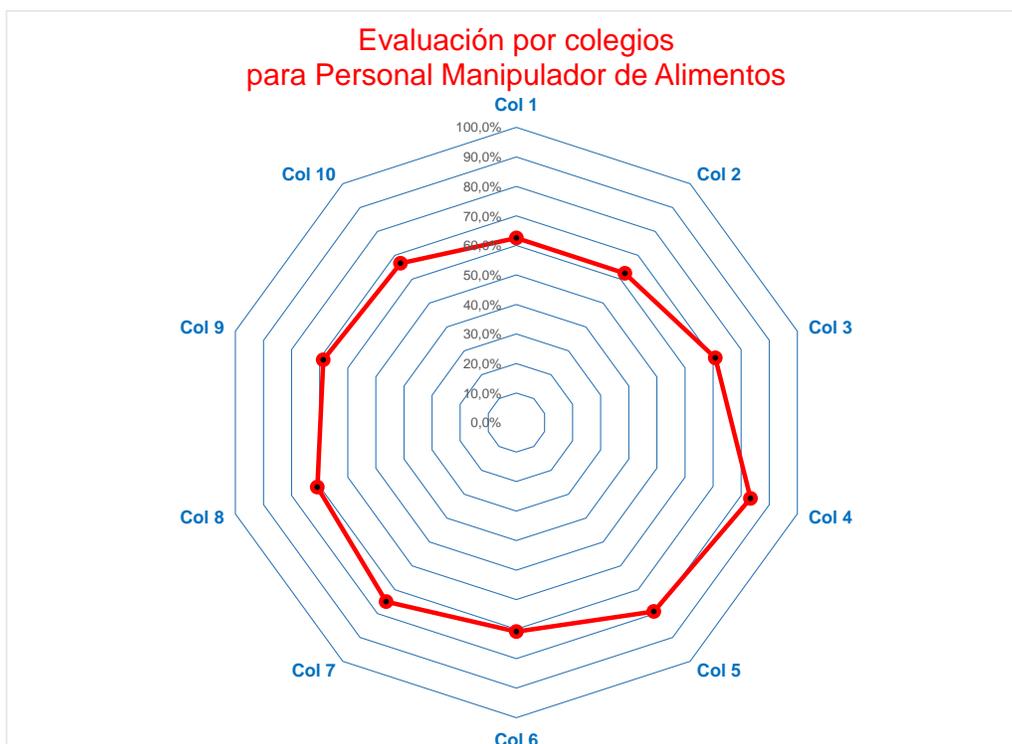
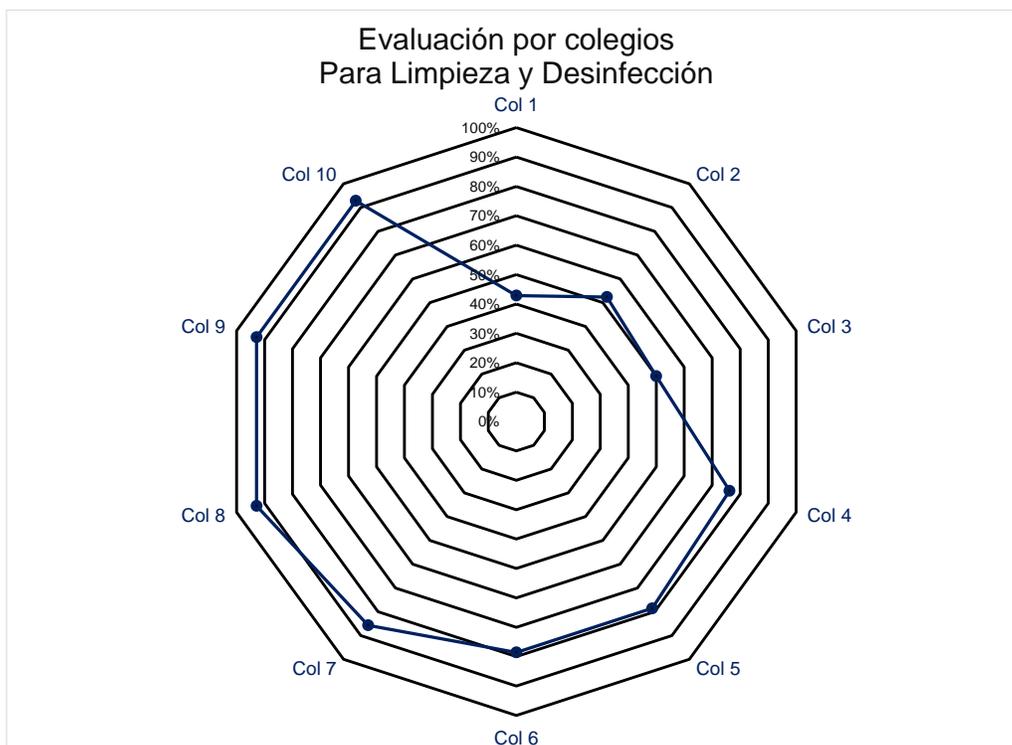










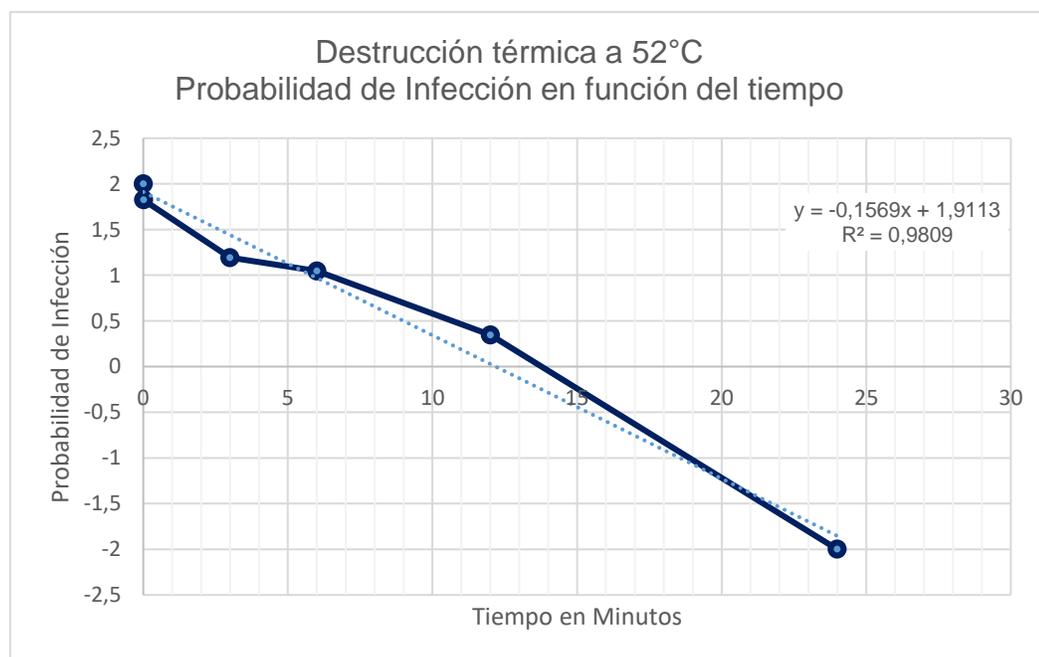
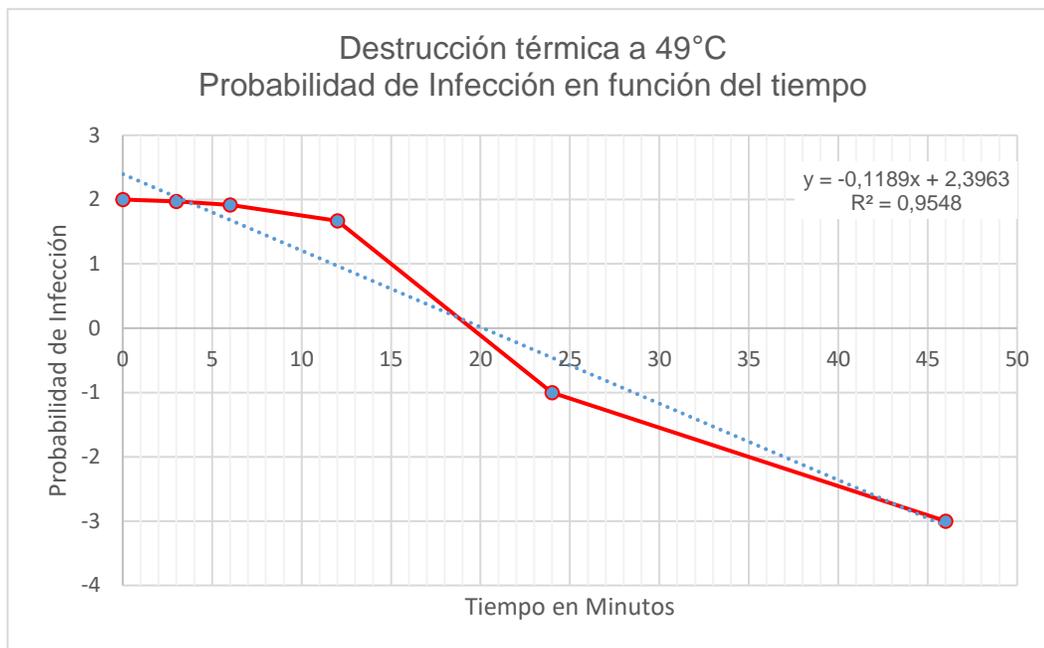


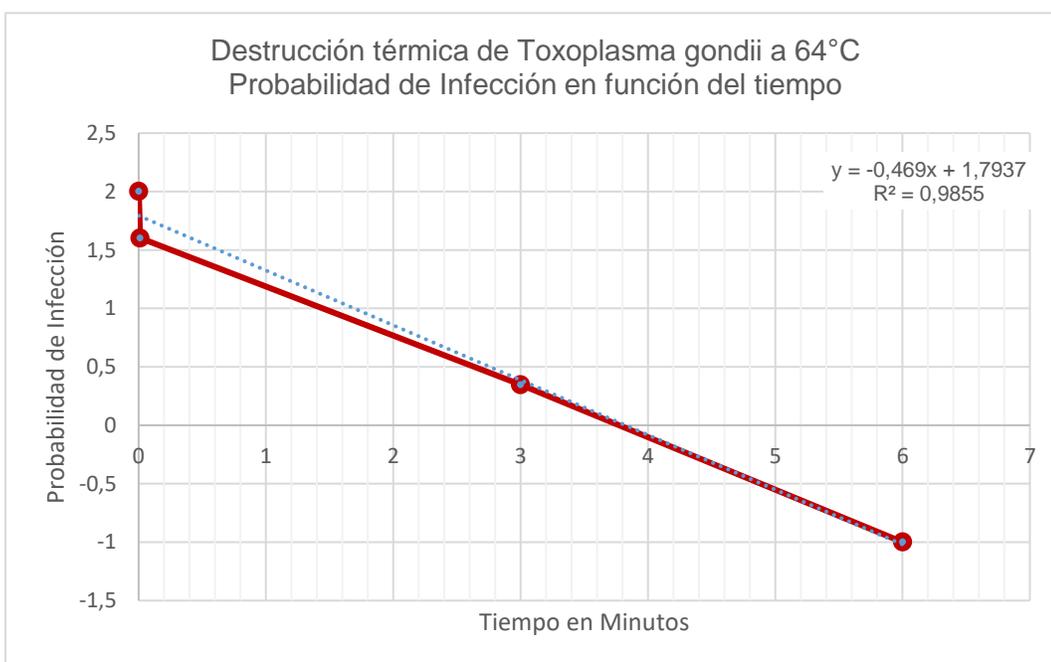
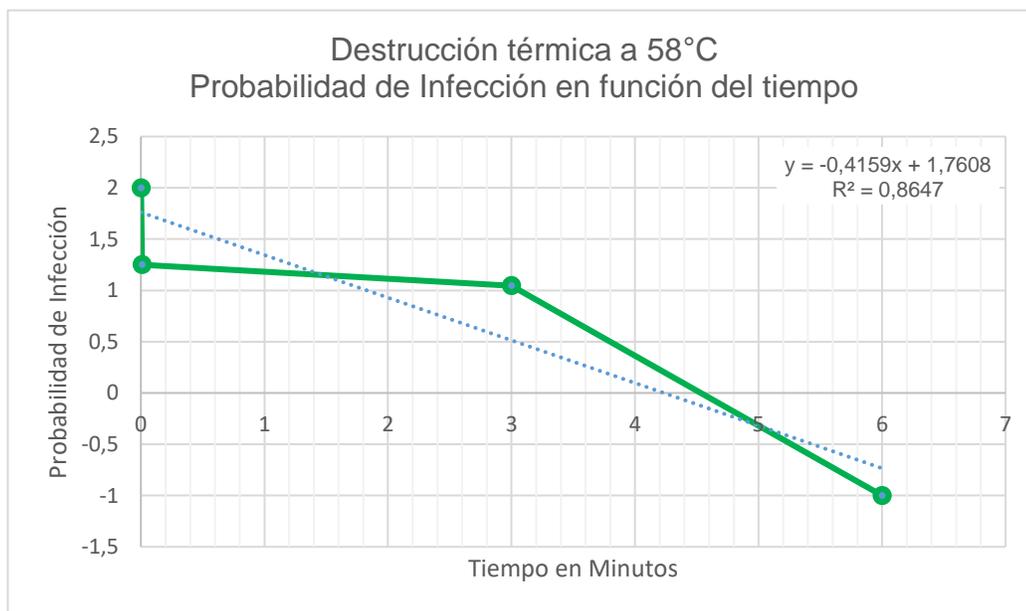
Anexos 6 Muestra de alimentos evaluados por colegio y reporte de presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en la muestra

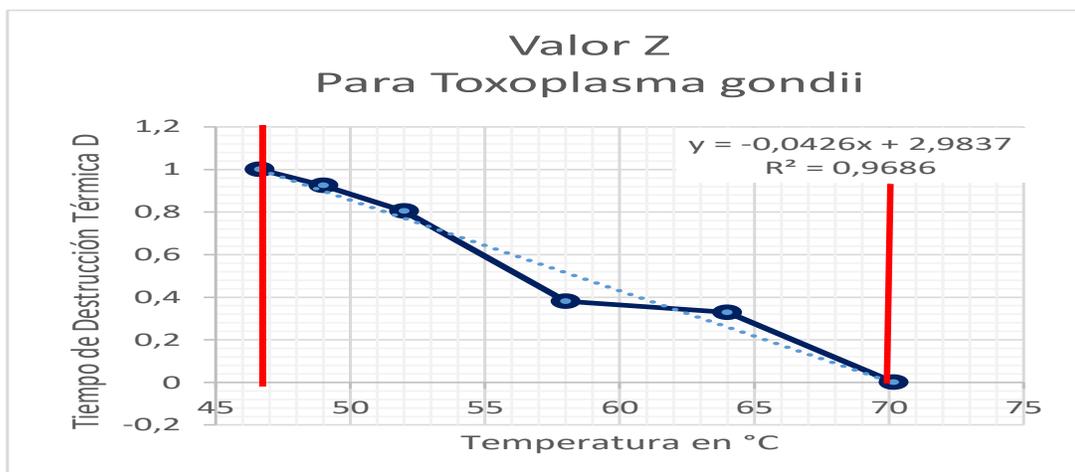
Numero de muestra evaluadas por alimentos y numero de muestras positivos para presencia de ADN de *Toxoplasma gondii*

colegio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
muestra alimentos	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	90
positivas	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
carnes	3	3		3	3	3		3	3		21
positivas	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
huevo			3				3			3	9
positivas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
vegetales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	30
positivas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
jugos	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	30
positivas	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
muestra agua	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40
positivas	0	0	2	1	0	0	0	0	0	1	4
agua para el jugo	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	30
positivas	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
agua del grifo	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
positivas	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
superficies	11	9	9	11	7	6	5	10	7	8	83
positivas	0	0	2	1	0	0	0	1	1	1	6
superficies inertes	7	6	6	8	4	3	2	7	5	5	53
positivas	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	3
superficies vivas	4	3	3	3	3	3	3	3	2	3	30
positivas	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	3

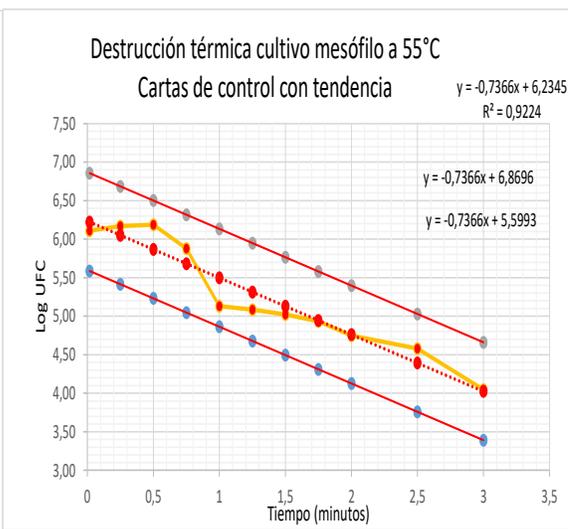
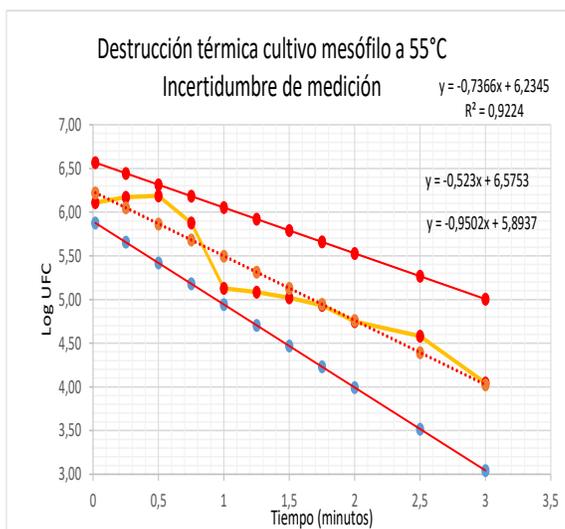
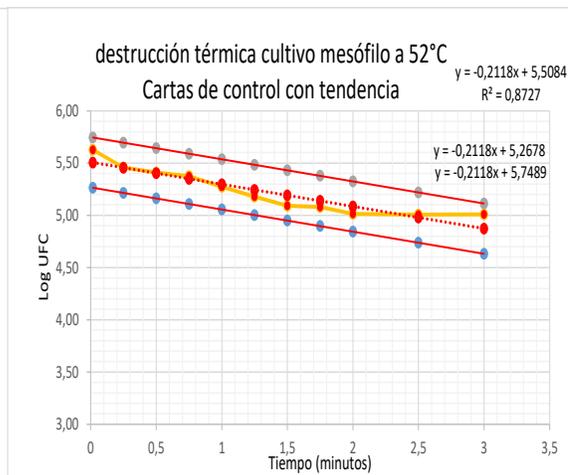
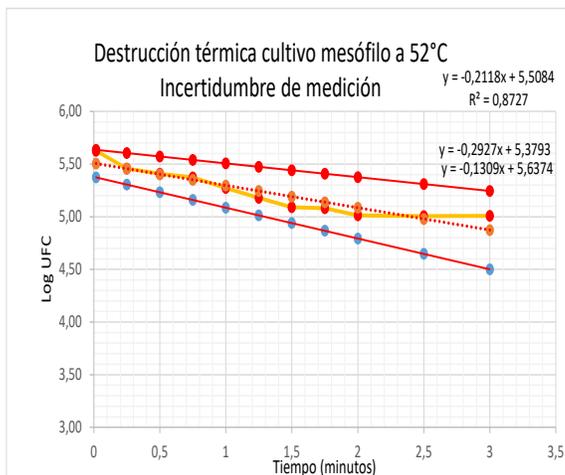
Anexos 7 Curvas de Tiempo de Destrucción térmica para el *Toxoplasma gondii* a 49, 52, 58 y 64°C

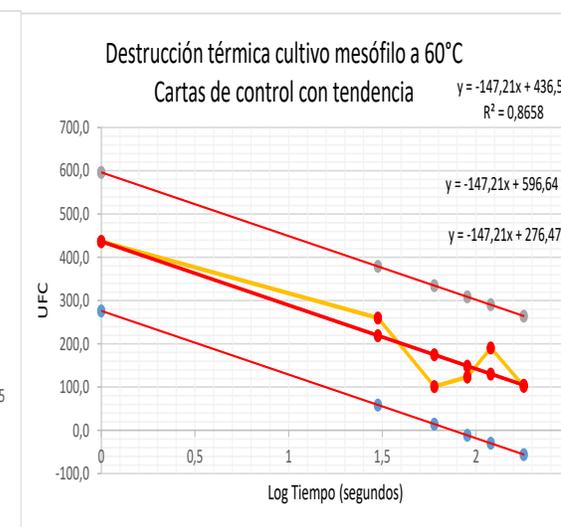
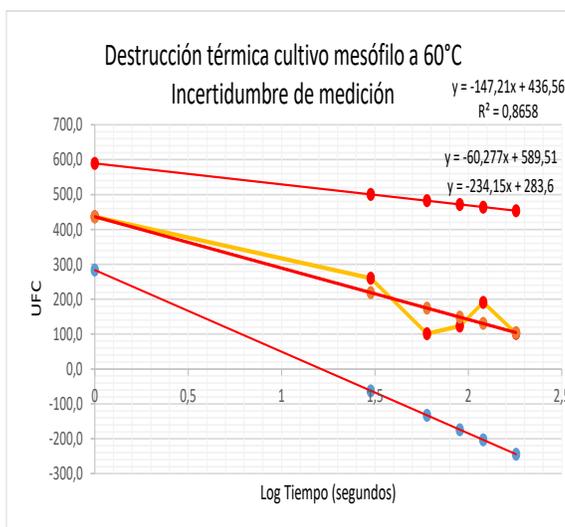
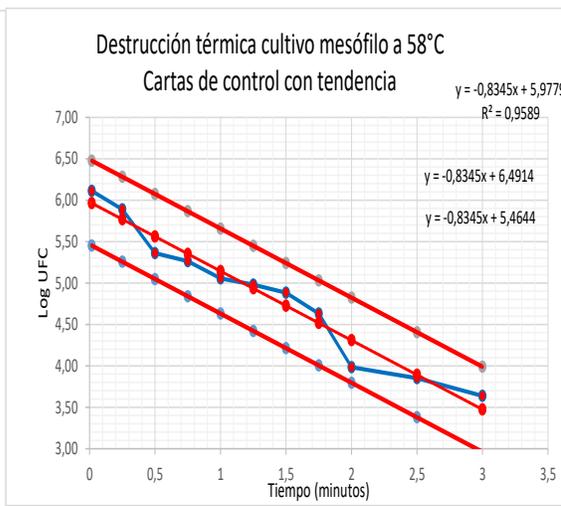
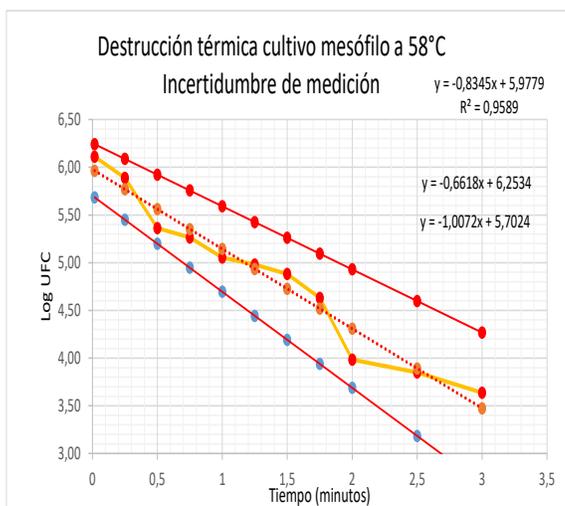


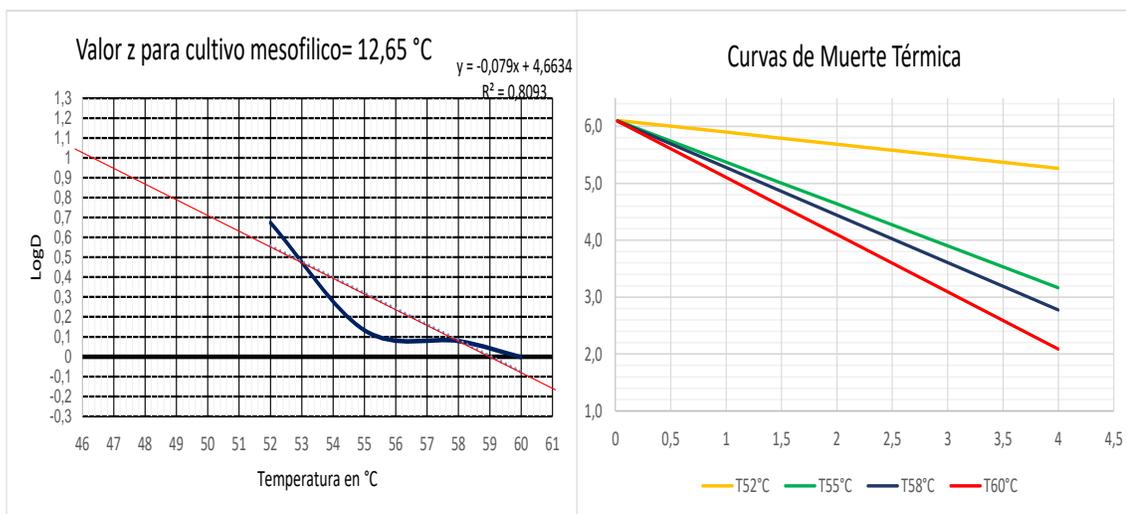




Anexo 8 Análisis Destrucción térmica Cultivo mesófilo



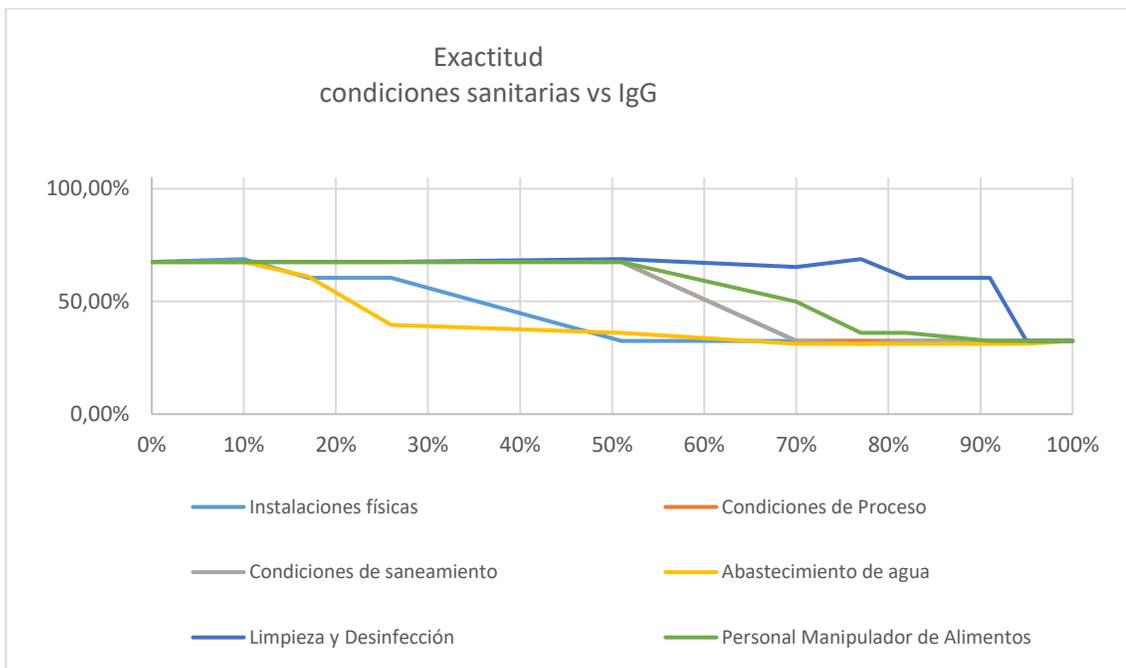
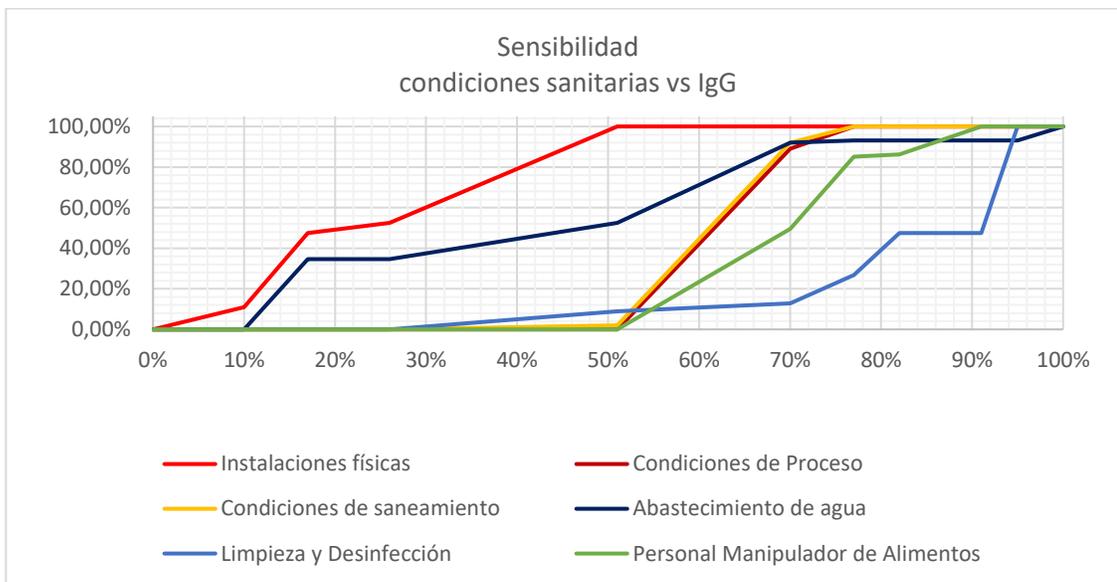


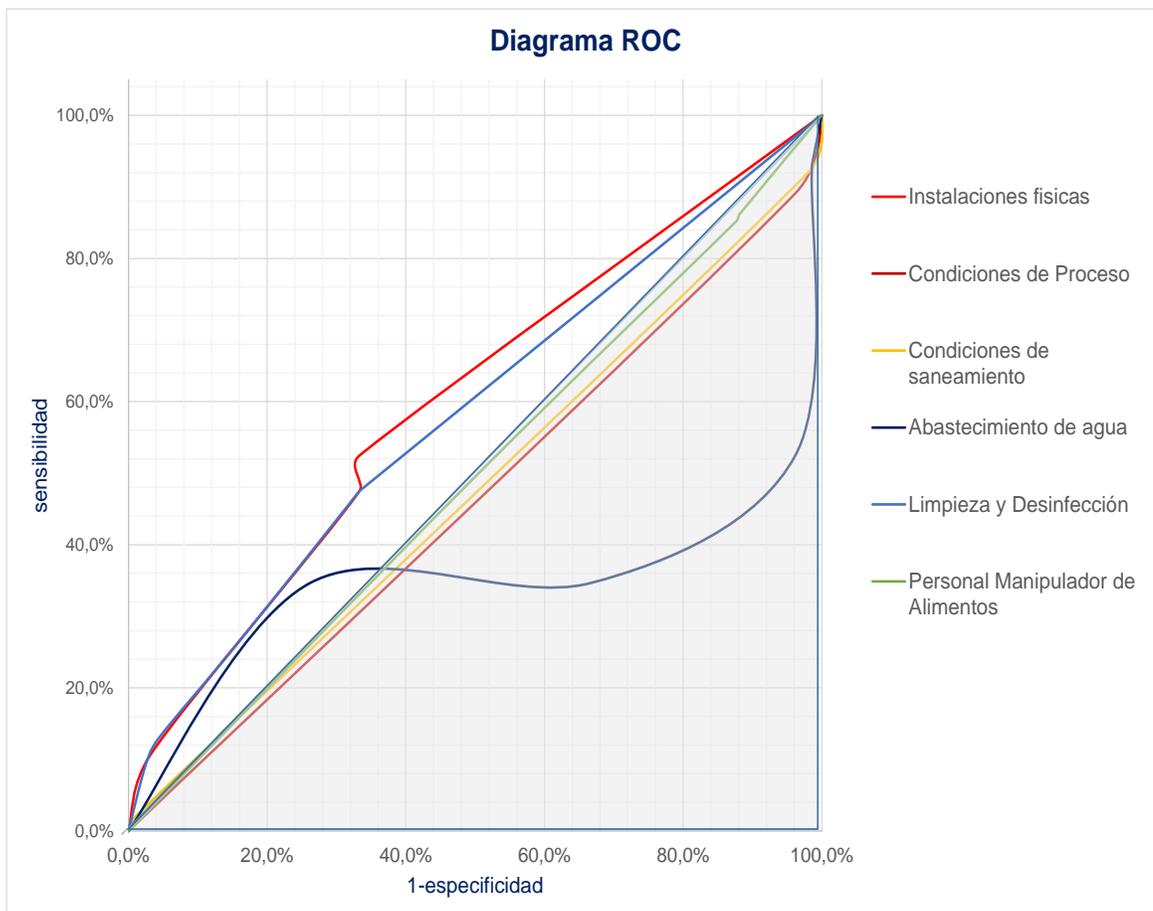
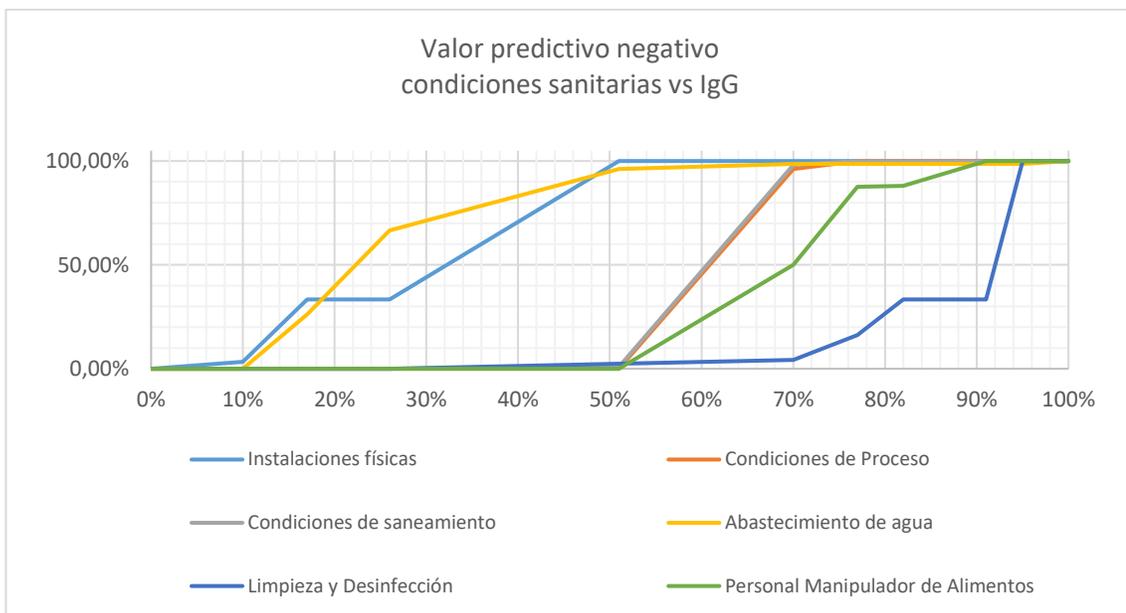


Valores de tiempo de muerte térmica para cultivo mesófilo

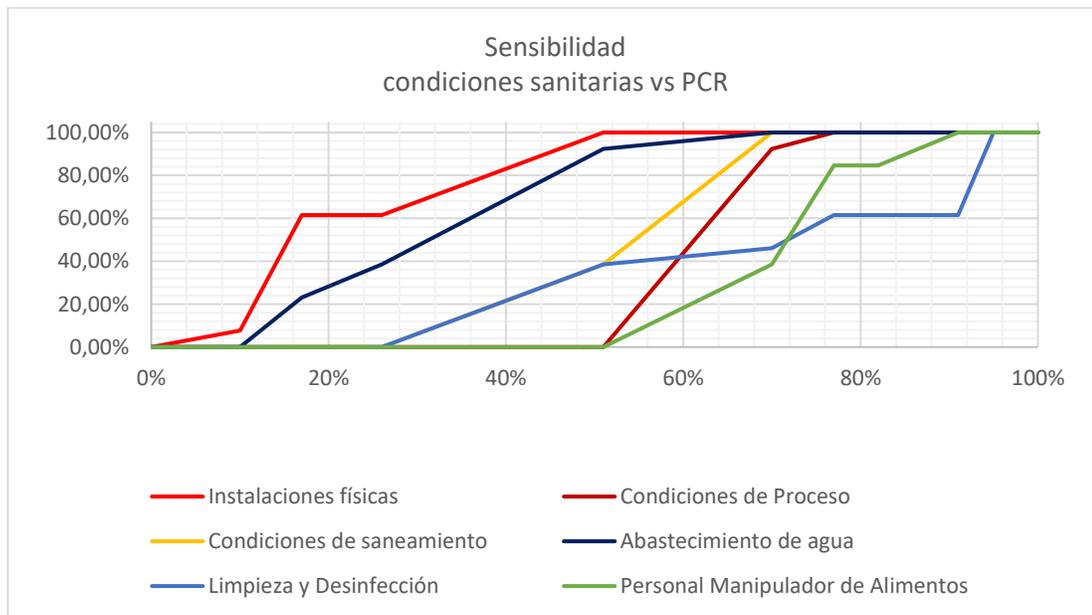
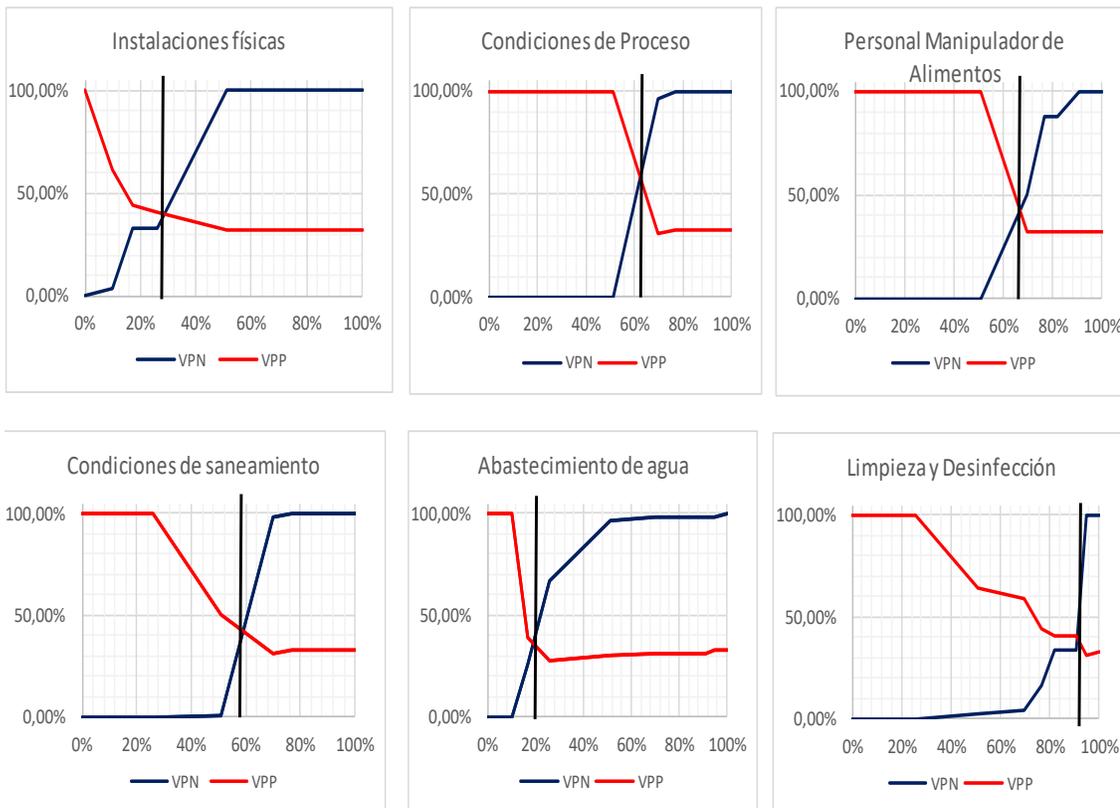
Temperatura	Valor D	ecuación	R2	U
52°C	4,72	$Y = -0,21X + 5,5$	0,87	$\pm 0,08$
55°C	1,36	$Y = -0,74X + 6,2$	0,92	$\pm 0,21$
58°C	1,20	$Y = -0,83X + 6,0$	0,96	$\pm 0,17$
60°C	0,99	$Y = -1,01X + 6,25$	0,80	$\pm 0,57$

Anexos 9 Curvas para evaluación de pruebas diagnosticas

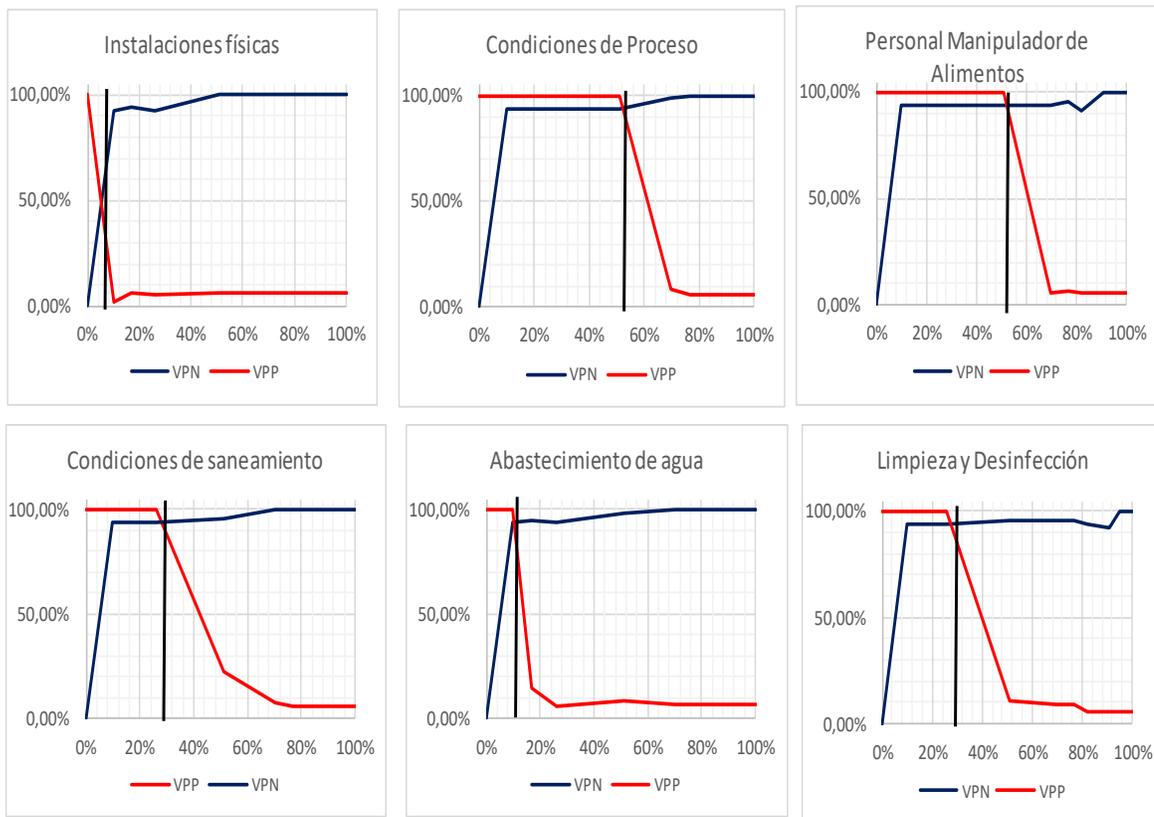




Elección punto de Corte condiciones higienico-sanitarias vs IgG

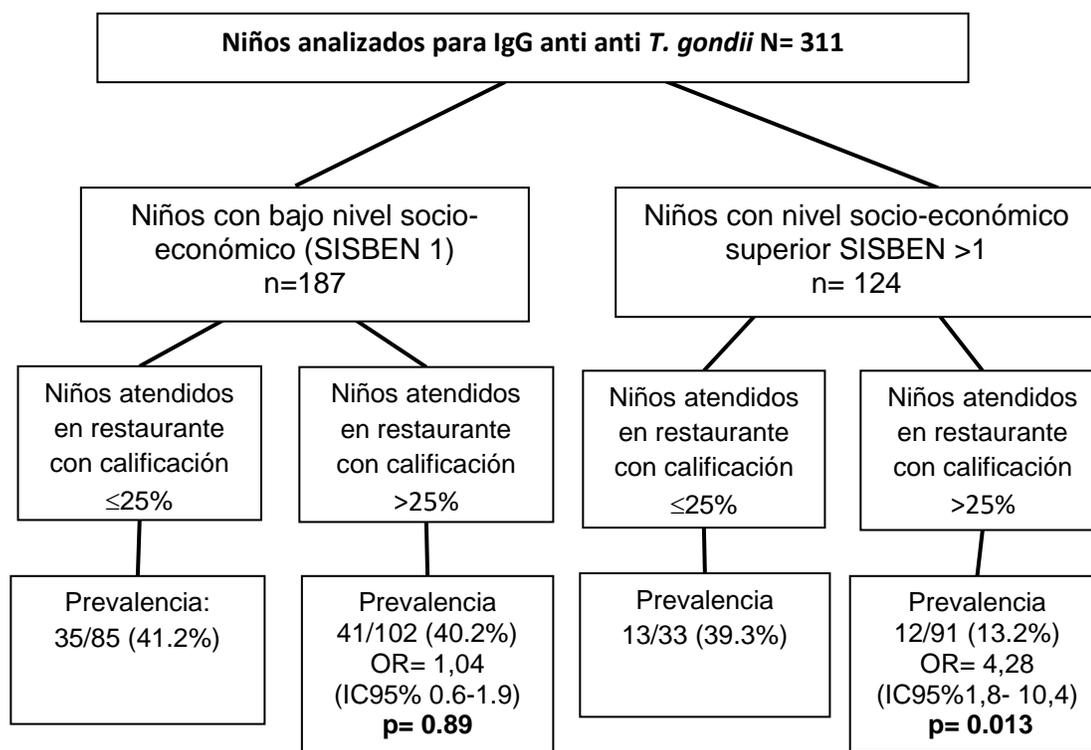


Eleccion punto de Corte condiciones higienico-sanitarias vs IgG

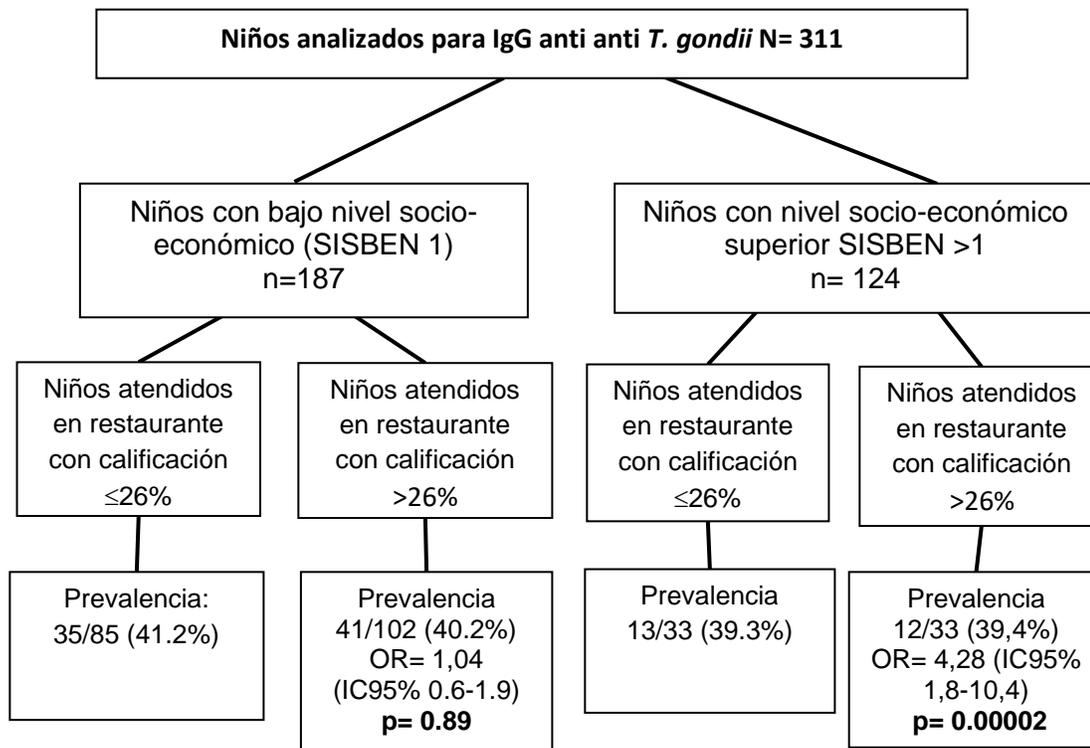


Anexo 10 Análisis estatificado

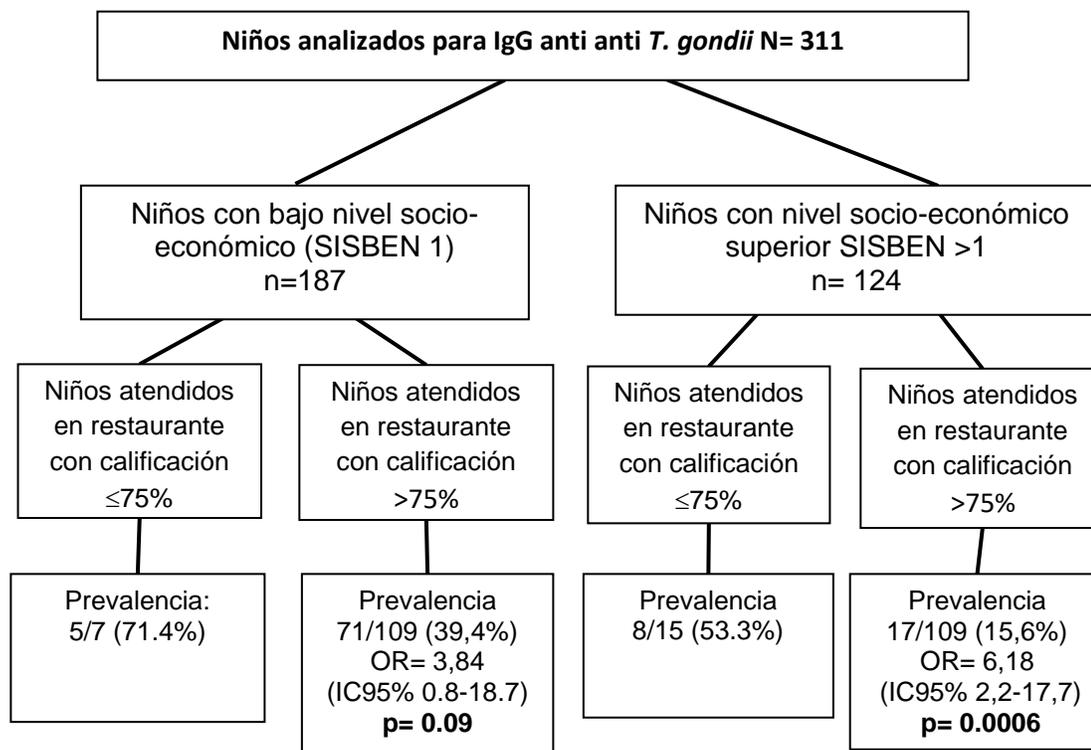
Para bajo condición socio-económica para niños atendidos en restante escolar con calificación inferior $\leq 25\%$ para infraestructura física según prevalencia anti *T. gondii* IgG



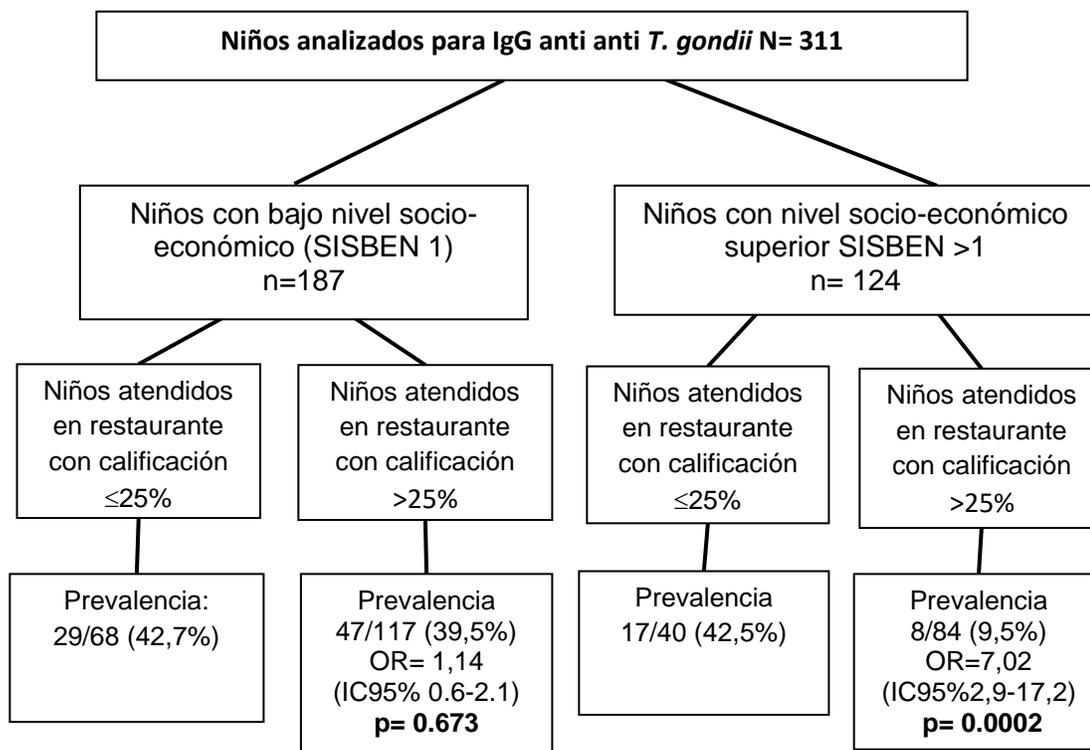
Para bajo condición socio-económica para niños atendidos en restante escolar con calificación inferior $\leq 26\%$ para abastecimiento de agua según prevalencia anti *T. gondii* IgG



Para bajo condición socio-económica para niños atendidos en restante escolar con calificación inferior $\leq 75\%$ para limpieza y desinfección según prevalencia anti *T. gondii* IgG



Para bajo condición socio-económica para niños atendidos en restante escolar con calificación inferior $\leq 67\%$ para personal manipulador de alimentos según prevalencia anti *T. gondii* IgG



Anexo 11 Artículos publicado

Toxoplasma en restaurantes escolares

Parasitology Research
<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06473-w>

PROTOZOOLOGY - ORIGINAL PAPER



Food safety assessment and risk for toxoplasmosis in school restaurants in Armenia, Colombia

Julio César Luna¹ · Alejandro Zamora · Natalia Hernández-Arango¹ · Delcy Muñoz-Sánchez¹ · Magda Ivonne Pinzón² · Jesús Alfredo Cortés-Vecino³ · Fabiana Lora-Suarez¹ · Jorge Enrique Gómez-Martín¹

Received: 28 April 2019 / Accepted: 24 September 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

We assessed the risk for toxoplasmosis in 10 school restaurants in Armenia (Quindío, Colombia). We analyzed the presence of *Toxoplasma gondii* DNA in the food, water, and living and inert surfaces of school restaurants, and we correlated these findings with the results of food safety inspection scores and with the prevalence of specific anti-*T. gondii* antibodies in children who ate at these restaurants. Of the 213 samples, 6.1% were positive using PCR to test for *T. gondii* DNA. Positive samples were found in meat, water, cucumber, guava juice, inert surfaces, and living surfaces. In 60% (6/10) of the public school restaurants, there was at least one PCR *T. gondii*-positive sample. In 311 serum samples from children who attended the restaurants, 101 (33%) were positive for IgG and 12 (3.9%) for IgM anti-*T. gondii*. The median of the compound score for the fulfillment of inspection for food safety conditions was of 60.7% (range 50–72). Higher *T. gondii* PCR positivity in surfaces, food, or water at each restaurant was correlated with lower inspection scores for water supply and water storage conditions. Lower scores in physical infrastructure and disinfection procedures and higher scores in furniture were correlated with a higher prevalence of IgG anti-*T. gondii* in children who ate at those restaurants. Inspection scores can identify restaurants with a higher risk for the presence of *T. gondii*.

Keywords *Toxoplasma* · Foodborne protozoa · PCR · Molecular detection

Julio César Luna and Alejandro Zamora contributed equally to this work.

Section Editor: Bert Burgmans

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06473-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jorge Enrique Gómez-Martín
 jgomez2@uniquindio.edu.co

¹ Grupo Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biotécnicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Avenida Bolívar 12N, Armenia, Quindío, Colombia

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

³ Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Grupo de Parasitología Veterinaria, Departamento de Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Introduction

Foodborne toxoplasmosis was prioritized within the foodborne parasites by the WHO and FAO, as the fourth most dangerous parasite for humans, due to its impact on human health and large prevalence worldwide (FAO/WHO 2014). Foodborne toxoplasmosis can be acquired through contaminated water (De Moum et al. 2006), undercooked meat (Franco-Hernandez et al. 2016) or unwashed raw vegetables (Robertson 2016). Inspection scores of sites of production or preparation of food, such as restaurants, are a vital instrument of public health authorities and have made proof to identify sites with high risk for food contamination with bacteria (Lee and Hedberg 2016). However, no evaluation exists of the concordance between inspection scores for parasites such as *Toxoplasma gondii* on food. For food industry policies and for health inspection authorities, it is important not only to identify the risk factors involved in foodborne toxoplasmosis but how hygienic measures can reduce such risks and if food safety evaluation tools, such as questionnaires about food safety

compliance, can identify restaurants that have a risk for foodborne toxoplasmosis.

We chose to analyze the elements involved in food preparation (that can be modified) for school restaurants in Armenia regarding the *T. gondii* DNA presence as an indicator of the potential contamination of food, live and inert surfaces, and water. We selected a representative sample of public school restaurants in Armenia, Quindío, in Colombia, and we collected all the information related to the hygienic conditions of providers of school students' meals and of the seroprevalence of *T. gondii* in school children.

Materials and methods

School restaurants selected for the study and analyzed samples

Armenia is the capital of the "Departamento del Quindío" and is located within Colombia's central mountain range at an altitude of 1480 m, and has 301,226 inhabitants, according to the projections and results from the last general census data in 2005 (DANE 2018). Armenia is divided into 10 administrative zones, called "comunas," and has 46 public school restaurants. For this study's purpose, one restaurant was randomly selected from each commune, resulting in a sample of 10 public school restaurants (21% of the total). By choosing one school by commune, the representativity of the geographical and socioeconomic diversity of the city was assured. The sampling days were randomly chosen, and all the food and water samples were taken in triplicate. The food samples corresponded to those that were prepared in the restaurant on the day of collection. We took 12 samples of raw beef meat and nine of raw chicken meat (50 g each), nine of raw and unshelled egg, three of lettuce, three of cabbage, nine of cucumber, nine of carrot, and six of tomato (200 g of principal raw vegetables from a salad before being mixed). Thirty samples of boiled water were used to prepare the juice (200 ml each), 10 samples of faucet water (4 l each), six of banana juice, 12 of guava juice, six of mango juice, and six of tamarillo (local Colombian fruit) juice (200 ml each). Samples from 52 food contact surfaces were taken using a swab and saline solution 0.9% (the number varied depending on the number of utilities or supplies used during food preparation). Thirty-one live surface samples were collected using a swab in saline solution 0.9% (palm of the hands of the people who handled food). In total, 213 samples from food and live and inert surfaces from the public school restaurants were collected. In consequence, in this study, we obtained the prevalence of *T. gondii* DNA present in food, surfaces, and water at each restaurant, as long as samples from each component of the menu and surfaces and water involved in food preparation were analyzed.

Serological testing for anti-*T. gondii* antibodies in children attending public schools of Armenia

The targets of the study were students of the public school restaurants aged 4 to 12 years, where the food samples were collected. Sample size was determined using Epi Info v7.2 software, where the total population of children attending public schools in 2017 was of 12,277 according to the data of the "Secretaría de Educación de Armenia." The expected prevalence of IgG anti-*T. gondii* in children in Colombia was estimated to be ~ 30%, according to data from the national study of toxoplasmosis (Cañón-Finco et al. 2004). A sample of 302 children was necessary to obtain inferences about the prevalence in this population with margin of error 5% and confidence level 90%. We prepared public meetings with the parents and guardians of children and requested voluntary permission from the children to gain access to venous blood sampling; if they agreed, they then signed an informed consent. The parents of children were interviewed by using questionnaires that included general demography data including age, followed by the main water supply and habits at home related to food preparation. Other factors included habit of meat consumption (well done or undercooked), type of meat, and cat contact (yes or no). A total of 5 ml of peripheral venous blood samples was obtained from each child by a laboratory technician in the presence of the children's parents. All serum samples were analyzed for anti-*T. gondii* IgG and IgM antibody titers using ELISA commercial assays according to the manufacturer's recommendation (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) and read in a Mini Vidas immune diagnostic assay system (bioMérieux, Inc., NC, USA).

DNA extraction method and PCR for *Toxoplasma*

The DNeasy Blood & Tissue Extraction Kit (Qiagen, Germany) with mechanical lysis and a zirconium beads was applied five times for DNA extraction in the vegetable and juice samples after agitation in a stomacher 400-W BagMixer (Interscience-France) at 260 rpm for 30 s with glycine 1 M and a pH of 5.5 (Cook et al. 2007) and a wash solution (PBS 1X, 100 µL of Tween 80 and 10 g of malonic acid) to a pH of 7.5, respectively, and a formic ether concentration method for water eluates was applied (also for inert and live surfaces samples), as described by Triviño-Valencia et al. (2016) and León-Suárez et al. (2016). Meat samples were processed for analysis as described by Alvarez et al. (2015) and Franco-Hernández et al. (2016). The meat was cut until pieces of approximately 5 g; they were then ground in a mortar with 2 ml of a lysis solution from the DNA extraction kit from Wizard Genomics (Promega, Madison, WI, USA) and with 50 µl of proteinase K over the course of 10 min, and then kept at room temperature for 30 min. Next, it was incubated at 37 °C for 30 min. After that, we added 250 µl of a saline solution buffer with a pH of 7.4, and the sample was centrifuged at 1000g over

Parasitol Res

10 min; the supernatant was then discarded. The cellular proteins were then removed using the reagents and procedures of the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), and genomic DNA was concentrated by adding 80 μ l of a Tris-EDTA rehydration solution and stored first at 4 °C overnight and then frozen at -80 °C until use. Oocysts from the *T. gondii* ME49 strain (clonal type II), cat 19, TX 586, collected June, 2014 (USDA, Beltsville), were used as controls of the DNA extraction procedure.

To amplify the *T. gondii* DNA, a conventional nested PCR was used for this study, as previously described (Tivilló-Valecín et al. 2016; Franco-Hernández et al. 2016; Zamora-Vélez et al. 2016). This test amplified a 97-bp fragment of the B1 repetitive gene of *T. gondii*, which is tandemly arrayed as 35-fold repetitive (GeneBank accession number AF179871). The primers for the first PCR were Toxo N1 (694 to 714 nt) at 5'-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3' and Toxo C1 (887 to 868 nt) at 5'-TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC-3'. The second PCR was performed with the primers Toxo N2 (757 to 776 nt) at 5'-TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG-3' and Toxo C2 (853 to 831 nt) at 5'-GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC-3'. All primers were synthesized by the Invitrogen Corporation (USA). All PCR amplifications were performed in the Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler machine (Thermo Fisher Scientific, USA). PCR products were gel-purified from low-melt agarose gels for sequencing. DNA recovery from gels was performed by using the Wizard PCR SV and PCR clean up system kit (Promega, WI). Sequencing was done by using the service by Macrogen (Korea) in 3730XL DNA sequencer with the same primers as the PCR amplifications. Sequences were aligned with Clustal W in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software, Version 5.05 (available at: <http://www.mega-software.net/>).

Evaluation of food safety conditions in school restaurants

To evaluate the food safety conditions of public school restaurants, we applied the checklist instrument for restaurant inspection from the Colombian National Institute for Food and Drug Control Resolution 2674 of 2013 (INVIMA, Bogotá, Colombia, <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lista/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DD/resolucion-2674-de-2013.pdf>), which included five topics with 26 items: (i) the physical conditions of restaurant infrastructure, including material of kitchen working zones and the material of the walls, ceiling, and floor; (ii) equipment, furniture, utensils, and the temperature that vegetables and meat are stored at; (iii) water supply, including water storage conditions; (iv) property conditions, including disinfection procedures, such as the frequency of washing hands, washing hands after meat manipulation, disinfectants used for surface decontamination, disinfectants used for food utensils, and the frequency that equipment and

furniture are cleaned; and (v) cooks knowledge and training in handling food. This instrument gives a scale by which to rate each one of the food safety practice items (2 = full, 1 = partial, or 0 = no compliance). Based on these scores, the percent of the fulfillment of conditions within each of the five conditions was finally established. A ranking of 100% indicated that a restaurant complied with all the items within each topic; lower percentages indicated partial fulfillment of conditions within each topic. Members of the research group were instructed to standardize the evaluation process. All data were collected and used for this study and were not part of a routine inspection.

Statistical analysis

Results were expressed as the median [min-max] for continuous variables and *N* (%) for categorical variables. Differences in proportions were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. Mantel-Haenszel statistics was used to test for independence between a dichotomous factor variable and a dichotomous response variable, conditional on covariate patterns defined by one or more layer (control) variables. Differences in means were compared using a Student's *t* test or a non-parametric test if not normally distributed. Stratified analysis was applied for controlling confounding factors (Trapezi et al. 2010).

To establish the predictive positive and negative value of the percent scores of fulfillments of food safety conditions for restaurants (obtained by food safety inspection instrument) that helped identify restaurants with *T. gondii* PCR-positive results in food and surfaces, a receiver operating curve was calculated. The SPSS software (version 14.0, Lead Technologies Inc, USA) was used to analyze the statistical tests. Values below $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Bioethics aspects

The protocol of this study was approved by the institutional ethical committee for the Faculty of Health Sciences of the Universidad del Quindío (Act 35 of May 14, 2012). All parents of the children accepted participating in the study and signed the informed consent. Institutional consent was also obtained from the school restaurants. Clinically relevant results were returned to the patients.

Results

Positivity of nested PCR for *T. gondii* in food, water, and live and inert surfaces

Of the 213 analyzed samples, 6.1% were positive using PCR for *T. gondii* DNA. The number of positive samples was higher in living surfaces and water samples and less common in vegetables

Parasitol Res

10 min; the supernatant was then discarded. The cellular proteins were then removed using the reagents and procedures of the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), and genomic DNA was concentrated by adding 80 μ l of a Tris-EDTA rehydration solution and stored first at 4 °C overnight and then frozen at -80 °C until use. Oocysts from the *T. gondii* ME49 strain (clonal type II), cat 19, TX 586, collected June, 2014 (USDA, Beltsville), were used as controls of the DNA extraction procedure.

To amplify the *T. gondii* DNA, a conventional nested PCR was used for this study, as previously described (Trivillo-Valecilla et al. 2016; Franco-Hernandez et al. 2016; Zamora-Vélez et al. 2016). This test amplified a 97-bp fragment of the B1 repetitive gene of *T. gondii*, which is tandemly arrayed as 35-fold repetitive (Genebank accession number AF179871). The primers for the first PCR were Toxo N1 (694 to 714 nt) at 5'-GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG-3' and Toxo C1 (887 to 868 nt) at 5'-TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC-3'. The second PCR was performed with the primers Toxo N2 (757 to 776 nt) at 5'-TGC ATA GGT TGC CAG TCA CTG-3' and Toxo C2 (853 to 831 nt) at 5'-GGC GAC CAA TCT GCG AAT ACA CC-3'. All primers were synthesized by the Invitrogen Corporation (USA). All PCR amplifications were performed in the Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler machine (Thermo Fisher Scientific, USA). PCR products were gel-purified from low-melt agarose gels for sequencing. DNA recovery from gels was performed by using the Wizard PCR SV and PCR clean up system kit (Promega, WI). Sequencing was done by using the service by Macrogen (Korea) in 3730XL DNA sequencer with the same primers as the PCR amplifications. Sequences were aligned with Clustal W in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software, Version 5.05 (available at: <http://www.mega-software.net/>).

Evaluation of food safety conditions in school restaurants

To evaluate the food safety conditions of public school restaurants, we applied the checklist instrument for restaurant inspection from the Colombian National Institute for Food and Drug Control Resolution 2674 of 2013 (INVIMA, Bogota, Colombia, <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DU/resolucion-2674-de-2013.pdf>), which included five topics with 26 items: (i) the physical conditions of restaurant infrastructure, including material of kitchen working zones and the material of the walls, ceiling, and floor; (ii) equipment, furniture, utensils, and the temperature that vegetables and meat are stored at; (iii) water supply, including water storage conditions; (iv) property conditions, including disinfection procedures, such as the frequency of washing hands, washing hands after meat manipulation, disinfectants used for surface decontamination, disinfectants used for food utensils, and the frequency that equipment and

furniture are cleaned; and (v) cooks knowledge and training in handling food. This instrument gives a scale by which to rate each one of the food safety practice items (2 = full, 1 = partial, or 0 = no compliance). Based on these scores, the percent of the fulfillment of conditions within each of the five conditions was finally established. A ranking of 100% indicated that a restaurant complied with all the items within each topic; lower percentages indicated partial fulfillment of conditions within each topic. Members of the research group were instructed to standardize the evaluation process. All data were collected and used for this study and were not part of a routine inspection.

Statistical analysis

Results were expressed as the median [min-max] for continuous variables and *N* (%) for categorical variables. Differences in proportions were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. Mantel-Haenszel statistics was used to test for independence between a dichotomous factor variable and a dichotomous response variable, conditional on covariate patterns defined by one or more layer (control) variables. Differences in means were compared using a Student's *t* test or a non-parametric test if not normally distributed. Stratified analysis was applied for controlling confounding factors (Tripepi et al. 2010).

To establish the predictive positive and negative value of the percent scores of fulfillments of food safety conditions for restaurants (obtained by food safety inspection instrument) that helped identify restaurants with *T. gondii* PCR-positive results in food and surfaces, a receiver operating curve was calculated. The SPSS software (version 14.0, Lead Technologies Inc, USA) was used to analyze the statistical tests. Values below $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Bioethics aspects

The protocol of this study was approved by the institutional ethical committee for the Faculty of Health Sciences of the Universidad del Quindío (Act 35 of May 14, 2012). All parents of the children accepted participating in the study and signed the informed consent. Institutional consent was also obtained from the school restaurants. Clinically relevant results were returned to the patients.

Results

Positivity of nested PCR for *T. gondii* in food, water, and live and inert surfaces

Of the 213 analyzed samples, 6.1% were positive using PCR for *T. gondii* DNA. The number of positive samples was higher in living surfaces and water samples and less common in vegetables

Table 2 Prevalence of IgG and IgM *T. gondii* antibodies as determined by ELISA assay in children that assisted to the public school's restaurants in the city of Armenia (Colombia) during the year 2018

Restaurant	I	II	III	IV	V	VI	VII	IX	X	Total
Proportion of children with IgG anti- <i>Toxoplasma</i> nB (%)	710 (70%)	48 (60%)	24 (30%)	143 (17.5%)	12 (15%)	2055 (64%)	1636 (51%)	408 (3.3%)	1560 (31%)	10371 (62.5%)
Proportion of children with IgM anti- <i>Toxoplasma</i> nB (%)	210 (20%)	68 (8%)	14 (18%)	108 (13.5%)	62 (78%)	2136 (66%)	656 (20%)	1462 (12%)	1600 (32%)	12511 (77.5%)

the region analyzed, indicating that they were unique, excepting three of them that are the same that the control sequence. Overall, there were no indications of generalized contamination.

Prevalence of *T. gondii* antibodies in children that assisted to school restaurants in Armenia

In total, 311 serum samples were collected from children. There were 101 (33%) children with IgG anti-*T. gondii*-positive and 12 (3.9%) with IgM anti-*T. gondii*-positive tests (Table 2). In one school (number VII), it was not possible to collect serum samples from children because the school's director denied to permit sampling. The lowest IgG prevalence was in school IX, with 8.4%, which was statistically significant compared with the other schools ($p = 0.0001$).

When the questionnaires about habits at home were analyzed in relation with IgG prevalence, we found that no habits at home were related to a higher frequency of IgG or IgM anti-*Toxoplasma*, but a lower socioeconomic stratum was related in statistically significant manner with higher prevalence of IgG anti-*Toxoplasma* and age lower than 5 years with a higher frequency of IgM anti-*Toxoplasma* (Supplementary Material).

Inspection scores for the food safety conditions of school restaurants and the correlation with the positivity of *T. gondii* DNA and the results of *T. gondii* serology

The median of the compound score for fulfillment of inspection for food safety conditions was of 60.7% for the 10 restaurants with a range of 50–72 (Table 4). The lower compliance was for physical infrastructure conditions with a mean of fulfillment of 23% (range of 0–50). A Kolmogorov–Smirnov test indicated the normality in data distribution for the inspection scores (Table 3), and a Pearson test was performed to determine if significant correlations between each inspection item, if the compound score and the positivity in the presence of *T. gondii* DNA using PCR at each restaurant, or if the prevalence of anti-*T. gondii* IgG or IgM in children who attended those restaurants existed (Table 4). Higher *T. gondii* PCR positivity in surfaces, food, or water at each restaurant was correlated with lower inspection scores for water supply and water storage conditions. Lower scores at the physical infrastructure conditions of each restaurant or property and higher scores in equipment or furniture were significantly correlated with a higher prevalence of specific IgG antibodies (Table 4). When stratified analysis was performed to control for lower socioeconomic level of children, the effect of exposure to restaurants with lower scores for infrastructure or property and high in equipment, was only significant for children with higher socioeconomic level. Conversely, the stratified analysis indicated that the relation between IgM anti-*T. gondii* and lower scores in disinfection was related to a lower age and not to the scores of the restaurants (Supplementary Material).

Table 3 Percent of fulfillment to compliance with items of food safety conditions at the checklist INVIMA instrument by public school's restaurants in the city of Armenia (Colombia) during the year 2018

School restaurant code	I. Physical conditions of restaurants infrastructure	II. Equipment, furniture, utensils, and temperature of storing of vegetables and meat	III. Water supply, including water storage conditions	IV. Property conditions including disinfection procedures	V. Food manipulators knowledge and training in food handling	Median compound score
I	0	71.4	71.4	42.90	62.5	62.5
II	0	71.4	59.5	52.40	62.5	59.5
III	16.6	64.3	50	50	70.8	50
IV	16.7	64.3	63.1	76.2	83.3	64.3
V	16.7	71	72.6	78.6	79.2	72.6
VI	16.7	66.7	64.3	78.6	70.8	66.7
VII	25	57.1	55.4	85.7	75	57.1
VIII	38.9	57.1	58.9	92.9	70.8	58.9
IX	50	57.1	58.9	92.9	68.8	58.9
X	50	57.1	54.8	92.9	66.7	57.1
Mean	23	63.7	60.89	74.31	71	60.76
Standard deviation	18	6.2	7.15	19	6.69	6.17
Range	0–30	57–71	50–72	42–92	62–83	50–72
One sample Kolmogorov-Smirnov test	0.6243	0.544	0.9124	0.6146	0.7479	0.8987

Predictive value of inspection scores for *T. gondii* DNA positivity

As the lower inspection scores for water supply and water storage conditions was significantly associated with higher positivity of *T. gondii* DNA in the restaurants, we performed a receiver operating analysis to establish which percentage scores were able to identify the restaurants with a higher risk for *T. gondii* presence and which were its predictive values (Table 5). Item III showed us that when the percent of fulfillment of conditions of $\leq 55\%$ was selected (Fig. 2), it had a sensitivity of 61.5% and a specificity of 87%, with a negative predictive value of 97% and a positive predictive value of 23%.

Discussion

We found that a majority of school restaurants in Armenia show the presence of *Toxoplasma* DNA in water, inert and living surfaces, and food. This presence could be correlated with a lower fulfillment of food safety conditions, particularly with the water supply and water storage conditions. The instrument that we used to check the food safety conditions was the Colombian official instrument for the inspection of restaurants and food processing installations. This questionnaire poses nine questions related to the existence of written protocol about the quality and handling of water; the existence of registries for the drinkability of water, such as chlorine concentration; the conditions of water reservoirs;

Table 4 Pearson correlation test between items and compound scores of the checklist INVIMA instrument and PCR positivity for *T. gondii* DNA at ten public school's restaurants or anti-*T. gondii* IgG and IgM in children

		Percent of samples with <i>Toxoplasma</i> DNA positivity by PCR at each restaurant $N = 10$	Percent of prevalence of anti- <i>Toxoplasma</i> IgG positivity in children at each restaurant $N = 9$	Percent of frequency of anti- <i>Toxoplasma</i> IgM positivity in children at each restaurant $N = 9$
I. Physical conditions of restaurant infrastructure	Pearson correlation	0.27	-0.39	-0.37
	Sig. (2-tailed)	0.46	0.0106	0.218
II. Equipment, furniture, utensils, and temperature of storing of vegetables and meat	Pearson correlation	-0.28	0.79	0.21
	Sig. (2-tailed)	0.4021	0.0072	0.5713
III. Water supply, including water storage conditions	Pearson correlation	-0.69	0.37	-0.17
	Sig. (2-tailed)	0.0252	0.3160	0.6955
IV. Property conditions including disinfection procedures	Pearson correlation	-0.09	-0.88	-0.70
	Sig. (2-tailed)	0.7016	0.0069	0.0355
V. Food manipulators knowledge and training in food handling	Pearson correlation	-0.009	-0.22	-0.14
	Sig. (2-tailed)	0.9787	0.5578	0.786
Median compound score	Pearson correlation	-0.66	0.11	-0.47
	Sig. (2-tailed)	0.0342	0.7620	0.1964

that existed in the public school's restaurants, of the city of Armenia (Colombia) during the year 2018. Two-tailed statistically significant correlation ($p < 0.05$) are showed in italics.

Parasitol Res

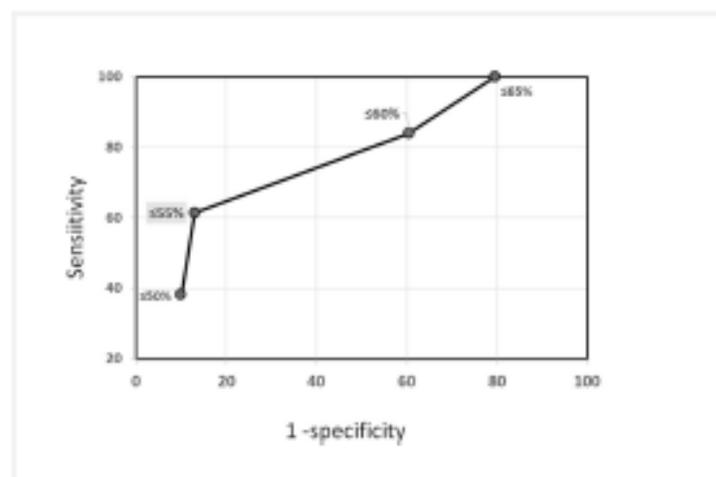
Table 5 Diagnostic predictive values of the same percent of fulfillment of conditions at the item III. Water supply, including water store conditions, of the checklist INVIMA instrument to identify restaurants with PCR-positive samples for *T. gondii* DNA at ten public school's restaurants of the city of Armenia (Colombia) during the year 2018

Percent score of fulfillment of conditions at the item III. Water supply, including water store conditions	Number of samples PCR positive at the restaurant with the selected score range	Number of samples PCR negatives at the restaurant with the selected score range	Sensitivity	Specificity
≤ 50%	5	20		
> 50%	8	180		
Total	13	200	38	90
≤ 55%	8	26		
> 55%	5	174		
Total	13	200	61.5	87
≤ 60%	11	121		
> 60%	2	79		
Total	13	200	84	39.5
≤ 65%	13	159		
> 65%	0	41		
Total	13	200	100	20.5
≤ 70%	13	159		
> 70%	0	41		
Total	13	200	100	20.5

and the production of ice from drinking water. In consequence, the lower percentages of scores in water storage conditions indicated that restaurants failed to have adequate conditions for drinkable water, and this was correlated with a higher presence of *T. gondii* DNA. The PCR assay detected that the restaurants where water had a presence of *T. gondii* also had positive samples on food and inert surfaces. This suggests that water is a major source for contamination in those restaurants, as logically, water is used in all food preparation and surface cleaning steps. The presence of

T. gondii on inert surfaces has been reported recently as a finding in metagenomics studies on automated teller machine keypads in New York City (Bik et al. 2016) and suggests that the disinfection of surfaces can play an important role in preventing *T. gondii* infection. In support of this, our finding that lower compliance of disinfection procedures was associated with a higher prevalence of IgG anti-*T. gondii* in children who attended these restaurants indicates that this is an important food safety condition that should be surveilled in restaurants.

Fig. 2 Receiver operating curve for the diagnostic predictive values of the same percent of fulfillment of conditions at the item III. Water supply, including water store conditions, of the checklist INVIMA instrument to identify restaurants with PCR-positive samples for *T. gondii* DNA. The best score percent of fulfillment of conditions at the item III as cutoff (≤ 55%) is highlighted



Armenia has a prevalence of *T. gondii* antibodies in the general population that is greater than 50% (Caldón-Franco et al. 2014). This study confirms this high prevalence exists since infancy and suggests that school restaurants can contribute to this early infection. A higher prevalence of IgG was associated with restaurants with lower compliance with disinfection procedures, indicating that children who attend public school restaurants have a higher risk of acquiring the infection as a foodborne disease. The stratified analysis for the confounding factor of lower socioeconomic level (for IgG anti-*T. gondii*) confirmed that lower scores for physical infrastructure and disinfection procedures, increased the risk for *T. gondii* infection, but only for children of high socioeconomic level, in other words, the results suggest that children of low socioeconomic level are being infected in home and those of high socioeconomic level at school restaurants. Curiously, higher scores related to furniture increased the risk of children to have more IgG anti-*T. gondii*. This score increases if plastic material is used in food preparation; therefore, it is possible that the recommendation of this material should be changed as part of the current norms, instead the use of metallic material should be privileged. The control of the age as a confounding factor for the correlation between IgM anti-*T. gondii* and score of restaurants demonstrated that these were not related. As most of the children analyzed in this study have been exposed many years to the school restaurants, IgG anti-*T. gondii* is a better indicator for the risk than IgM anti-*T. gondii*.

The infection sources in school restaurants for children, according to our findings, could be water (contaminated fruit juices), meat, and some vegetables. We found 8% positivity in beef meat, and previously, in large studies on various types of meat, we found that PCR can be positive in 32.4 to 52.7% of meat samples (Lom-sánchez et al. 2007; Alvarez et al. 2015; Franco-Hernandez et al. 2016). Additionally, in water samples, we found a positivity of 58.6% using the same technique (Triviño-Valencia et al. 2016). One sample, from a cucumber, had a positive result in our study; there are no previous studies in Colombia about the detection of *T. gondii* DNA in vegetables samples.

PCR for DNA detection does not determine viability or infectivity. Indeed, there is not available method for routine verification for *T. gondii* or other protozoa on food (Rousseau et al. 2018). We used PCR to detect *T. gondii* because it is sensitive enough to detect low quantities of parasites and are accessible for routine analyses. While this method can overestimate the presence of infective parasites by detecting all populations (live and infectious, live and non-infectious, or dead) they offer information of the maximum occurrence and about the level of food contamination. Food should be free from the presence of protozoa and any contamination (by viable or non-viable protozoa) indicates failure in good agricultural or food processing practices (Rousseau et al. 2018).

The instrument of restaurant inspection we applied identified the critical factors that increased the risk for the presence of *Toxoplasma* DNA. Although water seems to have a prominent role, other sources are crucial and the low positive predictive value of the score for water indicates that this cannot be the only item to be used to evaluate the risk for *T. gondii* presence at restaurants. These findings support the application of the food safety inspection instrument as a public health tool (da Cunha et al. 2016; Lee and Hedberg 2016). Future studies should analyze how the application of the procedures can impact the reduction of toxoplasmosis in the school children population.

In conclusion, this study identified the potential sources and the critical points where public health authorities can intervene in school restaurants to reduce the risk of foodborne toxoplasmosis.

Acknowledgments We thank Dr. Duboy (USDA, Beltsville) who kindly donated *T. gondii* oocysts.

Funding information This work was funded by the Universidad del Quindío and Colombian Grant Number: 11137253376.

Compliance with ethical standards The protocol of this study was approved by the institutional ethical committee for the Faculty of Health Sciences of the Universidad del Quindío (Act 35 of May 14, 2012).

Conflict of interest The authors declare they have no conflict of interest.

References

- Alvarez C, de-la-Torre A, Vargas M et al (2015) Striking divergence in *Toxoplasma* ROP16 nucleotide sequences from human and meat samples. *J Infect Dis* 211:1–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/ju333>
- Bik HM, Marie JM, Luong A et al (2016) Microbial community patterns associated with automated teller machine keypads in New York City. *mSphere* 1:e00226-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00226-16>
- Caldón-Franco W, López-Orozco N, Gómez-Martín J, Duboy JP (2014) An overview of seventy years of research (1944–2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasit Vectors* 7:427. <https://doi.org/10.1186/s12875-014-0427-7>
- Cook N, Nichols RAB, Wilkinson N, Paton CA, Barker K, Smith HV (2007) Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 73:7388–7391. <http://doi.org/10.1128/AEM.00552-07>
- da Cunha DE, de Rosso VV, Stuležič E (2016) Should weights and risk categories be used for inspection scores to evaluate food safety in restaurants? *J Food Prot* 79:501–506. <https://doi.org/10.4315/JFP15-292>
- DANE (2018) Reloj de población. Reloj de población. In <http://www.dane.gov.co/reloj/>
- De Moura L, Garcia Bahia-Oliveira LM, Wada MY et al (2006) Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis* 12:326–329. <https://doi.org/10.3201/eid1202.041115>

- FAO/WHO (2014) Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. *First. WHO/FAO, Geneva*
- Franco-Hernandez EN, Acosta A, Cortés-Vicino J, Gómez-Martin JE (2016) Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. *Parasitol Res* 115:691–695. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4790-7>
- Lee P, Halberg CW (2016) Understanding the relationships between inspection results and risk of foodborne illness in restaurants. *Foodborne Pathog Dis* 13:582–586. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2137>
- Lora-Suarez F, Ateaga J, Pérez I, et al. (2007) Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. 117–123
- Lora-Suarez F, Rivera R, Triviño-Valencia J, Gómez-Martin JE (2016) Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Res* 100:377–381. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.038>
- Robertson LJ (2016) Parasitic protozoa in salad vegetables. *Food hygiene and toxicology in ready-to-eat foods*, 1st ed, pp 69–88
- Roussau A, La Carbona S, Dumêtre A, et al (2018) Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite* 25:14. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018009>
- Tripepi G, Jager RJ, Dekker FW, Zoccali C (2010) Stratification for confounding – part 1: the Mantel-Haenszel formula. *Nephron Clin Pract* 116:e317–e321. <https://doi.org/10.1159/000319990>
- Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga JD, Gómez-Martin JE (2016) Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitol Res* 115:1789–1797. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5>
- Zamora-Vélez A, Cuadrado-Ríos S, Triviño-Valencia J, et al (2016) Diversidad Genética Y Filogenia De *Toxoplasma Gondii* a Partir De Susancias Parciales De B1 De Colombia Y Otros Países. *Rev la Asoc Colomb Ciencias Biológicas* 28:8–15

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Protozoo en restaurantes escolares

Received: 17 August 2019 | Revised: 18 September 2019 | Accepted: 20 September 2019
 DOI: 10.1111/jfs.12714

ORIGINAL ARTICLE

Journal of
Food Safety

WILEY

Food protozoa safety assessment and risk in school restaurants in Armenia, Colombia

Gloria Deicy Muñoz-Sánchez¹ | Natalia Hernández-Arango¹ |
 Estefanía Bultrago-Lopez¹ | Julio César Luna^{1,2} | Alejandro Zamora¹ |
 Fabiana Lora-Suarez¹ | Jorge Enrique Gómez-Marín¹

¹Molecular Parasitology Group (GEFAMOL, for the term in Spanish), Biomedical Research Center, Faculty of Health Sciences, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia
²Faculty of Agro-Industrial Sciences, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Correspondence:
 Jorge E. Gómez-Marín, Biomedical Research Center, Faculty of Health Sciences, Universidad del Quindío, Avenida Belívar 1.2N, Armenia, Quindío, Colombia.
 Email: jgpmo2@unquindio.edu.co

Abstract

This work assessed the risk of protozoa in 10 school restaurants in Armenia (Quindío, Colombia) by analyzing the presence of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, *Blastocystis*, and *Cyclospora cayentensis* DNA in the food, water, and living and inert surfaces of school restaurants and in stools of children who ate at these restaurants. Of the 213 food, water, and surface samples, 6.6% were positive using PCR to test DNA for *Blastocystis*; 3.8% for *Cryptosporidium* spp; 0.9% for *G. duodenalis*; and 0% for *C. cayentensis*. In 187 stool samples analyzed via microscopy from children who attended the restaurants, 40 (21.4%) were positive for *Blastocystis* and 21 (11.2%) were positive for *Giardia* spp. Via PCR, 20 (10.7%) were positive for *Cryptosporidium* and 0 (0%) for *C. cayentensis*. A higher positivity in children's stools for *Blastocystis* spp was correlated with lower compliance in property conditions and for higher positivity of *Giardia* spp in children's stool was related to lower knowledge by food manipulators. Inspection scores can identify restaurants with higher risk for protozoa infection.

1 | INTRODUCTION

Cryptosporidium spp and *Giardia duodenalis* are foodborne protozoa prioritized for risk management by the WHO and FAO (FAO/WHO, 2014). Additionally, although previously *Blastocystis* was debated in its pathogenicity, it is now clear that some subtypes are linked to symptoms and it is the most prevalent intestinal parasite worldwide in most intestinal parasite surveys (Tan, 2008). Inspection scores for food preparation are a vital instrument for public health authorities to identify sites with high risk for food contamination with bacteria (Lee & Hedberg, 2016). However, no assessment studies exist in the correlation between inspection scores for protozoa on food. Also, no previous studies address the frequency of detection of protozoa in restaurants. Because the most important consequences for health

care in children, we chose to study public school restaurants. Our work analyzed the frequency of these parasites by molecular methods and examined the correlation between inspection scores and their frequency in all elements involved in food preparation. Samples were collected from children to examine parasite frequency in children who ate in those restaurants and if this was related to the frequency in each restaurant.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | School restaurants selected for the study and samples analyzed

Armenia is the capital of the Department of Quindío and it is located within Colombia's central mountain range at an altitude of 1,480 msl, with 275,641 inhabitants, according to the results from the 2018 general census data (DANE, 2019). Armenia is divided into

Gloria Deicy Muñoz-Sánchez, Natalia Hernández-Arango, and Alejandro Zamora contributed equally to this work.

10 administrative zones, called communes, and has 46 public school restaurants. For study purposes, one restaurant was randomly selected from each commune from February to June 2018, resulting in a sample of 10 public school restaurants (21% of the total). By choosing one school per commune, the representativity of the geographic and socioeconomic diversity of the city was assured. The sampling days were randomly chosen, and all food and water samples were taken in triplicate. Food samples corresponded to those prepared in the restaurant on the day of collection. At each school were taken triplicate samples from meat or egg (protein at the menu of the sampling day), triplicate samples from the vegetable at the menu that day, triplicate samples of the boiled water used to prepare juice (in triplicate), one of tap water at each restaurant and from each surface where food was in contact during preparation (this varied between 3 and 7 samples by restaurant). In total, we took 12 samples of raw beef meat and nine of raw chicken meat (50 g each); nine of raw and unwashed egg, three of lettuce, three of cabbage, nine of cucumber, nine of carrot, and six of tomato (200 g of principal raw vegetables from a salad before mixing). Thirty samples of boiled water were used to prepare the juice (200 ml each), 10 samples of tap water (4 L each), six of banana juice, 12 of guava juice, six of mango juice, and six of tamarillo (local Colombian fruit) juice (200 ml each). Samples from 52 food-contact surfaces were taken by using a swab and saline solution at 0.9% (the number varied depending on the number of utilities or supplies used during food preparation). Thirty-one live surface samples were collected by using a swab in 1 ml of saline solution at 0.9% (palms of the hands of those manipulating food). In total, 213 samples from food and live and inert surfaces from the public school restaurants were collected. Consequently, this study obtained the prevalence at the day of sampling of the DNA of the pathogenic protozoa present in food, surfaces, and water at each restaurant, as long as samples from each component of the menu and surfaces and water involved in food preparation were obtained.

2.2 | Microscopic detection of pathogenic protozoa in children's stool

The target population of the study was students from 4 to 12 years of age in public school restaurants, where the food samples were collected. Sample size was determined by using Epi Info version 7.2 software, where the total population of children attending public schools in 2017 was 12,277 according to data from the Armenia Secretary of Education. A sample of 171 children was necessary to obtain inferences on prevalence in this population with an expected 13% prevalence, according to our previous studies (Gutiérrez-Gómez, Lora, Henao, Mejía, & Gómez-Merín, 2005), 5% margin of error, and 95% confidence interval. Public meetings were prepared with the parents and legal guardians of children and requested voluntary permission from the children to gain access to stool samples; if they agreed, they then signed an informed consent. The parents of participating children were interviewed by using questionnaires that requested general demography data, including age, followed by the main water supply and habits at home related to food preparation. Stool samples were

brought by parents in sterile plastic containers supplied by the researchers and conserved on ice until laboratory examination. Slides from stool samples were prepared by wet mounting in iodine 1% saline solution and observed in optical microscopy at objective 40x. Parasites were identified at genus level through morphological and micrometry characteristics. The students in these schools have a very low rate (4.9%) of desertion or change of school, according to reports from the city's education authority (de Competitividad, 2018). Therefore, it could be considered that the school population, in its majority, has been exposed to the same conditions of the restaurants during the time of their primary schooling.

2.3 | DNA extraction, PCR, and sequencing for pathogenic protozoa in food and stool samples

For food, live, and surface samples, the DNeasy Blood & Tissue Extraction Kit (Qiagen, Germany) with mechanical lysis and zirconium beads were applied five times for DNA extraction after agitation in a stomacher 400-W BagMixer (Interscience, France) at 240 rpm for 30 s with glycine 1 M (Biorad, Estados Unidos) and pH of 5.5 and a wash solution (PBS 1X, 100 μ l of Tween 80, Merck, Germany, and 10 g of sulfamic acid—Merck, Germany) at pH of 7.5, respectively (Cook *et al.*, 2007) and a formalin-ether concentration method for water samples was applied (also for inert and live surface samples) as described (Hernández-Arango, Pinto, Muñoz-Sánchez, Lora-Saenz, & Gómez-Merín, 2019; Lora-Saenz, Rivera, Triviño-Valencia, & Gómez-Merín, 2016; Triviño-Valencia, Lora, Zúñiga, & Gómez-Merín, 2014). For stools, 1 g of sample was diluted in 5 ml of sterile saline solution at 0.9% and filtered through gauze. Then, 3 ml of formalin-ether solution at 10% was added and the mixture was vortexed 1 min and then centrifuged 500g for 5 min. After decanting the supernatant, the pellet was diluted in 1 ml of saline solution at 0.9% and 300 μ l were added to 1 ml of saline solution at 0.9% with 400 μ l of DNAzol reagent (ThermoFisher Scientific), 10 μ l of boemilic alcohol and 0.3 g of 1 mm zirconium beads (BioSpec Product Inc) and followed by shaking in a mini-bead beater (Stratagene UK) for 1 min and placed such in ice for 1 min; this step was repeated five times. After centrifugation at 13,500 g for 6 min, the supernatant was transferred to a new tube and mixed it with 200 μ l of nuclear lysis buffer, vortexed it for 20 s and maintained it at 37°C for 30 min. Thereafter, 100 μ l of protein precipitation lysis was added, vortexed for 20 s and the tube was placed in ice for 5 min. Subsequently, the sample was centrifuged at 13,500 g for 1 min and the supernatant was transferred to another tube with 200 μ l of ethanol at 75% v/v, mixed gently four times and centrifuged at 13,500 g for 2 min; the supernatant was discarded and the pellet was dissolved in 80 μ l of Tris-EDTA buffer. One blank sample without DNA (400 μ l of saline solution at 0.9%) was processed simultaneously as contamination control during each DNA extraction procedure.

Gardia duodenalis was detected by amplifying specific sequences for the DNA coding SSU rRNA. Sequence of primers for the first PCR were Forward RH11 5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3' and reverse RH4 5'-AGTCGAACCCCTGATTCCTCCGCC-3' that amplifies a product

of 292 bp (Hopkins *et al.*, 1997). For the second PCR, primers were forward GlerF 5'-GAGGCTCTCCCAAGGAC-3' and reverse GlerR 5'-CTGGT CAGCCTGCTCG-3' that amplified a fragment of 175 bp (Read, Walters, Robertson, & Thompson, 2002). The PCR mix in the first PCR consisted of 12.5 μ l of GoTaq Green Master Mix (Promega) containing deoxycytosine diphosphate 0.2 mM, MgCl₂ 25 mM, Taq polymerase, 1.5 μ l of primers and 3 μ l of DNA in a final volume of 25 μ l. For the second PCR, the mix concentration of reagents was the same and the DNA was 1 μ l of the amplification product of the first PCR. Cycle conditions were denaturation at 94°C for 5 min; then 40 cycles comprising 1 min at 94°C, annealing at 61°C for 1 min and 1 min at 72°C; followed by a final 10-min extension at 72°C. The second PCR cycles were denaturation at 94°C for 5 min; then 14 cycles comprising 1 min at 94°C, annealing at 61°C for 1 min and 1-min extension step at 72°C; followed by a final 10-min extension at 72°C.

Cryptosporidium spp. DNA species was detected by amplifying genus-specific sequences from the 60 kDa glycoprotein (gp60) gene, as described (Ebach *et al.*, 2015). The primer sequences were for the first PCR, Csp60IF 5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3' and Csp60IR 5'-GCAGAGGAACCAGCATC-3', that amplified a fragment of 863 bp and for second PCR, Csp60IF 5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3' and Csp60IR 5'-GAGATATATCTTGTGGGG-3' that amplified a fragment of 443 bp (Ebach *et al.*, 2015). The PCR mix consisted of 12.5 μ l of GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 μ l of primers at 10 μ M, and 1 μ l of DNA in a final volume of 25 μ l. Amplification cycles for the first cycle consisted of denaturation at 94°C for 5 min; then 35 cycles comprising 1 min at 94°C, annealing at 46°C for 1 min, and 1 min at 72°C; followed by a final 10-min extension at 72°C. For the second PCR, amplification cycles were denaturation at 94°C for 10 min; then 14 cycles comprising 1 min at 94°C, annealing at 54°C for 30 s, extension at 72°C for 30 s, followed by a final 5-min extension at 72°C.

Blattella germanica was analyzed by conventional PCR by amplifying genus-specific sequences from the small subunit (SSU) rRNA with the primers 5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' and 5'-GAGCTTTTAACTGCAACG-3' that amplify a fragment of 611 bp, as described (Ramírez *et al.*, 2014). The PCR mix consisted of 12.5 μ l of GoTaq Green Master Mix (Promega), 1.5 μ l of primers at 10 μ M, 0.5 μ l of bovine serum albumin, and 2 μ l of DNA in a final volume of 25 μ l. Amplification cycles for the first cycle consisted of denaturation at 94°C for 5 min; then 35 cycles comprising 1 min at 94°C, annealing at 56.3°C for 30 s and 30 s at 72°C; followed by a final 10-min extension at 72°C.

Cyrtopora cayutanensis was amplified by conventional PCR by amplifying genus-specific sequences from the 5.8S small subunit of the ribosomal rRNA (SSU rRNA) with primers 5'-GCAGTCACAGGAGGCATATATCC-3' and 5'-ATGAGAGACCTCACAGCCAAC-3' that amplify a fragment of 116 bp, as described (Laronde & Gajedher, 2008). The PCR mix consisted of 12.5 μ l of GoTaq Green Master Mix (Promega), 1.5 μ l of primers at 10 μ M, and 3 μ l of DNA in a final volume of 25 μ l. Amplification cycles for the first cycle consisted of denaturation at 95°C for 2 min; then 40 cycles comprising 30 s at 95°C, annealing at 59°C for 30 s and 30 s at 72°C; followed by a final 5-min extension at 72°C.

The DNA from the reference strain used as control for PCR reactions were *G. duodenalis* isolate H3 assemblage B (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY258616>) donated by Dr. Kenen Shapiro (University of California, Davis, CA); *C. parvum* oocysts purchased at the University of Arizona (<https://arizona.cab.international/cryptosporidium/>); *B. hominis* DNA from an isolate of human source at our laboratory; and pUCS7 plasmid containing the 116 bp from the 5.8 SSU rRNA of *C. cayutanensis* (GenScript HK Limited, Hong Kong). The Verli Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) performed all PCR amplifications.

The PCR products were gel-purified from low-melt agarose gels for sequencing. DNA recovery from gels was performed by using the Wizard PCR SV and PCR clean up system kit (Promega, Madison, WI). Sequencing was done by using the service by Macrogen (Korea) in 37300 DNAs sequencer with the same primers as the PCR amplifications. Sequences were aligned with Clustal W in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software, version 5.05 (available at <http://www.megasoftware.net/>). Only sequences with final quality value ≥ 20 were used for alignment.

Evaluation of food safety conditions in school restaurants

To evaluate the food safety conditions of public school restaurants, we applied the checklist instrument for restaurant inspection from the Colombian National Institute for Food and Drug Control Resolution 2674 of 2013 (INVIMA, Bogotá, Colombia, <https://www.invia.gov.co/sites/default/files/BibliotecaDigital/RDE/DE/DU/resolucion-2674-de-2013.pdf>), which included five topics with 26 items: (a) the physical conditions of restaurant infrastructure, including material of kitchen working zones and the material of the walls, ceiling, and floor; (b) equipment, furniture, utensils, and the storage temperature of vegetables and meats; (c) water supply, including water storage conditions; (d) property conditions, including disinfection procedures, such as the frequency of washing hands, washing hands after meat manipulation, disinfectants used for surface decontamination, disinfectants used for food utensils, and the frequency that equipment and furniture are cleaned; and (e) cook's knowledge and training in handling food. This instrument provides a scale by which to rate each of the food safety practice items (2 = full, 1 = partial, or 0 = no compliance). Based on these scores, the percentage of the fulfillment of conditions within each of the five conditions was finally established. A ranking of 100% indicated that a restaurant complied with all the items within each topic; lower percentages indicated partial fulfillment of conditions within each topic. Members of the research group were instructed to standardize the evaluation process. All data were collected and used for this study and were not part of a routine inspection.

2.4 | Statistical analysis

Results were expressed as the median [min-max] for continuous variables and N (%) for categorical variables. Differences in proportions were analyzed by using the chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. Pearson test was used for correlation analysis between

scores of items of inspection of food safety conditions and percent of positivity of test for the presence of protozoa in food, water or surfaces of restaurants or in stools of children that ate at those restaurants. The SPSS software (version 14.0, Lead Technologies Inc) was used to analyze the statistical tests. Values below $p < .05$ were considered statistically significant.

2.5 | Bioethics aspects

The protocol of this study was approved by the Institutional ethical committee for the Faculty of Health Sciences of the Universidad del Quindío (Act 35 of May 14, 2012). All parents of the children accepted to participate in the study and signed the informed consent. Institutional consent was also obtained from school restaurants. Clinically relevant results were returned to the patients and children were treated when medically indicated.

3 | RESULTS

3.1 | Positivity of PCR for pathogen protozoa in food, water, and live and inert surfaces

Of the 213 samples analyzed from food, water, and surfaces, 6.6% were positive using PCR to test DNA for *Blattocystis*; 3.8% for *Cryptosporidium* spp; 0.9% for *G. duodenalis*; and 0% for *C. cayentanensis* (Table 1). A high prevalence of the three protozoa (*Blattocystis*, *Cryptosporidium*, or *Giardia*) were found on raw vegetables (11 PCR-positive between 30 samples or 36%). In 50% (5/10) of the public

school restaurants, there was at least one PCR-positive sample for pathogenic protozoa. *B. hominis* and *Cryptosporidium* spp were present as well in water and surfaces, like green vegetables, and *G. duodenalis* was present in carrot and guava juice (Table 1).

3.2 | Prevalence of intestinal pathogenic protozoa in children attending school restaurants in Armenia

In 187 stool samples from children who attended the restaurants, via microscopy, 40 (21.4%) were positive for *Blattocystis* spp and 21 (11.2%) positive for *Giardia* spp. By microscopy, there were no detection of *Cryptosporidium* or *Cyclospora*. Through PCR, 20 (10.7%) were positive for *Cryptosporidium* spp and 0 (0%) for *C. cayentanensis*. In 187 stool samples from children, 5 (2.7%) were diarrheic and 107 (57.2%) had smooth consistency. Two diarrheic stools revealed *Giardia* spp and one had *Blattocystis* spp.

3.3 | Inspection scores for the food safety conditions of school restaurants and the correlation with the positivity of pathogenic protozoa DNA in food, water, and surfaces and the results of stool detection of pathogenic protozoa in children

The median compound score to fulfill the inspection for food safety conditions was 59.2% for the 10 restaurants, with a range of 50–72. When the frequency, each pathogenic protozoa in food, water, and surfaces, was analyzed and compared with inspection scores, there was no relation with inspection scores (Table 2). Then, we analyzed

TABLE 1 Prevalence of DNA-positive samples by conventional PCR of pathogenic protozoa from food, water, juice, and inert and live surfaces collected in 10 public school restaurants in the city of Armenia (Colombia) during 2018

Type of sample	Number of samples	Number of PCR positives for <i>Blattocystis</i> (%)	Number of PCR positives for <i>Cryptosporidium</i> (% of the total)	Number of PCR positives for <i>Giardia</i> (% of total)	Number of PCR positives for <i>Cyclospora</i> (% of the total)
Raw chicken meat	9	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Raw beef meat	12	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Egg	9	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tap water	10	2 (20%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Boiled water for juice	30	0 (0%)	1 (3.3%)	0 (0%)	0 (0%)
Lettuce	3	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cabbage	3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Cucumber	9	2 (22.2%)	2 (22.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Carrot	9	2 (22.2%)	0 (0%)	1 (11.1%)	0 (0%)
Tomato	6	1 (16.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Barana juice	6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Guava juice	12	2 (16.7%)	0 (0%)	1 (8.3%)	0 (0%)
Mango juice	6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tamarillo juice	6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Inert surfaces	52	1 (1.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Live surfaces	31	1 (3.2%)	3 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	213	14 (6.6%)	8 (3.8%)	2 (0.9%)	0 (0%)

TABLE 2 Pearson correlation test between items and compound scores of the INVIMA checklist instrument and percent of PCR positivity for pathogenic protozoa at 10 public school restaurants of the city of Armenia (Colombia) during 2018

		Percentage of samples with <i>Blasotrycystis</i> DNA positivity by PCR at each restaurant (N = 10)	Percentage of samples with <i>Cryptosporidium</i> DNA positivity by PCR at each restaurant (N = 10)	Percentage of samples with <i>Giardia</i> DNA positivity by PCR at each restaurant (N = 10)
I. Physical conditions of the restaurant's infrastructure	Pearson correlation	0.388	0.494	-0.184
	Sig (two-tailed)	0.266	0.146	0.609
II. Equipment, furniture, utensils, and storage temperature of vegetables and meats	Pearson correlation	-0.209	-0.284	0.349
	Sig (two-tailed)	0.561	0.426	0.321
III. Water supply, including water storage conditions	Pearson correlation	0.119	0.006	0.541
	Sig (two-tailed)	0.741	0.985	0.106
IV. Property conditions, including disinfection procedures	Pearson correlation	0.271	0.504	0.087
	Sig (two-tailed)	0.447	0.137	0.809
V. Food manipulators' knowledge and training in food handling	Pearson correlation	-0.246	0.251	0.295
	Sig (two-tailed)	0.492	0.483	0.407
Median compound score	Pearson correlation	0.041	0.170	0.542
	Sig (two-tailed)	0.908	0.637	0.105

TABLE 3 Analysis of association between items of the compound scores of the INVIMA checklist instrument and habits at home and percentage of PCR positivity for *Blasotrycystis* in children (n = 187) who ate at 10 public school restaurants of the city of Armenia (Colombia) during 2018

Risk factor	Percentage of positivity in exposed vs. non-exposed n/N (%)	Odds ratio	95% confidence interval	p-value
Restaurant conditions				
I. Physical conditions of restaurant's infrastructure $\geq 5\%$	24/119 (20.2%) vs. 11/45 (24.4%)	0.78	0.3-1.8	.5505
II. Equipment, furniture, utensils, and storage temperature of vegetable and meat $\geq 70\%$	26/104 (25.0%) vs. 9/60 (15.0%)	1.89	0.8-4.3	.1322
III. Water supply, including water storage conditions $\geq 51\%$	26/104 (25.0%) vs. 9/60 (15.0%)	1.89	0.8-4.3	.1322
IV. Property conditions, including disinfection procedures $\geq 59\%$	21/68 (30.9%) vs. 14/96 (14.6%)	2.67	1.2-5.6	.0121
V. Food manipulators' knowledge and training in food handling $\geq 67\%$	9/50 (18.0%) vs. 26/114 (22.8%)	0.74	0.3-1.7	.4891
Children's physical condition and habits at home				
Children with nutritional score ± 2 (standard deviation)	20/101 (19.8%) vs. 11/46 (23.9%)	0.79	0.3-1.8	.5710
Age > 6 years	24/98 (24.5%) vs. 11/56 (19.7%)	1.33	0.6-3.0	.4899
Drinking boiled water	17/72 (23.6%) vs. 18/90 (20.0%)	1.24	0.6-3.0	.4899
Juice prepared with boiled water	23/94 (24.5%) vs. 12/69 (17.4%)	1.54	0.7-3.4	.2770
Washing fruits with unboiled water	3/18 (16.7%) vs. 32/144 (22.2%)	0.70	0.2-2.6	.5899
Washing vegetables with boiled water	5/26 (19.2%) vs. 30/135 (22.2%)	0.75	0.2-2.5	.6372
Same table used for cooking meats and vegetables	1/26 (3.9%) vs. 17/115 (14.8%)	0.83	0.3-2.4	.7349
Animals at home	9/62 (14.5%) vs. 26/76 (25.5%)	0.50	0.2-1.1	.0963

Two-tailed statistically significant association ($p < .05$) is shown in bold.

the inspection scores and the frequency of pathogenic protozoa in children who ate at those restaurants and their habits at home. To do this, we selected an inspection score for each item according to a receptor operator curve, in order to compare the prevalence of

parasites in children that ate in restaurants with the equal or higher inspection score selected for each item, vs. those that ate at restaurants below that score (Tables 3-5). In contrast with the findings on samples from the restaurants, we found many significant associations

TABLE 4 Analysis of association between items of the compound scores of the INVIMA checklist instrument and habits at home and percentage of PCR positivity for *Cryptosporidium* spp in children ($n = 187$) who ate at 10 public school restaurants of the city of Armenia (Colombia) during 2018

Risk factors	Percentage of positivity in exposed vs. nonexposed n/N (%)	Odds ratio	95% confidence interval	p-value
Restaurant conditions				
I. Physical conditions of restaurant's infrastructure $\geq 25\%$	14/119 (11.8%) vs. 2/45 (4.4%)	2.06	0.7–12.5	.1586
II. Equipment, furniture, utensils, and storage temperature of vegetables and meats $\geq 70\%$	2/45 (4.4%) vs. 14/119 (11.7%)	2.52	0.3–1.5	.1586
III. Water supply, including water storage conditions $\geq 5\%$	3/68 (4.4%) vs. 13/96 (13.6%)	0.30	0.1–1.0	.0522
IV. Property conditions, including disinfection procedures $\geq 5\%$	7/104 (6.7%) vs. 9/60 (15.0%)	0.41	0.1–1.1	.0856
V. Food manipulators' knowledge and training in food handling $\geq 6\%$	9/120 (7.5%) vs. 7/44 (15.9%)	0.43	0.2–1.2	.1070
Children's physical condition and habits at home				
Children with nutritional score ≥ 21 (3 standard deviation)	9/101 (9.9%) vs. 6/46 (13.0%)	0.65	0.2–2.0	.4420
Age > 6 years	5/98 (5.1%) vs. 11/56 (19.7%)	0.22	0.1–0.6	.0044
Drinking boiled water	6/72 (8.3%) vs. 10/90 (20.0%)	0.73	0.3–2.7	.5560
Juice prepared with boiled water	9/94 (9.6%) vs. 7/69 (10.1%)	0.94	0.3–2.7	.9037
Washing fruits with unboiled water	4/18 (22.2%) vs. 12/144 (8.3%)	3.14	0.9–10.5	.0612
Washing vegetables with boiled water	12/145 (8.3%) vs. 4/15 (26.7%)	0.25	0.1–0.8	.0238
Same table used for cooking meats and vegetables	2/26 (7.7%) vs. 14/135 (10.4%)	0.72	0.2–3.4	.6760
Animals at home	9/62 (14.5%) vs. 7/102 (6.9%)	2.31	0.8–6.4	.1092

Two-tailed statistically significant association ($p < .05$) is shown in bold.**TABLE 5** Analysis of association between items of the compound scores of the INVIMA checklist instrument and habits at home and percent of positivity in stools for *Giardia duodenalis* in children ($n = 187$) that ate at 10 public school restaurants of the city of Armenia (Colombia) during 2018

Risk factors	Percent of positivity in exposed vs. nonexposed n/N (%)	Odds ratio	95% confidence interval	p-value
Restaurant conditions				
I. Physical conditions of restaurant's infrastructure $\geq 25\%$	8/60 (13.3%) vs. 10/96 (10.4%)	1.15	0.4–3.1	.7856
II. Equipment, furniture, utensils, and storage temperature of vegetables and meat $\geq 70\%$	9/104 (8.7%) vs. 9/60 (15.0%)	0.54	0.2–1.4	.2105
III. Water supply, including water storage conditions $\geq 5\%$	9/104 (8.7%) vs. 9/60 (15.0%)	0.54	0.2–1.4	.2105
IV. Property conditions, including disinfection procedures $\geq 5\%$	8/68 (11.8%) vs. 10/96 (10.4%)	1.15	0.4–3.1	.7856
V. Food manipulators' knowledge and training in food handling $\geq 6\%$	11/510 (2.16%) vs. 11/114 (9.6%)	2.56	1.1–6.3	.0254
Children's physical condition and habits at home				
Children with nutritional score ≥ 21 (3 standard deviation)	10/101 (9.9%) vs. 7/46 (15.2%)	0.61	0.2–1.7	.3500
Age > 6 years	10/98 (10.2%) vs. 6/56 (10.7%)	0.95	0.3–2.8	.9205
Drinking boiled water	11/73 (15.1%) vs. 10/90 (11.1%)	1.42	0.6–3.6	.4533
Juice prepared with boiled water	11/94 (11.7%) vs. 7/69 (10.1%)	1.17	0.4–3.2	.7540
Washing fruits with unboiled water	5/18 (27.8%) vs. 13/131 (9.9%)	3.88	1.3–11.3	.0170
Washing vegetables with boiled water	15/145 (10.3%) vs. 3/15 (20.0%)	0.46	0.1–1.8	.2599
Same table used for cooking meats and vegetables	1/26 (3.9%) vs. 17/135 (12.6%)	0.28	0.0–1.9	.1950

Two-tailed statistically significant association ($p < .05$) is shown in bold.

that were different from those related to habits at home. The lower compliance of property conditions in restaurants increased significantly the risk for *S. hominis* in children (Table 3) and lower training in food manipulators increased the risk of *G. duodenalis* in the stool of children who ate at those restaurants (Table 5). At home, the habits that increased significantly the risk were to wash vegetables with unboiled water for *Cryptosporidium* spp (Table 4) and washing fruits with unboiled water for *G. duodenalis* (Table 5).

3.4 | Phylogenetics analysis from DNA sequencing results

We analyzed sequencing in all positive samples in food and stool. All good quality sequences had differences at the region analyzed, indicating that they were unique, except for three of them that are the same as the control sequence (Figures 1a and 2a). Overall, there were no indications of generalized contamination. For *Salmonella*, from

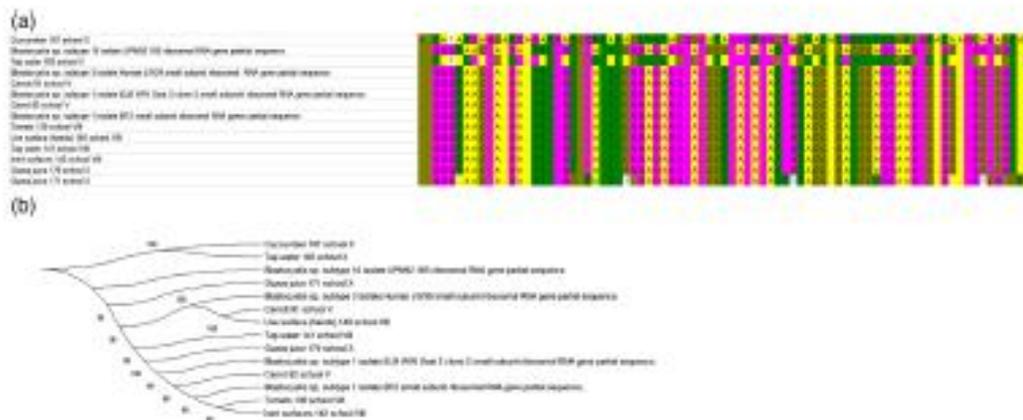


FIGURE 1 (a) Alignment of *Salmonella hominis* sequences amplified from food and surface samples obtained at the school restaurants in Armenia (Quindío, Colombia) during 2018. The source of visually curated good quality sequences is described together with the number assigned to the restaurants where the samples were obtained. (b) Bootstrap consensus tree inferred by UPGMA method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (2,000 replicates) are shown next to the branches. The analysis involved 14 nucleotide sequences. Codon positions included were first + second + third + Noncoding. There were a total of 80 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6.

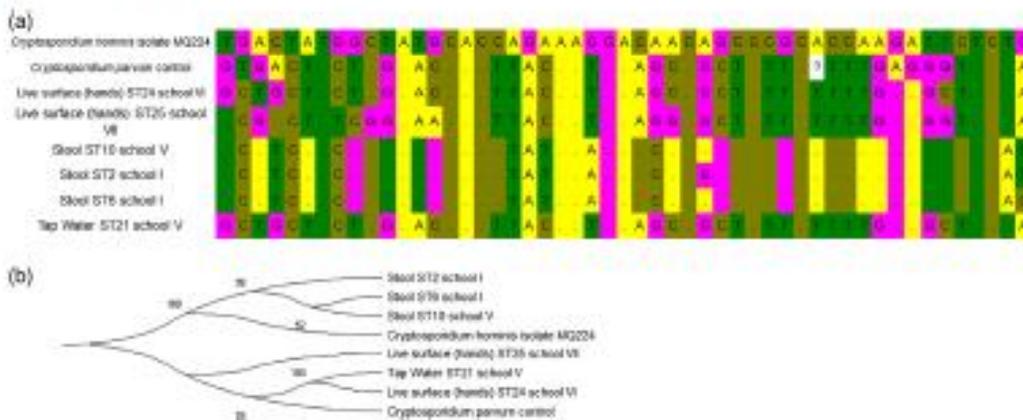


FIGURE 2 (a) Alignment of *Cryptosporidium* spp sequences amplified from food and surface samples obtained at the school restaurants in Armenia (Quindío, Colombia) during 2018. The source of visually curated good quality sequences is described together with the number assigned to the restaurants where the samples were obtained. (b) Bootstrap consensus tree inferred by UPGMA method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (2,000 replicates) are shown next to the branches. The analysis involved 52 nucleotide sequences. Codon positions included were first + second + third + Noncoding. There were a total of 50 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 6.

14 PCR-positive samples, 10 were of good quality for alignment analysis, within these, two sequences (from carrot and live surface) were clustered with the human subtype 3 (Figure 1b). For *Cryptosporidium* spp from 20 PCR-positive samples in stools, only three were of quality for alignment and they were clustered with *C. hominis* reference strain. From eight samples with PCR-positive samples for *Cryptosporidium* spp in food, water, and surfaces, three were sequenced and then the phylogenetic analysis showed they clustered with *C. parvum* (Figure 2b). No sequencing was obtained for *Giardia* spp positive samples.

4 | DISCUSSION

Foodborne and waterborne monitoring for parasites is challenging, given that no standardized methods exist for routine analysis (Roussseau *et al.*, 2018). No regulation exists at this moment regarding these biohazards. Although PCR for DNA detection does not determine the viability or infectivity of the parasites, it is sensitive enough to detect low quantities of parasites and is accessible for routine analyses. While this method can overestimate the presence of infective parasites by detecting all populations (live and infectious, live and noninfectious, or dead) they offer information on the maximum occurrence and about the level of food contamination. In principle, food should be free from the presence of parasite DNA and any contamination indicates failure in good agricultural or food processing practices (Roussseau *et al.*, 2018).

We found that in 50% of the school restaurants in America there was the presence of DNA of pathogenic protozoa (*Blattocystis*, *Cryptosporidium*, and *Giardia*) in water, inert and living surfaces, and food. Also, our data showed that children who ate at those restaurants have the same parasites that are present in food and we could correlate the compliance of food inspection requirements with the prevalence of *Giardia* spp and *Blattocystis* in children who ate at those restaurants. Particularly, the disinfection measures and the level of formation of food manipulators were associated with a higher risk for infection of children that ate at those restaurants for *Blattocystis* and *Giardia*, respectively. Sequencing was relevant to confirm that *Blattocystis* subgroups that infect humans were present in food from these restaurants, such as subtype 3 (Ramírez, Fletes, Olivares, Bernal, & Giraldo, 2017). This suggests food as a potential vehicle for this protozoa, as we described previously (Londolfo-Franco, Loalza-Hierona, Lara-Suárez, & Gómez-Marín, 2014). *Blattocystis* subtypes 2 and 3 have been related to diarrhea and irritable bowel syndrome (Ramírez *et al.*, 2017). Subtype 3 is the most common subtype found in humans and present data indicate that food can also be implied in its transmission (Jiménez, Jaime, & Ramírez, 2019). Sequencing of PCR results was also important to discriminate between species for *Cryptosporidium* and in the present work it was possible to identify *C. hominis* in stools from children and to detect *C. parvum* in water and surface. We have reported that *C. parvum* is detected in tap water more frequently than *C. hominis* in our city (Tirvilo-Valencia *et al.*, 2016).

Microscopy for *Blattocystis* and *Giardia* was enough to detect these parasites in children's stools, contrary to *Cryptosporidium* that only was detected by PCR. It is reported that molecular assays increase its identification considerably (Adeyemo, Singh, Reddy, & Steinhilber, 2018).

Inspection scores identified restaurants with a higher risk for parasite infection in children. The lack of coincidence between the inspection scores and the frequency of protozoa in the samples obtained in food and surfaces in the restaurants, can be explained by the low sensitivity of the technique to identify parasites on food, but the association with inspection scores and infection of children indicates that continuous exposure to restaurants with deficient hygienic conditions is an important factor for these infections in children. The present study provides information indicating that fulfillment of inspection scores can reduce the exposure of children to pathogenic protozoa in restaurants, but it is also important to note that prevention measures at home are important and prevention measures should be conducted with parents to reduce the infection of children at home. Particularly, the use of boiled water was very significant when preparing fruits and vegetables for consumption to reduce risk for *Giardia* and *Cryptosporidium*.

This is the first study, to the best of our knowledge, that looked for many pathogenic intestinal protozoa and its correlation with restaurant inspection scores. The present findings support the application of the food safety inspection instrument as a public health tool (da Cunha, de Rosas, & Stedefeldt, 2014; Lee & Hedberg, 2016). In conclusion, this study identified potential sources and critical points where public health authorities can intervene in school restaurants to reduce the risk of foodborne protozoa.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Universidad del Quindío and COLCIENCIAS (Grant Number: 111372553376).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare having no conflict of interest related to the contents of this manuscript.

ORCID

Giulia Deisy Murcia-Sánchez  <https://orcid.org/0000-0001-8617-3209>

Natalia Heredia-Arango  <https://orcid.org/0000-0003-1363-5040>

Estefanía Buitrago-López  <https://orcid.org/0000-0003-1245-5478>

Julio César Luna  <https://orcid.org/0000-0001-8430-7293>

Alejandra Zamora  <https://orcid.org/0000-0003-4258-000X>

Fabiana Lara-Suárez  <https://orcid.org/0000-0003-0094-3044>

Jorge Enrique Gómez-Marín  <https://orcid.org/0000-0001-6472-3329>

REFERENCES

- Adeyemi, F. E., Singh, G., Reddy, P., & Sternström, T. A. (2018). Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Tropica*, 184, 1–5–28. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.011>
- Cook, N., Nichols, R. A. B., Wilkinson, N., Paton, C. A., Barker, K., & Smith, H. V. (2007). Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of solid products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7388–7391. <https://doi.org/10.1128/AEM.02552-07>
- da Cunha, D. T., de Rosa, M. V., & Stedebeidt, E. (2016). Should weights and risk categories be used for inspection scores to evaluate food safety in restaurants? *Journal of Food Protection*, 79(3), 501–506. <https://doi.org/10.4315/JFP-15-292>
- DANE. (2019). No Title. Retrieved from <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/censo-nacional-de-poblacion-y-vivienda-2018>
- de Competitividad, C.P. (2018). INDICE DEPARTAMENTAL (Sector) Bogotá: Punto Aparte Retrieved from https://compitividad.com.co/wp-content/uploads/2019/03/LIBRO-CPC_DC_2018_WEB.pdf
- Ebach, D., Krumkamp, R., Al-Emer, H. M., Sarpong, N., Hagen, R. M., Adu-Sarkodie, Y., ... May, J. (2015). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. among children in rural Ghana. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0003551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003551>
- FAO/WHO (2014). *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites*. In WHO (Ed.), *Microbiological Risk Assessment Series (first)*. Geneva: WHO/FAO Retrieved from <http://www.who.int/a-06-49e.pdf?S6Crfile/540/a-06-49e.pdf>
- Graldo-Gómez, J. M., Lora, F., Henao, L. H., Mejía, S., & Gómez-Marín, J. E. (2005). Prevalence of giardiasis and intestinal parasites in pre-school children from homes being attended as part of a state programme in Armenia, Colombia. *Revista de Salud Pública (Bogotá, Colombia)*, 7, 327–338. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642005000300008>
- Hernández-Arango, N., Pinto, V., Muñoz-Sánchez, D., Lora-Suárez, F., & Gómez-Marín, J. E. (2019). Detection of *Giardia* spp. with formalin/ether concentration in *Brosica oleracea* (cabbage) and *Lactuca sativa* (lettuce). *Heliyon*, 5(8), e02377. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02377>
- Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherill, J. D., Reynolds, J. A., & Thompson, R. C. (1997). Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *The Journal of Parasitology*, 87(1), 44–51. <https://doi.org/10.2307/3284315>
- Jiménez, P. A., Jaime, J. E., & Ramirez, J. D. (2019). A summary of *Blattocystis* subtypes in north and South America. *Parasite & Vectors*, 12(1), 376. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2>
- Lalonde, L. F., & Gajadhar, A. A. (2008). Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclopora caytonensis* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4354–4358. <https://doi.org/10.1128/AEM.00332-08>
- Lee, P., & Hedberg, C. W. (2016). Understanding the relationships between inspection results and risk of foodborne illness in restaurants. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(10), 502–506. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2137>
- Londoño-Franco, Á. L., Loaiza-Hernera, J., Lora-Suárez, F. M., & Gómez-Marín, J. E. (2014). *Blattocystis* sp. frequency and sources among children from 0 to 5 years of age attending public day care centers in Calaró, Colombia. *Biotropica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, 34, 218–227. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000200008>
- Lora-Suárez, F., Rivera, R., Triviño-Valencia, J., & Gómez-Marín, J. E. (2016). Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Research*, 100, 377–381. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.038>
- Ramírez, J. D., Fikser, C., Olivera, M., Bernal, M. C., & Graldo, J. C. (2017). *Blattocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One*, 12(2), e0172586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172586>
- Ramírez, J. D., Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Fikser, A. C., & Sternsvold, C. R. (2014). *Blattocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020>
- Read, C., Walters, J., Robertson, I. D., & Thompson, R. C. A. (2002). Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *International Journal for Parasitology*, 32(2), 229–231. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00340-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00340-X)
- Roussseau, A., La Carbona, S., Dumitre, A., Robertson, L. J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., ... Aubert, D. (2018). Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: A review of methods. *Parasite*, 25, 34. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018009>
- Tan, K. S. W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blattocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 639–665. <https://doi.org/10.1128/CMR.0022-08>
- Triviño-Valencia, J., Lora, F., Zúñiga, J. D., & Gómez-Marín, J. E. (2016). Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitology Research*, 115(5), 1789–1797. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Muñoz-Sánchez GD, Hernández-Arango N, Bullrago-López E, et al. Food protozoa safety assessment and risk in school restaurants in Armenia, Colombia. *J Food Saf*. 2019;e12754. <https://doi.org/10.1111/jfs.12754>

Modelo de cocción

**VI Simposio Internacional
Agroalimentario**

Del 9-11 de octubre de 2019
Centro de convenciones – Montería, Córdoba



sial¹⁹
VI Simposio Internacional
Agroalimentario
Asociación para el Emprendimiento
y Desarrollo Alimentario Sostenible

**THEORETICAL COOKING EVALAUTION OF PORK MEAT AND
EFFECT ON THE THERMAL DESTRUCTION OF PARASITES.**

***Luna R. Julio C.¹, Pinzón F. Magda I.¹, Gómez M. Jorge E.², Villa Z. Cristian C.³,
Cortes V. Jesús A.⁴, Lora Fabiana M. C.⁵**

¹ *Programa de Ingeniería de Alimentos. Facultad de Ciencias Agroindustriales.
Universidad del Quindío. Armenia. Colombia * jluna@uniquindio.edu.co*

² *Programa de Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío.
Armenia. Colombia.*

³ *Programa de Química. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Universidad del
Quindío. Armenia. Colombia*

⁴ *Grupo Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Colombia*

⁵ *Programa de Biología. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Universidad del
Quindío. Armenia. Colombia*

Abstract

There exist a need for improved models of risk for meat borne toxoplasmosis. Here we proposed a model that includes time and temperature of cooking and thickness of the pork meat portion. The model was based on data of lethality with heat treatment for pig meat taking into account the thermodynamic properties of the meat piece. The heat penetration curves were integrated into a Monte Carlo simulation. We found that one critical component to obtain safe cooking temperatures at the center of the piece (65 °C) is the thickness of the piece. This model indicates important practical recommendation to obtain a low risk for *Toxoplasma* infection during cooking of meat.

Keywords: *Toxoplasma*; meat; Colombia; cooking temperatures, model, Thermal destruction time




www.unicordoba.edu.co

VI Simposio Internacional Agroalimentario

Del 9-11 de octubre de 2019
Centro de convenciones – Montería, Córdoba



1. Introduction

Toxoplasma gondii infects a large variety of vertebrates and is considered the most prevalent zoonotic parasite in the world ⁽¹⁾. The consequences for humans are important, including opportunistic, congenital infections and recent evidence also suggest an effect on mental health ^(2,3). The Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization declared *Toxoplasma* as the fourth priority parasite in food of global concern ^(4,5). Systematic review of case controlled studies about consumption of raw or undercooked beef or sheep meat indicate that they are an important source of *T. gondii* transmission to humans ⁽⁶⁾. There exist also good evidence that indicates that in Europe uncooked meat is the main source of infection for pregnant women, as was concluded by a review about meat as source of *Toxoplasma* infection ⁽⁷⁾ and, at least in Colombia, consumption of raw meat (irrespective of meat species) was the risk factor with the highest odds ratio to acquire infection during pregnancy ⁽⁸⁾. In consequence, to protect the general population it is necessary to establish what measures to prevent *Toxoplasma* infection from meat can be recommended ⁽⁹⁾. Five qualitative and quantitative microbial risk assessment (QMRA) models have been proposed ⁽¹⁰⁻¹⁵⁾. All this models were proposed to estimate the probability of infection and/or exposure in order to support decisions on the management of food safety issues, but important gaps in our knowledge were identified that indicates that without further data on the distribution of the number of cysts in edible tissues and of bradyzoites per cyst, estimations will have considerable uncertainty ⁽¹²⁾. We consider that until we can completely model the risk, the present option is to consider all meat potentially infected, so it is important to give indications to the population about what cooking conditions eliminates the risk of infection for consumer. At this regard, two definitive factors, that it has not been analyzed in previous models of risk assessment, are the temperature and the time for cooking taking into account the thermodynamics of different type of meat and thickness of the portion of meat. Here we present a model by using the pork loin meat as example, considering thermodynamics for each piece of meat and thus we can offer practical recommendation of cooking to prevent *Toxoplasma* infection through meat.

2. Materials and methods.

2.1 General model

In order to model the lethality on *Toxoplasma gondii* in pork during cooking, five stages were required, the first two focused on the determination of temperature profile a) determination of thermodynamic properties of pork loins, b) determination of heat penetration curves or temperature profile of the loin (as the temperature changes inside the piece depending on the type of cooking), the next two focused on the destruction of the *T. gondii* by the heat treatment in the cooking of loins, which requires c) determination of the time of thermal death (D) at different temperatures and finally d) lethality analysis of *T. gondii*. The purpose of the last stage is to validate the model for which the Monte Carlo simulation was carried out.



VI Simposio Internacional Agroalimentario



2.2 Determination of the thermodynamic properties of pork

The thermodynamic properties of meat that were used in the model were specific heat (Cp), thermal conductivity (κ), thermal diffusivity (α) and density (ρ) were calculated by using the following equations: ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

$$Cp = \sum_{i=1}^{100} (Cp_i + \phi_i) \quad \text{Eq. 1}$$

$$K = \sum_{i=1}^{100} (K_i + \phi_i) \quad \text{Eq. 2}$$

$$\rho = \sum_{i=1}^{100} (\rho_i + \phi_i) \quad \text{Eq. 3}$$

The values (ϕ) of nutrient composition (water, carbohydrates, lipids and) for each type of meat (beef, pork or chicken) were obtained from the software Nutrix • and AgroUQ Termin •. The data of both software are based on a table of nutrient composition of Colombian food (Instituto Colombiano de Bienestar Familiar), including standard deviation of values. The Termin® software performs a combined uncertainty analysis for these values (Equation 5).

$$U = \sqrt{\sum_{i=1}^n U_i^2 + \phi_i} \quad \text{Eq. 5}$$

2.3 Heat penetration curves.

We assume that heat transfer across a solid (meat piece) is not uniform, this difference will be manifested as a rate of change of temperature with time ⁽¹⁹⁾. This type of problem is called an unsteady state of heat transfer, thus the temperature at the center of the piece is estimated according the rate of change of temperature with time at any position (τ) and \square the time of cooking (θ) and by using equation 6:

$$\frac{\delta \tau}{\delta \theta} = \frac{k}{\rho Cp} \left(\frac{\delta^2 \tau}{\delta x^2} \right) = \alpha \left(\frac{\delta^2 \tau}{\delta x^2} \right) \quad \text{Eq. 6}$$

Due to the complexity of these calculations, a graphic method was used in order to solve them, where the order is θ is the relationship between differences that exist in initial temperature (T_0) and final temperature at time t (T) of de center of piece of meat (or cold point). With respect to the temperature of the environment (T_a).

$$\theta = \frac{T - T_a}{T_0 - T_a} = \frac{T_a - T}{T_a - T_0} \quad \text{Eq. 7}$$

And the values of axis with the Fourier number obtained with the following formula::

$$F_0 = \frac{k}{\rho Cp} \left(\frac{\theta}{L^2} \right) = \alpha \left(\frac{\theta}{L^2} \right) \quad \text{Eq. 8}$$

The slope was acquired with the formula (Biot number, Bi):

$$Bi = \frac{hL}{K} \quad \text{Eq. 9}$$

With this information an Excel® spreadsheet was designed in order to calculate the temperature inside the pork meat as they are cooked. Heat penetration is dependent of several variables, such as: thickness, origin of the meat, initial temperature and specially of the cooking conditions. This model was adjusted for pork loins and any other type of pork meat.



VI Simposio Internacional Agroalimentario



2.3.9. Evaluation of the cooking model.

Theoretical evaluation of the model was carried out by comparing the results to the heat penetration curves reported by Swart y Franssen^(7 y 8), using a thickness value of 1.25 cm, an initial temperature of 20°C and the stove temperature was set at 153°C

On the other hand, experimental evaluation was carried by heating pork loins with 10 times greater than the radius in order to assume that the loin is like an infinite cylinder and allows the calculation of the uni-directional heating. Heating was carried out in convection ovens of pork loins at three different temperatures (100, 130 and 150 ° C). In order to obtain the temperature profiles, a temperature sensor was placed in the midpoint of the midpoint of the piece. The temperature sensors were K type thermopiles adapted to a MAX6675 module and later connected to the conditioning module and the data acquisition system. The Arduino connection to the computer presents the temperature information of each of the evaluation points in real time (temperatures were recorded every 2 seconds). Then with the information the temperature curves were constructed and fitted to the proposed mathematical mode.

2.4 Estimation of the effect of heat on *Toxoplasma* viability:

To estimate the effect of different cooking conditions on *Toxoplasma* cysts viability we used the data obtained by bioassay on mouse model of the effect of heat on viability of *Toxoplasma* in pork meat⁽²⁰⁾. This work reported the viability after cooking pork meat at 49, 52, 55, 58, 61, 64 and 67 °C during 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 96 minutes and described the 99% upper confidence limits of the time required at each temperature for the inactivation of *Toxoplasma gondii*. By using this data, the time of thermal destruction of *Toxoplasma* (constants D and z) was calculated by assuming a kinetic of first order where the Dt value was the time need to destroy the 90% of parasites (based on the bioassay data). The z value was the increase in temperature in °C need to obtain a tenth of the initial Dt value. Finally the D (destruction of parasites at different cooking temperatures) was calculated as follows:

2.5 *T. gondii* lethality analysis.

Cooking is the most common form implemented in households to reduce the presence of biological hazards, as is the case of exposure to *T. gondii* in infected fresh pigs. However, another type of treatment such as low temperatures, marinated use may not be sufficient to inactivate *T. gondii* bradyzoites. So it is assumed that cooking is the only factor associated with the reduction / inactivation of *T. gondii* in home kitchens. To calculate the lethality, the D values are multiplied at each of the temperatures reported according to the temperature profile curve (the D values were calculated based on D 49 °C and z) for the time that the piece of meat is at that temperature (for each test, 20 divisions were made) and the sum of the projected time was made to the reference temperature (only the data were used for the calculation when the internal temperature of the meat was higher than 49 ° C), for it % compliance the relation of the projected time to which the indicator microorganism was subjected to a treatment similar to that of the reference temperature (T1) was made on the time that the microorganism should be in order to guarantee that the food is considered safe F0 (the F value represents the integrated microbial lethality or as a known cooking value C, time equivalent to the reference temperature, using the heat penetration curves as a function



VI Simposio Internacional Agroalimentario



of time alluded to the reduction the probability of infection assuming as the effect of lethality in the parasite by cooking.

$$F(\text{treatment}) = \sum_{n=1}^{\infty} L \theta_n = \int_0^t L(T) d\theta = \int_0^t D 10^{\frac{T-t}{z}} \theta \quad \text{Eq. 10}$$

2.6. Treatment validation

We used Montecarlo simulation to analyze cooking conditions by using the Crystal Ball software (Oracle, United States). We estimated different curves of heat penetration by modifying time of cooking, thickness of meat portion and type of preparation (barbecue or frit), and % of achievement of thermal treatment (% logarithms cycles). Finally sensitivity analysis was performed. We made 30 simulations with 3 repetitions and 10.000 iterations. We use Termin software data with a limit of variability of 2%.

3. Results and Discussion

3.1 Thermal properties analysis

Using the concept of mixing thermodynamics, the physical properties of foods can be determined if the fractions of the macronutrient components (ϕ) are known. The Nutrix® software presents the food composition or mixture of these using the tables of Colombian food composition and results are show in table 1.

Table 1. Composition of Colombian pork loins

Component g/ 100 g	
Water	67.80
Protein	27.10
Fat	3.60
Sugars	0.30
Ash	1.20

Using the AgroUQ Termin® software, the thermodynamic properties were determined using the equations of Choi et al., 1986⁽¹¹⁾. With the composition values and the uncertainty reported by the Nutrix software. The values of thermodynamic properties are presented in the table 2

Table 2. Thermic properties of the pork loins

Thermic properties		
Specific heat C_p	3.34 ± 0.10	KJ / Kg °K
Thermal conductivity K	0.47 ± 0.01	Wat / m °K
Density ρ	1105 ± 33	Kg / m ³
Thermal diffusivity α	0.00013	m ² / s



VI Simposio Internacional Agroalimentario



3.2 Temperature profile and final temperature inside the piece of meat
 In order to perform the temperature profile curves, the thermodynamic properties and the designed model are used and the temperature of the piece of meat is determined as a function of time as shown in Figure 1.

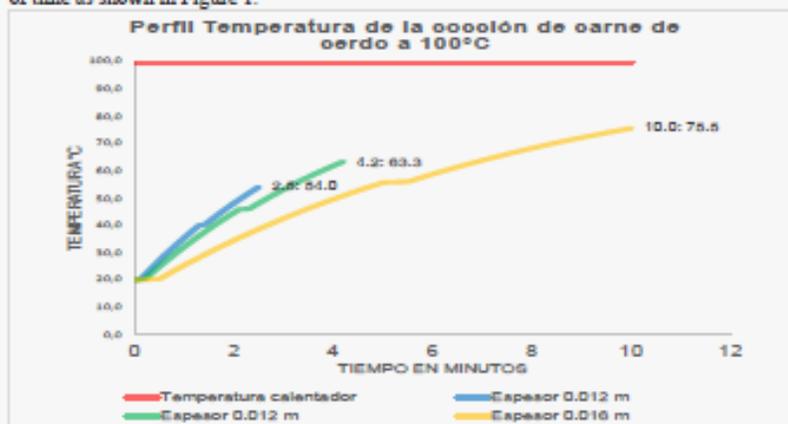


Figure 1. Temperature profile of the pork loins during cooking. Meat thickness 0.012m.

The results obtained were compared with those presented by Swart for different scenarios of pork cooking and, as shown in Figure 3, they are similar. (If a piece with an initial temperature of 0.0125 m thickness is heated, after 2.5 minutes it achieves a final temperature of 54 ° C or after 4.2 an internal temperature of 63 ° C is achieved) comparatives are presented in Figure 2.

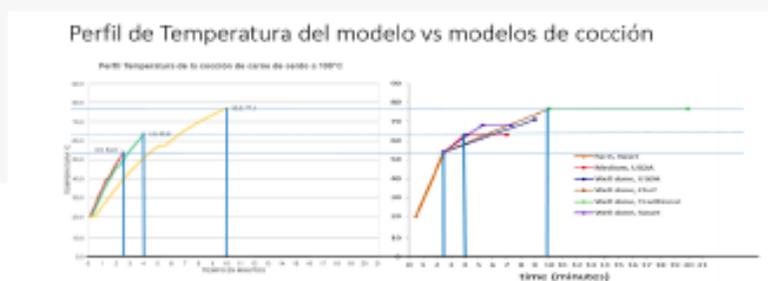


Figure 2. Comparison of the temperature profiles of pork loin cooked from the calculated data vs those reported by other authors



VI Simposio Internacional Agroalimentario



For the experimental evaluation, first 5 heating tests were carried out on two pieces of pork loin to which a temperature sensor was placed in the middle of the meat, the average thickness of the pieces was 4.5 cm, with a initial temperature of 20 ° C. And a heating was done in an oven at 120 ° C, a record of 4 temperatures was made (two inside the pieces and two in different points of the chamber) the temperature record was made on average every 2.98 second. These results can be exported from the module through a flat file which is passed to an Excel sheet for calculations. Using the concepts of control charts, the standard deviation of the temperatures reported between the sensors is 1.16 ° C in the chamber and 0.66 ° C in the pieces of pork loin. With the average of the data, the temperature profile graph is presented which is presented in Figure 3.

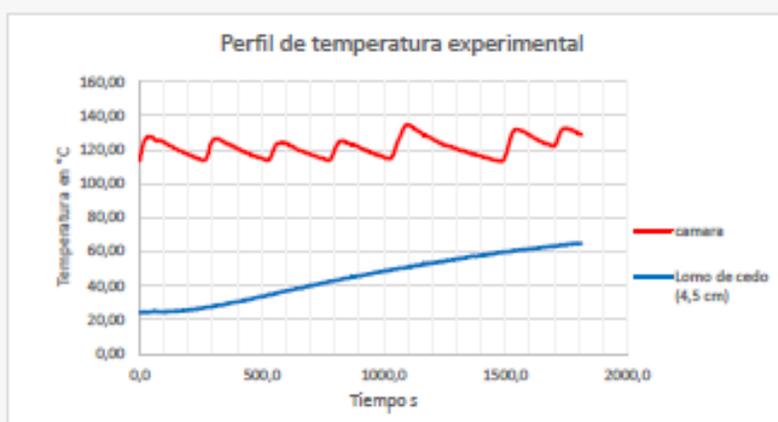


Figure 3. Experimental temperature profile of pork loin cooking temperature of 4.5 cm thick

After determining the thermodynamic properties of the pieces and calculating the temperature profile in the center of the piece according to the same conditions of the tests, these results are compared with the experimental results. In Figure 4 it can be seen that the calculated temperature profile is coincident with experimental temperature profile



Del 9 al 11 de octubre de 2019



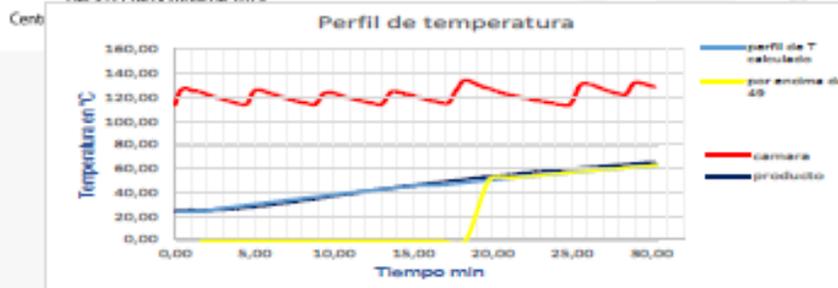
Unión para el Mejoramiento
del Alimento Sostenible


Figure 5. Comparison of temperature profiles Calculated vs. experimental

3.3 Evaluation of lethality on *Toxoplasma gondii* in pork loin cooking.

Determination of the thermal death time D is carried out as well as the determination of the z value for which the curves of the kinetics are made at different temperatures of the data reported by Dubbey in 1990, to which the regression analysis is made and found that $D_{49}^{\circ}C = 8.3$ minutes and $z = 7^{\circ}C$ (Results not shown)

Table 3. Thermal Destruction (value D) of *T. gondii* in minutes at different temperatures

Temperature ($^{\circ}C$)	D-value (minutes)
49	8.3
52	3.2
58	0.5
64	0.07

With this information, we can calculate the Thermal Destruction Time D at other temperatures using the following equation (equation 11), where T is the reference Temperature ($49^{\circ}C$ $D=8.3$) and t is the temperature at which the heat treatment is performed and z for *Toxoplasma gondii* is $7^{\circ}C$

$$D = D_T + 10^{\frac{T-t}{z}} \quad \text{Eq. 11}$$

$$D_t = D_{49^{\circ}C} + 10^{\frac{T-t}{z}} \quad \text{Eq. 11}$$

$$D_t = 8,3 + 10^{\frac{49-t}{7}}$$

For the analysis, lethality is calculated by performing the summation of the reduction at each temperature and time reported in the thermal treatment, according to the temperature profiles. Only temperatures higher than $49^{\circ}C$ are taken into account.



VI Simposio Internacional Agroalimentario



para el Mejoramiento
Alimentario Sostenible

$$F(\text{treatment}) = \sum_{n=1}^{\infty} L \theta_n = \int_0^t L(T) d\theta = \int_0^t 10^{\frac{T-49}{x}} \theta$$

And the time that the piece of meat is exposed to a treatment similar to 49 ° C is calculated, which if it lasts 8.3 minutes reduces to 10% of the probability of infection (reduces a logarithmic cycle) that lasts 16.6 reduces to 1% the probability of infection (reduces two logarithmic cycles) and that if it lasts 24.9 minutes reduces to 0.1% probability of infection (reduces three logarithmic cycles), a condition recommended by Dubey's work. To make the calculation the sum of the adjusted times of the temperatures above 49 ° C is made

Table 4. Calculation to determine the Lethality (sum of time)

Time (min)	Temperature (°C)	Δ	T-49	(T-49)/t	$10^{(T-49)/t}$	$L = \theta 10^{(T-49)/t}$
0.00	20.8	0.00	-28.25	-2.825	0.001496236	0.000000
1.03	21.0	1.03	-28.00	-2.8	0.001584893	0.001630
2.01	21.0	0.98	-28.00	-2.8	0.001584893	0.001551
3.02	22.3	1.01	-26.75	-2.675	0.002113489	0.002139
4.05	23.0	1.03	-26.00	-2.6	0.002511886	0.002584
5.03	24.5	0.98	-24.50	-2.45	0.003548134	0.003473
7.03	29.0	2.01	-20.00	-2	0.01	0.020073
9.04	35.8	2.01	-13.25	-1.325	0.047315126	0.094977
11.00	41.3	1.96	-7.75	-0.775	0.167880402	0.328636
13.01	47.3	2.01	-1.75	-0.175	0.668343918	1.341587
15.01	51.8	2.01	2.75	0.275	1.883649089	3.781106
17.02	56.5	2.01	7.50	0.75	5.623413252	11.268048
19.03	60.8	2.01	11.75	1.175	14.96235656	30.034391
21.04	64.3	2.01	15.25	1.525	33.49654392	67.238626
21.09	65.0	0.05	16.00	1.6	39.81071706	1.981320
Summation						114.3

3.4 Data simulation.

After evaluating the model comparing with the reported results and the experimental data, the determinations were made of the time required to heat pork loin of different thickness and achieve an internal temperature of 65 ° C, which is the recommended temperature for cooking meat from pork as shown in Table 5.

Table 5. Pork loin temperature cooking results at 100 and 170 ° C

Characteristic	Pork loin					
	100			170		
Thickness (cm)	2	4	6	2	4	6
External temperature (°C)	5	5	5	5	5	5
Initial temperature (°C)	5	5	5	5	5	5
Final temperature (°C)	65	65	65	65	65	65
Cooking time (min)	13.0	52.0	117.0	5.7	22.5	50.6



VI Simposio Internacional Agroalimentario



¡para el Mejoramiento
y Alimentario Sostenible!

Cent Using the Monte Carlo simulation to analyze the cooking conditions by using the Crystal Ball software (Oracle, United States). We estimate different heat penetration curves modifying the cooking time, the thickness of the meat portion and the type of preparation (roasted 100 °C or fried 170 °C), it is assumed that the meat is safe when the treatment performed has a reduction of 2 logarithmic cycles. Finally, a sensitivity analysis was carried out. Performing 18 simulations with 3 repetitions and 10,000 iterations each. For the variability of the data in each iteration, the following information was used: for temperatures (standard deviation of the temperatures reported between the sensors is 1.16 °C in the chamber and 0.66 °C), thermodynamic properties according to the results of combined uncertainty ($C_p 3.34 \pm 0.1002$, $K 0.47 \pm 0.0141$, $\rho 1105 \pm 33.15$). And it was found that although the product reaches the internal temperature of 65 °C. The time necessary to reduce the probability of infection to less than 0.1% is not always achieved, as shown in Figure 6

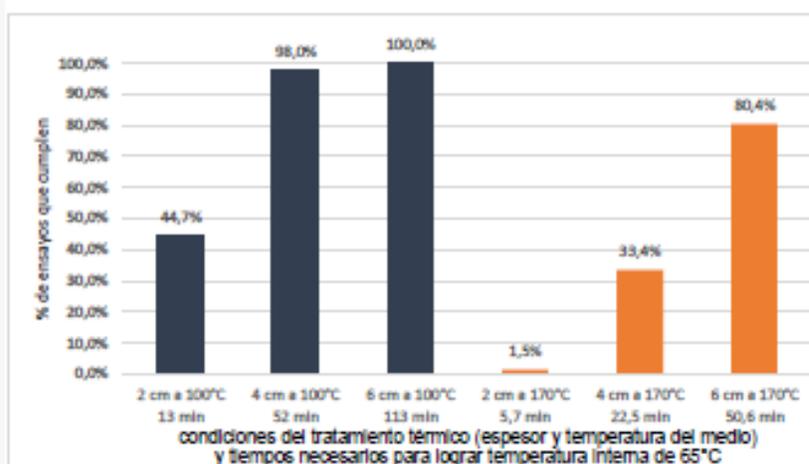


Figure 6. Iterations that comply with the destruction of *Toxoplasma gondii* when the pork is cooked up to 65 °C, depending on temperature and thickness

4. Conclusion.

It was found that: a) the proposed mathematical model is coincident with the experimental data and similar to other reported results. b) to achieve safe temperatures in the cooking of pork (according to the Department of Agriculture of the United States is 65 °C inside the piece), a critical factor is the thickness of the piece. This model indicates important practical recommendations to prepare meat with a low risk of infection by *Toxoplasma gondii* prepares the meat at low temperature and preferably thick pieces. In order to keep the meat longer at temperatures that guarantee the destruction of the parasite.



VI Simposio Internacional Agroalimentario



The model emphasizes that the thickness of the piece of meat is the critical parameter that influences the time and temperature necessary to achieve optimal temperatures in the center of the piece. The food industry must take into account that the thermodynamic properties change according to the species and the cut used, in addition that these vary from one country to another, therefore the recommendations can also be modified and the health authority of each country must take into account the estimate of risk and determine what cooking recommendations should be made to the final consumer.

5. References

1. Gómez B., Rodríguez C., Zambrano D., González N. Manual de cortes de cortes de carne de cerdo Colombiano. Centro de Investigación y transferencia de tecnología del sector porcícola Ceniporcino, Bogotá 2012
2. United States Department of Agriculture. USDA Revises Recommended Cooking Temperature for All Whole Cuts of Meat, Including Pork, to 145 °F. Volume 13, Issue 21 May 27, 2011
3. Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture. Inocuidad de la carne de cerdo, desde el criadero hasta la mesa del consumidor. Washington, D.C. febrero 2003
4. U. S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. Temperature rules cooking for food service, 2008
5. Choi Y., M. Okos. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of Foods. Food Engineering and Process Applications. 1. 93-101.
6. Orrego C. 2003. Procesamiento de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales
7. Swart, A., Berriman, A., Kosmider, R., 2015. Application of the thermal inactivation model to model risk to human health from consumption of VTEC O157 in beef burgers. Summary Report. Animal & Plant Health Agency and National Institute for Public Health and the Environment.
8. Franssen F, Swart A, Van der Giessen J, Havelaar A, Takumi K. Parasite to patient: A quantitative risk model for *Trichinella* spp. in pork and wild boar meat. International Journal of Food Microbiology 241 (2017) 262-275
9. Dubey J., Kotula A., Sharar A., Andrews C., and Lindsay D.. Effect of High Temperature on Infectivity of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Pork. Journal of Parasitology · May 1990
10. Rao M, Rizvi S., Datta A. 2005. Engineering properties of food. 3ª edición. Taylor & Francis Group. New York, USA
11. Choi Y., M. Okos. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of Foods. Food Engineering and Process Applications. 1. 93-101.
12. Swart, A., Berriman, A., Kosmider, R., 2015. Application of the thermal inactivation model to model risk to human health from consumption of VTEC O157 in beef burgers. Summary Report. Animal & Plant Health Agency and National Institute for Public Health and the Environment.



Anexo 12 Analisis de escenarios

Evaluación cuantitativa de riesgo de infección en población infantil por *Toxoplasma gondii* por consumo de carne de cerdo, modelo para Armenia. Quindío

Toxoplasma gondii es uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos el cual infecta a más de la mitad de la población colombiana, según datos reportados población infantil tiene una prevalencia del 32%. Uno de los factores de riesgo es el consumo de carne de cerdo poco cocida en los que el *T. gondii* ha enquistado. Sin embargo, no se dispone de suficiente información sobre la evaluación cuantitativa del riesgo por carne o productos cárnicos. El objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo de evaluación cuantitativa de riesgo microbiano (QMRA) para predecir el riesgo de salud pública asociado con el consumo de cerdo en población infantil de 6 a doce años en la ciudad de Armenia Quindío. Los datos obtenidos para el modelo fueron obtenidos de un meta-análisis de los datos existentes de La prevalencia de *T. gondii*, reportes de sacrificio de cerdo, el consumo y frecuencia de consumo. Se utilizó el aplicativo Agro UQ cocción de carnes para predecir probabilidad de *T. gondii* de acuerdo al tipo de punto final de la cocción. De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que se puede reducir de 430 a 2 nuevos casos por año si prepara la carne de un punto jugoso (temperatura interna de 53°C) a bien cocida (temperatura interna de 75°C). Este estudio recomendaciones para la preparación de alimentos en las condiciones de restaurantes escolares o en hogar para el control del riesgo de infección de *T. gondii* y otros parásitos.

1.1 Introducción

La mayoría de los animales de sangre caliente pueden infectarse con *T. gondii*. Existen tres estadios infecciosos de *T. gondii*: taquizoítos, bradizoitos en quistes tisulares y esporozoitos contenidos en ooquistes (Hill, Sreekumar, & Dubey, 2005). Los brotes documentados de toxoplasmosis humana se han relacionado con el consumo de agua contaminada con oocistos y la carne que contiene quistes de tejido (Dubey, 2010). Estudios epidemiológicos han demostrado que la carne,

particularmente el cerdo y el cordero, es una fuente importante de infección (Boyer et al., 2005, Cook et al., Jones et al., 2009). Un método reconocido y que se utiliza a nivel casero es la cocción este permite eliminar los microorganismos presentes. Para lo cual existen diversos métodos de preparación previa al consumo. Dependiendo del método que se utilice afecta la calidad de la carne de formas diferentes y también se afecta la calidad nutricional sin olvidar que todavía existen costumbres gastronómicas y culturales que van a incidir directamente reducción de los microorganismos presente Los tipos de cocción se clasifican en dos métodos: Cocciones secas (como el asado en parrilla, BBQ, plancha, sartén, sartén grill y horno), y Cocciones húmedas (como Brasear: Estofar, Escalfar¹).El Departamento de Agricultura de los estados Unidos (USDA) está actualizando su recomendación para cocinar con seguridad carne de cerdo, la se recomienda que para los cortes enteros sea de a 63 °C medida con un termómetro de comida colocado en la parte más gruesa de la carne². La carne de cerdo se debe de cocer adecuadamente para eliminar parásitos y bacterias, causantes de enfermedades, Las personas que consumen carne de cerdo cocida de manera inadecuada contraer enfermedades transmitidas diferentes agentes etiológicos 1) parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*.. Y 2) bacterias que también se pueden encontrar en otras carnes como de res o aves, estas bacterias pueden ser: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocitogenes*. Todos éstos se destruyen mediante la manipulación adecuada y la cocción cuidadosa³. Hoy en día por la implementación de Las Buenas Prácticas de Producción Porcicola y los tipos de alimentación permite consumir la carne de cerdo cocida a punto medio, como lo propone el documento USDA denominado Reglas de temperatura cocina para servicio de comida donde se recomienda que el cerdo pueda cocerse a 63°C (145°F) durante 15 segundos⁴.

¹ Gómez B., Rodríguez C., Zambrano D., González N. Manual de cortes de cortes de carne de cerdo Colombiano. Centro de Investigación y transferencia de tecnología del sector porcicola Ceniporcino, Bogotá 2012

² United States Department of Agriculture. USDA Revises Recommended Cooking Temperature for All Whole Cuts of Meat, Including Pork, to 145 °F. Volume 13, Issue 21 May 27, 2011

³ Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture. Inocuidad de la carne de cerdo, desde el criadero hasta la mesa del consumidor. Washington, D.C. febrero 2003

⁴ U. S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. Temperature rules cooking for food service, 2008

El tiempo de cocción depende de la forma como esta se realiza, del corte carne utilizado (el cual determina el espesor de la carne). Estas condiciones (tiempo, espesor y forma de cocción) determinan el punto final de carne y por ende el efecto que se tiene sobre los microorganismos presentes.

2. Materiales y métodos

2.1 Modelo general

2.2 Modelo granja

Se utilizó un método de revisión sistemática y meta-análisis para extraer los datos entre los estudios e integrar los resultados para proporcionar una estimación completa de la prevalencia de *T. gondii* en los cerdos para Colombia (Lora 2007, Campo 2014, Franco 2015). Con dicha información se calculó la media y la desviación estándar de la prevalencia de en los cerdos. Estos valores se utilizaron para definir una distribución binomial (0 probabilidad 53,3% y 1 con una probabilidad de 46,7%)

2.3 Planta de sacrificio

Según los datos promedio de sacrificio para Armenia los cerdos llegan a la planta de sacrificio con un peso promedio de 96,5 Kg y una desviación estándar de 10,6. El rendimiento en canal 76,36% y una desviación estándar de 4,20%. Las canales son posteriormente despostadas en cuatro cortes principalmente (pierna con un peso de 20,20 Kg, lomos con un peso de 11,30 Kg, costilla con un peso de 14,20 Kg y brazos con un peso de 10,28) Kg). Los procesos de sacrificio (por ejemplo, escaldado, evisceración y enfriamiento de carcasa) no incluyen ningún paso que pudiera inactivar los quistes tisulares de *T. gondii* que estén presentes.

En este momento no se dispone de datos sobre las concentraciones de bradizofo en la carne de cerdo. Como resultado, los datos se obtuvieron a partir de un estudio de PCR en tiempo real que cuantificó la concentración de bradizofo en muestras de músculos de 16 cabras infectadas experimentalmente (Jurankova et al., 2013). En este experimento, dos grupos de cabras infectadas (8 cabras / grupo) murieron 30 y 90 días después de la infección, respectivamente. Para cada cabra, la concentración

de bradizoito se cuantificó en cada miembro. Con esta información se calculó la distribución de bradizoitos en el cerdo (pierna 75%, lomos 42%, costilla 8%, y brazos 42%). Este modelo no supone cambios de la concentración de bradizoitos en las carnes ya que se asume que la temperatura de transporte y almacenamiento son de refrigeración a 4 a 8°C

2.4 cocción

La cocción es una de las maneras más eficaces de reducir la exposición a *T. gondii* en el cerdo fresco infectado. Sin embargo, temperaturas inferiores a 49°C pueden ser insuficientes para inactivar los bradizoitos de *T. gondii*. No se cuenta con información para compra de carne de cerdo para Colombia se asume el 82% del cerdo fresco se compró en tiendas minoristas y se preparó en casa, En modelo supone que el 100% de cerdo fresco es comprado en tiendas minoristas y cocido en casa.

Se supone que la cocción es el único factor asociado con la reducción / inactivación de *T. gondii* en cocinas caseras. El efecto térmico de la cocción en el hogar sobre la concentración de bradizoitos se modeló utilizando el aplicativo Agro UQ cocción de carnes® donde se asocian 4 tipos de preparación de carne de cerdo según los puntos finales de la temperatura en su cocción (jugosa temperatura interna 60,6°C, media temperatura interna 66,1°C, tres cuartos temperatura interna 71,2°C y bien cocida temperatura interna 75,8°C), para poder calcular la reducción de la probabilidad de infección Agro UQ cocción de carnes® requiere una información inicial, para esto se determinó que el medio de calentamiento tiene una temperatura de 120°C, las piezas de carne tienen un espesor de 1,25 cm con una temperatura inicial de 4°C. Según el reporte del aplicativo el aplicativo define se requiere un tiempo de 3,25 minutos para jugosa, 3,75 minutos para media, 4,25 minutos para tres cuartos y 5 minutos para bien cocida. Según esta información la probabilidad de infección se reduce para jugosa hasta 70,8%, medio hasta 20,5%, tres cuartos 0,2% y para bien cocida hasta 0,000002%. Esta información se calcula el análisis de la letalidad con cinéticas de destrucción térmica por estudios realizados en inactivación térmica, las carnes infectadas con *T. gondii* tratadas por diferentes tiempos (0,01, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y

96 min) y temperaturas (49, 52, 55, 58, 61, 64 y 67°C), y cada muestra tratada se bioensayo en cinco ratones (Dubey et al., 1990).

2.5 consumo

Para la información del consumo carne se determinó según los reportes de las tablas del ENSIM para población de niños y niñas de 5 a 12 años de la región central de Colombia. El modelo asume distribuciones Pert para el consumo con una prevalencia del 12,9% valor mínimo 11,3%, valor máximo 14,5%. Para el tamaño de la porción una prevalencia del 93,73 g valor mínimo 86,11g, valor máximo 101,11g. y para la frecuencia del consumo diario una prevalencia del 0,42 veces por día valor mínimo 0,40 veces por día, valor máximo 0,50 veces por día.

2.6 probabilidad de infección

La probabilidad de infección se calculó de manera individual según el tipo de preparación (jugosa, media, tres cuarto, bien cocida), para esto se hicieron 3 simulaciones de 10.000 iteraciones del cálculo de la prevalencia de la carne de cerdo, porcentaje de piezas que pueden tener presencia de quiste de bradizoitos, la reducción de la probabilidad de infección, el consumo diario de carne de cerdo, este se multiplico 365días y 27.951 (que es la población infantil de 5 a 12 años para Armenia para el año 2019) y se reporta el número de niños que se pueden infectar por año . Además de la probabilidad de infección

2.6. Análisis de sensibilidad

Se realizó un análisis de sensibilidad para proporcionar una medida cuantitativa de los parámetros más importantes que afectan el riesgo para la salud humana de *T. gondii* a través de las vías consideradas en el modelo.

3 Resultados

3.1. Número estimado de casos de infección por *T. gondii*

El número de casos nuevos infectados con *T gondii* por año en Armenia Quindío debido al consumo de carne de cerdo según su tipo de preparación se presenta en la tabla 1

Tabla 18 El número de casos nuevos infectados con *T gondii* por año

Tipo de preparación	Número de casos	Intervalos de confianza 95%
Jugosa	390	IC 350 – 430
Media	110	IC 100 – 120
Tres cuarto	23,5	IC 21 – 26
Bien cocida	1,5	IC 1 - 2

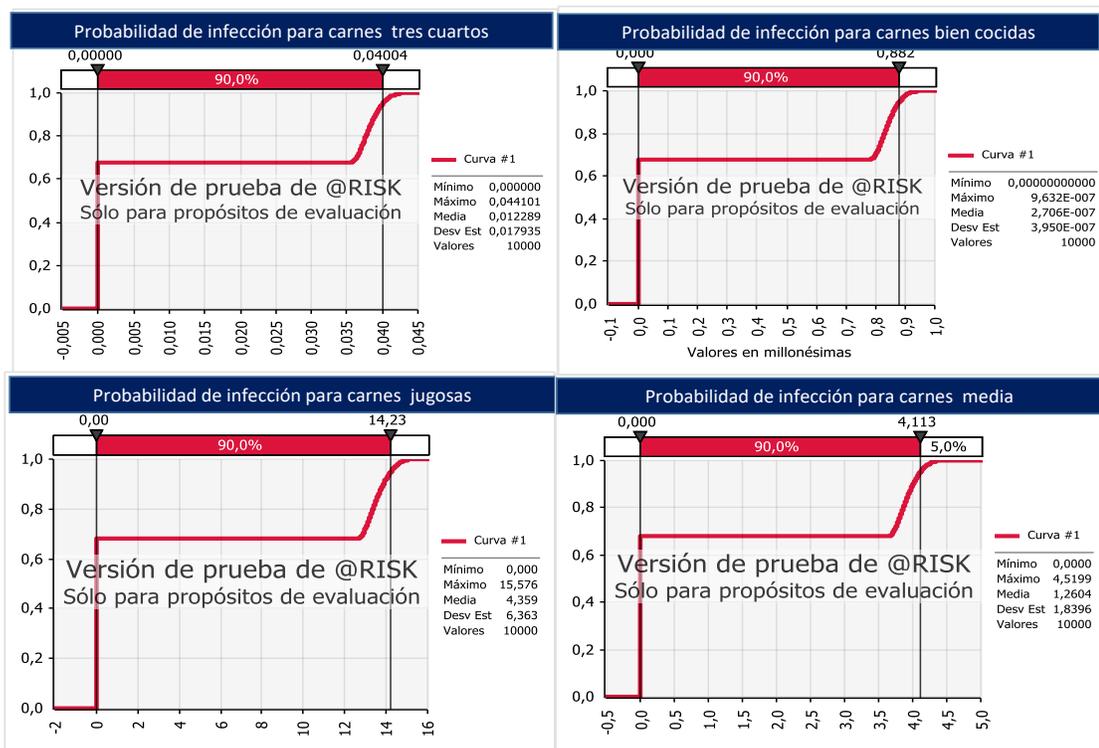
3.2. Probabilidad de infección

Las gráficas de distribución de probabilidad de infección para cada tipo de preparación presentan dos tipos de distribución una primera de distribución discreta para la probabilidad de infección de 0% y una segunda donde se presenta distribución tipo normal. La primera agrupa el 53% y la segunda agrupa el 47% de los datos.

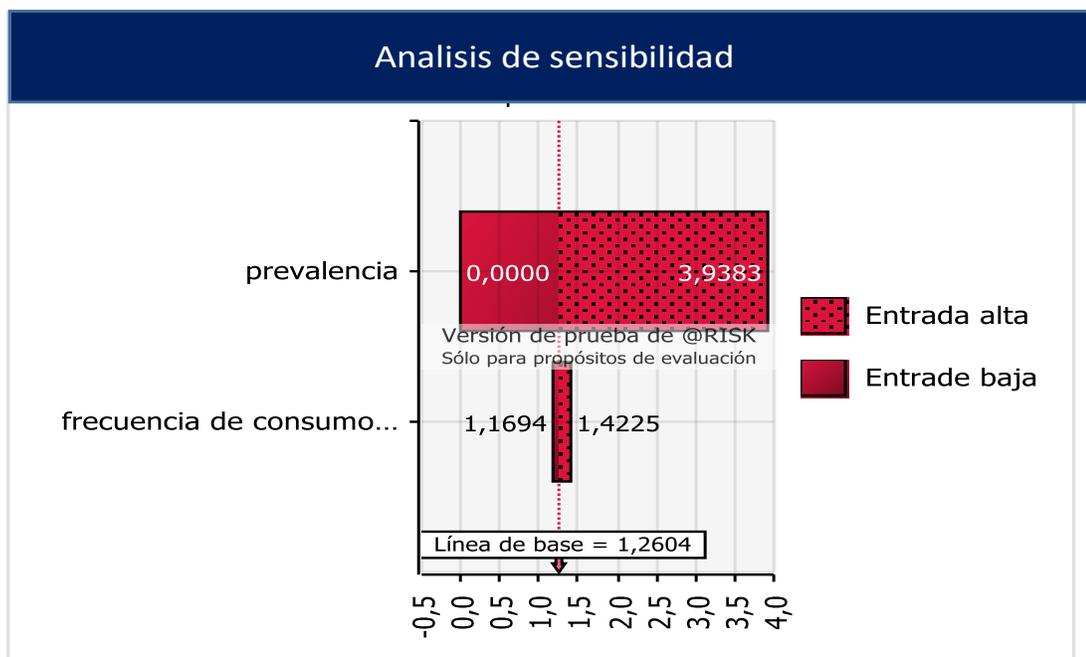
Esto debido que cuando las carnes que provenga de cerdo que no presente quiste de *T. gondii* la probabilidad de infectarse al consumirse la carne en esas condiciones es nula. Pero cuando el cerdo pueda tener quistes de *T. gondii* la probabilidad de infección se ve afectada por las condiciones del tratamiento térmico. La probabilidad de infección por consumo de carne se presenta en la tabla 2

Tabla 19 La probabilidad de infección por consumo de carne

Tipo de preparación	probabilidad	Intervalos de confianza 95%
Jugosa	13,51 %	IC 12,88 – 14,23
Media	3,91 %	IC 3,72 – 4,11
Tres cuarto	0,03 %	IC 0,02 – 0,04
Bien cocida	0,00%	IC 0,00 – $8 \cdot 10^{-7}$



3.3. Efecto de la variabilidad



Según los parámetros del modelo sobre el riesgo de infección Los análisis de sensibilidad indicaron prevalencia de *T. gondii* en cerdo y la frecuencia de consumo son las variables de mayor impacto

4. Discusión

En el presente estudio, se desarrolló un modelo QMRA para predecir el número de casos de niños infectados con *T. gondii* asociados con el consumo de cerdo según el tipo de preparación. La probabilidad de consumir carnes con quistes viables depende del tipo de preparación y que si se consumen carnes jugosas la probabilidad de infectarse es del 13,51%, medio de 3,91%, tres cuartos 0,03% y bien cocida 0,00%. Lo que muestra que el parásito si se ve afectado por la temperatura y que se recomienda que se consuma carne bien cocidas

5. Conclusiones

El presente modelo QMRA cuantifica el riesgo de infección por *T. gondii* por el consumo de cerdo según su tipo de preparación. El modelo estima que si se preparan las carnes bien cocidas se puede reducir de 350 a 1 nuevos casos por año en población infantil de 5 a 12 años para Armenia Quindío. Además, se puede reducir la probabilidad de infección por consumo de carne de 13,1% a 0,00%.

El modelo muestra que los factores de riesgo de mayor importancia de la forma de infección por el consumo de carne de cerdo son la prevalencia del *T. gondii* en el cerdo y la preparación de carnes inferiores 60°C

Simulación de escenario del análisis de riesgo de infección con *Toxoplasma gondii* de población escolar infantil según las condiciones higiénico-sanitarias del restaurante escolar

Introducción

Existen muchas fuentes por la cual el *Toxoplasma gondii* puede infectar a la población Humana, como es el caso por el consumo de alimentos cuando el agua o vegetales están contaminados, por carnes contaminadas y poco cocidas, pero también por la contaminación cruzada que se puede tener en los sitios de preparación de alimentos. Luna en 2019 reporta que existen otros factores asociados infección para población infantil como son las condiciones higiénico-sanitarias de los restaurantes escolares. De estas las más relevantes son: instalaciones físicas (OR: 1,8), limpieza y desinfección (OR: 1,8) y personal manipulador de alimentos (OR: 2,0).

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto que puede tener el mejoramiento de las condiciones higiénico sanitarias de sobre sobre la infección por *Toxoplasma gondii* en población infantil que asiste a restaurantes escolares en la ciudad de Armenia. Para lo cual se utilizó como metodología La simulación que es el proceso de desarrollar un modelo computarizado para conducir un experimento con el propósito de comprender el comportamiento de un sistema de acuerdo a situación dada

Metodología

Para esto situación se realizó una simulación de Montecarlo con la información obtenida de los resultados serológicos de los niños y las asociaciones según las evaluaciones de las condiciones higiénico-sanitaria de cada uno de los colegios.

Según el análisis estratificado se encontró que la prevalencia y la incidencia de la infección con *Toxoplasma gondii* están asociados a las condiciones socioeconómicas y la edad de los niños. Por tal razón se utilizaron análisis de regresión para prevalencia o incidencia según la edad para niños de estrato 1 y niños de estrato 2 o más. Y estos valores se ajustaron según el reporte de la población infantil que asisten a los colegios

reportados por la secretaria de educación para salud para el 2019 y las estadísticas de los estudios realizados (ver tabla 1).

Tabla 20 Población Proyectada según la condición socio-económica y su edad

Edad de los niños	población	Proyectado estrato 1	Proyectado estrato 2 o mas
5 años	3064	1802	1262
6 años	3171	1611	1560
7 años	3396	1934	1462
8 años	3430	2005	1425
9 años	3615	2473	142
10 años	3592	2694	898
11 años	3695	3695	0
12 años	3988	3988	0

Con resultados obtenidos de los estudios de los colegios se realizaron diferentes tipos de regresiones para calcular la incidencia y prevalencia proyectada (población infantil con IgM positivas y con IgG positiva respectivamente). Según los análisis obtenidos los mejores coeficientes de correlación se presentan si la población se divide en dos grupos: grupo 1 estrato socioeconómicos 1 y grupo 2 estrato socio económico 2 o más. Se encontró que: la incidencia general sería del 4,5% (el 5,2% para el estrato socio-económico 1 y 2,5% para los estratos socioeconómicos 2 o más) 1.059 de 20.202 niños del estrato 1 y 195 de 7.748 niños para el estrato 2. Y la prevalencia general sería del 44,2% (51,5% para el estrato socio-económico 1 y de 24,5% para el estrato socio-económico 2 o más), 10.459 de 20.202 niños del estrato 1 y 1.897 de 7.748 niños para el estrato 2 (ver tabla 2 y 3)

Tabla 21 Incidencia de la población infantil según su edad y condición socio-económica para el año 2019

Edad de los niños	población	Incidencia Proyectada estrato 1	Incidencia Proyectada estrato 2 o mas
5 años	3064	333	0
6 años	3171	240	17
7 años	3396	218	32
8 años	3430	154	47
9 años	3615	101	50
10 años	3592	13	49
11 años	3695	1	1
12 años	3988	1	1

Tabla 3 Prevalencia proyectada población infantil según su edad y condición socio-económica para el año 2019

Edad de los niños	población	Incidencia Proyectada estrato 1	Incidencia Proyectada estrato 2 o mas
5 años	3064	919	721
6 años	3171	818	260
7 años	3396	1811	258
8 años	3430	1418	223
9 años	3615	1112	285
10 años	3592	1596	150
11 años	3695	2772	1

12 años	3988	1	1
---------	------	---	---

Según estudios realizados reportan que existen muchas fuentes de infección para *Toxoplasma gondii* (Pérez et al, 2008; Kijlstra et al, 2008; Mirza et al, 2018; Shapiro et al, 2019). El estudio realizado encontró que los factores relacionados a las condiciones higiénico-sanitarias del restaurante escolar son significativos, las más son: instalaciones físicas, condiciones de saneamiento, abastecimiento de agua, limpieza y desinfección y personal manipulador (ver tabla 4).

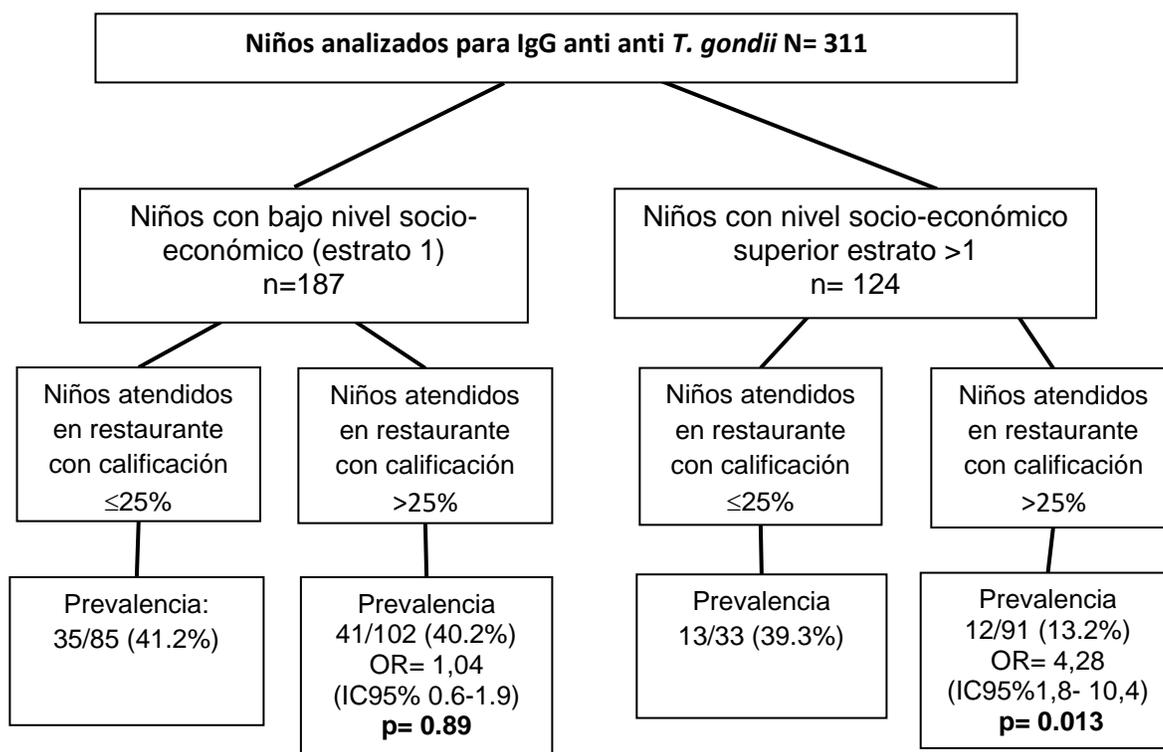
Tabla 4 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Toxoplasma gondii según la calificación del restaurante escolar

Factor de Riesgo	Prevalencia en expuesto vs no expuesto n/N (%)	OR	IC 95%	P valor	Riesgo atribuible
Condiciones higiénicas					
Instalaciones físicas con calificación ≤ 25%	48/118 (40,7%) vs 53/193 (27,5%)	1,81	1,1 – 2,9	0,0157	-0,431
Condiciones de proceso con calificación ≤ 60%	53/193 (27,4%) vs 48/118 (40,68%)	0,55	0,3 – 0,9	0,0157	-0,260
Condiciones de saneamiento con calificación ≤ 59%	46/114 (40,4%) vs 55/197 (27,2%)	1,75	1,1 – 2,8	0,0241	-0,424
Abastecimiento de agua con calificación ≤ 26%	48/118 (40,7%) vs 53/193 (27,5%)	1,81	1,1 – 2,9	0,0157	-0,431
Limpieza y desinfección con calificación ≤ 75%	13/22 (59,1%) vs 88/289 (30,5%)	3,29	1,4 – 7,7	0,0057	-0,278

Calificación promedio < 56,4%	41/102 (40,2%) vs 60/209 (28,7%)	1,67	1,0-2,7	0,0422	-0,466
-------------------------------	----------------------------------	------	---------	--------	--------

El análisis estratificado si demostró que para los cuatro aspectos evaluados solo son significativos los factores de riesgo del restaurante para los niños de nivel socioeconómico superior. Esto indica que llegan al restaurante escolar ya infectados.

A manera de ejemplo se presenta el análisis estratificado para condición socio-económica para niños atendidos en restaurante escolar con calificación inferior $\leq 25\%$ para infraestructura física según prevalencia anti *T. gondii* IgG



Para el análisis de escenario

Con base en esta información se planean dos escenarios 1) simulación no cumple: Instalaciones físicas con calificación $\leq 25\%$, Condiciones de proceso con calificación ≤ 60 , Condiciones de saneamiento con calificación $\leq 59\%$, Abastecimiento de agua con calificación $\leq 26\%$, Limpieza y desinfección con calificación $\leq 75\%$, Calificación

promedio < 56,4% y 2) simulación cumple: con cumplimiento de condiciones higiénico-sanitarias con calificación cuando la característica cumple se hace la reducción según el porcentaje de riesgo atribuible según los datos obtenidos del estudio. Y se evalúa la prevalencia y la incidencia según los escenarios. Utilizando el software @risk 7.6.1 se plantea para cada escenario una simulación de Montecarlo (esta se realiza por triplicado con 1,000.000 iteraciones cada una)

Resultados

Para cada escenario el software reporta los siguientes estadísticos: máximo mínimo, media, desviación estándar, mediana, moda, X izquierda (el valor del percentil 5% el cual se asume como error tipo β), la probabilidad de X izquierda, X derecha (el valor del percentil 95% el cual se asume como error tipo α), la probabilidad de X izquierda. Se hacen tres simulaciones para cada escenario y los datos se promedian (ver tabla 5).

Tabla 5 Reporte de simulaciones para incidencias y prevalencias según escenario

estadísticos	Incidencia		Prevalencia	
	Cumple	No cumple	Cumple	No cumple
Numero de simulaciones	3	3	3	3
Numero de iteraciones	100.000	100.000	100.000	100.000
Mínimo	-2,8%	-0,4%	17,7%	30,3%
Máximo	10,7%	12,2%	40,5%	53,3%
Media	4,2%	5,8%	28,8%	41,8%
Desv Est	1,7%	1,7%	2,7%	3,1%
Mediana	4,2%	5,8%	28,8%	41,8%
Moda	4,4%	5,7%	29,1%	41,4%
X izquierda	1,5%	3,1%	24,3%	36,8%

P izquierda	5,0%	5,0%	5,0%	5,0%
X derecha	7,0%	8,6%	33,3%	46,8%
P derecha	95,0%	95,0%	95,0%	95,0%

Además, el software presenta los gráficos individuales de la probabilidad y probabilidad acumulada, ver ejemplo para escenario de prevalencia no cumple

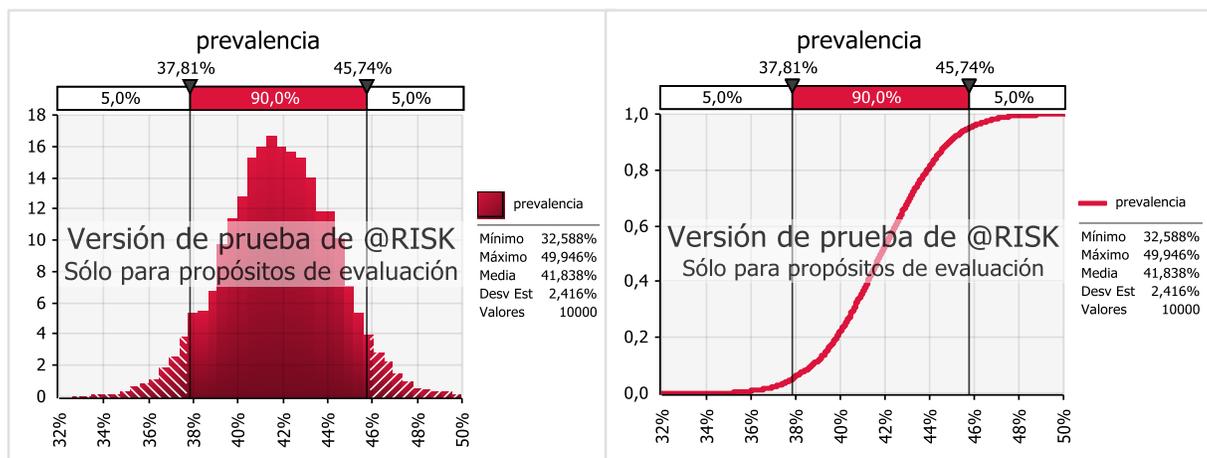


Ilustración 15 gráfico individual de probabilidad según su prevalencia para el escenario no cumple

Según los resultados obtenidos se ve que al mejorar las condiciones higienico sanitaria se reduce la incidencia en 1,8% lo que equivale a 457 menos casos y la prevalencia en 13,0% lo que equivale 3.646 casos, pero solamente es significativo para prevalencia ya que en la incidencia se presenta un solapamiento de las graficas de distribucion ver ilustracion 2

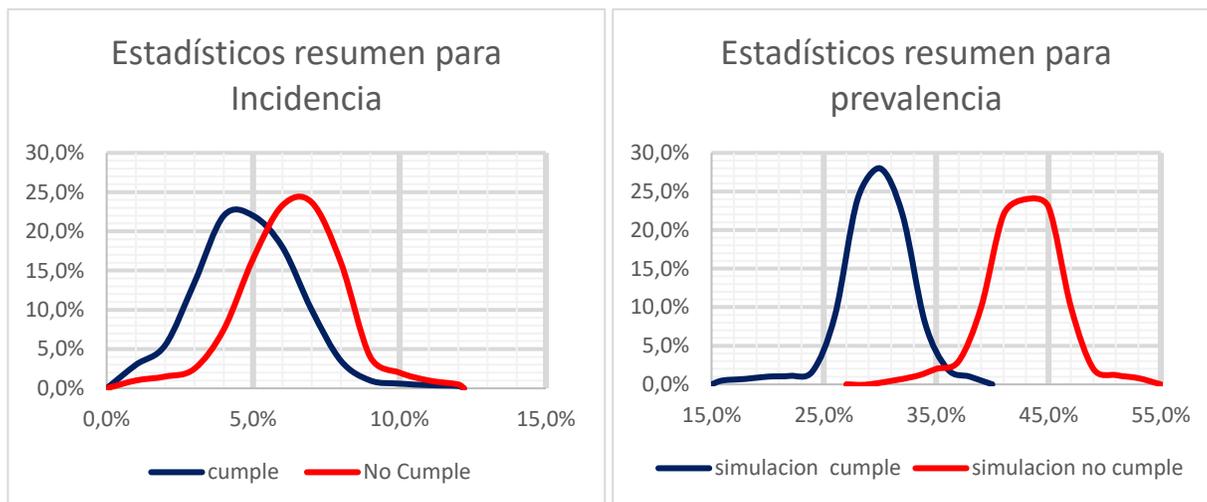


Ilustración 16 Estadísticos de distribución para prevalencia e incidencia según escenario

Conclusión

De acuerdo con los resultados se encuentra que si se mejora las condiciones higiénico-sanitarias de los colegios se puede reducir la prevalencia del 41,8% a 28,8% lo que indica que habrían 3.646 menos infectados con *Toxoplasma gondii*. Además, esta diferencia es estadísticamente significativa ya que el error tipo α es del 33,3% y el error tipo β es del 36,8%.

Para la incidencia se encontró que reduciría en 457 casos nuevos de niños infectados con *Toxoplasma gondii* por año. Pero esta situación no es estadísticamente significativa ya que se presenta error tipo α es del 7,0% y el error tipo β es del 3,1% y con medias 4,2% y 5,8%. Esto puede ser a la IgM tiene un periodo muy corto de permanencia en el individuo además que los valores son muy bajos