

Paula Nieto Bressel

Toxoplasma gondii en la industria
de elaboración de productos
curados. Evaluación de métodos
de detección y su aplicación al
proceso de evaluación y control
del riesgo

Director/es

Bayarri Fernandez, Susana
Gracia Salinas, Maria Jesus

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

TOXOPLASMA GONDII EN LA INDUSTRIA DE
ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CURADOS.
EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DETECCIÓN Y SU
APLICACIÓN AL PROCESO DE EVALUACIÓN Y
CONTROL DEL RIESGO

Autor

Paula Nieto Bressel

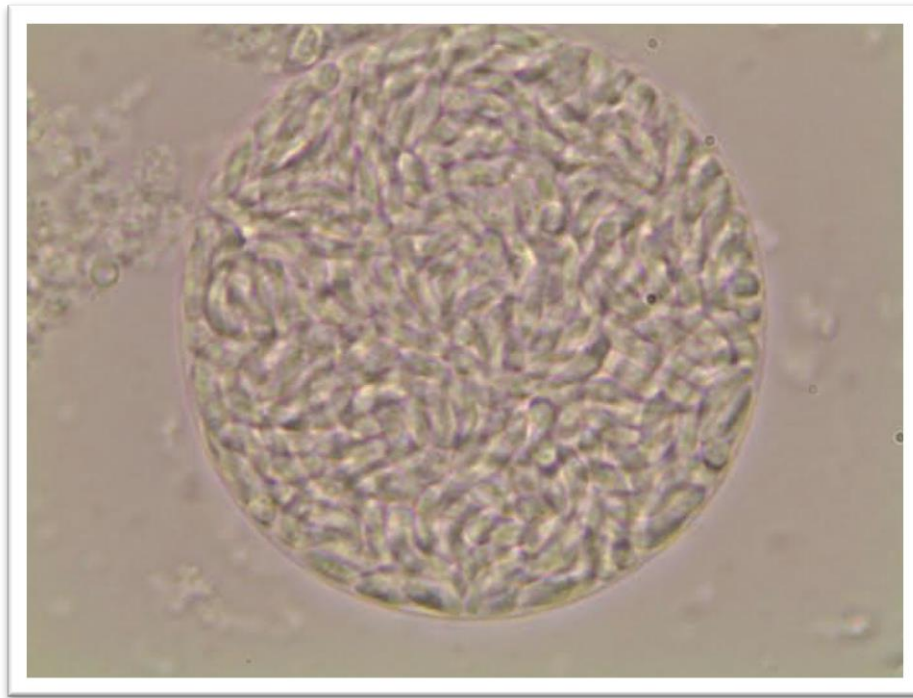
Director/es

Bayarri Fernandez, Susana
Gracia Salinas, Maria Jesus

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Calidad, Seguridad y Tecnología de los
Alimentos

2021



TESIS DOCTORAL

“Toxoplasma gondii en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

Memoria presentada por

PAULA NIETO BRESSEL

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

DIRECTORAS

Dra. Dña. Susana Bayarri Fernández

Dra. Dña. María Jesús Gracia Salinas



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación Mixto
Agroalimentario de Aragón
Universidad Zaragoza

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa”

- Mahatma Gandhi -

Gracias a mi gente, por todo.

AGRADECIMIENTOS

He podido reescribir estos agradecimientos mil millones de veces, unos días más optimista, otros no tanto, con un sinfín de frases como *no puedo seguir* y un vaivén de sentimientos. Pero a mitad del camino, aprendí que al final la vida consiste en tener el valor para enfrentarte a tus propias montañas. Cada persona que ha estado a mi lado a lo largo de este periodo sabe cuántas piedras, despeñaderos y bosques se han interpuesto entre mi montaña y yo, ella tan bonita y a la vez tan llena de desafíos. Con el tiempo también me di cuenta de que el paisaje cambia, tu escenario es infinitamente distinto de la noche a la mañana, que creces no sólo a nivel profesional sino incalculablemente más a nivel personal, y que a veces hay que hacer una pausa para observar lo bonito del recorrido y de la gente que te ha acompañado en él. Estoy agradecida tanto a las personas que cogieron mi tren y nunca lo abandonaron, pues son mis personas vitamina y paracaídas, como las que se pararon en la primera estación, de las que también guardo un buen recuerdo y un aprendizaje.

Para mis compañeros ya doctores o doctorandos/as tengo tan sólo palabras de agradecimiento y de ánimo para los que continúan.

Gracias a Miriam, de la cual me siento muy orgullosa, siempre con un espíritu y una actitud admirables, positiva y alegre, una investigadora excepcional, y que desde luego, no sólo ha sido una gran compañera sino que se ha convertido en una gran amiga.

Cómo no a mi pequeña Pati, por esa alegría que sólo ella es capaz de transmitir, y por ese humor que le echa a la vida, que admiro muchísimo, que hace que los problemas sean menos problemas y obviamente por ser la amiga más dulce, divertida y cariñosa que tengo.

También quiero agradecer a Héctor todos los momentos vividos, pero sobre todo su gran capacidad de trabajo, su pasión por la investigación y su autoexigencia, dignos de admirar, que me impulsaron a continuar en mis días más grises.

A mis compañeros Ana Pilar, Gimi y Dani, por nuestras charlas en los pasillos y laboratorios de la que fue por aquel entonces nuestra segunda casa, la Facultad de Veterinaria, y por todas y cada una de nuestras divertidísimas juergas en las plazoletas y patrones.

Por otro lado, agradecer a mis directoras, la Dra. Susana Bayarri y la Dra. María Jesús Gracia por haber confiado en mí para realizar este trabajo, por estos cuatro años de tutela del doctorado y sobre todo por la comprensión y ayuda en la recta final. Por supuesto, gracias a toda la gente del Área de Nutrición y Bromatología y a la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias por toda la ayuda, risas y cariño prestado. Jamás olvidaré esos bingos en Navidad, y los increíbles y personalizados villancicos de Nieves. He de decir que quiero hacer especial hincapié en mi cariño hacia la Dra. Carmina Rota, siempre valoraré y

admiraré su implicación, su humildad y su integridad por encima de todo. *La enseñanza que deja huella no es la que se hace de cabeza a cabeza sino de corazón a corazón* (Hendrick, 1924-2013).

Este trabajo ha sido posible gracias a la enorme colaboración y ayuda de Fidel Aguilar en el proceso de curado de jamones y paletas y a las instalaciones del Grupo Jorge. Asimismo, agradecer al grupo VISAVET por su colaboración en la infección experimental porcina, así como en el muestreo, en el que también ha colaborado el grupo ITACyL. Mi agradecimiento también al Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2) y al Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles de la Universidad de Zaragoza por poder utilizar sus instalaciones.

Gracias también a los miembros de AlquizVetek, por su orientación en la biología molecular, en especial al Dr. Héctor Fuertes, por toda su ayuda, su disponibilidad y su gran corazón.

Al Dr. Nacho de Blas, por guiarme en el complicado mundo de la estadística siempre con muchísima paciencia y humor. A la Dra. Chelo Ferreira por aportar también todos sus conocimientos en este gran desconocido y complejo ámbito para mí.

A mis padres, Jesús y Ana, pues soy quién soy y he llegado hasta aquí gracias a ellos. Por toda su generosidad, apoyo incondicional y dedicación a lo largo de toda mi vida. Por desear siempre mi felicidad por encima de todo y no cuestionarse nunca ninguna de mis decisiones, *estamos aquí para ser felices*. Por inculcarme la habilidad de la perseverancia, trabajar y lograr mis metas como una hormiguita, poquito a poco, todos los días, resistiendo a las dificultades e inconvenientes que siempre llegan en la vida. Por todos los ánimos y detalles de cariño durante este periodo, que sé que no ha sido fácil. Por cada *sopita de caracol* en mis noches frente al ordenador. Por creer en mí. Por todo ello y mucho más, mi más grande y sincero GRACIAS.

A mi *herman*, Álvaro, por estar ahí siempre, por ser mi polo totalmente opuesto, por recordarme lo sencillo de muchas cosas, que a veces se me olvida, y por ayudarme a enfrentarme a mis propios miedos. No dudes que dominar a la *bala blanca* es mi próximo reto.

Naturalmente, gracias a mi sobrina, Blanca, *mi pequeña gran revolución*, por haber aparecido en nuestras vidas, por ser la personita más bonita, más lista y más cautivadora que ha podido venir a este mundo, y que me ha sacado miles y millones de sonrisas durante este trayecto. A tu tía *Pavu* siempre le encantará hacer puzzles contigo y leerte *el principito*.

Gracias a Bego, por llevar más de media vida cuidándome, animándome, y por todas nuestras conversaciones acerca de las injusticias del mundo.

Gracias a mi perrita Penny, por todo su entusiasmo cada vez que me ve y sobre todo por rascar a la puerta de mi habitación pidiendo mimos cuando intuía que mi cerebro ya no podía más con la escritura.

Gracias a mi padrino Eduardo, por sus conocimientos de Word, su tiempo, y devanarse los sesos para ayudarme con mis problemas de maquetación en el tramo final.

También agradecer al resto de mi familia su grandísimo apoyo, pero en especial a mi tía Lola. Gracias abuela por escucharme siempre y estar tan orgullosa de mí. Este logro te lo dedico a ti.

Y qué decir de la familia que elegimos, no tengo casi palabras y las que tengo no serán, seguramente, lo suficientemente justas. He descubierto una fuerza llamémosla sobrehumana que ni siquiera conocía y eso es gracias a ellos.

A mis amigos Doctores, Pilar S. y Dani, pues sin ellos no hubiese sido capaz de seguir.

A ti Pilar S., por preocuparte tanto por mí. Por animarme siempre y restarle importancia a muchas cosas. Por escuchar cada uno de mis audiolibros y soportar cada uno de mis bostezos. Por tu regalo del congreso a Japón, el *daruma*, el amuleto de los propósitos, que te obliga, en cierta manera, a buscarte tu propia suerte y nunca rendirte para conseguir tus objetivos. El amuleto que ha estado frente a mí cada largo día de escritura. Por fin, puedo decir que tiene el otro ojo pintado y eso es gracias a ti.



A ti Dani, por estar siempre ahí ante mis llamadas de socorro. Por nuestras divagaciones científicas, excursiones y cervecitas. No sabes cuánto te agradezco todas y cada una de estas vías de escape.

A ti Pilar R., mi madrileña preferida, por todo tu apoyo y tu fe en mí. Por estar ahí siempre, por sacarme una carcajada cuando más lo necesitaba y por ese pedazo de viaje que nos vamos a dar en honor a mi tesis y a tu categoría de adjunta.

A ti Ana, la mujer más fuerte que conozco, juntas empezamos el Máster de CTA y desde entonces nos hemos vuelto inseparables. Gracias por todos y cada uno de los momentos vividos, no dudes que se quedarán por siempre guardados en mi retina.

A ti Carmen V., gracias por cada una de las experiencias compartidas y por haber estado siempre al pie del cañón pese a la distancia. Gracias también a Edu, *your partner in crime*, pues sois una pareja maravillosa y si tuviese que elegir una pareja preferida ya sabéis de sobra cuál sería mi decisión. Gracias a ambos por cuidar siempre de mí.

A mis amigos del cole de toda la vida, Pablo A., Pablo C, Sergio y Guille, por llevar más de media vida aguantándome y eso tiene muchísimo mérito. En especial a Pablo C., por ser mi segundo hermano, porque a pesar de nuestros altibajos y la distancia durante los años, siempre hemos encontrado un huequito para alegrarnos y ayudarnos el uno al otro.

A mis amigas de la universidad, Natalia, Andrea y Carmen D., porque pese a nuestras ajetreadas agendas os tengo siempre más que presentes, y siempre es una ilusión veros y daros un achuchón.

A mis chicas del Pirineo, Marta, Leti y Cris, pues aunque a nuestro pesar sean pocos nuestros reencuentros, cada vez que ocurren siempre vuelvo con agujetas de reír.

A mis pequeñas del Máster de Profesorado, Marina e Irene. Siempre agradeceré a Escuelas Pías Santa Engracia todas las experiencias vividas y el haberme dado la oportunidad de conoceros, pues sois maravillosas.

A mis festivaleras, Ceci y María, porque nos conocimos por casualidad y desde entonces no hemos parado de saltar en cada concierto y de emocionarnos cada vez que suena *la mujer de verde*.

A Mara, por ayudarme siempre y por ser tan entrañable. Mi pequeña psicóloga favorita.

A mis compañeros de PHX por todas nuestras risas en cada café y por animarme siempre a continuar con la tesis. En especial a mi *Pecerica*, por acogerme con los brazos abiertos, enseñarme, adentrarme en el mundo de la farmacovigilancia y regalarme un sinfín de carcajadas.

Os quiero a todos. Mucho no, Muchísimo.

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado gracias a la financiación del proyecto de investigación “Evaluación del riesgo de *Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de jamón y otros productos curados” (Proyecto RTA2014-00024-C04-02, INIA/MINECO/FEDER) y del Grupo de Investigación de Referencia A06 “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria” (Gobierno de Aragón/FEDER 2014-2020 “Construyendo Europa desde Aragón”).

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	10
II. REVISIÓN Y BIBLIOGRÁFICA.....	19
1. Antecedentes históricos.....	20
2. Taxonomía del parásito	22
3. Estadios de desarrollo.....	22
3.1.Taquizoito	22
3.2.Bradizoito	25
3.3.Esporozoito	28
4. Ciclo vital	30
5. Genética y genómica	32
5.1.Genotipos y distribución geográfica	32
5.2.Genotipos y virulencia	34
6. Vías de transmisión	36
7. Inmunidad frente a <i>T. gondii</i>	39
7.1.Inmunidad innata	40
7.2.Inmunidad celular	41
7.3.Inmunidad humoral	42
8. Enfermedad clínica	44
8.1.Toxoplasmosis humana.....	44
8.1.1. Toxoplasmosis en individuos inmunocompetentes	44
8.1.2. Toxoplasmosis en individuos inmunodeprimidos	44
8.1.3. Toxoplasmosis congénita	45
8.2.Toxoplasmosis en animales	46
9. Epidemiología	49
10. Importancia de la industria cárnica porcina	52
11. Aproximación al sistema de producción porcino	56
12. Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en cerdo	59
13. Prevalencia de <i>T. gondii</i> en cerdo.....	65
14. Efecto de los tratamientos tecnológicos de la carne en la viabilidad de <i>T. gondii</i>	66
14.1.Efecto del tratamiento tecnológico del curado	69
14.2. <i>Toxoplasma gondii</i> en el jamón curado	71
15. Métodos de detección de <i>T. gondii</i>	75

15.1. Métodos indirectos	75
15.1.1. Prueba de Sabin y Fieldman o Dye test (DT)	75
15.1.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	76
15.1.3. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	77
15.1.4. Test de aglutinación modificado (MAT)	79
15.1.5. Prueba de aglutinación en látex (AL)	81
15.1.6. Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI)	82
15.1.7. Inmunotransferencia o Western Blot (WB)	82
15.2. Métodos directos	82
15.2.1. Microscopía en tejidos u histología	82
15.2.2. Inmunohistoquímica (IHC)	83
15.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	84
15.2.4. Bioensayo	88
15.2.5. Cultivo celular	90
III. MATERIAL Y MÉTODOS	92
1. Infección experimental con <i>T. gondii</i>	94
1.1. Comprobación de la infectividad de la cepa VEG de <i>Toxoplasma gondii</i>	94
1.1.1. Análisis de sueros de ratón mediante IFI	96
1.1.2. Análisis de cerebros de ratón mediante qPCR	98
1.1.2.1. Extracción del DNA	98
1.1.2.2. Evaluación de la pureza y del DNA extraído	99
1.1.2.3. Condiciones de análisis de qPCR	99
1.1.2.3.1. Cebadores seleccionados	99
1.1.2.3.2. Protocolo de qPCR y condiciones de amplificación	102
1.1.2.3.3. Cuantificación de la carga parasitaria en las muestras	103
1.2. Infección experimental porcina	104
1.1.1. Toma de muestras	105
2. Evaluación de técnicas de análisis de <i>T. gondii</i>	105
2.1. Técnicas indirectas	105
2.1.1. Análisis mediante la técnica IFI	106
2.1.2. Análisis mediante la técnica MAT	106
2.1.3. Análisis mediante la técnica ELISA mono especie	107
2.1.4. Análisis mediante la técnica ELISA multiespecies	109
2.2. Técnicas directas	110
2.1.1. Evaluación de tratamientos previos a la extracción del DNA	110

2.1.1.1.	Digestión péptica	111
2.1.1.2.	Liofilización	113
2.1.1.3.	Extracción del DNA y qPCR	113
2.1.2.	Aplicación de la qPCR a distintos tejidos porcinos	114
2.1.2.1.	Análisis de sangre	114
2.3.	Análisis estadístico de los resultados	115
3.	Prevalencia de <i>T. gondii</i> en porcino en España	117
3.1.	Análisis estadístico de resultados	118
4.	Influencia del curado del jamón y embutidos en la viabilidad de <i>T. gondii</i>	120
4.1.	Curado de jamones y paletas	120
4.2.	Curado de embutidos	122
4.3.	Análisis de <i>T. gondii</i>	123
4.3.1.	Presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i>	123
4.3.1.1.	qPCR para determinar la presencia de <i>T. gondii</i>	124
4.3.1.2.	Bioensayo en ratón para determinar la presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i>	125
4.4.	Análisis de la composición físico-química de los productos curados	126
4.5.	Análisis estadístico de resultados	126
5.	Estudio de <i>T. gondii</i> en productos curados de comercios de venta al por menor. 127	
5.1.	Muestreo	127
5.2.	Análisis de <i>T. gondii</i> : presencia y viabilidad	127
5.3.	Análisis estadístico de resultados	128
6.	Contribución a la evaluación del riesgo de <i>Toxoplasma gondii</i> en el sector cárnico porcino, en especial en la industria del jamón curado, y aportación de medidas para su gestión	129
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	129
1.	Infección experimental con <i>T. gondii</i>	130
1.1.	Resultados	130
1.1.1.	Comprobación de la infectividad de la cepa VEG de <i>T. gondii</i>	130
1.1.2.	Comprobación de la infección por <i>T. gondii</i> en los cerdos	130
1.2.	Discusión	131
2.	Evaluación de técnicas de análisis de <i>T. gondii</i>	134
2.1.	Resultados	134

2.1.1. Técnicas indirectas	134
2.1.2. Técnicas directas	137
2.1.2.1. Evaluación de tratamientos previos a la extracción del DNA	137
2.1.2.2. Aplicación de la qPCR a distintos tejidos porcinos	137
2.1.2.2.1. Análisis de sangre	138
2.2. Discusión	140
3. Prevalencia de <i>T. gondii</i> en porcino en España	148
3.1. Resultados	148
3.1.1. Prevalencia de <i>T. gondii</i> en cerdo blanco	148
3.1.2. Prevalencia de <i>T. gondii</i> en cerdo ibérico	151
3.1.3. Comparativa de prevalencia de <i>T. gondii</i> en cerdo blanco e ibérico.....	154
3.2. Discusión	155
4. Influencia del curado de productos cárnicos en la viabilidad de <i>T. gondii</i>	162
4.1. Resultados	162
4.1.1. Paletas y jamones curados	162
4.1.2. Embutidos curados	167
4.1.3. Influencia de la composición físico – química de los productos curados en la viabilidad de <i>T. gondii</i>	167
4.1.3.1. Jamones y paletas curados	167
4.1.3.2. Embutidos curados	170
4.2. Discusión	171
5. Estudio de <i>T. gondii</i> en productos curados de comercios de venta al por menor... 177	
5.1. Resultados	177
5.1.1. Información del etiquetado	177
5.1.2. Presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en productos cárnicos curados	180
5.2. Discusión	186
6. Contribución a la evaluación del riesgo de <i>Toxoplasma gondii</i> en el sector cárnico porcino, en especial en la industria del jamón curado, y aportación de medidas para su gestión.....	188
V. Conclusiones	191
VI. Conclusions	195
VII. Referencias bibliográficas	198
VIII. Anexos	244

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas específicas de taquizoito y bradizoito	27
Tabla 2. Recopilación de dosis infectivas según la bibliografía consultada	35
Tabla 3. Casos de toxoplasmosis congénita en humanos y tasas de notificación por 100000 recién nacidos vivos en la UE/EEA, por país y año, 2012-2016	50
Tabla 4. Volumen de Producción cárnica española	53
Tabla 5. Volumen de producción de los diferentes elaborados cárnicos en España	54
Tabla 6. Volumen de exportaciones españolas de los distintos tipos de carne	55
Tabla 7. Volumen de exportaciones españolas de los distintos elaborados cárnicos	55
Tabla 8. Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en cerdo	60
Tabla 9. Prevalencia de <i>T. gondii</i> en carne de cerdo	65
Tabla 10. Valores de kappa y la fuerza de la concordancia	116
Tabla 11. Tabla de resultados emparejados obtenidos por la técnica de referencia y las técnicas alternativas	116
Tabla 12. Formulación del salchichón, la longaniza y el chorizo	122
Tabla 13. Resultados de confirmación de la infección por <i>T gondii</i> mediante IFI, qPCR y bioensayo en ratón	131
Tabla 14. Repetibilidad de las técnicas serológicas IFI, MAT, ELISA mono especie y ELISA multiespecies	135
Tabla 15. Valores de <i>d de Somers</i> para evaluar la correlación entre títulos de anticuerpo en IFI y MAT	136
Tabla 16. Valores de <i>coeficiente de correlación de Spearman (rho o p)</i> para evaluar la correlación entre las técnicas ELISA mono especie y ELISA multiespecies	136
Tabla 17. Valores de <i>kappa</i> para las técnicas serológicas IFI, MAT, ELISA mono especie y ELISA multiespecies	136

Tabla 18. Valores de sensibilidad, especificidad y veracidad relativa de las técnicas MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies usando la IFI como técnica de referencia	136
Tabla 19. Valores de qPCR de los distintos tratamientos previos a la extracción del DNA ...	137
Tabla 20. Resultados del análisis de diferentes tejidos mediante la metodología de la digestión péptica y análisis de qPCR.....	137
Tabla 21. Resultados de qPCR de las sangres procedentes de cerdos infectados experimentalmente.....	138
Tabla 22. Valores de <i>kappa</i> para las técnicas serológicas IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies con la qPCR.....	140
Tabla 23. Resultados del análisis serológico de cerdo blanco por provincias y regiones	149
Tabla 24. Resultados del análisis por qPCR de diafragmas de cerdo blanco por provincias y regiones	151
Tabla 25. Resultados serológicos de cerdo ibérico en cuanto a títulos de anticuerpo por provincias y regiones	152
Tabla 26. Resultados del análisis por qPCR de diafragmas de cerdo ibérico por provincias y regiones	153
Tabla 27. Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en función de distintos puntos de corte.....	154
Tabla 28. Resultados de presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en jamones y paletas curadas procedentes de cerdos infectados experimentalmente	165
Tabla 29. Resultados de presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en embutidos procedentes de cerdos infectados experimentalmente	167
Tabla 30. Composición físico-química de los jamones y paletas curados y viabilidad de <i>T. gondii</i>	169
Tabla 31. Valores promedio de cada uno de los componentes físico-químicos, y significación (p) y potencia para cada uno de ellos en función de la pieza, localización y viabilidad	170
Tabla 32. Composición físico-química y viabilidad del parásito en cada uno de los embutidos curados infectados	171
Tabla 33. Datos del etiquetado y otros parámetros tecnológicos de los productos curados	179

Tabla 34. Presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en productos cárnicos curados	185
Tabla 35. Resultados de presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en productos curados con datos de Ct e IFI	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taquizoitos de <i>T. gondii</i>	23
Figura 2. Estructura del taquizoito	23
Figura 3. Quistes tisulares de <i>T. gondii</i>	26
Figura 4. Ooquistes de <i>T. gondii</i>	29
Figura 5. Ciclo vital de <i>T. gondii</i>	30
Figura 6. Vías de transmisión de <i>T. gondii</i>	37
Figura 7. Inmunidad frente a <i>T. gondii</i>	40
Figura 8. Cinética de anticuerpos frente a <i>T. gondii</i>	43
Figura 9. Retinocoroiditis de un paciente con toxoplasmosis ocular	46
Figura 10. Producción cárnica española en el 2019	52
Figura 11. Distintos sistemas de cría porcina	57
Figura 12. Seroprevalencia mundial de <i>T. gondii</i> en porcino	63
Figura 13. Seroprevalencia porcina en las distintas regiones de España	64
Figura 14. Esquema del fundamento de la IFI	76
Figura 15. Reacción positiva a <i>T. gondii</i> bajo el microscopio de fluorescencia	77
Figura 16. Esquema del fundamento de la técnica ELISA indirecta	78
Figura 17. Esquema del fundamento de la técnica MAT	80
Figura 18. Observación a simple vista de los resultados del MAT	80
Figura 19. Esquema del fundamento de la prueba de aglutinación en látex	81
Figura 20. Fotografía de microscopio electrónico de baja potencia de un quiste tisular	83
Figura 21. Fotografías de inmunohistoquímica	84
Figura 22. Etapas de la PCR	85
Figura 23. Procedimiento más común de Bioensayo en ratón	90
Figura 24. Vial con la suspensión de ooquistes	95
Figura 25. Recuento de ooquistes esporulados	95

Figura 26. Imágenes de las distintas etapas del protocolo de análisis mediante IFI	97
Figura 27. Observación al microscopio de fluorescencia de los resultados de la técnica IFI ...	98
Figura 28. Aparato automatizado Maxwell® para la extracción del DNA	98
Figura 29. Colocación de muestra en el espectrofotómetro <i>Nanodrop TM 2000 UV-Vis</i>	99
Figura 30. Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador repetitivo de 529 bp	100
Figura 31. Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador SAG. Fuente: Herrero (2019)	100
Figura 32. Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador repetitivo de 529 bp (en rojo) y el SAG (en verde)	101
Figura 33. Curva de disociación con el cebador B1	101
Figura 34. Imágenes del procedimiento de qPCR	103
Figura 35. Curva de calibrado obtenida de las diluciones del control positivo	104
Figura 36. Imagen de una placa de microtitulación de MAT a las 24 horas de incubación ...	107
Figura 37. Imágenes del procedimiento de la técnica ELISA	108
Figura 38. Esquema del procedimiento de evaluación de tratamientos previos a la extracción del DNA	111
Figura 39. Fases del procedimiento de la digestión péptica	112
Figura 40. Equipo de liofilización (Heto-Holten Modelo FD8) de la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CTA) de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza	113
Figura 41. Imágenes del proceso de curado, picado y envasado de los jamones y paletas curadas	121
Figura 42. Imágenes del proceso de elaboración de embutidos en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.....	123
Figura 43. qPCR para determinar la presencia de <i>T. gondii</i> en la matriz	124
Figura 44. Esquema del procedimiento del bioensayo en ratón para determinar la presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i>	125
Figura 45. Quiste tisular de <i>T. gondii</i> en el cerebro de uno de los ratones inoculados.....	130

Figura 46. Cinética de la respuesta de anticuerpos IgG en cerdos infectados experimentalmente analizados mediante las cuatro técnicas 134

Figura 47. Ciclos de qPCR de las muestras de diafragma en función de la raza del cerdo 155

Figura 48. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados 181

RESUMEN

La toxoplasmosis es una de las zoonosis más extendidas mundialmente y el agente causal de esta enfermedad es *Toxoplasma gondii*, protozoo intracelular obligado perteneciente al phylum Apicomplexa. *T. gondii* es, probablemente, el protozoo más frecuente de infección en el hombre. Se estima que el entre el 25 y el 40 % de la población está infectada, no obstante, la prevalencia en las diferentes regiones del mundo varía de acuerdo con factores económicos, sociales y culturales. La toxoplasmosis, por lo general, cursa de forma leve o asintomática en personas inmunocompetentes. Sin embargo, en personas inmunocomprometidas es una enfermedad severa, y en mujeres embarazadas existe el riesgo de transmisión al feto con graves consecuencias. De los patógenos reseñados como los agentes principales de enfermedades de transmisión alimentaria, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) identifica a *Toxoplasma gondii* como uno de los parásitos más importantes, evidenciando la escasez de métodos estandarizados y validados para su control. Los estudios epidemiológicos apuntan tanto al consumo de carne fresca o poco cocinada como al consumo de productos cárnicos curados como factores de riesgo. Concretamente, de entre los animales productores de carne en los que se detectan más frecuentemente los quistes de *Toxoplasma*, destaca el cerdo.

La EFSA considera a *T. gondii* como uno de los riesgos biológicos más relevantes en el contexto de la inspección de la carne de cerdo, sin embargo, en la actual legislación de la Unión Europea no existen criterios para su detección en matadero. A esto se suma que España es un país con una larga tradición en la elaboración y consumo de productos cárnicos curados, y que, de los elaborados con carne de cerdo, el jamón es uno de los productos más emblemáticos, siendo nuestro país el primer productor mundial de jamones y paletas curados. Por todo ello, las empresas del sector cárnico necesitan conocer datos científicos sobre este patógeno, controlarlo y ofrecer al consumidor un producto seguro y de calidad.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido contribuir al proceso de evaluación del riesgo de *T. gondii* en el sector cárnico porcino, en especial, en la industria de elaboración de productos curados, y aportar herramientas para su control. Para ello, se han evaluado diferentes metodologías analíticas para la detección del parásito en animales vivos, en carne y en jamón curado; se han aplicado las metodologías más fiables al estudio de la prevalencia de *T. gondii* en porcino en España; se ha evaluado el efecto del curado en la viabilidad del parásito; y se ha estudiado la prevalencia de *T. gondii* en productos curados de venta en comercios al por menor. Para realizar la evaluación de los métodos de análisis, así como de la influencia del curado en la viabilidad de *T. gondii*, se ha llevado a cabo una infección experimental porcina.

Se ha realizado una evaluación de las técnicas indirectas (IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies) y directas (qPCR) con la finalidad de seleccionar las más adecuadas para la detección del parásito. La técnica IFI ha permitido la detección precoz de la infección, a los 8 días p.i., frente al resto de técnicas serológicas, con las que se detectó la positividad a los 15 días p.i. Los resultados obtenidos muestran que existe una buena concordancia entre las técnicas serológicas, así como una alta repetibilidad. Tomando como referencia la IFI, la técnica ELISA multiespecie proporcionó los peores resultados de sensibilidad y veracidad relativas.

Por otro lado, la evaluación de la qPCR como metodología de detección directa en sangre ha proporcionado muy buenos resultados dado que se reveló la presencia del parásito en el 100% de los cerdos infectados.

En carne, se han evaluado distintos tratamientos de concentración de la muestra para mejorar la sensibilidad de la qPCR, como la digestión péptica y la liofilización. Los tratamientos previos a la extracción del DNA, así como el análisis directo de la carne, no han mostrado diferencias significativas. No obstante, el hecho de que se obtuvieran valores de Ct más bajos con la digestión péptica, unido a un informe científico externo de la EFSA que recomienda su uso para aumentar la sensibilidad de la PCR, nos ha llevado a seleccionarla como técnica de tratamiento previo para el análisis de las muestras de carne y productos cárnicos. Su aplicación al análisis de distintos tejidos porcinos (diafragma, lengua, corazón, lomo y pernil), ha mostrado que el parásito se distribuye en todos ellos, determinándose la mayor carga parasitaria en corazón y pernil. Ello permite proponer como herramienta de control de materia prima el análisis de órganos diana, de menor valor comercial que los pernils.

La técnica serológica IFI y la qPCR (previa digestión péptica), se han aplicado al análisis de sueros y diafragmas, respectivamente, de cerdos de producción intensiva y extensiva obtenidos en mataderos de toda España, con el objetivo de aportar datos actuales de seroprevalencia porcina, así como de prevalencia de *T. gondii* en carne. Se analizaron un total de 1382 sueros, así como 488 diafragmas porcinos.

La seroprevalencia porcina ha sido del 28,2%, no existiendo diferencias significativas entre cerdo ibérico (27,6%) y cerdo blanco (28,7%) con un punto de corte 1:20, aunque sí hubo diferencias significativas en cuanto a títulos de anticuerpos. Éstos fueron significativamente más elevados en cerdo ibérico que en cerdo blanco. Tan sólo un 2,6% de los sueros analizados

fue de titulación igual o superior a 1:80 en cerdo blanco, mientras que en cerdo ibérico fue de un 10,9%. No obstante, sí que se observó diferencia significativa con un punto de corte 1:80, siendo la seroprevalencia total en cerdo blanco del 2,6% frente a un 10,9% en cerdo ibérico.

En relación a la presencia de *T. gondii* en diafragmas de cerdo blanco, la prevalencia ha sido del 9,8%, y en diafragmas de cerdo ibérico del 13,9%, observándose diferencias significativas en cuanto a carga parasitaria, siendo mayor en cerdo blanco (Ct 36,09) que en ibérico (Ct 34,45). Se observó una mayor probabilidad de detectar DNA de *T. gondii* en diafragma de cerdos ibéricos con títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:80.

Con el objetivo de evaluar la influencia del curado en la viabilidad de *T. gondii*, se ha llevado a cabo el curado de perniles procedentes de cerdos infectados experimentalmente, y se ha analizado, mediante bioensayo en ratón, la viabilidad de *T. gondii* al final del proceso tecnológico, tanto la parte interior como la exterior de cada pieza. Asimismo, se ha evaluado la técnica qPCR para la detección del DNA del parásito en los productos listos para el consumo. Además, se ha realizado un estudio preliminar con embutidos procedentes de tejidos de dichos cerdos infectados. En ambos casos, se ha analizado la composición físico-química de los productos listos para el consumo (a_w , NaCl, nitratos, nitritos, grasa y pH) y se ha valorado la posible implicación de éstos en la supervivencia del parásito.

El tratamiento del curado fue eficaz frente a *T.gondii*, ya que el parásito no fue viable en el 52,9% de los jamones y paletas. Sin embargo, permaneció infectivo en 6 paletas y 10 jamones. En relación a la localización de la toma de muestra, se detectó mayor viabilidad de *T. gondii* en el interior (17,7%) que en el exterior (11,8 %) aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El bajo porcentaje de error obtenido con la técnica qPCR aplicada a los extractos de la digestión, demuestra que es una buena alternativa al bioensayo en ratón para detectar la presencia del parásito en productos curados, de forma que podría utilizarse como técnica de cribado para posteriormente aplicar el bioensayo en ratón solamente en aquellas muestras positivas para confirmar la viabilidad del parásito. En los tres tipos de embutidos se detectó *T. gondii* tanto por bioensayo en ratón como por qPCR. El parásito permaneció infectivo en salchichón y longaniza pero no en chorizo, requiriéndose estudios adicionales siendo que éstos son datos preliminares. Ninguno de los parámetros físico-químicos influyó significativamente en la viabilidad de *T. gondii*.

Finalmente, se ha estudiado la prevalencia de *T. gondii* en productos curados de venta en comercios al por menor. El número de productos cárnicos curados analizados fue de 552 (311 jamones/paletas y 241 embutidos). Las muestras fueron analizadas mediante qPCR, previa digestión péptica, antes de finalizar su fecha de consumo preferente. Las muestras positivas, fueron posteriormente analizadas mediante bioensayo en ratón para determinar la viabilidad del parásito. De todos los productos, se recogió la información que venía especificada en el etiquetado para relacionarla con los resultados obtenidos. El porcentaje de positividad y viabilidad de *T. gondii* ha sido de un 10,3% y un 1,1%, respectivamente, lo que supone un riesgo bajo para el consumidor.

Los datos obtenidos en la consecución de los objetivos anteriores nos han permitido establecer conclusiones y contribuir a la evaluación del riesgo actual de *T. gondii* derivado del consumo de jamón y productos cárnicos curados, así como plantear medidas que se recogen en una serie de recomendaciones específicas para el control rutinario de este patógeno, integradas dentro de la gestión del riesgo en el sector cárnico porcino.

Toxoplasma gondii en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

SUMMARY

Toxoplasmosis is one of the most widespread zoonoses worldwide caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan parasite which belongs to the phylum Apicomplex. Probably *T. gondii* is the most common protozoan infection in humans. It is estimated that 25-40% of the population is infected, however its prevalence in different regions of the world varies according to economic, social and cultural factors. Toxoplasmosis is usually mild or asymptomatic in immunocompetent people. However, it is a severe disease in immunocompromised people, besides that there is a high risk of transmission from pregnant women to the fetus with harmful consequences. The European Food Safety Authority (EFSA) identifies *Toxoplasma gondii* as one of the most relevant parasites of the pathogens listed as the main agents of food-borne diseases, highlighting the scarcity of standardised and validated methods for its control. Epidemiological studies attribute to consumption of raw, undercooked or cured meat as risk factors. The pig stands out from rest of meat-producing animals in which Toxo cysts are more frequently detected.

EFSA considers *T. gondii* as one of the most relevant biological risks in the context of pork inspection. Nevertheless, in the current EU legislation there are no criteria for its detection in slaughterhouses. In addition, Spain is a country with a long tradition in the production and consumption of cured meat products, and of those made from pork, ham is one of the most emblematic products, with our country being the world's leading producer of cured hams and shoulders. For all these reasons, companies in the meat sector need to know scientific data about this pathogen, control it, and offer the consumer a safe, quality product.

The aim of this Doctoral Thesis has been to contribute to the process of risk assessment of *T. gondii* in the pig meat sector, especially in the cured products processing industry, and to provide tools for its control. For that purpose, different analytical methodologies have been evaluated for the detection of the parasite in live animals, in meat and in cured ham; the most reliable methodologies have been applied to the study of the prevalence of *T. gondii* in pigs in Spain; the effect of curing on the viability of the parasite has been evaluated; and the prevalence of *T. gondii* in cured products sold in retail outlets has been studied. An experimental pig infection has been carried out to evaluate the methods of analysis and the influence of curing on the viability of *T. gondii*.

An evaluation of the indirect (IFAT, MAT, monospecies ELISA and multispecies ELISA) and direct (qPCR) techniques has been performed in order to select the most suitable ones for the detection of the parasite. The IFAT has allowed the early detection of the infection, at 8 days p.i., while the other techniques have detected positivity at 15 days p.i. The results obtained show that there is a good concordance among the serological techniques, as well as a high

repeatability. Taking the IFA technique as a reference, the multispecies ELISA technique provided the worst results of relative sensitivity and veracity.

On the other hand, the evaluation of qPCR as a direct blood screening methodology has provided very good results as the presence of the parasite was revealed in 100% of the infected pigs.

In meat, different sample concentration treatments have been evaluated to improve the sensitivity of qPCR, such as acid pepsin digestion and freeze-drying. Treatments prior to DNA extraction, as well as direct analysis of the meat, have shown no significant differences. However, the fact that lower Ct values were obtained with acid pepsin digestion, along side an external EFSA scientific report recommending its use to increase the sensitivity of PCR, has led us to select it as a pre-treatment technique for the analysis of samples of meat products. Its application to the analysis of different pig tissues (diaphragm, tongue, heart, loin and hind leg), has shown that the parasite is distributed in all of them, with the highest parasitic load determined in heart and hind leg. This makes it possible to propose the analysis of target organs, of lesser commercial value than hind legs, as a tool for the control of raw material.

The IFAT and the qPCR (previous acid pepsin digestion) have been applied to the analysis of sera and diaphragms, respectively, from intensive and extensive production pigs obtained from slaughterhouses all over Spain, with the aim of providing current data on pig seroprevalence, in addition to the prevalence of *T. gondii* in meat. A total of 1382 sera and 488 pig diaphragms were analysed.

The pig seroprevalence was 28.2%, with no significant differences between Iberian pigs (27.6%) and white pigs (28.7%) with a cut-off value of 1:20, although there were significant differences in terms of antibody titres. These were significantly higher in the Iberian pig than in the white pig. Only 2.6% of the sera analysed had titres equal to or higher than 1:80 in white pigs, while in Iberian pigs it was 10.9%. Nevertheless, a significant difference was observed with a cut-off value of 1:80, with the seroprevalence in white pigs being 2.6% compared to 10.9% in Iberian pigs.

According to the presence of *T. gondii* in diaphragms of white pigs, the prevalence was 9.8%, and in diaphragms of Iberian pigs 13.9%. Besides that, significant differences were observed in terms of parasitic load, being higher in white pigs (Ct 36.09) than in Iberian pigs (Ct 34.45). A higher probability of detecting *T. gondii* DNA in diaphragm of Iberian pigs with antibody titers equal or higher than 1:80 was observed.

With the aim of evaluating the influence of curing on the viability of *T. gondii*, the curing of hind legs from experimentally infected pigs has been carried out. The viability of *T. gondii* at the end of the technological process, both the inside and the outside of each piece, has been analysed by means of a mouse bioassay. Likewise, the qPCR technique has been evaluated for the detection of parasite DNA in ready-to-eat products. In addition, a preliminary study has been carried out with sausages from the tissues of these infected pigs. In both cases, the physico-chemical composition of the ready-to-eat products has been analysed (a_w , NaCl, nitrates, nitrites, fat and pH) and their possible involvement in the survival of the parasite has been assessed.

The curing treatment was effective against *T.gondii*, due to the parasite not being viable in 52.9% of hams and shoulders. However, it remained infective in 6 hams and 10 shoulders. In relation to the location of the sample, higher viability of *T. gondii* was detected in the interior (17.7%) than in the exterior (11.8%) although the differences were not statistically significant. The low percentage of error obtained with the qPCR technique applied to digestion extracts shows that it may be a good alternative to the mouse bioassay for detecting the presence of the parasite in cured products, so that it might be used as a screening technique to subsequently apply the mouse bioassay only to those samples that are positive to confirm the viability of the parasite. In all three types of charcuterie, *T. gondii* was detected by both mouse bioassay and qPCR. The parasite remained infective in *salchichón* and *longaniza* but not in *chorizo*, requiring further studies as these are preliminary data. None of the physical-chemical parameters had a significant influence on the viability of *T. gondii*.

Finally, the prevalence of *T. gondii* in cured retail products has been studied. The number of cured meat products analysed was 552 (311 hams/shoulders and 241 sausages). The samples were analysed by qPCR, after acid pepsin digestion, before the end of their best-before date. Subsequently, positive samples were analysed by mouse bioassay to determine the viability of the parasite. The information specified on the label of all products was collected to relate it to the results obtained. The percentage of positivity and viability of *T. gondii* was 10.3% and 1.1%, respectively, which represents a low risk for the consumer.

The data obtained in the achievement of the above objectives have allowed us to draw conclusions and contribute to the assessment of the current risk of *T. gondii* derived from the consumption of ham and cured meat products. Moreover, it has permitted us to propose measures that are included in a series of specific recommendations for the routine control of this pathogen, integrated within risk management in the pork meat sector.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La toxoplasmosis es una de las zoonosis más extendidas mundialmente. El agente causal de la enfermedad es *Toxoplasma gondii*, protozoo intracelular obligado perteneciente al phylum Apicomplexa y descubierto por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux. El ciclo biológico de *T. gondii* incluye a los felinos como hospedadores definitivos y a los animales de sangre caliente (mamíferos y aves) como hospedadores intermediarios. *T. gondii* tiene un ciclo que comprende tres estadios de desarrollo: taquizoito, bradizoito (en quistes tisulares) y esporozoito (en los ooquistes).

La fase de reproducción sexual en el hospedador definitivo se inicia cuando los gatos ingieren carnes infectadas con quistes tisulares que contienen bradizoitos. La pared de los quistes se disuelve por las enzimas proteolíticas del estómago y el intestino delgado, con la consecuente liberación de los bradizoitos. Éstos penetran en las células epiteliales del intestino delgado donde tiene lugar una fase de multiplicación asexual. Posteriormente, se produce la formación de macro y microgametocitos que pasan a gametos. Después de la fecundación, se forman los ooquistes, los cuales se eliminarán al exterior con las heces, en un estado no-esporulado y no infectante. La esporulación se realiza en el medio exterior, de uno a cinco días después de la eliminación de los ooquistes, dependiendo de las condiciones ambientales (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Hill, Chirukandoth & Dubey, 2005).

La transmisión del parásito a los hospedadores intermediarios se produce por la ingestión de ooquistes esporulados, o a través del consumo de carne cruda o poco cocinada que contiene quistes con bradizoitos. Otra ruta de infección es la vía transplacentaria por el paso de taquizoitos de la madre al feto. Independientemente de la vía de transmisión del parásito a los hospedadores intermediarios, el desarrollo asexual de este protozoo consta de dos etapas infectivas: taquizoitos (fase de multiplicación rápida) y bradizoitos (fase de multiplicación lenta). Inicialmente los taquizoitos se diseminan por todo el organismo a través de macrófagos, linfocitos, así como libres en el plasma e invaden cualquier tipo de célula nucleada. Los taquizoitos se multiplican repetidamente por endodiogenia y la invasión y crecimiento en la célula provoca su ruptura y la liberación del parásito. Los taquizoitos liberados buscan nuevas células y se repite el proceso. Una vez que se establece la respuesta inmunitaria del hospedador, los taquizoitos se transforman en bradizoitos incluidos en quistes tisulares donde se continúan multiplicando más lentamente por endodiogenia. El parásito tiene una alta afinidad por los tejidos musculares (esquelético y cardiaco) y neuronales (cerebro y ojo), y los quistes tisulares pueden persistir en los tejidos del huésped durante toda

su vida (Dubey, 2009a; 2010; Hill, Chirukandoth & Dubey, 2005; Tenter, 2009; Van der Giessen et al., 2007).

T. gondii es, probablemente, el protozoo más frecuente de infección en el hombre. Se estima que el 30% de la población está infectada, sin embargo, la prevalencia en las diferentes regiones del mundo varía de acuerdo con factores económicos, sociales y culturales. De los patógenos reseñados como los agentes principales de enfermedades de transmisión alimentaria en Estados Unidos, *Toxoplasma* se sitúa en segundo lugar superado únicamente por *Salmonella* en cuanto al número de muertes anuales que provoca (Dorny et al., 2009; Maenz et al., 2014; Scallan et al., 2011). En un reciente estudio realizado por una comisión de expertos para la FAO-OMS se ha establecido a este organismo como la cuarta prioridad entre los parásitos de origen alimentario (FAO/WHO, 2014).

La toxoplasmosis, por lo general, cursa de forma leve o asintomática en personas inmunocompetentes. Sin embargo, en personas inmunocomprometidas es una enfermedad severa. En mujeres embarazadas existe el riesgo de transmisión al feto con graves consecuencias, desde abortos espontáneos, nacimientos prematuros y/o enfermedades severas en el niño como hidrocefalia, retinocoroiditis, calcificaciones intracerebrales y daños encefálicos, que reducen significativamente su calidad de vida (Jones-Brando, Torrey & Yolken, 2003).

Estudios epidemiológicos señalan que entre el 30 y el 60% de las infecciones se deben al consumo de carne cruda o poco cocinada (Boyer et al., 2005; Cook et al., 2000; Lundén & Uggla, 1992). Concretamente, los quistes de *Toxoplasma* en los animales productores de carne se detectan más frecuentemente en cerdos, ovejas y cabras, y con menor frecuencia en ganado vacuno, pollos, conejos y caballos (Opsteegh et al., 2016). Dado su carácter omnívoro, los cerdos tienen mayores posibilidades de adquirir la infección por *T. gondii*. El consumo de carne de esta especie es una de las fuentes más relevantes de infección en el hombre (Balea et al., 2012; Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000).

Según los datos de la Asociación Nacional de Industrias de la carne de España (ANICE), la Unión Europea es el segundo productor de carne de porcino (20%), después de China (47,8%). Particularmente España se ha consolidado en estos últimos años como el cuarto mayor productor mundial de carne de porcino (4,1%) por detrás de China (47,8%), EE.UU (10,6%) y Alemania (4,7%), y por delante de Brasil (3,3%), Rusia (2,8%), Vietnam (2,5%), Francia (1,9%) y Polonia (1,8%) (ANICE, 2019). De hecho, en los últimos 8 años, las exportaciones en el sector

porcino español han incrementado de forma importante, cerrándose el año 2019 con record histórico de exportaciones (1.723.129 millones de toneladas).

La seroprevalencia de *T. gondii* en el ganado porcino es variable y está influenciada principalmente por el sistema de producción, siendo el riesgo en granjas de producción extensiva estadísticamente mayor que en granjas de producción intensiva (Alvarado-Esquivel et al., 2011; Dubey & Jones, 2008; Dubey, 2009b; Guo et al., 2015b; Tenter, Heckerth & Weiss, 2000; Yu et al., 2011). Este sistema de explotación en extensivo permite gozar de un alto estatus de bienestar animal, aunque es frecuente el contacto con otras especies animales, tanto domésticas como silvestres, lo que facilita la circulación y transmisión de patógenos entre estas especies animales (Astorga et al., 2010; Funk & Gebreyes, 2004). La seroprevalencia mundial de *T. gondii* en cerdos oscila entre el 0,4 % y el 92,7 % (Foroutan et al., 2019; Sroka et al., 2020). En España, a nivel nacional, el único estudio del que se dispone es el de García-Bocanegra et al. (2010b), que señalaron una seroprevalencia del 16,6%, por lo que se hace necesario aportar datos actuales para conocer la evolución de la seroprevalencia porcina en nuestro país.

Existen diversas técnicas de análisis serológico de *T. gondii*. Éstas varían dependiendo de la metodología, antígenos utilizados e isotipo de inmunoglobulina detectado. De entre todas ellas, las más empleadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el test de aglutinación modificada (MAT) y el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Pardini et al., 2012). Sin embargo, realizar una comparación entre estudios de seroprevalencia es difícil, debido al amplio abanico de pruebas serológicas utilizadas y a los diferentes valores de corte empleados que no siempre son indicados por los autores (Herrero et al., 2016). Asimismo, los estudios de validación de estas metodologías que aporten datos sobre sensibilidad, especificidad y grado de concordancia entre las distintas técnicas son limitados (Aroussi et al., 2015); por ello es importante la evaluación de estas técnicas analíticas para disponer de una herramienta fiable de control.

Para saber más acerca del papel que tiene la carne como fuente de infección de *T. gondii* para el ser humano es importante tener datos de prevalencia de quistes tisulares infecciosos (Opsteegh et al., 2016). Se ha demostrado que en respuesta a una infección natural, la mayoría de los animales de las granjas seropositivos a *T. gondii* contienen parásitos en sus carnes (Opsteegh et al., 2016; Tenter, Heckerth, & Weiss, 2000; Zia-Ali et al., 2007). En general, la seropositividad es un buen indicador de la presencia del parásito en los tejidos y algunos autores mencionan que el nivel de detección aumenta cuanto mayor es el título de anticuerpos en el cerdo (Dubey & Jones, 2008; Herrero et al., 2016; Opsteegh et al., 2016;

Herrero, 2019). De hecho, Herrero (2019) demostró la alta probabilidad de detectar formas viables de *T. gondii* en tejidos de cerdos con títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:80, pudiendo ser este título serológico idóneo para discriminar a los animales de mayor riesgo.

Existen varios estudios en la literatura científica sobre la prevalencia de *T. gondii* en tejidos de cerdos infectados de forma natural. A nivel mundial la prevalencia de *T. gondii* en carne de cerdos destinados al consumo humano es del 9,32% al 57,1% (Aspinall et al., 2002; Bacci et al., 2015; Bezerra et al., 2012; Dubey et al., 2009b; Guo et al., 2015b; Hálová et al., 2013; Hamilton et al., 2015; Herrero, 2019; de Sousa et al., 2006; Wang et al., 2012), pero concretamente en España apenas hay datos. Bayarri et al. (2012) obtuvieron una prevalencia del 8% en muestras de carne fresca porcina procedentes de distintos establecimientos localizados en la ciudad de Zaragoza. Recientemente, en un estudio realizado con animales seropositivos, *T. gondii* estaba presente en el 73,7% de los animales, detectándose parásitos viables en el 42,1% (Herrero et al., 2016).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) puede ser utilizada para la detección de quistes de *T. gondii* en tejidos. Se han descrito distintos tipos de sistemas (convencional, anidada, semi-anidada y PCR en tiempo real, entre otros) y distintos genes diana, siendo el gen B1 y el elemento de repetición 529bp los más comunes (Franco-Hernández et al., 2016; García et al., 2006; Hill et al., 2006.; Ortega-Pacheco et al., 2013; Veronesi et al., 2017). En general, esta metodología puede detectar bajas concentraciones de DNA de *T. gondii*. Sin embargo, los quistes tisulares son escasos, se estima 1 quiste por cada 50 g de carne (Dubey, 2010), y los kits comerciales de extracción de DNA generalmente están diseñados para cantidades muy pequeñas de tejido (en concreto, 25 mg), por lo que la probabilidad de detectar *T. gondii* en una muestra tan pequeña es baja. Por este motivo, el tratamiento de la muestra previo al aislamiento del DNA puede ser un factor fundamental para mejorar la sensibilidad de la PCR. Los tratamientos previos más utilizados son la digestión péptica (Bayarri et al., 2010; Dubey, 1998; Herrero, 2019), la homogeneización (Bacci et al., 2015; Rahumatullah, Khoo & Noordin., 2012), el aislamiento sobre gradientes de Percoll (Kul et al., 2013; Omata et al., 1997) y la captura magnética (Gómez-Samblás et al., 2016; Juranková et al., 2013; Opsteegh et al., 2010). Sin embargo, para evaluar el riesgo hay que confirmar que el parásito está viable y aunque el desarrollo de la PCR para confirmar la viabilidad está en curso para varios patógenos, todavía no existen tales metodologías para *T. gondii* (Opsteegh et al., 2016).

En la actualidad, el bioensayo en ratón es considerado la prueba de oro para confirmar la viabilidad de *T. gondii* en tejidos (EFSA, 2018). Esta metodología consiste en la inoculación de la muestra objeto de estudio a ratones de experimentación. Tras aproximadamente 60 días post-inoculación, se procede a su sacrificio y análisis del cerebro por PCR a tiempo real para determinar la posible presencia de DNA de *T. gondii*. Un resultado positivo indica que el parásito se ha multiplicado, y por tanto estaba viable en la muestra. El bioensayo es una técnica eficaz y aporta resultados válidos. Sin embargo, es laboriosa, cara y exige la utilización de animales de experimentación, por lo que se hace necesaria la evaluación de metodologías alternativas o complementarias.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria considera a *T. gondii* como uno de los riesgos biológicos más relevantes en el contexto de la inspección de la carne de cerdo (EFSA, 2018; Hill et al., 2013), sin embargo, en la actual legislación de la Unión Europea no existen criterios para su detección en matadero. La industria cárnica ha centrado su atención en producir carne segura y de alta calidad, y por ello resulta indispensable evaluar técnicas para la detección y control de *T. gondii* tanto en animales vivos como en carne.

La mayoría de las recomendaciones relacionadas con los sistemas de prevención de la toxoplasmosis se basan en el uso de metodologías de conservación o tratamientos culinarios que aseguren la destrucción de los quistes viables. En líneas generales puede decirse que la eficacia de las tecnologías es variable y, en muchas ocasiones, está relacionada con la intensidad y el tiempo con que se ejercen estos tratamientos. Existen estudios en la literatura científica sobre la sensibilidad de los quistes tisulares presentes en la carne a diferentes tratamientos tecnológicos como el tratamiento térmico con calor, la congelación, las altas presiones, la irradiación y el proceso de curado (Cook et al., 2000; Dubey, 1990; Franssen et al., 2019; Kijlstra & Jongert, 2009; Lundén & Uggla, 1992).

Respecto a los productos cárnicos curados, el jamón y los embutidos son alimentos importantes en el área mediterránea, y España es uno de los principales productores. Se trata de productos de alta calidad nutricional con creciente relevancia económica, ampliamente consumidos en España y del que somos el principal exportador. Durante el año 2019, se exportaron 49.138 toneladas de jamones y paletas curadas. Los principales destinos continúan siendo los países de la UE, Francia, Alemania, Portugal e Italia, aunque en 2019 se registró una mayor demanda de China, a causa de sus problemas de producción y abastecimiento por la peste porcina africana que asola el sector porcino del país, que ha disparado las ventas y los precios de las empresas exportadoras españolas (ANICE, 2019).

En relación a la prevalencia de *T. gondii* en estos productos, Warnekulasuriya et al. (1998) llevaron a cabo una investigación en Reino Unido de diversos productos cárnicos, entre ellos el jamón curado, donde detectaron un 1,5% de positividad. Posteriormente, en España, en un estudio sobre jamones curados de diferentes modalidades disponibles en el comercio, no se detectó el parásito en ninguna de las muestras analizadas (Bayarri et al., 2012), aunque estudios más recientes señalan prevalencias alrededor del 4,8% en España (Gómez-Samblás et al., 2015). No obstante, existen pocos estudios y no aportan datos sobre las características físico-químicas del producto y su influencia sobre la viabilidad de *T. gondii* por lo que urge la necesidad de profundizar en estos aspectos. Además, tampoco hay investigaciones acerca de la prevalencia de *T. gondii* en embutidos curados. Estos productos, al igual que el jamón, son emblemáticos de la gastronomía española y por tanto, sería necesario aportar datos científicos para que se pueda detectar el riesgo, controlarlo y ofrecer al consumidor un producto más seguro.

Con respecto al efecto del procesado tecnológico del curado en la viabilidad de *T. gondii*, la literatura científica nos ofrece disparidad de opiniones a favor (Genchi et al., 2017; Gómez-Samblás et al., 2016; Gómez-Samblás et al., 2020) y en contra de su efecto sobre la viabilidad de *T. gondii* (Bayarri et al., 2010; Herrero et al., 2017). Sin embargo, los estudios epidemiológicos identifican el consumo de productos cárnicos curados como un factor de riesgo de adquirir toxoplasmosis durante el embarazo (Buffolano et al., 1996; Cook et al., 2000; Kapperud et al., 1996; Thaller et al., 2011).

En los escasos estudios que han examinado la eficacia del proceso de curado en la inactivación de *T. gondii*, la mayoría de ellos establecen una correlación entre el tiempo de salado/curado, y la viabilidad de *Toxoplasma* (Bayarri et al., 2010; Herrero et al., 2017; Kijlstra & Jongert, 2008; Mie et al., 2008).

En España, Bayarri et al. (2010) llevaron a cabo un trabajo pionero para aportar datos sobre la influencia del proceso de curado en la viabilidad de *T. gondii*, utilizando la técnica de bioensayo en ratón para evaluar el riesgo de infección derivada del consumo de este producto. El estudio concluyó que el tiempo de curado era fundamental para destruir el parásito, no detectándose formas viables a los 14 meses de curación. En la misma línea de investigación pero con otros tiempos de curación, Herrero et al. (2017) observaron que la viabilidad de *T. gondii* se veía afectada significativamente por el proceso de curado. Estos autores observaron una mayor pérdida de viabilidad a los 12 que a los 9 meses de curado. Sin embargo, aunque el riesgo se redujo, no se eliminó por completo. Además, observaron una asociación entre la

pérdida de viabilidad de *T. gondii* y un menor contenido en grasa, señalando que la grasa podría ejercer un efecto protector.

Por el contrario, en una investigación llevada a cabo por Gómez-Samblás et al. (2016), observaron que el parásito permanecía viable después de 5 meses en las muestras con bajo contenido en sal, pero 7 meses de curación ya eran suficientes para inactivar al parásito. Con similares resultados, Genchi et al. (2017) no halló *T. gondii* viable después de la elaboración del jamón curado de Parma (producto Denominación de Origen de Italia) de animales infectados experimentalmente ni a los 12, 14 ni tras 16 meses de curación.

Estas discrepancias entre estudios radican posiblemente en la diversa metodología de análisis empleada (toma de muestras, método de detección, etc.), por lo que es preciso realizar más estudios que evalúen la eficacia del curado tradicional en la supervivencia de *T. gondii* en España. La realización de dichos trabajos a partir de productos cárnicos procedentes de cerdos infectados experimentalmente con una evaluación de las características de dichos productos (actividad de agua, pH, contenido de sal, etc.) y su influencia en la viabilidad de *T. gondii*, aportará resultados concluyentes acerca del efecto de este tratamiento tecnológico.

Por otro lado, tampoco existen estudios de prevalencia en productos cárnicos curados, que incluyan un alto número de muestras, tanto de jamón como de embutidos curados, así como datos de trazabilidad e información sobre el proceso tecnológico aplicado, herramienta fundamental para garantizar la seguridad de los alimentos. Por todo ello, es fundamental aportar más datos científicos y así contribuir al proceso de evaluación del riesgo de adquirir *T. gondii*, por el consumo de productos cárnicos curados.

La presente Tesis Doctoral se ha realizado dentro de las actividades del proyecto de investigación titulado “Evaluación del riesgo de *Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de jamón y otros productos curados” (Proyecto RTA2014-00024-C04-02, INIA/MINECO/FEDER). El **objetivo general** de este estudio ha sido aportar datos científicos que permitan evaluar el riesgo de *T. gondii* en la industria cárnica y aportar herramientas para su control.

Para ello se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar metodologías para el análisis de *Toxoplasma gondii* en la industria cárnica porcina.
2. Determinar la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en porcino en España.
3. Evaluar el efecto del tratamiento tecnológico de curado del jamón y embutidos utilizando materia prima procedente de cerdos infectados experimentalmente con *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

4. Analizar la presencia y viabilidad de *Toxoplasma gondii* en jamón curado y embutidos curados listos para el consumo y relacionarla con datos del proceso tecnológico.
5. Contribuir al proceso de evaluación del riesgo de *Toxoplasma gondii* en el sector cárnico porcino, en especial en la industria de productos curados, y aportar medidas para su gestión.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Antecedentes históricos

Nicolle & Manceaux (1908) descubrieron un protozoo en el hígado y en el bazo de un roedor africano similar a un hámster, el gundi, *Ctenodactylus gundi*, que estaba siendo utilizado para la investigación de leishmaniosis en el Instituto Pasteur de Túnez. En un principio, incluyeron a este parásito en el género *Leishmania* y le denominaron *L. gondii*. Sin embargo, posteriormente, se dieron cuenta de que habían descubierto un nuevo microorganismo y lo llamaron *Toxoplasma gondii*, basándose en su morfología (*toxoplasma*: arco y *plasma*: forma) y en el huésped en el que había sido encontrado. Aunque el nombre correcto del parásito debería haber sido *T. gundii*, Nicolle & Manceaux (1908) identificaron incorrectamente al hospedador como *Ctenodactylus gundi*. Casi al mismo tiempo, Splendore, en Brasil, halló un protozoo con las mismas características en el conejo pero éste no le otorgó ningún nombre concreto (Splendore, 1908). En años posteriores, el parásito fue aislado de distintos mamíferos y aves, y se designó con el nombre genérico de *Toxoplasma*, seguido del animal donde se aislaba (Chatton & Blanc, 1917). Durante aproximadamente 20 años el parásito fue poco conocido y estudiado y por tanto, no se le consideró de especial relevancia para la salud humana ni veterinaria. Sin embargo, en 1923, se empezó a tomar consciencia de su existencia gracias a las investigaciones de un oftalmólogo checo, Janků, que encontró quistes del parásito en la retina de un niño hidrocefálico (Janků, 1923). A pesar de ello, *T. gondii* no fue mundialmente reconocido como parásito en humanos hasta que en 1938, Wolf, Cowen & Paige (1939) identificaron a *T. gondii* como el agente causal de una meningo-encefalomielitis mortal en un recién nacido; documentando por primera vez la toxoplasmosis congénita. En 1940, Pinkerton & Weinman registraron los primeros casos mortales por toxoplasmosis en adultos (Pinkerton & Weinman, 1940). En el ámbito veterinario, aunque durante 30 años hubo casos de toxoplasmosis canina en Cuba, Francia, Alemania, India, Iraq, Tunisia, U.S.S.R y Estados Unidos (Dubey & Beattie, 1988), no se le dio importancia hasta que en 1957 se descubrió que causaba abortos en las ovejas (Hartley & Marshall, 1957).

Estos hallazgos suscitaron el interés por el estudio de este parásito y en 1948, Sabin & Feldman desarrollaron la primera prueba serológica de diagnóstico, el dye test, lo que supuso un avance en el conocimiento de la toxoplasmosis. A partir de entonces, otros científicos tales como Frenkel (1948), Goldman, (1957), Remington & Merigan (1968), Desmonts & Remington (1980), Burg et al. (1989) y Dubey et al. (1995a) entre otros, contribuyeron con sus investigaciones al campo del diagnóstico. De entre estos descubrimientos cabe destacar el de Desmonts & Remington (1980) que desarrollaron los primeros tests de aglutinación directa DAT y MAT, el de Dubey et al. (1995a) que llevaron a cabo la primera validación de tests

serológicos usando un aislado del parásito como estándar y finalmente, el de Burg et al. (1989) que pusieron en marcha la primera PCR para detectar el DNA de *T. gondii* usando como cebador el gen B1.

Hasta los años cincuenta las vías de transmisión de la toxoplasmosis eran desconocidas. La única vía conocida hasta entonces era la transmisión congénita, que ocurría con muy poca frecuencia y era insuficiente para explicar la amplia difusión de la enfermedad. En 1954, Weinman y Chandler sugirieron que la transmisión podría producirse por la ingestión de carne poco cocinada (Weinman & Chandler, 1954). Jacobs, Remington & Melton (1960) aportaron datos que corroboraron esta idea, al demostrar que los quistes tisulares de *T. gondii* eran resistentes a las enzimas proteolíticas digestivas, permitiendo infectar al hospedador. Esta hipótesis fue confirmada por Desmonts, Couvreur & Benrachi (1965) mediante un experimento con niños tuberculosos en el que se compararon los niveles de anticuerpos de los niños frente a *T. gondii* al entrar al hospital y tras ser alimentados con una dieta rica en carne poco cocinada, observando que estos niveles aumentaban drásticamente. Hubo evidencias epidemiológicas que indicaban que era común en humanos en algunas localidades donde la carne cruda se comía de forma rutinaria. En una encuesta en París, Desmonts, Couvreur & Benrachi (1965) encontraron que más del 80% de la población adulta muestreada tenía anticuerpos contra *T. gondii*.

Desde el punto de vista epidemiológico, Hutchison (1965) encontró formas de resistencia (ooquistes) en las heces del gato hasta ese momento desconocidas, reconociendo así por primera vez la transmisión fecal. Este acontecimiento reveló la importancia del gato en el ciclo y, por lo tanto, en la propagación de la enfermedad (Pumarola et al., 1982).

Todo lo que hoy conocemos sobre *T. gondii* lo debemos a los estudios realizados desde principios del siglo XX. Gracias a ellos se han averiguado y caracterizado desde su ciclo vital hasta las repercusiones que tiene para la salud, tanto humana como animal. Aún con todo, todavía existen muchas incógnitas por resolver acerca de este parásito y dado su carácter zoonótico, es necesario continuar profundizando en sus investigaciones.

2. Taxonomía del parásito

La posición taxonómica de este parásito ha sido modificada en multitud de ocasiones, permaneciendo actualmente el criterio seguido por Levine (1973) y aceptado por Frenkel (1977):

Reino: *Protozoa*

Phylum: *Apicomplexa*

Clase: *Sporozoea*

Subclase: *Coccidia*

Orden: *Eucoccidiida*

Suborden: *Eimeriina*

Familia: *Sarcocystidae*

Subfamilia: *Toxoplasmatinae*

Género: *Toxoplasma*

Especie: *Toxoplasma gondii*

3. Estadios de desarrollo

T. gondii presenta tres fases o estadios de desarrollo a lo largo de su ciclo vital: taquizoito, bradizoito (en quistes tisulares) y esporozoito (en los ooquistes).

3.1. Taquizoito

El taquizoito, término derivado del griego *tachos* = velocidad, es la etapa de multiplicación rápida. Es la forma activa de replicación y la responsable de la diseminación de la infección. Son parásitos intracelulares obligados, que pueden salir de la célula, infectar cualquier otra célula nucleada y multiplicarse en su interior. Tiene forma de arco o luna creciente y es aproximadamente del tamaño de un glóbulo rojo (2 x 6 µm), con el extremo anterior conoidal y el posterior redondeado (Figura 1).

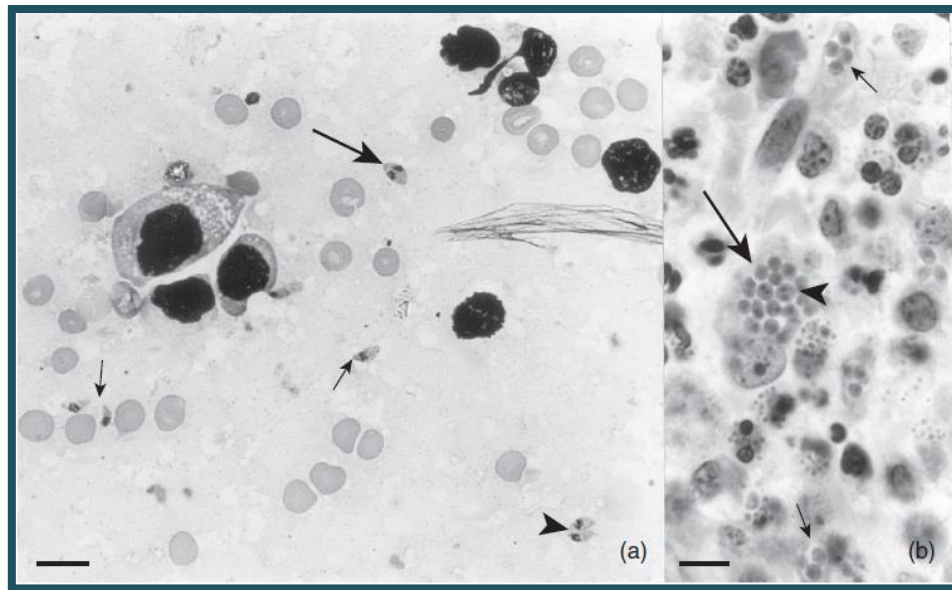


Figura 1. Taquizoitos de *T. gondii*. (a) Individuales (↗), binucleados (↘), y taquizoitos dividido (↔) en pulmón, que compara su tamaño con los glóbulos rojos y los leucocitos (tinción de Giemsa). (b) Taquizoitos en grupo (↗) y por pares (↘) en una sección del nódulo linfático mesentérico. Los organismos se localizan en vacuolas parasitóforas y algunos se dividen (↔) [Tinción de hematoxilina y eosina (H & E)]. Fuente: Hill y Dubey (2015).

Posee una película (recubrimiento exterior), varios orgánulos incluyendo microtúbulos subpeliculares, anillos apicales o aplicoplasto, un conoide, roptrias, micronemas, gránulos densos, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi, ribosomas, mitocondrias, un microporo, un nucléolo pequeño y un núcleo bien definido (Dubey et al., 1998) (Figura 2).

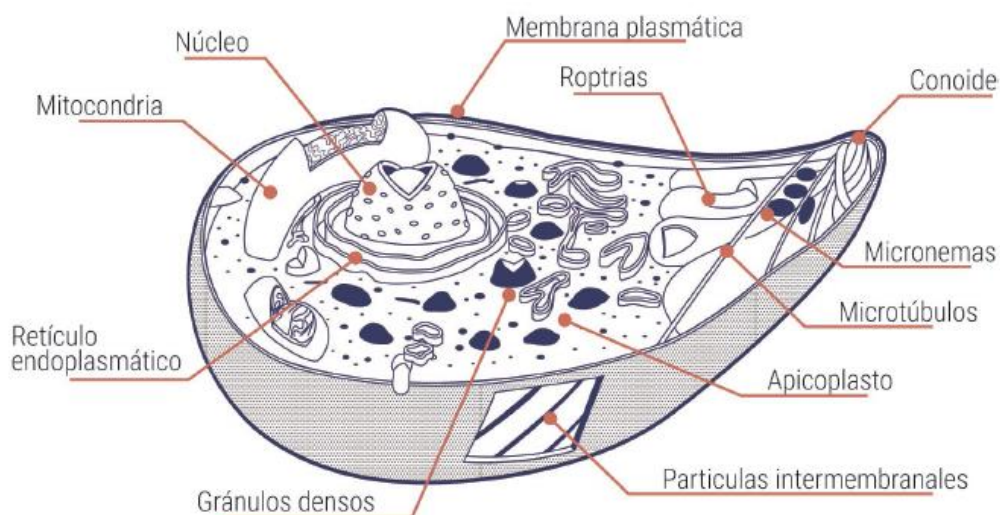


Figura 2. Estructura de un taquizoito. Fuente: Herrero (2019)

La película comprende 3 membranas: el plasmalema, que es la lámina que está en contacto con el medio externo, y el complejo membranoso interno, formado por dos citomembranas localizadas justo debajo del plasmalema. Esta estructura juega un papel importante en los procesos de ataque e invasión de las células hospedadoras y en la comunicación, permeabilidad y motilidad del parásito (Rabjeau, 1997). En su composición se ha encontrado una alta proporción de lípidos/proteínas y un microporo, que consiste en una invaginación de la membrana externa que atraviesa el complejo membranoso interno.

Asimismo, *T. gondii* al igual que otros miembros del phylum *Apicomplexa*, posee una estructura polar determinada por la conformación de un complejo apical o citoesqueleto. Este complejo apical comprende un conoide que contiene una espiral de filamentos de 26 a 30 nm, y el anillo polar que se encuentra en su base y sirve de anclaje a 20-22 microtúbulos longitudinales dispuestos en intervalos regulares (Morrisette et al., 1994; Nichols & Chiappino, 1987). El complejo apical está implicado en la motilidad y en el proceso de invasión de la célula huésped (Bonhomme, Pingret & Pinon, 1992).

Las roptrias tiene una función secretora asociada con la penetración en la célula huésped, secretando su contenido a través del plasmalema justo encima del conoide hacia el exterior. El núcleo suele estar situado hacia el extremo posterior u en el centro de la célula (Sheffield & Melton, 1968)

El taquizoito entra en la célula huésped mediante penetración activa. Después de incorporarse a la célula, adquiere una forma oval y se rodea de una vacuola parasitófora. Dentro de esta vacuola, *T. gondii* está protegido de los mecanismos de defensa de la célula que lo alberga. Los taquizoitos se multiplicarán repetidamente por endodiogenia (surgen dos células hijas a partir de una célula progenitora) y su invasión y crecimiento en la célula provocarán su ruptura y la liberación del parásito. Los taquizoitos liberados buscarán nuevas células y se repetirá el proceso. El taquizoito es la forma que induce la respuesta inflamatoria y la destrucción de tejidos asociada, en definitiva, es el estadio que manifiesta los signos clínicos de la enfermedad.

Los taquizoitos son extremadamente frágiles y son sensibles a la mayor parte de los desinfectantes como el hipoclorito de sodio al 1% o el etanol al 70% (Gómez & Grau, 2004). También, son susceptibles al pH bajo (Dubey, 1998; Jacobs, Remington & Melton, 1960; Pettersen, 1979), y a la desecación y ebullición.

Los taquizoitos se transforman en bradizoitos para formar los quistes una vez concluida la fase aguda de la infección (Montoya & Liesenfeld, 2004).

3.2. Bradizoito

El término bradizoito (Frenkel, 1973), procedente del griego *bradys* = lento, es utilizado para nombrar las formas de multiplicación lenta que se encuentran en el interior de los quistes tisulares (Dubey, 1998) y representan la fase crónica de la infección.

Las diferencias estructurales entre los bradizoitos y los taquizoitos son prácticamente inexistentes. El núcleo de los bradizoitos está localizado más cerca del extremo posterior, mientras que en los taquizoitos suele estar situado en la parte central. El contenido de roptrias en los bradizoitos es más electrodense y éstos contienen gránulos de amilopectina PAS positivos que están ausentes en los taquizoitos (Webster, 2010). Además, los bradizoitos son más resistentes a su destrucción por enzimas proteolíticas que los taquizoitos.

Una vez que se establece la respuesta inmunitaria del hospedador, los taquizoitos se transforman en bradizoitos y éstos continúan multiplicándose por endodiogenia en las células del hospedador y segregan en su interior componentes fibrilares a modo de capas formando una pared quística de 2 – 3 μm de grosor. Estos quistes tisulares actúan como una barrera de protección del parásito frente a los mecanismos fisiológicos e inmunológicos del huésped. Tienen una forma ovalada con un diámetro de 200 – 500 μm en cuyo interior se pueden almacenar de dos hasta miles de bradizoitos en función de la cepa del parásito, la célula hospedadora parasitada y el momento de formación del quiste (Dubey, Lindsay & Speer, 1998, 2009; Juránková et al., 2014) (Figura 3).

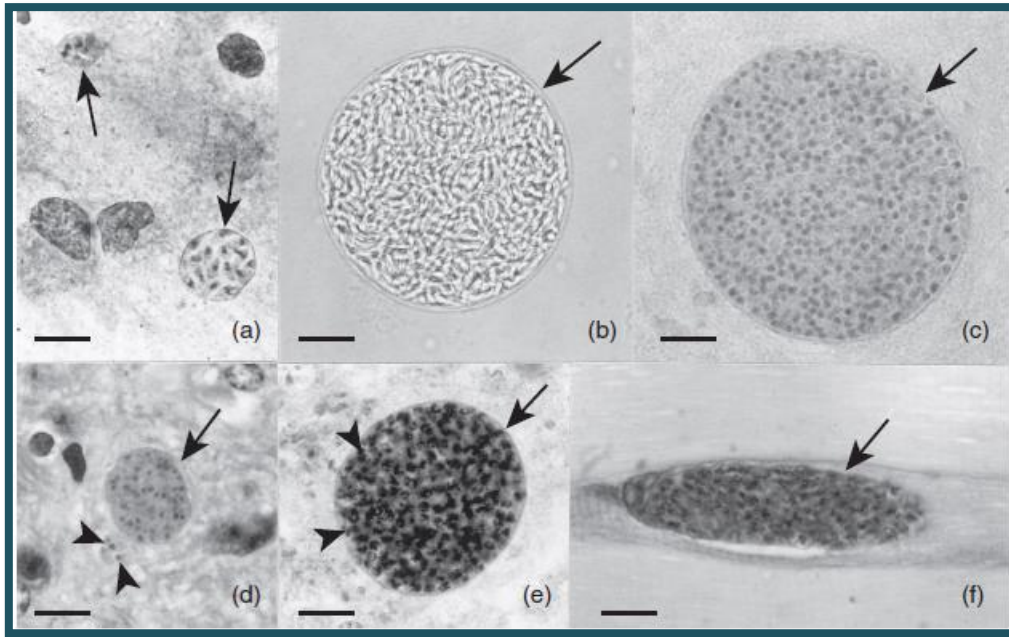


Figura 3. Quistes tisulares de *T. gondii*. (a) Dos quistes tisulares, mostrando las paredes finas del quiste que encierran bradizoítos en un cerebro de ratón. (b) Un quiste tisular aislado del cerebro del ratón por homogeneización en solución salina mostrando la delgada pared del quiste que encierra a muchos bradizoítos. (c) Un quiste de gran tamaño en el cerebro de una rata 14 meses post-infección (p.i.), que también muestra la delgada pared de éste. (d) Un quiste de pequeño tamaño con la pared del quiste intacta y cuatro bradizoítos con núcleos terminales adyacentes a ella en el cerebro de un ratón 8 meses p.i. (e) Un quiste tisular en el cerebro de un ratón, que muestra las paredes del quiste PAS-negativo encerrando muchos bradizoítos PAS-positivos. (f) Un quiste tisular alargado en el músculo esquelético de un ratón. Fuente: Hill y Dubey (2015).

Pueden alojarse en cualquier órgano, pero tienen una alta afinidad por los tejidos musculares (esquelético y cardíaco) y neuronales (cerebro y ojo). Los quistes tisulares pueden permanecer en los tejidos del huésped durante toda su vida (Dubey, 2009a ;Hill, Chirukandoth & Dubey., 2005; Tenter, 2009; Van der Giessen et al., 2007).

Los quistes resisten sin problemas a temperaturas de 45°C y al pH ácido del fluido gástrico durante el proceso de digestión (Gómez & Grau, 2004). Asimismo, pueden soportar temperaturas de congelación durante varios días pero son susceptibles a la irradiación y desecación (Dubey, 2010; Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Tenter, Heckerth & Weiss, 2000).

A pesar de que los bradizoitos contenidos en los quistes tisulares son las formas crónicas de la infección, éstos pueden reactivarse y convertirse en taquizoitos cuando la inmunidad celular del hospedador se deteriora. La interconversión entre las etapas de taquizoito y bradizoito se asocia con cambios morfológicos y moleculares, incluyendo la expresión de los antígenos específicos de cada etapa y alteraciones en el metabolismo. Varios estudios han identificado numerosos antígenos de superficie (SAG), enzimas y familias de proteínas como las proteínas

ribosómicas, proteínas de gránulos densos (GRA), proteínas micronémicas (MIC) y proteínas de shock térmico (HSP) como específicos de cada etapa (Chen et al., 2018; Lyons et al., 2002) (Tabla 1). Uno de los más abundantes y parece ser el más conservado entre los distintos aislados de *T. gondii* es el antígeno de superficie SAG1 (Bulow & Boothroyd, 1991; Sibley & Boothroyd, 1992). Se encuentra sólo en el taquizoito y constituye el 5% del total de proteínas que contiene. Algunos estudios sugieren que puede ser un determinante importante de virulencia (Paredes-Santos et al., 2016, Windeck & Gross, 1996).

Las proteínas MIC también son exclusivas del taquizoito y conducen al movimiento de deslizamiento necesario para la invasión y la adhesión a la célula huésped. Asimismo, en un estudio reciente, se observó que las proteínas GRA no sólo poseían un papel importante en la rápida proliferación intracelular de los taquizoitos, sino que también están implicadas en la formación de los bradizoítos contenidos en quistes tisulares (Chen et al., 2018).

Por otro lado, las proteínas HSP desempeñan un papel importante en la diferenciación de los bradizoítos, la invasión de las células huésped y su crecimiento y virulencia (Angel et al., 2014; Sun et al., 2017).

Tabla 1. Proteínas específicas de taquizoito y bradizoito.

Etapa o estadio	Proteína ¹	Referencias
Taquizoito	ENO2	Dzierszinski (2001)
	PtdIns (t)	Dzierszinski et al. (2000)
	SAG2A	Lekutis et al.(2000)
	SAG2B	Lekutis et al.(2000)
	SAG1	Manger et al (1998)
	LDH1	Yang & Parmley (1997)
	GRA1	Chen et al. (2018)
	GRA2	Chen et al. (2018)
	GRA5	Chen et al. (2018)
	GRA8	Chen et al. (2018)
	MIC1	Lourenço et al. (2006)
	MIC2	Lourenço et al. (2006)
	MIC6	Lourenço et al. (2006)
	MIC10	Lourenço et al. (2006)
MIC11	Lourenço et al. (2006)	

Tabla 1. Proteínas específicas de taquizoito y bradizoito (Continuación)

Bradizoito	BAG1	Bohne et al. (1995)
	PtdIns(b)	Dzierszinski et al. (2000)
ENO1	Dzierszinski (2001)	
p-ATPase	Holpert et al. (2001)	
SAG2C	Lekutis et al.(2000)	
SAG2D	Lekutis et al.(2000)	
BRS4	Manger et al (1998)	
SAG4	Ödberg-Ferragut et al. (1996)	
MAG1	Parmley et al. (1994)	
LDH2	Yang & Parmley (1997)	
GRA1	Chen et al. (2018)	
GRA12	Chen et al. (2018)	
HSP90	Joly et al. (2010)	

¹ Abreviaturas: BAG, antígeno-bradizoito; BRS, proteína recombinante específica de bradizoito; ENO, enolasa; LDH, Lactato-deshidrogenasa; MAG, antígeno de matriz; PtdIns, fosfatidilinositol; SAG, antígeno de superficie; MIC: proteínas de micronemicas y HSP: Proteína de shock térmico.

3.3. Esporozoito

El término esporozoito se emplea para definir el estadio que sucede en el interior de los ooquistes como resultado de su ciclo sexual en las células intestinales del hospedador definitivo. Los ooquistes son eliminados por los gatos en sus heces una vez han sido infectados por *T. gondii* (Dubey, 1996; Dubey & Frenkel, 1972; 1976; Hill & Dubey, 2002). Son de subsféricos a esféricos y poseen un diámetro de 10 x 12 µm. Para que el ooquiste sea infeccioso es necesario que esporule o madure. La esporulación se da una vez se han excretado al medio ambiente y en un tiempo de entre 1 a 5 días, dependiendo de la aireación y la temperatura. Los ooquistes contienen dos esporocistos, cada uno de los cuales contiene cuatro esporozoitos que tienen un tamaño de 2 x 6-8 µm (Figura 4). Los ooquistes son muy resistentes y pueden mantenerse viables hasta 18 meses en condiciones adversas de humedad, aireación y temperatura, es por ello que se consideran un reservorio ambiental (Toro-Montoya, 1995).

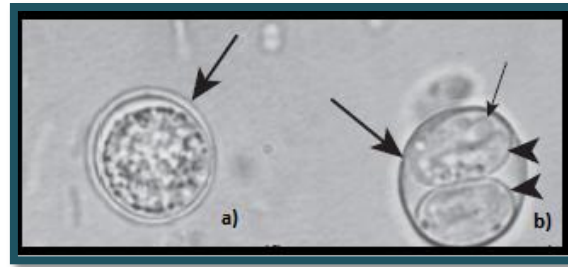


Figura 4. Ooquistes de *T. gondii*. a) ooquiste no esporulado en una flotación de heces de gato, mostrando una pared de ooquistes de doble capa que muestra una masa indefinida. b) Ooquiste esporulado con una pared delgada (→) y dos esporocistos (◀); cada esporocisto tiene cuatro esporozoitos (✦). Fuente: Hill & Dubey (2015).

La capacidad de los microorganismos para sobrevivir en condiciones extremas está estrechamente relacionada con las propiedades físico-químicas de su pared. El ooquiste de *T. gondii* posee una pared de dos capas que protege a los parásitos inactivos pero potencialmente infecciosos de las condiciones ambientales extremas hasta su ingestión por el hospedador (Dumètre et al., 2013). Ninguno de los diversos factores estresantes físico – químicos, incluidos los desinfectantes como los rayos UV, el ozono y productos a base de cloro son eficaces para eliminar al parásito ya que la pared del ooquiste actúa como una barrera primaria de protección (Belli, Smith & Ferguson, 2006; Dumètre & Dardé, 2003).

Sin embargo, Speer et al. (1998) encontraron que la pared del ooquiste posee dos capas, siendo la capa externa más delgada que la interna y posteriores investigaciones mostraron que las capas no están estrechamente unidas entre sí y la capa exterior puede ser fácilmente destruida por agentes químicos como el hipoclorito de sodio (Dumètre et al., 2013; Fritz et al., 2012; Mai et al., 2009). Además, como la pared del ooquiste está compuesta por más del 90% de proteínas ricas en cisteína y tirosina (Possenti et al., 2010), los métodos térmicos como la alta temperatura o los métodos físicos pueden desnaturalizar las proteínas y causar la inactivación o destrucción de *T. gondii*. Temperaturas superiores a los 66°C fueron suficientes para destruir los ooquistes en menos de 10 minutos (Gómez & Grau, 2004). Métodos como la irradiación gamma de baja dosis y la desecación también resultaron eficaces a la hora de destruirlos (Dubey, 1996; Hill et al., 2005)

4. Ciclo vital

Los tres estadios de desarrollo anteriormente descritos (taquizoitos, bradizoitos y esporozoitos) aparecen a lo largo del ciclo vital de *T.gondii* en el que encontramos dos etapas muy diferenciadas: una fase de reproducción sexual y otra asexual (Figura 5).

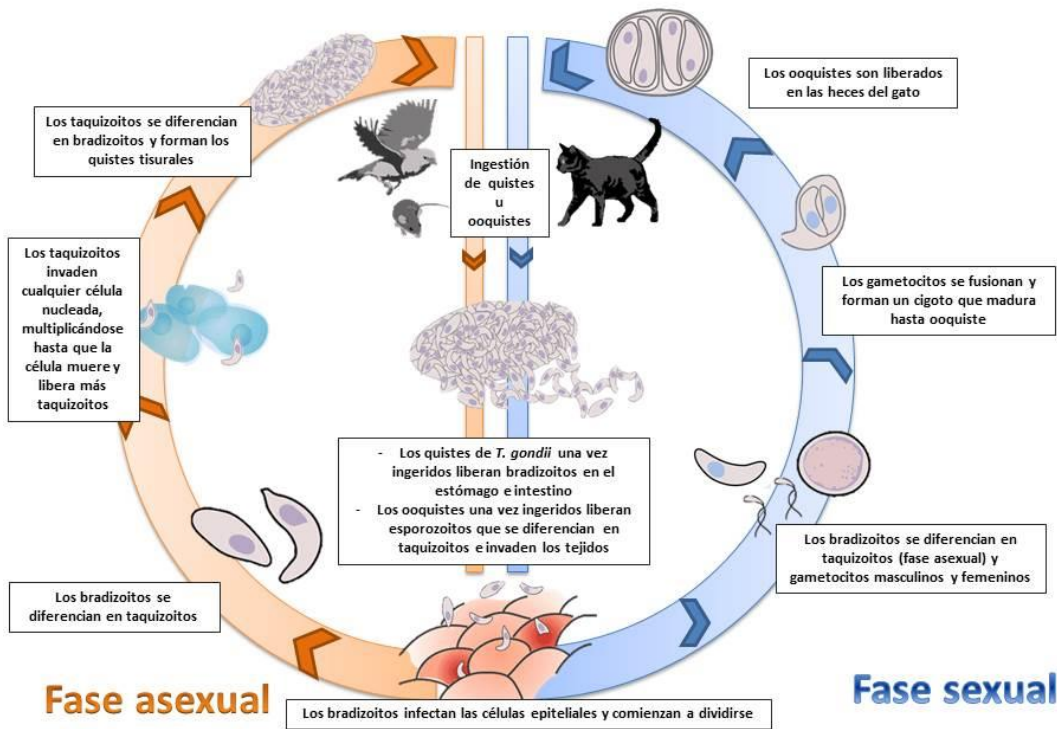


Figura 5. Ciclo vital de *T. gondii*. Fuente: Elaboración propia.

La fase sexual, también conocida como fase enteroepitelial, acaece única y exclusivamente en el intestino de los miembros de la familia Felidae (gatos domésticos y salvajes), que se erigen en el hospedador definitivo de *T. gondii*. Sin embargo, la fase asexual o fase extraintestinal, además de producirse en el hospedador definitivo, tiene lugar en cualquier hospedador intermediario (mamíferos y aves) (Dubey & Beattie, 1988). El ciclo comienza cuando el gato ingiere cualquiera de los tres estados infecciosos del parásito: taquizoitos, bradizoitos u ooquistes (Dubey & Frenkel, 1976; Dubey, Miller & Frenkel, 1970).

Tras la ingestión de ooquistes o quistes tisulares por parte de los huéspedes definitivos, los esporozoitos o bradizoitos son liberados y penetran el epitelio intestinal, donde se produce una fase de multiplicación asexual (esquizoogonias) para después liberar merozoitos. Éstos abandonan la célula hospedadora, destruyéndola, y penetran en nuevas células para iniciar

una nueva esquizogonia o iniciar la formación de los gametos a los 3-15 días de la infección. Los macrogametos (femeninos) y los microgametos (masculinos) se fusionan y forman los cigotos, los que posteriormente se transforman en ooquistes y salen al lumen intestinal y al ambiente con las heces del felino (Webster, 2010). El periodo pre-patente (el tiempo entre la infección inicial y la eliminación de ooquistes) y la frecuencia de ooquistes expulsados varía en función del estadio de *T. gondii* ingerido. El periodo pre-patente suele ser de 3 a 10 días cuando se trata de ingestión de quistes tisulares y de 19 días o más si se ha ingerido taquizoitos u ooquistes (Dubey, 1996; Dubey & Frenkel, 1976). Menos del 50 % de los gatos liberan ooquistes después de ingerir taquizoitos u ooquistes. No obstante, todos expulsan ooquistes una vez han ingerido quistes tisulares (Dubey, 2001; Dubey et al., 1995b). Estos ooquistes se liberan al ambiente en un estado no-esporulado y no-infectante. Para que el ooquiste sea infeccioso ha de sufrir un proceso de esporulación, que suele ocurrir en los cinco primeros días tras su expulsión al exterior, siempre y cuando se den las condiciones ambientales adecuadas (aireación, humedad y temperatura). Los ooquistes esporulados pueden sobrevivir durante varios meses en el suelo o en las plantas y conservar su infectividad tanto para los hospedadores definitivos como para los intermediarios (Savva, 1992). Los gatos desarrollan una respuesta inmune que los protege contra nuevas infecciones y les permite mantener una infección crónica latente durante la cual, en tanto recuperen unas condiciones de inmunidad normal, no excretarán más ooquistes en las heces; y por tanto, no serán fuente de infección, ya que pierden la capacidad de transmitir el parásito (Dubey, 2010).

Independientemente de la vía de transmisión del parásito a los hospedadores intermediarios, el desarrollo asexual de este protozoo consta de dos etapas infectivas: taquizoitos (fase de multiplicación rápida) y bradizoitos (fase de multiplicación lenta). Inicialmente los taquizoitos se diseminan por todo el organismo a través de macrófagos, linfocitos, así como libres en el plasma e invaden cualquier tipo de célula nucleada. Los taquizoitos se multiplican repetidamente por endodiogenia y la invasión y crecimiento en la célula provoca su ruptura y la liberación del parásito. Los taquizoitos liberados buscan nuevas células y se repite el proceso. Una vez que se establece la respuesta inmunitaria del hospedador, los taquizoitos se transforman en bradizoitos incluidos en quistes tisulares donde se continúan multiplicando más lentamente por endodiogenia.

Aunque los quistes tisulares pueden desarrollarse en órganos viscerales, incluidos pulmones, hígado y riñones, son más prevalentes en los tejidos musculares (esquelético y cardiaco) y neuronales (cerebro y ojo), y pueden persistir en los tejidos del huésped durante toda su vida

(Dubey, 2009b; Hill et al., 2005; Hill & Dubey, 2014; Tenter, 2009; Van der Giessen et al., 2007; Webster, 2010).

5. Genética y genómica

5.1. Genotipos y su distribución geográfica

El núcleo de *T. gondii* es haploide, salvo durante la recombinación sexual en el intestino del gato. Posee catorce cromosomas que abarcan un genoma de 65 MB (Khan et al., 2006; Su et al., 2012; Webster, 2010).

Los estudios de genotipado de *T. gondii* comenzaron a principios de la década de 1990 y se basaron en un principio en el análisis de isoenzimas (Dardé, Bouteille & Pestre-Alexandre, 1988; Dardé et al., 1992) y en la amplificación de algunos marcadores de polimorfismos de restricción (PCR-RFLP) (Howe & Sibley, 1995). Más tarde, estos estudios se mejoraron con la adición de nuevos marcadores PCR-RFLP (Su, Zhang, & Dubey, 2006) y con el análisis de microsatélites (Ajzenberg, Dumètre & Dardé, 2003; Ajzenberg et al., 2010). La secuenciación de intrones fue propuesta como la mejor herramienta para estudios filogenéticos (Khan et al., 2007), mientras que los microsatélites lo fueron para el estudio de la estructura genética poblacional y las investigaciones sobre brotes (Demar et al., 2007; Mercier et al., 2010; Wendte et al., 2010).

A pesar de tener un ciclo sexual y una amplia distribución mundial, la estructura poblacional de este parásito fue inicialmente descrita como altamente clonal y con una baja diversidad genética. Esta fue la conclusión de los estudios genéticos realizados a aislados de Europa y Estados Unidos, que agruparon a éstos en tres genotipos principales: tipo I, II y III, equivalentes a linajes clonales, estables en el tiempo y en el espacio (Ajzenberg et al., 2002; Dardé, Bouteille, & Pestre-Alexandre, 1988; Dardé et al., 1992; Sibley & Ajioka, 2008)

Estudios posteriores revelaron una mayor diversidad genética de *T. gondii*, reflejando una posible historia de intercambios genéticos frecuentes y deriva genética (Shwab et al., 2014). Jensen et al. (2015) plantearon la hipótesis de que la reinfección podría ser un mecanismo importante para generar dicha diversidad, ya que dos cepas podrían coexistir en un hospedador definitivo, y la recombinación podría ocurrir durante el ciclo sexual. Es probable que *T. gondii* se disemine utilizando una combinación de estrategias, que varían según la ubicación anatómica, la cepa del parásito y las especies hospedadoras (Harker et al., 2015).

El hallazgo de esta diversidad condujo a la descripción de nuevos haplogrupos, algunos de ellos ampliamente distribuidos por los continentes (Khan et al., 2007; Mercier et al., 2010; Pena et al., 2008). Hasta ahora, han sido descritos 16 haplogrupos (incluyendo los 3 linajes inicialmente descritos) (Galal et al., 2019; Khan et al., 2007; Khan et al., 2011). Todavía quedan, no obstante, aislamientos verdaderamente atípicos con muchos polimorfismos únicos que no pueden agruparse en ninguno de estos descritos (McLeod et al., 2006).

Los análisis recientes de la diversidad genética de *T. gondii* han revelado patrones geográficos de distribución de estos genotipos (Shwab et al., 2014). La mayoría de los aislados de América del Sur, África o Asia no encajan en ninguno de los tres linajes principales (con la excepción del tipo III, que es cosmopolita). Entre los genotipos de *T. gondii*, el tipo I es poco frecuente (Webster, 2010). En Europa, la estructura poblacional de *T. gondii* es principalmente clonal, con prevalencia de cepas pertenecientes al linaje tipo II, entre el 50% en España (Calero-Bernal et al., 2015) y el 100% en Francia (Aubert et al., 2010; Richomme et al., 2009; Su et al., 2012). Los otros dos linajes clonales se han encontrado ocasionalmente (tipo III) o excepcionalmente (tipo I) en Europa. El aislamiento de cepas atípicas que no encajan en estos 3 linajes principales es raro en Europa y sugiere una posible contaminación por cepas no europeas, ya sea durante la residencia en el extranjero o después del consumo de alimentos importados (Ajzenberg et al., 2009; Pomares et al., 2011).

En América del Norte, la estructura poblacional parecía similar a la observada en Europa, con predominio de cepas de tipo II (Howe & Sibley, 1995), pero datos más recientes sugieren una mayor prevalencia de cepas atípicas y del haplogrupo 12 en animales salvajes y domésticos (Dubey et al., 2008). Sin duda, Sudamérica es el área con mayor diversidad para *T. gondii*, 88 genotipos ya han sido identificados a partir de una extensa variedad de animales en Brasil (Pena et al., 2011), mientras que el linaje tipo II suele ser algo insólito en esta zona (Dubey et al., 2006). En América del Sur, hay una proporción significativa de cepas atípicas que no parecen encajar en un patrón de propagación exclusivamente clonal, sino que más bien indicarían una incidencia frecuente de recombinaciones genómicas que generan diversidad (Shwab et al., 2014).

En África, son comunes los haplogrupos 1, 2 y 3 que coexisten con los linajes clonales tipo II y III (Ajzenberg et al., 2009; Mercier et al., 2010; Velmurugan, Dubey & Su, 2008). Los datos correspondientes a Asia son escasos pero en general existe una diversidad genética más limitada que en Sudamérica, aunque algunos genotipos son comunes a ambas áreas (Dubey et al., 2008; Zhou et al., 2009).

Recientemente y confirmando estos hallazgos, se realizó una revisión sistemática de 50 informes publicados desde 1992 hasta junio de 2019 y los datos revelaron que a nivel mundial predominaron los genotipos atípicos (47,7%, n = 316); y las cepas clonales de tipo II fueron el segundo genotipo más común (37%, n = 244). Además, los resultados sugirieron una estructura de población epidémica en América y Asia, y una estructura de población clonal en Europa y África (Amouei et al., 2020).

5.2. Genotipos y virulencia

Los ratones de laboratorio son generalmente sensibles a la infección por *T. gondii* y son el modelo animal por excelencia para determinar la virulencia del parásito. La expresión de esta virulencia en una especie huésped no sólo depende de las características intrínsecas biológicas y genéticas de las diferentes cepas, sino que es un mecanismo algo más complejo, al depender también de las peculiaridades de cada hospedador (Cavaillès et al., 2006), que pueden hacerle resultar más o menos susceptible.

Algunos genotipos de *T. gondii* son letales para todas las cepas de ratones, independientemente de la dosis de parásitos administrados, mientras que otros no lo son ni siquiera con una dosis alta de inoculación y pueden desencadenar una infección crónica en ratones (Ajzenberg et al., 2002; Dardé et al., 1992; Howe & Sibley, 1995; Shwab et al., 2016; Sibley & Boothroyd, 1992). Las cepas de tipo I (alta virulencia) son letales en todas las dosis en todas las cepas de ratones, mientras que las cepas de tipo II (virulencia intermedia) y III (baja virulencia) son mucho menos patógenas (Hill & Su, 2012; Sibley & Boothroyd, 1992). Las cepas de tipo I son más móviles que las menos virulentas y pueden migrar a través de barreras celulares, lo que explica que se diseminen tan rápidamente *in vivo* y ocasionen una alta mortalidad (Barragan & Sibley, 2002). Las cepas de tipo II y III estimulan respuestas proinflamatorias más potentes en sus huéspedes que ayudan a frenar la diseminación de parásitos y la patología inducida por éstos (Sibley & Boothroyd, 1992). Los aislados de cepas atípicas van desde muy virulento al fenotipo intermedio o no virulento, según la combinación de genes que hayan heredado (Dardé, 2008; Grigg & Suzuki, 2003; Saeij et al., 2005). Los genotipos con mayoría de alelos de tipo I son por lo general más virulentos (Mercier et al., 2010).

Las cepas más estudiadas y más representativas de los 3 linajes clonales aisladas de animales o humanos en América del Norte y Europa son: RH, ENT, GT-1 y VEL del genotipo I; Me49, DEG y PIH del genotipo II; y las cepas VEG, CTG y STRL del genotipo III. Además, cepas con otros genotipos diferentes como por ejemplo, CAST, COUG y MAS (Khan et al., 2006).

Varias publicaciones han tratado sobre infecciones experimentales con este parásito para ahondar en su diagnóstico y biología, pero empleando una metodología muy dispar: distintas cepas o estadios de *T. gondii*, diferentes dosis infectivas o diversas vías de administración (Tabla 2). A pesar de que hay estudios en los que se emplean la cepa RH o la cepa S48, se sabe que éstas no son cistogénicas y por tanto no formarán quistes tisulares (Oopstegh, 2016). Los resultados de los estudios en infecciones experimentales suelen ser más satisfactorios que en infecciones naturales. Esto es así debido a que estas condiciones experimentales, en las que se administra una dosis única por lo general elevada, dan lugar a grandes cantidades de quistes tisulares y a altos títulos de anticuerpos contra *T. gondii*, razón por la cual se obtienen buenos resultados en términos de sensibilidad y especificidad (Hill et al., 2006). La posibilidad de regulación del intervalo entre la inoculación y el muestreo es otro de los motivos por los que la sensibilidad aumenta considerablemente (Lind et al., 1997).

Tabla 2. Recopilación de dosis infectivas según la bibliografía consultada. Fuente: Elaboración propia.

Cepa	Estadio	Dosis infectiva	Autor
VEG	Ooquistes	100, 300, 500 o 10000	Al-Adhami et al. (2016)
		10	Dubey (1996)
		100,500,100	Forbes, Parker y Gajadhar (2012)
		40000	Garcia et al. (2006)
			Garcia et al. (2008)
			Tsutsui et al. (2007)
		1000	Hill et al. (2006)
			Aguilar et al. (2001)
		10000	Hill et al. (2018)
500	Jauregui & Higgins (2001)		
50000	Minho et al. (2004)		
Cepa tipo II (No específica)	ooquistes	1000	Genchi et al. (2017)
CZ-Tiger	Ooquistes	5000	Basso et al. (2013)
CZ	Ooquistes	10000	Basso et al. (2017)
RH	Ooquistes	1000-10000	Pardini et al. (2012)
	Taquizoitos	100000	Gomez-Samblas et al. (2016)
			Gomez-Samblas et al. (2020)
		10000000	Suaréz-Aranda et al. (2000)
			Bugni et al. (2008)

Tabla 2. Recopilación de dosis infectivas según la bibliografía consultada. Fuente: Elaboración propia (Continuación)

GT1 ME49 TC2 TS2	Ooquistes	1000	Dubey (1998)
SS1	Ooquistes	10000	Lind et al.(1997)
AS-28	Ooquistes	50000	Minho et al. (2004)
		50000	Yai et al. (2003)
ME49 y NED	Ooquistes	1000-10000	Pardini et al. (2012)
PRU	Bradizoitos	300	Verhelst et al.(2014)
C4	Taquizoitos	10000000	Vitor et al. (1999)
DX y ME49	Ooquistes	100000	Nau et al. (2017)
ME49 RH	Bradizoitos	660	Miranda et al. (2015)
	Taquizoitos	10000000	
P RH	Ooquistes	15000	Moura et al. (2007)
	Taquizoitos	1000000	
SSI-119	Ooquistes	10000	Wingstrand et al. (1997)
	Bradizoitos	12	
M4	Bradizoitos	1000	Garcia et al. (2017)
	Ooquistes	1000	
S48	Taquizoitos	120000	

6. Vías de transmisión

Existen diferentes rutas de transmisión de *T. gondii* al hombre, dependiendo de factores culturales, religión y condiciones ambientales (Demar et al., 2007). De forma general, las vías de transmisión del parásito a sus hospedadores intermediarios son las siguientes (Acha & Szyfres, 2003; Dubey, 2009a)(Figura 6).

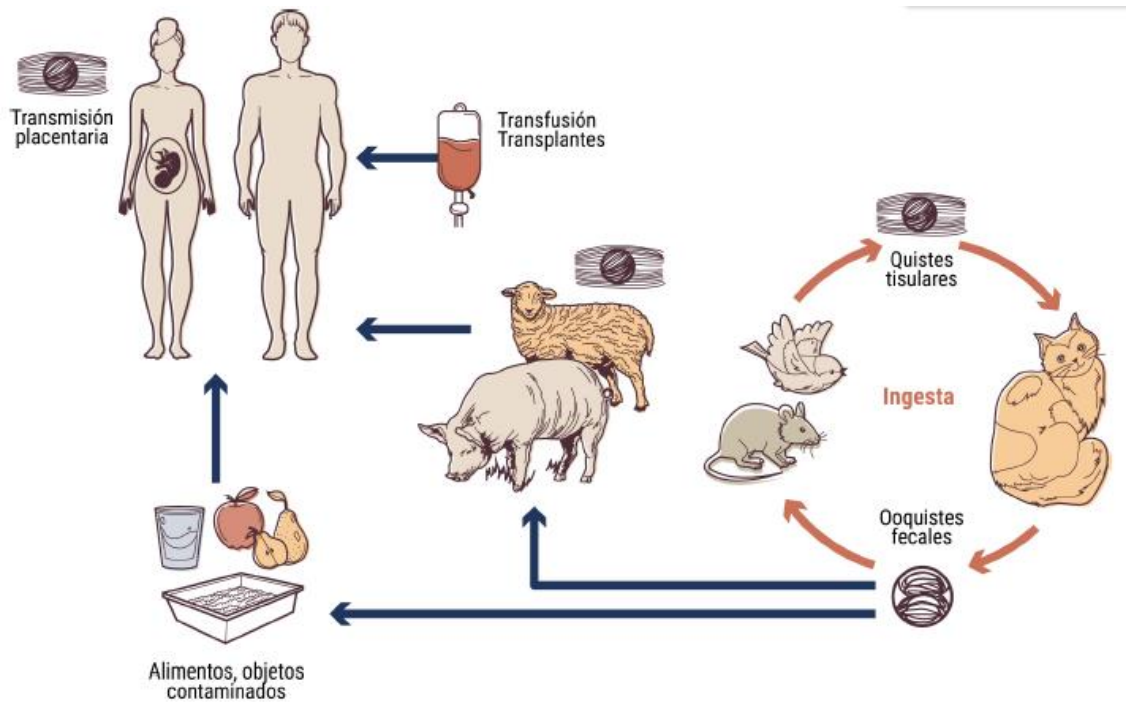


Figura 6. Esquematación del ciclo vital y las vías de transmisión de *T. gondii*. Fuente: Herrero (2019).

- 1. Consumo de carnes infectadas con quistes tisulares:** Se trata de una de las vías más comunes de infección para el ser humano, y va ligada normalmente al consumo de carne cruda, poco cocinada o curada que contiene quistes con bradizoitos (Buffolano et al., 1996; Cook et al., 2000; EFSA, 2007; Foroutan et al., 2019; Jones et al., 2009) y a medidas higiénicas insuficientes a la hora de la manipulación de los alimentos. Esta vía es la principal para explicar las rutas de transmisión entre carnívoros y omnívoros y la adquisición del parásito por parte del gato, debida a la ingestión de presas como roedores o aves infectados (Swierzy et al., 2014).

Los quistes de *T. gondii* en los animales productores de carne para consumo humano se detectan más frecuentemente en cerdos, ovejas y cabras, con menor frecuencia en pollos, conejos y caballos, y raramente en carne de vacuno o de búfalo (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000). De hecho, es el consumo de carne porcina una de las fuentes más importantes de infección en el hombre, representando el 50% o más de casos de toxoplasmosis en humanos (Balea et al., 2012; Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000; Torgerson et al., 2014; Webster, 2010).

- 2. Ingestión de oocistos esporulados:** La ingestión de oocistos es la ruta que quizás pueda explicar mejor la gran difusión mundial que ha alcanzado el parásito y como éste infecta tanto a especies carnívoras como herbívoras. Los oocistos tienen la capacidad de

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

permanecer infectivos en el medio ambiente hasta un año y como los gatos pueden expulsar gran cantidad en sus heces, facilita en gran medida sus posibilidades de propagación. Después de la infección primaria, un solo gato puede expulsar más de 100 millones de ooquistes en el medio ambiente (Dubey, 1996). Dependiendo de la cepa de *T. gondii*, la ingestión de tan sólo 10 ooquistes esporulados puede causar infección en hospedadores intermediarios como los cerdos (Dubey et al., 1996), y la ingestión de 100 o más ooquistes esporulados puede resultar en una infección importante en felinos (Dubey, 1996), lo que contribuye aún más al desarrollo de la contaminación del medio ambiente con ooquistes.

Esta forma de infección se produce en todos los hospedadores intermediarios bien a través del contacto con tierra contaminada con heces de gatos, bien por la ingestión de verduras mal lavadas que contengan ooquistes (Holliman, 1995).

- 3. Congénita (transmisión vertical):** La transmisión vertical se produce por el paso de los taquizoitos de *T. gondii* de la madre gestante al feto a través de la placenta durante la primera fase de parasitemia durante la gestación. El parásito se multiplica en la placenta e invade los tejidos fetales, siendo más graves los efectos a menor edad gestacional, aún cuando la infección puede ocurrir en cualquiera de ellas (EFSA, 2018; McLeod et al., 2000; Remington et al., 2001).

Esta vía puede afectar potencialmente a cualquier especie. No obstante, las infecciones congénitas en perros y gatos no han sido estudiadas en profundidad en la literatura científica, aunque se cree que es menos común que en otras especies (Calero - Bernal & Gennari, 2019).

- 4. La transmisión de *T. gondii* por ingestión de taquizoitos** se considera, en general, un evento poco probable (Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000; Webster, 2010). Numerosos estudios han postulado que éstos no pueden sobrevivir en el fluido gástrico fisiológico (Gómez & Grau, 2004; Pocock et al., 2013). Sin embargo, Dubey (1998) demostró que todavía presentaban infectividad en una solución gástrica artificial cuando ésta era neutralizada. El pH del fluido gástrico se desplaza hacia valores más o menos neutros al ingerir alimentos líquidos y sólidos dependiendo de la composición de éstos (Dressman et al., 1990; Savarino et al., 1988). Por lo que podría haber un entorno donde los taquizoitos todavía pudieran ser infectantes.

Algunos estudios han sugerido que la leche también podría ser una ruta de transmisión de taquizoitos ya que se detectó DNA del parásito en muestras de leche de ovejas y cabras

infectadas naturalmente (Saad et al., 2018; De Santana Rocha et al., 2015) y los resultados del bioensayo de la leche cruda revelaron su potencial infeccioso (Chiari & Neves, 1984; Dehkordi et al., 2013). De hecho, Koethe et al. (2017) estudiaron la supervivencia de taquizoitos en fluido gástrico artificial a distintos pHs (soluciones de pH de 2 a 6) y al añadir diferentes concentraciones de leche (25, 50, 75%) así como en leche pura. Los taquizoitos preservaron su infectividad en las soluciones gástricas de pH 5 y 6 durante al menos 90 minutos, mientras que eran más sensibles a valores de pH más bajos. La mezcla con leche resultó ser clave para un mayor tiempo de supervivencia.

Asimismo, la ingestión de ostras crudas, mejillones u almejas son un potencial factor de riesgo para la infección por el parásito *T. gondii* al obtener su alimento filtrando agua (Dubey, 2010; EFSA, 2018; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000).

5. Otros mecanismos menos frecuentes de transmisión son: **trasplante de órganos, transfusión sanguínea e inoculación accidental en laboratorios** (Carrier et al., 2012; Kamerkar & Davis, 2012; Paquet et al., 2013; Sullivan & Jeffers, 2012).

7. Inmunidad frente a la infección con *T. gondii*

El sistema inmune protege al organismo contra cualquier enfermedad infecciosa por su capacidad de reconocer al agente patógeno e iniciar una serie de respuestas para combatirlo (Abbas et al., 2014). El sistema inmune puede dividirse en dos partes: el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido o adaptativo.

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa de los seres vivos y la reacción que desencadena puede ser reconocida como una respuesta inflamatoria. Casi todos los componentes de la inmunidad innata se encuentran antes del inicio de la infección y forman un grupo de mecanismos de resistencia contra la enfermedad que no son específicos de un patógeno particular. Los principales elementos de la inmunidad innata son: 1) barreras físicas y químicas como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en la superficie epitelial; 2) moléculas del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación y 3) células fagocíticas (neutrófilos, células dendríticas y macrófagos) y otros leucocitos como granulocitos, eosinófilos y células citotóxicas naturales (NK) (Abbas et al., 2014; Welsch, 2009). En definitiva, la respuesta inmune innata favorece diversas funciones importantes en la inducción de respuestas inmunitarias específicas (sistema inmune adaptativo).

La inmunidad adquirida se desarrolla cuando los agentes infecciosos logran evadir el sistema inmune innato. Esta respuesta se inicia una vez que las células presentadoras de antígeno

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

(CPA), (por ejemplo, macrófagos y células dendríticas) procesen y presenten antígenos a los linfocitos T y B para que reconozcan dichos antígenos, se diferencien y se conviertan en células efectoras (Abbas et al., 2014) (Figura 7).

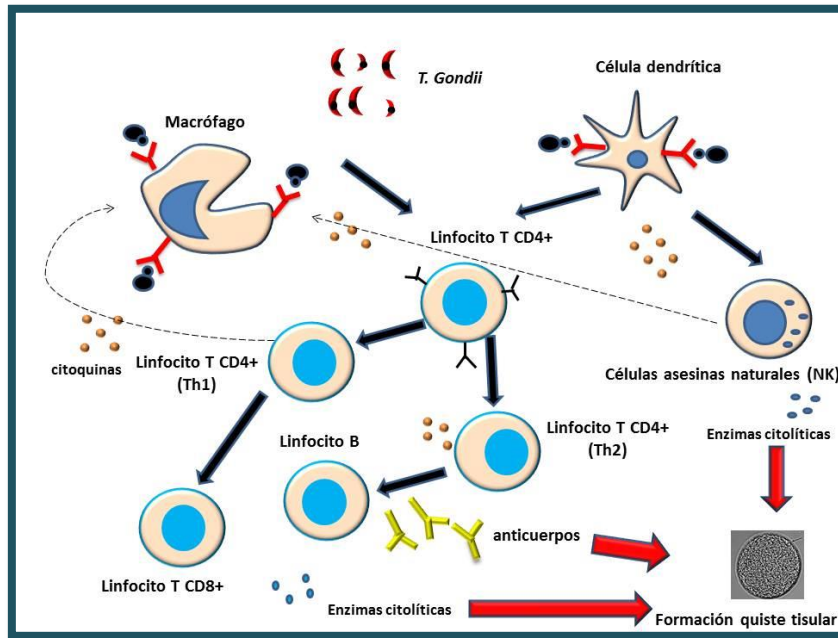


Figura 7. Inmunidad frente a *T. gondii* (Elaboración propia).

Las características de la inmunidad adaptativa son: especificidad, es decir, capacidad para actuar de manera particular frente a cada microorganismo, y su facilidad para memorizar y responder con mayor intensidad a posibles nuevas exposiciones al patógeno.

La respuesta inmune adaptativa frente a *Toxoplasma* se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: una respuesta inmune humoral, en la que los linfocitos B y su producción de anticuerpos juegan un papel preponderante, y una respuesta inmune celular, en la que los linfocitos T son las células esenciales (Owen & Punt, 2009).

7.1. Inmunidad innata

El parásito *T. gondii* posee la capacidad de infectar cualquier célula nucleada, de forma que éstas pueden expresar antígenos parasitarios en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I). Cuando la célula infectada se rompe como consecuencia de la replicación masiva de los parásitos, éstos quedan libres de forma transitoria en la circulación sanguínea y de esta forma quedan expuestos a la acción de las

proteínas del complemento y a la fagocitosis por parte de los macrófagos y las células dendríticas.

En la primera fase de reconocimiento de los antígenos parasitarios, las células dendríticas son las principales CPA gracias a su capacidad fagocítica y a su elevada expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II); asimismo, estas células secretan interleuquina 12 (IL-12) que produce la activación de las células asesinas naturales (NK) que, a su vez, segregan interferón gama (IFN- γ), que provoca la activación de los macrófagos, promoviendo así los mecanismos intracelulares para destruir los parásitos e inhibir su replicación (Giraldo, 2008; Male et al., 2014).

Los macrófagos y las células dendríticas son las CPA por excelencia para activar a los linfocitos T, dada su capacidad fagocítica, su expresión de MHC II y su liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-12, IL-15, TNF- α), indispensables para la activación de los linfocitos T (Kindt et al., 2007).

Verhelst et al. (2011) describieron un aumento de la expresión génica del factor de respuesta al interferón 1 (IRF1) y del interferón-gamma (IFN- γ) en cerdos infectados. Dawson et al. (2004) atribuyeron la elevada expresión del IFN- γ en los cerdos infectados con *T. gondii* a las células mononucleares de la sangre periférica. Se sabe que el IFN- γ es la citoquina TH1 esencial para una defensa eficiente contra *T. gondii* en diferentes especies de huéspedes y tipos de células. Nau et al. (2017) mostraron que los cerdos infectados tienen una fuerte respuesta inmunitaria contra los antígenos recombinantes de GRA (rGRA), que y a su vez una elevada producción de IFN- γ mediando los efectos antiparasitarios.

Junto al IFN- γ , otras citoquinas están involucradas en la respuesta inmune. La infección de los cerdos con los ooquistes de la cepa VEG indujo una respuesta inmune Th-1 poco después de la inoculación, con la producción de IL-15 y TNF- α mRNA (Dawson, 2005). Posteriormente, se detectó un perfil de respuesta Th-2 con IL-10 como citoquina antiinflamatoria después de la fase aguda de la infección, en la que predominó la producción de IFN- γ (Aguilar et al., 2001).

7.2. Inmunidad celular

La inmunidad celular es indispensable para la protección a largo plazo. Ésta es inducida por los taquizoitos en la fase inicial de control de la replicación parasitaria e involucra a los linfocitos T CD4+ con perfil de citoquinas Th1 (Principalmente, IFN- γ) que favorece la proliferación de los linfocitos T CD8+ y refuerza la activación de los macrófagos. Una vez instaurado el perfil Th1 de citoquinas inflamatorias, se inicia la activación de linfocitos T CD4+ con perfil de citoquinas Th2

(IL-4, IL-10) que estimula la respuesta inmune humoral y, además, contribuye a la regulación negativa de los macrófagos, con lo que se garantiza una respuesta inmune efectiva y autolimitada. La respuesta inmune celular inducida por el parásito *T. gondii* se caracteriza por mecanismos citotóxicos de los linfocitos TCD8+ y de las células NK, que garantizan el control de la replicación de los taquizoitos y promueven la formación de quistes tisulares que permanecen latentes durante toda la vida del huésped cuyo control dependerá de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de memoria que se generan durante este proceso (Denkers, 1999; Suzuki et al., 1988). La producción de IL-4 por parte de los linfocitos Th2 está asociada con la progresión de la enfermedad y la reactivación de la enfermedad latente (Hope et al., 2005).

7.3. Inmunidad humoral

El sistema inmune humoral es otra de las barreras que participa como protección contra el parásito en individuos inmunocompetentes. La detección de anticuerpos específicos es una de las estrategias más empleadas actualmente para el diagnóstico de la infección. Principalmente se emplea la IgM para la detección de toxoplasmosis aguda y la IgG para el diagnóstico de la infección crónica. La producción de anticuerpos específicos contra *T. gondii* de todos los isotipos (IgA, IgE, IgM e IgG) es llevada a cabo por los linfocitos B activados. Estos anticuerpos promueven la opsonización, la fagocitosis y la activación del complemento.

Los anticuerpos IgM son los primeros anticuerpos en aparecer, generalmente una semana después de la infección, por lo que son un signo de infección reciente. Sus niveles aumentan hasta alcanzar su máximo en un periodo de 1 a 3 meses. Luego, se produce una disminución progresiva en los 9 meses siguientes hasta su teórica total eliminación. Sin embargo, se ha encontrado que en 9 - 27% de sujetos tuvo una respuesta persistente de anticuerpos IgM hasta dos años o más después de la infección (Bobic, Sibalic & Djurkovic-Djakovic, 1991; Del Bono et al., 1989; Gras et al., 2004). La presencia de IgM en la circulación sanguínea de los neonatos es de origen fetal, y sirve en el diagnóstico de infección congénita, ya que esta inmunoglobulina no atraviesa la barrera placentaria (Jenum & Stray-Pedersen, 1998). En cuanto a la IgA, la cinética es similar a la de los anticuerpos IgM pero el pico de IgA se alcanza más tarde y persiste durante 3 o 4 meses después de la infección (Bessieres et al., 1992).

Finalmente, la IgG aparece después de 2 semanas de infección y alcanza el pico a los 3 meses. Después, permanece en un nivel estable durante 6 meses, para luego reducirse hasta niveles que permanecen constantes durante toda la vida del individuo (Figura 8).

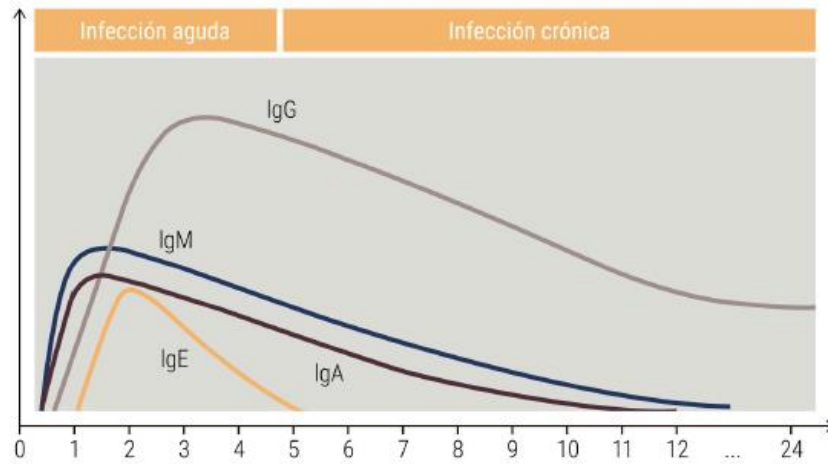


Figura 8. Cinética de anticuerpos frente a *T. gondii*. Fuente: Herrero (2019).

En animales, según la vía de administración y la metodología empleada para su detección, la respuesta de anticuerpos encontrada en las diversas investigaciones es distinta. Jungersen et al. (1999) detectaron anticuerpos IgM a los 8-10 días e IgG a los 10-17 días post-infección (p.i.), cuando los cerdos eran inoculados con taquizoítos de *T. gondii*. Similares resultados obtuvieron Lind et al. (1997) cuando los cerdos eran infectados con *T. gondii* en cualquier estadio (taquizoitos, quistes tisulares u ooquistes esporulados). Una detección más temprana fue llevada a cabo por García et al. (2006), encontrando anticuerpos IgG a los 7 días de la infección con 7000 taquizoitos. Sin embargo, en otro estudio, los anticuerpos IgG fueron detectados a las 3 semanas p.i. después de la inoculación de 1 o 10 ooquistes (Dubey, 1996).

Además de la técnica utilizada y el antígeno empleado para dicha metodología, la respuesta de anticuerpo también depende de la especie huésped (Verhelst et al., 2015). Verhelst et al. (2015) infectaron con 300 quistes/ml de cepas de tipo II y se vio que, mientras la distribución del parásito era similar en todos los tejidos tanto de cerdos como de ovejas, la respuesta de anticuerpos difería considerablemente. En ovejas, hubo respuesta de anticuerpos contra todos los antígenos probados rGRA7, rMIC3 y TLA, mientras que en cerdos sólo se pudieron demostrar anticuerpos específicos contra rGRA7. Las diferencias en las respuestas de los anticuerpos frente a los diferentes antígenos podrían reflejar diferencias en la interacción de los patógenos del huésped.

8. Enfermedad clínica

8.1. Toxoplasmosis humana

8.1.1. Toxoplasmosis en individuos inmunocompetentes

La infección suele cursar de manera asintomática en más del 80% de los casos en individuos inmunocompetentes (Montoya & Liesenfeld, 2004). Sin embargo, los pacientes también pueden experimentar fiebre o linfadenopatía cervical, a veces asociada con mialgia, astenia u otros signos clínicos inespecíficos.

Sin embargo, varias publicaciones actuales han revelado que la infección por *T. gondii* podría estar implicada en diferentes formas de alteración del comportamiento y trastornos neurológicos, lo que sugiere que el contagio con este parásito podría ser más grave de lo que se pensaba (Milne et al., 2020; Webster et al., 2013). Se ha asociado la seropositividad frente a *T. gondii* con síntomas depresivos y de ansiedad (Duffy et al., 2015; Gale et al., 2014; Groër et al., 2011), trastorno obsesivo – compulsivo (TOC) (Miman et al., 2010), mayor índice de suicidios (Zhang et al., 2012), agresión e impulsividad (Cook et al., 2015), e incluso más recientemente con cáncer (Liu et al., 2019).

Asimismo, se ha observado vinculación entre la seropositividad frente a *T. gondii* y el deterioro de la función cognitiva en personas mayores, aunque una investigación reciente no ha encontrado una asociación clara (Wyman et al., 2017).

8.1.2. Toxoplasmosis en individuos inmunodeprimidos

La toxoplasmosis es una de las principales infecciones oportunistas que afectan a los pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y puede manifestarse como una amenaza potencial para la vida, resultando de gran relevancia el estado del sistema inmune del huésped (Abgrall et al., 2001; Israelski et al., 1993). Así pues, la infección por VIH y las terapias inmunosupresoras comprometen la inmunidad celular y pueden conducir a una toxoplasmosis severa.

En pacientes infectados por este virus, la encefalitis toxoplásmica (ET) es la manifestación más predominante de la enfermedad y puede conducir a diversos síntomas, que van desde dolor de cabeza, letargo, hemiparesia, descoordinación o ataxia, pérdida de memoria, demencia o convulsiones motoras generalmente asociadas con fiebre (Luft & Remington, 1992; Vidal, 2019). No obstante, gracias al descubrimiento de la terapia antirretroviral (TARV) a mediados de la década de 1990, el número de pacientes con SIDA que sufren de encefalitis toxoplásmica

ha disminuido drásticamente (Palella et al., 1998; Pozio, 2004; Pozio & Morales, 2005; Vidal, 2019).

En pacientes trasplantados, la toxoplasmosis severa puede ser el resultado de una reactivación de la infección latente en el receptor o el transplante de un órgano infectado del donante al receptor (Botterel et al., 2002; Martina et al., 2011; Rogers et al., 2008), una situación en la que los trasplantes de corazón conllevan el mayor riesgo (Gallino et al., 1996; Mejia et al., 2011). En dichos pacientes la manifestación clínica más preponderante es la toxoplasmosis pulmonar (Botterel et al., 2002).

8.1.3. Toxoplasmosis congénita

La toxoplasmosis congénita suele ser el resultado de una primoinfección que adquiere la madre seronegativa durante la gestación. La tasa de la infección y la gravedad del daño fetal dependen de la etapa del embarazo. La placenta juega un papel primordial en el proceso, pues supone por un lado una barrera natural que protege al feto y, por otro, un tejido diana para la multiplicación del parásito (Abbasi et al., 2003). De hecho, la barrera placentaria es más eficiente en el comienzo de la gestación y se vuelve más permeable al paso de parásitos a medida que avanza el embarazo. Así pues, la tasa de infección con *T. gondii* es menor cuando la infección materna se presenta en el primer trimestre (inferior al 10%), que cuando sucede en el segundo (30%) o en el tercer trimestre (60-70%) (Dunn et al., 1999).

En cuanto a la gravedad de la infección, ocurre al contrario, ésta es mayor en las primeras etapas del embarazo. Los neonatos son asintomáticos en más del 80% de los casos cuando se infectan durante el tercer trimestre de gestación (Desmonts & Couvreur, 1974), y sin embargo, cuando la transmisión transplacentaria se produce durante el primer trimestre, las consecuencias para el desarrollo fetal son fatales, a menudo provocando anomalías severas o aborto. Los signos clínicos se pueden manifestar en dos momentos: al nacimiento, con hidrocefalia o microcefalia (Nowakowska et al., 2006), calcificaciones cerebrales, coriorretinitis, linfadenitis, neumonitis, erupción petequial, hepato-esplenomegalia e ictericia; al postnacimiento (meses o años después) con coriorretinitis, estrabismo, nistagmus, convulsiones, retraso psico-motor y sordera.

Tenter, Heckerth & Weiss (2000) afirmó que la infección previa al embarazo provoca inmunidad en los embarazos siempre que no existan situaciones de inmunosupresión en los que se reactiva la enfermedad (Tenter, Heckerth & Weiss, 2000). No obstante, otros estudios han confirmado la reinfección natural en mujeres embarazadas con IgG frente a *T. gondii*

elevadas y estables, con la subsiguiente transmisión congénita y aborto, toxoplasmosis ocular (Silveira et al., 2003; Valdés et al., 2011) y la enfermedad diseminada (Costa et al., 2018). Por lo tanto, las mujeres embarazadas con serología positiva frente a *T. gondii* a las que regularmente se les excluye de estos exámenes prenatales, puede que no estén protegidas frente a la infección.

Otra de las enfermedades que puede adquirirse de forma congénita o postnatal es la toxoplasmosis ocular, que se manifiesta como una retinocoroiditis, como resultado de una infección aguda o de una reactivación. La gran mayoría de las personas con infección crónica son asintomáticas, aunque en algunos casos se producen lesiones oculares y éstas con relativa frecuencia provocan necrosis y destruyen la retina, y algunas veces afectan a las coroides (Dubey et al., 2012; Maenz et al., 2014) (Figura 9).

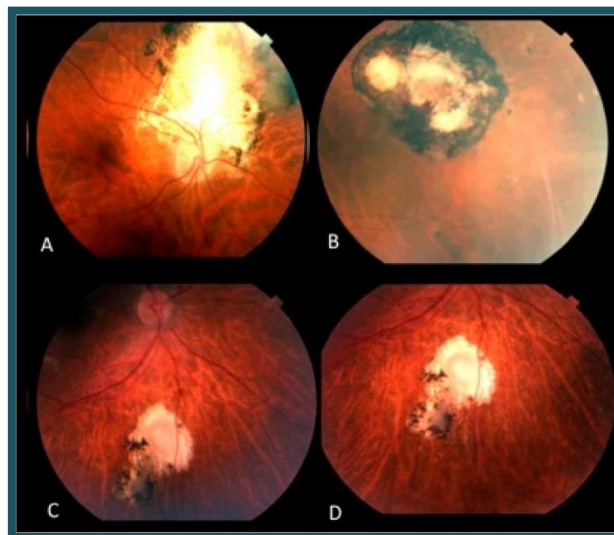


Figura 9. Retinocoroiditis de un paciente con toxoplasmosis ocular. Fuente: De Mattos et al. (2018).

8.2. Toxoplasmosis en animales

Los felinos, y concretamente el gato, tienen una gran relevancia en la epidemiología de la infección por *T. gondii* ya que son los únicos hospedadores definitivos. Numerosos estudios han demostrado que la seroprevalencia y/o prevalencia del parásito en gatos oscila entre el 6 y el 88% en todo el mundo (Dubey, 2010).

La enfermedad suele cursar de manera subclínica pero puede ser clínicamente importante para casi todos los animales homeotérmicos. El curso de la toxoplasmosis implica signos generales, como fiebre, anorexia o disnea y signos más específicos como afectación neurológica, respiratoria, cutánea u ocular (Calero & Gennari, 2019). La susceptibilidad a la infección por *T. gondii* de los huéspedes intermediarios varía según la especie, observándose

una elevada prevalencia en animales productores de carne (Tenter, 2009). Concretamente, el parásito aparece con mayor frecuencia en tejidos de cerdos, ovejas y cabras, y en menor proporción en aves de corral, conejos y caballos (Dubey, 2009b; Stelzer et al., 2019; Tenter, Heckerroth & Weiss, 2000). Dado que los animales de granja representan una fuente de infección para los seres humanos y un reservorio de *T. gondii* en la fauna silvestre, se ha propuesto reducir las infecciones por *T. gondii* en el ganado en la medida de lo posible, especialmente en los cerdos (EFSA, 2011).

Los estudios seroepidemiológicos han proporcionado evidencias de una amplia distribución mundial de *T. gondii* sobre todo en cerdos, con prevalencias que varían según la edad, la raza, la geografía y el sistema de producción. En general, se observa una baja prevalencia de infecciones por *T. gondii* (<1%) en cerdos criados en confinamiento con condiciones de producción controladas, lo que impide el acceso de roedores y gatos, mientras que se pueden encontrar valores de prevalencia más altos (>60%) en explotaciones de cerdos en libertad, explotaciones sin condiciones controladas que permitan el acceso al aire libre (De Berardinis et al., 2017). Generalmente, las infecciones porcinas son subclínicas o presentan signos no patognomónicos, como disnea, astenia, anorexia, hipertermia, taquipnea, tos, cianosis y diarrea (Dubey, 2009b). Se cree que la enfermedad clínica grave, sólo se produce durante la fase aguda de la infección como resultado de procesos necróticos e inflamatorios durante la multiplicación de los taquizoitos en varios tejidos (Dubey, 2009a). Se piensa que hay diversos factores que influyen en la presentación clínica de la infección por *T.gondii* en los cerdos, como el estado inmunológico del huésped, la edad, la coinfección con otros agentes, el estadio parasitario de *T. gondii* (ooquiste, taquizoito o quiste tisular conteniendo bradizoitos), la dosis infectiva o la cepa (Stelzer et al., 2019). En algunas ocasiones, las infecciones virales como el Circovirus porcino tipo 2 (Klein et al., 2010) y el Parvovirus porcino (Basso et al., 2015) también se asociaron a manifestaciones clínicas en los cerdos.

La toxoplasmosis clínica grave en el cerdo es inusual, no obstante puede causar partos prematuros y neumonía, e incluso se ha dado algún caso de miocarditis y encefalitis. Informes previos al 2009 registraron algunos casos en Asia pero también alguno en Europa y América (Dubey & Beattie, 1988), generalmente en cerdos recién nacidos (Haritani et al., 1988; Kumagai et al., 1988; Thiptara et al., 2006) o cerdos destetados (Liao et al., 2006; Okamoto et al., 1989; Weissenböck & Dubey, 1993). Desde entonces, se publicaron más casos confirmados de toxoplasmosis clínica que afectaban a lechones en Brasil (Olinda et al., 2016) y cerdos de engorde en China y Alemania (Klein et al., 2010). De igual forma, la toxoplasmosis congénita es muy poco común en porcino (Webster, 2010), y depende tanto de la cepa del parásito como

de la vía de infección, raza y etapa de gestación de la cerda (Dubey & Beattie, 1988). Sin embargo, en los últimos años, un estudio de Handke et al. (2012) mostró que, aunque la etiología de más del 50% de los casos de la insuficiencia reproductiva en cerdos en Suiza seguía sin estar clara, existían pruebas de que *T. gondii* podría estar involucrado en parte de las pérdidas reproductivas no diagnosticadas. Estudios posteriores mostraron la transmisión de *T. gondii* y/o infección placentaria en el 3,5% de 113 cerdas que abortaron o dieron a luz un alto número de muertos o lechones débiles (Basso et al., 2015). Curiosamente, la mayoría de casos de toxoplasmosis clínica se han registrado en Asia (China, Korea, Japón, Taiwan y Tailandia) aunque hay informes en todos los países del mundo. Se desconoce si los genotipos específicos de *T. gondii* que circulan en Asia pueden ser más propensos a causar infecciones clínicas en los cerdos (Basso et al., 2017).

El ganado ovino y caprino es muy sensible a las infecciones por *T. gondii* y este parásito se considera una de las causas de pérdidas reproductivas en pequeños rumiantes en todo el mundo. Concretamente, se ha estimado que la toxoplasmosis es responsable del 10 al 23% de los abortos ovinos en Europa o Estados Unidos (Dubey, 2009b).

En aves de corral en libertad, la infección por *T. gondii* es un indicador de la contaminación ambiental con ooquistes del parásito (Dubey, 2010). En general, los pollos, pavos, patos y gansos rara vez desarrollan signos clínicos después de la infección por *T.gondii* (Dubey, 2010). A nivel mundial, hay más informes sobre toxoplasmosis en pollos que en patos y gansos infectados naturalmente (Dubey, 2010). Asimismo, hay que tener en cuenta que algunos de los casos clínicos reportados en los que el agente causal es *T. gondii* podrían haber sido desencadenados por otras infecciones (por ejemplo, virales) o complicados por otras enfermedades. No obstante, la prevalencia de las infecciones por *T. gondii* de entre otras factores del tipo de cría, siendo notablemente mayor en la cría al aire libre o de pequeñas explotaciones que en aves criadas en granjas de producción (Guo et al., 2015).

Del mismo modo, pocos son los estudios acerca de la infección del parásito en el ganado bovino, por lo que se sugiere que este ganado es resistente a la infección y a la toxoplasmosis clínica. Aunque se detectaron algunos signos clínicos y alteraciones histológicas después de la infección experimental, en los casos de infección natural sólo se registraron abortos pero no estuvo claro si la infección con *T.gondii* había provocado dichos abortos (Canada et al., 2002). No obstante, hay tendencia a consumir carne de esta especie poco cocinada lo que conlleva un riesgo de infección de *T. gondii* (García - Bocanegra et al., 2013).

9. Epidemiología

Desde el punto de vista de la salud pública, la toxoplasmosis ha adquirido una gran importancia y ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una zoonosis grave. Es la enfermedad zoonótica parasitaria con mayor incidencia en los seres humanos. Se asume que aproximadamente entre el 25 y el 30% de la población está infectada con *T. gondii* (Montoya & Liesenfeld, 2004). A pesar de ello, en la Unión Europea (UE) está considerada una enfermedad subestimada tanto en su detección como en su comunicación (EFSA, 2007), y en otros países, como Estados Unidos (EE.UU.), la clasifican dentro del grupo de enfermedades parasitarias desatendidas. De acuerdo con la Directiva 2003/99/CE (UE 2003) la vigilancia de la toxoplasmosis y sus agentes etiológicos se realizará si la situación epidemiológica del Estado miembro lo justifica, razón por la cual no existen datos representativos sobre la distribución real de este parásito en la UE, ni en humanos ni en animales o alimentos (EFSA, 2017).

Datos epidemiológicos indican que la exposición a oocistos e ingerir alimentos poco cocinados, son los principales factores de riesgo para la infección humana (Bahia-Oliveira et al., 2003; Jones et al., 2001; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000). La toxoplasmosis ha sido identificada como la segunda causa más importante de muerte relacionada con el consumo de alimentos y la cuarta en relación a las hospitalizaciones por toxoinfecciones alimentarias en EE.UU. (Scallan et al., 2011). La EFSA (2018) señala que el 40-60 % de las infecciones por *T. gondii* son transmitidas por la ingestión de alimentos. En este sentido, las encuestas seroepidemiológicas realizadas señalan el consumo de carne de origen porcino contaminada con quistes de *T. gondii* como la fuente de contagio más importante en la población humana.

En la UE, en el año 2009, se informaron 1259 casos de toxoplasmosis, la mayoría de ellos en mujeres en edad fértil. Desde el año 2010, EFSA y ECDC sólo incluyen los casos de toxoplasmosis congénita en su informe anual de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes alimentarios, de acuerdo con la definición de caso establecido en la Decisión 2008/426/CE (UE, 2008), informándose por tanto únicamente los casos de niños menores de 1 año (EFSA/ECDC, 2012). En el año 2011, se confirmaron 29 casos de toxoplasmosis congénita en 19 Estados miembros, aunque se sospecha que es un dato menor al real porque algunos países no habían proporcionado aún sus datos al cierre del Informe Epidemiológico Anual 2013.

En 2016, se notificaron 47 casos de toxoplasmosis congénita en la UE (Tabla 3). En Estados Unidos (EE.UU.) la tasa de notificación fue de 1.57 casos por cada 100.000 nacidos vivos (EFSA, 2017).

Tabla 3. Casos de toxoplasmosis congénita en humanos y tasas de notificación por 100000 recién nacidos vivos en la UE/EEA, por país y año, 2012-2016. Fuente: Modificado de EFSA (2017).

País	Alcance Nacional	Casos confirmados y ratios (año 2016)		Casos confirmados y ratios (año 2015)		Casos confirmados y ratios (año 2014)		Casos confirmados y ratios (año 2013)		Casos confirmados y ratios (año 2012)	
		Casos	Ratio	Casos	Ratio	Casos	Ratio	Casos	Ratio	Casos	Ratio
Austria	- ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bélgica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bulgaria	YES	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Croacia	YES	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Chipre	YES	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
República Checa	YES	0	0.00	1	0.90	1	0.90	0	0.00	1	0.90
Dinamarca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estonia	YES	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Finlandia	YES	1	1.80	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Francia ²	YES	-	-	246	30.76	216	26.40	179	22.00	104	12.70
Alemania	YES	10	1.36	15	2.03	6	0.80	10	1.50	20	3.00
Grecia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hungría	YES	0	0.00	1	1.10	3	3.20	0	0.00	0	0.00
Irlanda	YES	0	0.00	1	1.50	0	0.00	1	1.50	1	1.40
Italia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Letonia	YES	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	5.03
Lituania	YES	0	0.00	1	3.30	0	0.00	1	3.30	1	3.30
Luxemburgo	YES	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	16.50
Malta	YES	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Países Bajos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polonia	YES	20	5.42	15	4.00	20	5.30	18	4.90	10	2.60
Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rumanía	YES	0	0.00	0	0.00	1	0.50	0	0.00	0	0.00
Eslovaquia	YES	2	3.60	0	0.00	0	0.00	2	3.60	0	0.00
Eslovenia	YES	1	4.84	1	4.80	0	0.00	0	0.00	0	0.00
España ³	NO	5	-	0	-	0	-	0	-	0	-
Suecia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reino unido	YES	8	1.03	7	0.90	11	1.40	2	0.30	5	0.60
EU TOTAL	-	47	4.7	1.57	8.27	258	7.40	213	6.20	144	4.20
Islandia	YES	0	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0	0.00	-	-
Noruega	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escocia ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ (-): No notificado

² En 2016 no hay datos comunicados en Francia ya que hay un retraso de 2 años en notificar casos de toxoplasmosis congénita en Francia.

³ No hay un programa de vigilancia y por lo tanto, no hay una media estimada. Así que un ratio de notificación no puede ser estimado.

⁴ Escocia proporciona datos directamente a la EFSA.

El número de casos ascendió en la UE en 2017, notificándose 194 casos confirmados de toxoplasmosis congénita, con el 78,9% de los casos confirmados en Francia. No hay más datos posteriores a esta fecha puesto que de nuevo hay un retraso de 2 años en la presentación de los datos (EFSA, 2018).

Recientemente, Guo et al. (2017) desarrollaron un modelo de evaluación de riesgos microbiológicos (*quantitative microbial risk assessment*, QMRA) de la granja a la mesa, para predecir el riesgo para la salud pública asociado con el consumo de carne de cerdo fresca en los EE.UU. y se estimó que se producirían aproximadamente 94.600 nuevas infecciones anualmente en EE.UU. debido a la ingestión de estos productos. Se estima que

aproximadamente 957 nuevas infecciones por año ocurren en mujeres embarazadas que corresponden a 277 casos de toxoplasmosis congénita por año. Un estudio similar fue llevado a cabo por Condoleo et al. (2018) en Italia. El modelo mostró que casi todas estas infecciones están asociadas con el consumo de preparaciones de carne fresca (el riesgo promedio de infección varió entre 4.5×10^{-5} y 5.5×10^{-5}) y solo un pequeño porcentaje se debe a salchichas fermentadas o salami. Por el contrario, productos cárnicos curados con sal parecen representar un riesgo menor, pero se necesitan más investigaciones para aclarar aspectos aún poco claros. En este estudio el promedio global estimado de nuevas infecciones por año en EE.UU es de 12.513 para adultos y de 92 para las mujeres embarazadas.

Los sistemas de vigilancia epidemiológica en relación a esta enfermedad son muy diversos, lo que dificulta la estimación de su carga real y la comparación entre países. Así pues, no es posible hacer una buena estimación de la prevalencia de la toxoplasmosis congénita en humanos en la UE, ya que solo tres Estados miembros tienen un sistema de vigilancia activo para esta enfermedad. Esta ausencia o escasez de monitorización no sólo ocurre en humanos sino también en animales. Alemania, Austria, Finlandia, Grecia, Hungría, Italia, Letonia, Países Bajos, Rumanía, Eslovaquia, España, Reino Unido, Noruega y Suiza proporcionaron datos de vigilancia de *Toxoplasma gondii* en pequeños rumiantes, ganado vacuno, caballos, cerdos y animales de compañía. En pequeños rumiantes (ovejas y cabras) se hicieron pruebas serológicas a 6756 animales y se encontraron 1237 positivos (18,3%). En cuanto a ganado vacuno, sólo seis de los estados miembro (Austria, Eslovaquia, España, Italia, Letonia y Reino Unido) proporcionaron datos de anticuerpos específicos frente a *Toxoplasma gondii*, encontrando una seroprevalencia del 27,8%. En cerdo, Austria, Alemania, Italia y Reino Unido aportaron datos de monitoreo. Se hicieron pruebas a 263 animales y 58 (22%) fueron detectados como positivos. En animales de compañía (gatos y perros), Alemania, Austria, Finlandia, Hungría, Italia, Letonia, Países Bajos, Polonia, Rumanía y Suiza examinaron un total de 3051 animales (1626 gatos y 1425 perros) de los cuales 335 fueron seropositivos (11%). Los datos de vigilancia de animales comunicados en 2018 muestran que *Toxoplasma* está presente en la mayoría de animales de la UE. Sin embargo, las limitaciones de estos datos impiden cualquier observación o análisis de tendencias. El actual sistema de vigilancia de *Toxoplasma* en la UE está fuertemente afectado por varios factores: 1) pequeña cantidad de animales muestreados, 2) uso de diferentes métodos de detección que, en la mayoría de los casos, no han sido validados por un órgano independiente, 3) se desconoce la edad de los animales muestreados, 4) no hay información sobre el sistema de cría. Asimismo, varios estudios han señalado que no existe relación entre la presencia de anticuerpos frente a *T. gondii* y la

cantidad de parásitos infectantes en el ganado vacuno y en caballos (Aroussi et al., 2015; Opsteegh et al., 2016). Sin embargo, en los cerdos, las aves de corral y los pequeños rumiantes, las pruebas serológicas pueden ser útiles para la detección de *T. gondii* de animales o rebaños de alto riesgo pero no como un indicador de infección en animales individuales. Todas estas limitaciones dan como resultado la falta de rigor científico de los datos que proporcionados y que estos datos no sean directamente comparables entre países (EFSA, 2018).

10. Importancia de la industria cárnica porcina española

El sector cárnico es con diferencia uno de los sectores más importantes en la agricultura de la UE, donde se destaca el ganado porcino en cuanto a especie doméstica con mayor presencia en la alimentación humana. En 2019, y con un crecimiento del 5,2 % respecto al 2018, la carne de porcino española registró un nuevo hito, al alcanzar los 4,63 millones de toneladas, lo que marca un año más un nivel histórico nunca alcanzado.

La producción porcina es la primera actividad cárnica española y representa el 84,8 % de las carnes producidas en nuestra país en 2019 (y el 64% de todas las carnes, si incluimos avicultura y cunicultura) (Figura 10). La tabla 4 muestra las toneladas de carne producidas por tipo de carne en España del 2011 al 2019.

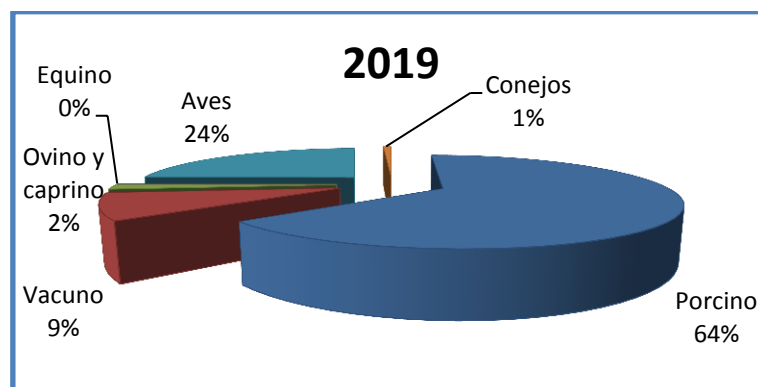


Figura 10. Producción cárnica española en el 2019 (Elaboración propia de datos procedentes de ANICE (2019)).

Tabla 4. Volumen de Producción cárnica española (Toneladas (tm)). Fuente: Tabla de elaboración propia de datos a partir de datos de ANICE (2019)).

Especies	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Porcino	3.469.348	3.466.323	3.431.219	3.620.222	3.854.658	4.181.091	4.298.789	4.530.474	4.627.179
Vacuno	604.112	596.853	580.840	577.264	626.104	637.013	643.861	666.632	659.939
Ovino y caprino	142.000	133.100	128.100	121.100	125.000	126.900	125.700	129.900	126.806
Equino	11.265	15.606	11.668	11.529	12.940	13.088	11.034	10.194	9.823
Aves	1.373.604	1.384.243	1.342.578	1.436.689	1.446.990	1.526.631	1.528.846	1.636.819	1.736.120
Conejos	64.139	64.578	63.289	63.790	63.461	59.589	57.258	55.824	52.662
Total	5.664.468	5.660.703	5.557.694	5.830.594	6.129.153	6.544.312	6.665.488	7.029.843	7.212.529

La producción porcina española representa el 4,1 % de la producción mundial. Así pues, España se consolida ya en estos últimos años como el cuarto mayor productor de carne de porcino por detrás de China (que por sí sola produce el 47,8% de la carne de cerdo de todo el mundo), EE.UU (10,6% de la producción mundial) y Alemania (4,7%), y por delante de Brasil (3,3%), Rusia (2,8%), Vietnam (2,5%), Francia (1,9%) y Polonia (1,8%). A la vez España es el segundo país europeo en producción, representando el 19% del total de la UE, por delante de Francia (9,2%), Polonia (8,7%), Dinamarca (6,6%), Países Bajos (6,4%) e Italia (6,2%).

En cuanto a la producción de elaborados cárnicos, España, con más de 1,4 millones de toneladas anuales, se sitúa en cuarto lugar en la UE, por detrás de Alemania, Italia y Francia. Por productos, destacan en volumen los fiambres cocidos y en valor los jamones y paletas curados (blancos e ibéricos) (Tabla 5). Las preferencias del consumidor español están encabezadas por los jamones curados, serranos e ibéricos, que son los productos estrella de la producción cárnica de nuestro país. Los jamones serranos procedentes de cerdos de raza blanca e ibérica superan el 30% del valor de los productos comercializados.

**Tabla 5. Volumen de producción de los diferentes elaborados cárnicos en España ((Toneladas (tm)).
Fuente: Tabla de elaboración propia a partir de datos de ANICE (2019)).**

Elaborados cárnicos	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018 ¹
Jamón y paleta curados	255.000	247.500	254.000	260.500	273.550	287.000	299.000	306.000
Embutidos curados	185.000	183.000	186.000	191.000	199.000	203.000	209.000	214.000
Jamón y paleta cocidos	175.600	176.000	177.500	178.500	177.600	179.000	178.200	175.000
Otros tratados por el calor	408.700	421.000	417.000	413.000	418.000	423.000	429.800	430.000
Productos adobados y frescos	185.000	187.200	189.000	191.500	188.200	193.000	197.000	200.000
Platos preparados	83.000	86.300	87.500	89.200	91.000	95.000	100.000	104.000
Total elaborados	1.292.300	1.301.000	1.311.000	1.323.700	1.347.350	1.380.000	1.413.000	1.429.000

¹ No hay datos de 2019.

Según los datos de la Unión Europea, a partir del 2016 el censo total porcino de España superó por primera vez al de Alemania, convirtiendo a nuestro país en el primero de Europa en número de animales en producción. España ya ocupaba la primera posición en el censo de reproductoras desde hace años, pero en el censo total (contabilizando todos los tipos de animales) nuestro país ha alcanzado ya la primera posición, aún cuando Alemania sigue siendo el primero en la producción europea de carne de cerdo.

Sobre un censo total de la UE de 148,42 millones de animales en diciembre de 2018, España tiene una cuota del 20,8%, por delante de Alemania (17,8%) y seguidos de Francia (9,2%), Dinamarca (8,2%), Países Bajos (8,0%) y Polonia (7,4%).

La industria cárnica española ha sufrido una espectacular transformación, de no realizar apenas ventas exteriores a convertirse en el primer sector exportador de la industria agroalimentaria española a nivel mundial en poco menos de un cuarto de siglo.

El año 2019 marcó un nuevo récord en ese espectacular desarrollo exportándose un total de 2,71 millones de toneladas de carnes y productos elaborados de todo tipo por valor de 7.555 millones de euros a mercados de todo el mundo, con una balanza comercial cada vez más

positiva, en este caso del 657%, creciendo nada menos que un 26% en facturación exterior y un 15,1% en volumen, lo que indica que se exportó producto de más valor añadido y/o a mejores precios. Las tablas 6 y 7 presentan el volumen de exportaciones españolas de los distintos tipos de carne y de los distintos elaborados cárnicos, respectivamente.

Tabla 6. Volumen de exportaciones españolas de los distintos tipos de carne (Toneladas (tm)). Fuente: Tabla de elaboración propia a partir de datos de ANICE (2019)).

Tipo de carne	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Porcino	979.958	1.030.121	984.722	1.055.610	1.246.171	1.471.417	1.516.238	1.523.885	1.723.129
Vacuno	125.159	133.898	127.364	130.027	163.129	169.068	172.310	162.817	191.295
Ovino	28.854	32.279	34.594	33.926	32.094	35.230	37.538	41.880	45.017
Despojos	261.287	276.120	240.228	297.832	327.161	395.149	367.311	422.920	542.731
Total	1.395.258	1.472.418	1.386.908	1.517.395	1.768.555	2.070.864	2.093.397	2.151.502	2.502.172

Tabla 7. Volumen de exportaciones españolas de los distintos elaborados cárnicos. Fuente: Tabla de elaboración propia a partir de datos de ANICE (2019).

Elaborado cárnico	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Jamón curado	26.825	26.978	33.143	34.794	39.368	41.165	45.687	50.534	49.138
Embutidos curados	33.341	38.489	40.218	43.742	53.435	53.592	59.604	62.058	63.103
Jamón/Paleta cocidos	6.001	7.222	4.550	4.907	4.564	5.353	6.069	4.767	4.157
Embutidos cocidos	9.702	11.291	12.026	11.049	11.842	16.133	14.589	12.521	12.604
Otros productos	41.341	44.114	42.666	50.420	57.618	62.109	70.997	72.652	79.119
Total elaborado	116.071	122.981	138.736	144.912	166.827	178.352	196.946	202.532	208.121

Estas cifras globales tan llamativas se basan en la trayectoria exterior imparable del sector porcino. En 2019 se exportaron 1.723.129 toneladas de carne de cerdo, por valor de 4.582 millones de euros, lo que supone un espectacular crecimiento del 34,4% en valor y un 13.1% en volumen. La demanda desatada de China, debida a sus problemas de producción y abastecimiento por la peste porcina africana que asola el sector porcino del país, ha disparado las ventas y los precios de las empresas exportadoras españolas.

En la exportación de despojos y grasas, el año 2019 siguió igualmente el mismo camino hacia Asia que las carnes de cerdo. Así, las ventas exteriores fueron de 542.731 toneladas (+28,3%) y 663 millones de euros (+63%).

Sin embargo, en productos elaborados, las ventas no acabaron de despegar, y aunque las exportaciones fueron de 208.121 toneladas (+2,7%) y 1.376 millones de euros (+2,3%), todavía queda mucho camino por recorrer para nuestros productos de mayor calidad y de mayor valor añadido.

En conjunto, la parte más importante de las exportaciones españolas se dirige aún a la UE. La mayoría de nuestros productos van a Francia, Alemania, Portugal e Italia, aunque en 2019, por las circunstancias anteriormente dichas, China se convirtió en el primer destino de las carnes españolas, duplicando sus compras de porcino y dejando más de 1.400 millones de euros en la balanza comercial española, un 20 % de las exportaciones totales.

En definitiva, el sector tiene dos grandes desafíos en este ámbito: seguir aumentando las ventas exteriores a mercados extracomunitarios, y promover las exportaciones de productos de valor añadido, las que nos diferencian de nuestros competidores internacionales, comenzando con emblemas de la producción española como son los jamones ibéricos y serranos (ANICE, 2019).

11. Aproximación al sistema de producción porcino

En España existen dos sistemas de producción porcina claramente diferenciados: la producción intensiva, que engloba alrededor del 90% del total, representada por el cerdo blanco y el ibérico y la extensiva o semiextensiva, protagonizada exclusivamente por el cerdo ibérico. La producción intensiva tiene por meta ofrecer una gran variedad de productos cárnicos de calidad garantizada a precios relativamente asequibles y competitivos con otros productos alternativos. Sin embargo, los productos del cerdo ibérico suelen ser más exclusivos ofreciendo una mayor calidad y por tanto a un precio más elevado.

Estos sistemas de cría de cerdo se diferencian principalmente en el nivel de confinamiento y en la alimentación (Figura 11).

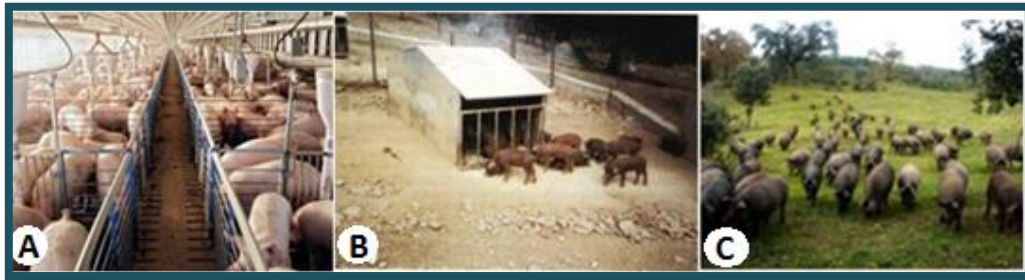


Figura 11. Distintos sistemas de cría porcina. A) Régimen intensivo, B) Régimen semi-extensivo, C) Régimen extensivo.

El sistema de cría del cerdo en intensivo supone una forma de explotación altamente tecnificada, enfocada a situar al cerdo en condiciones tales que se permita obtener de él altos rendimientos productivos en el menor tiempo posible. Las características principales de dicho sistema son que el animal crece en un recinto cerrado sin contacto normalmente con el exterior, su alimentación es a base de piensos y cereales, y se utilizan razas muy mejoradas genéticamente.

El sistema de cría en extensivo se basa en que el cerdo se encuentra libre en el campo donde aprovecha los recursos naturales que le ofrece la dehesa; hierbas, bellotas, etc. durante la última fase de cría del cerdo ibérico. Por otro lado, el régimen en semi-extensivo, utilizado en ocasiones para raza ibérica, combina las ventajas de ambos sistemas anteriormente descritos, ya que al igual que el sistema intensivo el animal crece en un lugar cerrado, pero dispone de una parcela para el pastoreo. Además, mantiene una alimentación basada en piensos y cereales.

Según el Real Decreto 4/2014 del 10 de Enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomos ibérico, se distinguen las siguientes clasificaciones según el tipo de alimentación y manejo:

De bellota o terminado en montanera: *animales sacrificados inmediatamente después del aprovechamiento exclusivo de bellota, hierba y otros recursos naturales de la dehesa, sin aporte de pienso suplementario. El peso medio del lote a la entrada en montanera está situado entre 92 y 115 kg. La edad mínima al sacrificio es de 14 meses. El peso mínimo individual de la canal es de 115 kg, salvo para los animales 100% ibéricos que es de 108 kg.*

De cebo de campo: *animales que aunque hayan podido aprovechar recursos de la dehesa o del campo, han sido alimentados con piensos, constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, y cuyo manejo se realiza en explotaciones extensivas o intensivas al aire libre*

“Toxoplasma gondii en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

pudiendo tener parte de la superficie cubierta. La estancia mínima en dichas explotaciones, previa a su sacrificio, es de 60 días. La edad mínima al sacrificio es de 12 meses. El peso mínimo individual de la canal es de 115 kg, salvo para los animales 100% ibéricos que es de 108 kg. Los animales de producción de más de 110 kilos de peso vivo deben disponer de una superficie mínima de suelo libre total por animal de 100 m² en su fase de cebo.

De cebo: *se trata de animales alimentados con piensos, constituidos fundamentalmente por cereales y leguminosas, cuyo manejo se realiza en sistemas de explotación intensiva. La edad mínima al sacrificio es de 10 meses Han de presentar una edad mínima al sacrificio de 10 meses. El peso mínimo individual de la canal es de 115 kg, salvo para los animales 100% ibéricos que es de 108 kg. Los animales de producción de más de 110 kilos de peso vivo deben disponer de una superficie mínima de suelo libre total por animal de 2 m² en su fase de cebo.*

Las tecnologías modernas de producción han provocado una considerable disminución de la infección por agentes patógenos en animales productores de carne, sin embargo, la demanda de alimentos de origen animal basada en la cría en libertad y orgánica es cada vez mayor. El problema en este sistema de producción extensiva es que es frecuente el contacto con otras especies animales, tanto domésticas como silvestres, lo que facilita la libre circulación y transmisión de diferentes agentes patógenos entre dichas especies (Astorga et al., 2010). El cerdo puede ser el huésped de una amplia gama de parásitos zoonóticos. Entre los parásitos transmitidos por la carne, los protozoos *T. gondii* y *Sarcocystis* spp. junto con los helmintos *Trichinella* spp. y *Taenia* spp. son los más importantes en la cadena de producción porcina. *T. gondii* es uno de los agentes zoonóticos más comunes en humanos en la Unión Europea y se ha estimado que es el más común de todas las infecciones parasitarias, similar a la salmonelosis y campilobacteriosis (Djurković-Djaković et al., 2013). Además del tipo de granja, la fuente de alimentación, la presencia de gatos, los métodos insuficientes de control de roedores y aves y de manejo de cadáveres y la calidad del agua son también considerados importantes factores de riesgo (Guo et al., 2015).

De esta forma, urge la necesidad entre los ganaderos de cerdo y las empresas agroalimentarias del sector de conocer la situación sanitaria en la que se encuentran estos animales, para poder aplicar nuevas metodologías que permitan reducir o eliminar la prevalencia de patógenos en la cadena de producción con dos objetivos primordiales: asegurar unos niveles óptimos de sanidad animal y seguridad alimentaria, lo que aporta una garantía de seguridad de los productos y la apertura a nuevos mercados internacionales; y mejorar sus parámetros productivos y por tanto, el rendimiento económico de sus empresas.

A pesar de esta conocida preocupación actual por la calidad, se han evidenciado ciertos desajustes en relación con la aceptación y conocimiento de los productos por parte de los consumidores, como consecuencia de una excesiva variedad de menciones en el etiquetado que puede inducir a confusión al consumidor. Como por ejemplo, el uso de marcas comerciales, logotipos, imágenes, símbolos y menciones facultativas que hacen alusión a aspectos relacionados con productos cuya denominación de venta no se corresponde con el producto etiquetado con esa reseña (RD 4/2014, del 10 de Enero).

Dentro de un mercado alimentario competitivo es fundamental que todos los miembros de la cadena de producción del alimento se propongan elaborar productos de la mejor calidad e informar a los consumidores sobre el valor real de estos productos. El reto del futuro es la competitividad, que se ha de basar, en primer lugar, en una oferta de productos con calidad diferenciada, donde se dé transparencia y control de procesos mediante la trazabilidad; en segundo lugar, en una oferta de producto saludable, seguro y elaborado con una tecnología respetuosa con el medio ambiente; y en tercer lugar, en la adaptación a la demanda, lo que exigirá replantear los modelos productivos y los métodos de autocontrol para conseguir mayores garantías en seguridad alimentaria.

12. Seroprevalencia de *T.gondii* en cerdo

Existen numerosos estudios de seroprevalencia que proporcionan información sobre la tasa de infección por *T. gondii* de los cerdos en granjas en diferentes áreas geográficas. Los resultados muestran un amplio abanico de valores entre los países y entre regiones dentro de un mismo país (Dubey 2009; Tenter, Heckeroth, y Weiss, 2000). Estos datos dependen de factores como la zona geográfica, la edad de los animales o la técnica serológica empleada (Alvarado-Esquivel et al., 2014; Djokic et al., 2016; Foroutan et al., 2019). Asimismo, el sistema de producción juega un papel importante en la seroprevalencia de *T. gondii* en ganado porcino, siendo el riesgo en granjas de producción extensiva estadísticamente mayor que en granjas de producción intensiva (Alvarado-Esquivel et al., 2011; Dubey, 2009b; Dubey & Jones, 2008; Guo et al., 2015; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Yu et al., 2011).

En la Tabla 8 se presentan los estudios de seroprevalencia realizados a nivel mundial. Como se puede observar en la tabla, las cifras de seropositividad obtenidas en estos estudios son muy heterogéneas tanto entre países como dentro de un mismo país, variando entre el 0% y el 95,8%. En el continente europeo, los valores se encuentran comprendidos entre el 0,5% en República checa o Italia y el 61% en cerdo Ibérico en España. En el caso de América, las cifras varían entre el 0% en Brasil al 95,8% en México. Los resultados obtenidos en el continente

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

asiático se sitúan entre el 2,3% en Indonesia y el 70% en China. En el caso de África, los estudios revelaron cifras del 17,9% en Burkina Faso al 45,2% en Nigeria.

Asimismo, las técnicas serológicas fueron muy dispares, siendo las más utilizadas el test de inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el test de aglutinación modificado (MAT).

Tabla 8. Seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo.

País	Seroprevalencia (%)	Técnicas serológicas ¹	Autor
Europa			
Alemania	16,5	ELISA e IFI	Damriyasa et al. (2004)
Dinamarca	3,1	ELISA	Grønbech et al. (2017)
Eslovaquia	2,1	ELISA	Turčeková et al. (2013)
España	61,0	MAT	Murillo et al. (2004)
	16,0	MAT	García-Bocanegra et al. (2010b)
	19,0	MAT	García-Bocanegra et al. (2010a)
	27,9	ELISA	Hernández et al. (2014)
	24,5	IFI	Herrero et al. (2016)
	24,3	ELISA	Castillo – Cuenca et al. (2019)
	10	ELISA	Gómez-Samblás et al. (2020)
Estonia	5,8	MAT	Santoro et al. (2017)
Francia	2,0	ELISAmultiespecies	Roqueplo et al. (2011)
Holanda	3,0	ELISA	Meerburg et al. (2006)
Inglaterra	2,0	MAT	Gamble et al. (1999)
	3,6	ELISA y MAT	Limon et al. (2017)
Irlanda	4,7	LAT	Hálová et al. (2013)
Italia	16,3	ELISA	Villari et al. (2009)
	16,1	IFI	Veronesi et al. (2011)
	0,5	ELISA	Gazzonis et al. (2014)
Letonia	4,2	ELISA	Deksne & Kirjusina (2013)
Polonia	34/33/26.4/21.7	IFI/ELISA/MAT/LAT	Sroka et al. (2008)
	11,9	DAT	Sroka et al. (2020)
Portugal	15,6	ELISA	De Sousa et al. (2014)
	9,8	MAT	Lopes et al. (2013)
	7,1	MAT	Esteves et al. (2014)
República Checa	0,5	CFT	Vostalová et al. (2000)
	36,0	ELISA	Bártová y Sedlák (2011)
Rumania	43,1	ELISA	Balea et al. (2012)
	23,1	IFI	Paștiu et al. (2013)

Tabla 8. Seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo (Continuación)

Serbia	28,9	MAT	Klun et al. (2006)
	9,2	MAT	Klun et al. (2011)
Suecia	5,2	ELISA	Lunden et al. (2002)
Suiza	14,0	ELISA	Berger-Schoch et al. (2011)
América			
Antillas	24,3	ELISA <i>multiespecies</i>	Sharma et al. (2015)
Argentina	37,8	MAT	Venturini et al. (2004)
Brasil	17,0	MAT	Dos Santos et al. (2005)
	65,8	IFI	Bonna et al. (2006)
	0,0	ELISA	Brandão et al. (2006)
	37,5/ 43,7	MAT/IFI	Cavalcante et al. (2006)
	8,5	IFI	De Moura et al. (2007)
	18,3	ELISA	Bezerra et al. (2009)
	50,0	IFI	Freitas et al. (2009)
	36,2	IFI	De azevedo et al. (2010)
	12,4	ELISA	Flausino et al. (2010)
	13,4	MAT	Piassa et al. (2010)
	11,5	ELISA	Frazão-Teixeira & De Oliveira (2011)
	7,6	IFI	Luciano et al. (2011)
	12,5	IFI	Fernandes et al. (2012)
	36,0	IFI	Cademartori et al. (2014)
19,5	IFI	Feitosa et al. (2014)	
25,5	ELISA	De Sousa et al. (2014)	
51,9	IFI	Magalhães et al. (2017)	
Canadá	0,7	ELISA	Poljak et al. (2008)
EE.UU	2,3	MAT	Dubey et al. (1995b)
	4,1	ELISA	Gebreyes et al. (2008)
	2,6	ELISA	Hill et al. (2010)
	27,7	MAT	Sandfoss et al. (2011)
México	12,7	MAT	Alvarado-Esquivel et al. (2011)
	0,5	MAT	Alvarado-Esquivel et al. (2012)
	95,8	ELISA	Ortega-Pacheco et al. (2013)
	45,3	MAT	Alvarado-Esquivel et al. (2014)
Panamá	59,5	IFI	Correa et al. (2008)
Perú	32,3	ELISA y WB	Suarez-Aranda et al. (2000)
	27,7	WB	Saavedra y Ortega (2004)
San Cristóbal y Nieves	48,0	ELISA	Hamilton et al. (2015)

Tabla 8. Seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo (Continuación)

Asia			
China	16,9	HAI	Zou et al. (2009)
	27,0	ELISA	Zhou et al. (2010)
	24,5	ELISA	Tao et al. (2011)
	29,6	ELISA	Du et al. (2012)
	12,0	HAI	Liu et al. (2012)
	30,6	HAI	Wu et al. (2012)
	4,6	HAI	Chang et al. (2013)
	70,0	ELISA	Li et al. (2015)
	19,1	HAI	Xu et al. (2015)
Indonesia	2,3	LAT	Tuda et al. (2017)
Japón	5,2	LAT	Matsuo et al. (2014)
Taiwan	10,1	LAT	Tsai et al. (2007)
Vietnam	23,0	MAT	Huong & Dubey (2007)
África			
Burkina Faso	29,0	ELISA	Bamba et al. (2016)
	17,9	MAT	Bamba et al. (2017)
Ghana	39,0	ELISA e IFI	Arko-Mensah et al. (2000)
Nigeria	29,1	ELISA	Onyche & Ademola (2015)
	45,2	ELISA	Ayinmode & Abiol (2016)
	40,0	LAT	Ishaku et al. (2018)
República de Benin	23,0	ELISA	Tonouhewa et al. (2018)

¹ ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (monoespecie). IFI: Test de inmunofluorescencia indirecta. MAT: Test de aglutinación modificada. WB: Western Blot o inmunotransferencia. HAI: Prueba de hemaglutinación indirecta. LAT: Test de aglutinación en latex. CFT: Test de fijación del complemento. DAT: test de aglutinación directa.

En una revisión sistemática de estudios realizada por Foroutan et al. (2019), se estimó la seroprevalencia global porcina en un 19 % (23.696 positivos de los 148.092 casos estudiados). En cuanto a continentes, la mayor seroprevalencia se observó en África y América del Norte con un 25%, seguido de América del Sur con un 23 % y Asia con un 21%; y la menor en Europa con un 13% (Figura 12).

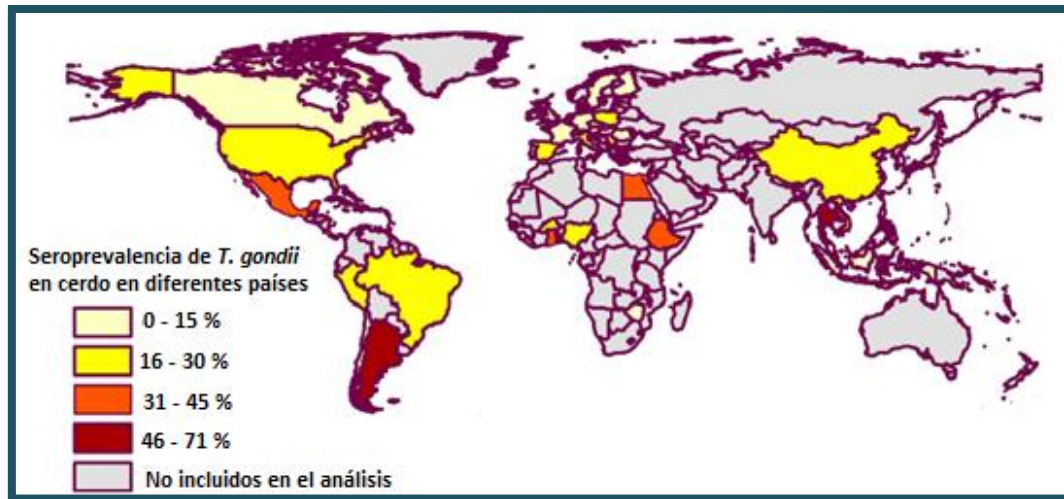


Figura 12. Seroprevalencia mundial de *T. gondii* en porcino (Modificado de Foroutan et al., 2019).

En concreto en España, los datos de seropositividad porcina son limitados. Tan sólo se ha realizado un estudio a nivel nacional (García - Bocanegra et al., 2010b) y 5 regionales (Castillo - Cuenca et al., 2019; García - Bocanegra et al., 2010a; Hernández et al., 2014; Herrero et al., 2016; Sánchez - Murillo et al., 2004).

En el estudio de seroprevalencia porcina nacional, García Bocanegra et al. (2010b) realizaron el muestreo en granjas procedentes de las principales regiones productoras de porcino en España. Se obtuvo una seroprevalencia total del 16% (del 24% en cerdas de cría y del 10% en animales de engorde). Por regiones, en Cataluña, Comunidad Valenciana y Extremadura se observaron valores de seroprevalencia superiores al 20 %, cifras entre el 10 % y el 20% en Aragón, Castilla y León, Navarra, Castilla-La Mancha y Andalucía; mientras que datos inferiores al 10% se detectaron en Galicia y Murcia (Figura 13).

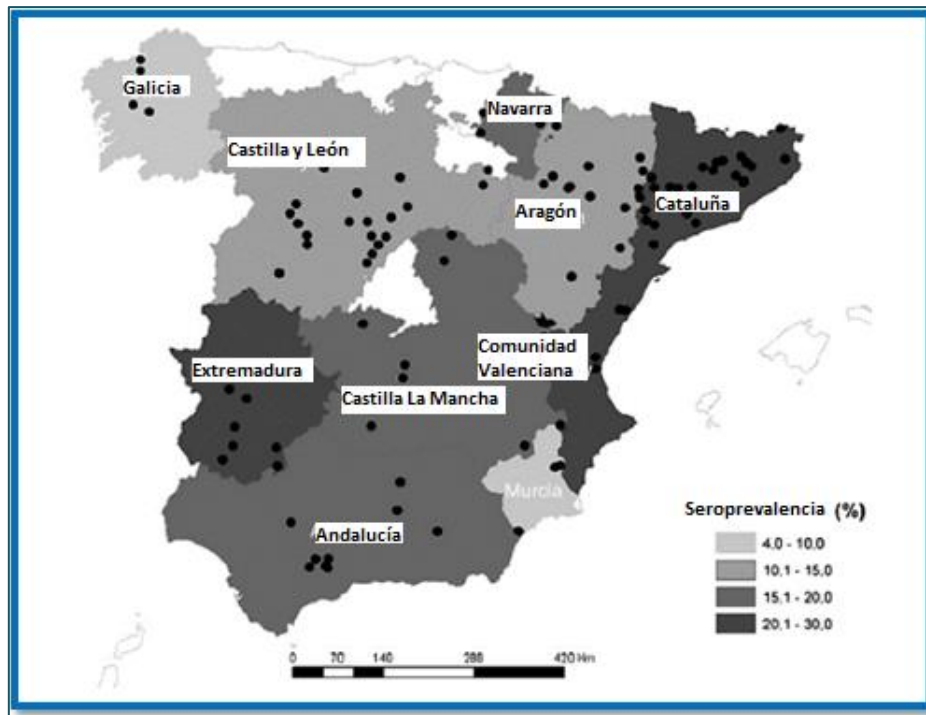


Figura 13. Seroprevalencia porcina en las distintas regiones de España. Fuente: Modificado de García-Bocanegra et al. (2010b).

En relación a los estudios regionales, Sánchez - Murillo et al. (2004) detectaron una seropositividad del 61 % en cerdos ibéricos en Extremadura. Posteriormente, García-Bocanegra et al. (2010a) evaluaron distintas explotaciones repartidas por Cataluña, detectando una seroprevalencia del 19% en cerdos de cría y de engorde. Más tarde y en la Comunidad Autónoma de Aragón, Herrero et al. (2016) encontraron cerdos seropositivos (IFI 1:20 o superior) en el 96,67% de las explotaciones estudiadas y la seroprevalencia total detectada fue del 24,52%. Recientemente, y sólo en cerdo de cría extensiva, Castillo - Cuenca et al. (2019) detectaron una seroprevalencia de *T. gondii* del 24,3% en el suroeste de España (Andalucía y Extremadura), regiones con mayor producción de cerdo ibérico, en el 86% de los 114 rebaños analizados. Estos resultados son consistentes con el 27,9 % de seroprevalencia en cerdo ibérico encontrada en el estudio de Hernández et al. (2014) en esta misma región entre el 2008 y el 2009.

Ante la escasa información de seroprevalencia porcina en nuestro país, urge la necesidad de aportar datos actuales. No obstante, una comparación entre estudios de seroprevalencia es difícil, debido a las diversas pruebas serológicas utilizadas y a los diferentes valores de corte empleados, que no siempre son indicados por los autores. Asimismo, son escasos los estudios de validación de estas metodologías que aporten datos sobre sensibilidad, especificidad y

grado de concordancia entre las distintas técnicas (Aroussi et al., 2015); por ello es importante la evaluación de estas técnicas analíticas para disponer de una herramienta fiable de control.

13. Prevalencia de *T. gondii* en carne de cerdo

Según datos de ANICE (2019), el sector cárnico porcino en España ocupa el primer lugar en cuanto a relevancia económica dentro del sector agroalimentario, por lo que urge conocer más acerca del papel que tiene la carne porcina como fuente de infección de *T. gondii* para el ser humano. Para ello, es importante no sólo tener datos de seroprevalencia en animales vivos sino también tener datos de prevalencia de quistes tisulares infecciosos de *T. gondii* en la carne.

En la Tabla 9 se indican los estudios de prevalencia de *T. gondii* a nivel mundial, que presentan valores muy dispares tanto entre países como dentro de un mismo país, variando entre 0,3% y el 100%. A nivel Europeo las cifras se sitúan entre el 4,5 % en Portugal (De Sousa et al., 2006) y el 100 % en Eslovaquia (Turčeková et al., 2013). Por lo general las prevalencias observadas en el resto de países son bajas o relativamente bajas. Ejemplos de ello son EE.UU. con un 0,3 % (Dubey et al., 2005), México con un 2,1 % (Galván-Ramírez et al., 2010) y China con un 18,6 % (Wang et al., 2012). No obstante, también se han detectado prevalencias altas del 50 al 65 % en países como Japón o Brasil (Belfort-Neto et al., 2007; Bezerra et al., 2012; Fernandes et al., 2012; Frazão-Teixeira et al., 2006; Zakimi et al., 2006).

En concreto en España no existe apenas información, solamente se conoce un trabajo puntual llevado a cabo por Bayarri et al. (2012), donde se obtuvo una prevalencia del 8 % en muestras de carne fresca (costilla, lengua, magro y lomo) procedente de establecimientos localizados en la ciudad de Zaragoza.

Tabla 9. Prevalencia de *T. gondii* en carne de cerdo.

País	Prevalencia (%)	Métodos de detección ¹	Autor
Europa			
Escocia	12,3	qPCR	Plaza et al. (2020)
Eslovaquia	100,0	qPCR	Turčeková et al. (2013)
España	8,0	Bioensayo en ratón	Bayarri et al. (2012)
Irlanda	13,0	PCR <i>anidada</i>	Hálóvá et al. (2013)
Italia	57,1	qPCR	Bacci et al. (2015)
	33,13	PCR- <i>semianidada</i>	Veronesi et al. (2017)
Portugal	4,5	Bioensayo en ratón	De Sousa et al. (2006)
Reino Unido	38,0	PCR <i>anidada</i>	Aspinall et al. (2002)

Tabla 9. Prevalencia de *T.gondii* en carne de cerdo (Continuación)

Serbia	72,7	Bioensayo en ratón	Klun et al. (2011)
América			
Brasil	25,0	Bioensayo en ratón	Dos Santos et al. (2005)
	50,0	Bioensayo en ratón	Frazão-Teixeira et al. (2006)
	34,0-66,0	Bioensayo en ratón	Frazão-Teixeira & De Oliveira, (2011)
	14,2	qPCR	Belfort-Neto et al. (2007)
	55,0	Bioensayo en ratón y qPCR	Bezerra et al. (2012)
	55,2	qPCR	Fernandes et al. (2012)
	47,2	Bioensayo en ratón	Cademartori et al. (2014)
	35,1	Bioensayo en ratón	Feitosa et al. (2014)
Canadá	3,2	qPCR	Iqbal et al. (2018)
EE.UU.	0,3	Bioensayo en ratón	Dubey et al. (2005)
	36,8	Bioensayo en ratón	Dubey & Jones (2008)
	9,6	Bioensayo en ratón y gato	Velmurugan et al. (2009)
México	2,1	Bioensayo en ratón y PCR <i>semi-anidada</i>	Galván-Ramírez et al. (2010)
	5,3	qPCR	Dzib-Paredes et al. (2016)
San Cristóbal y Nieves	3,2	qPCR	Iqbal et al. (2018)
Asia			
China	18,6	Bioensayo en ratón, qPCR e histología	Wang et al. (2012)
	13,56	LAMP	Zhuo et al. (2015)
	8,2	PCR <i>anidada</i>	Zhang et al. (2019)
Japón	56,4	qPCR	Zakimi et al. (2006)

¹ qPCR o PCR a tiempo real: Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa. LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle.

14. Efecto de los tratamientos tecnológicos de la carne en la viabilidad de *T. gondii*

La mayoría de las recomendaciones relacionadas con los sistemas de prevención de la toxoplasmosis por consumo de alimentos se basan en el uso de metodologías de conservación o tratamientos culinarios que aseguren la destrucción de los quistes viables. En líneas generales puede decirse que la eficacia de las tecnologías es variable y, en muchas ocasiones, está relacionada con el tiempo y la intensidad con que se ejercen estos tratamientos. Existen varios estudios acerca de la susceptibilidad de los quistes tisulares presentes en la carne a diferentes tratamientos tecnológicos como el calor, la congelación, las altas presiones, la irradiación y el proceso de curado (Cook et al., 2000; Dubey et al., 1990; Kijlstra & Jongert, 2009; Lundén & Uggla, 1992). Se han llevado a cabo varios estudios para evaluar los diferentes parámetros y condiciones de estos tratamientos que podrían comprometer la viabilidad del

parásito (De Berardinis et al., 2017; Guo et al., 2015b ; Kijlstra & Jongert, 2008). El problema reside en que existe disparidad de opiniones en cuanto a la eficacia de estos tratamientos a la hora de inactivar al parásito (Hill et al., 2004; Hill et al., 2006).

El principal factor de control para prevenir la infección por *T. gondii* a través del consumo de alimentos se basa en la reducción de la contaminación cruzada y el uso de una temperatura adecuada de cocción. Sin duda, este es el primer método seguro para inactivar al parásito. La primera investigación que demostró que **las altas temperaturas** podía inactivar los quistes tisulares fue llevada a cabo por Jacobs, Remington & Melton (1960) y en ella se confirmó la destrucción definitiva del parásito cuando la temperatura interna de la carne alcanzaba los 67°C en quistes tisulares aislados de cerebro de rata. Posteriormente, Dubey et al. (1990) evaluaron este tratamiento ya en una matriz alimentaria, utilizando carne de cerdos infectados con cerebros de ratón positivos a *T. gondii*. Estas muestras fueron sometidas a 49, 52, 55, 58, 61, 64 y 67°C en baño de agua termostatzado durante 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 96 min. Estos autores concluyeron que los quistes tisulares de *T. gondii* resultaron inviables en la mayoría de los casos al calentarlos a 61°C o a una temperatura superior durante 3,6 minutos. Más tarde, y en carne de ovejas infectadas experimentalmente, El-Nawawi et al. (2008) encontraron que el parásito se inactivaba aplicando una temperatura de 60°C durante 10 minutos. Así pues, una temperatura lo suficientemente alta durante todo el cocinado de la carne podría minimizar el riesgo de infección con *T. gondii*. Sin embargo, una encuesta realizada en EE.UU demostró que alrededor del 9% de los consumidores cocinaba algunos tipos de carne de cerdo con temperaturas inferiores a 48°C, lo que no es suficiente para inactivar los quistes tisulares de *T. gondii* (Ecosure, 2008). Por otro lado, la cocción en microondas fue considerada menos eficiente que los métodos de calentamiento convencionales, ya que no proporciona la relación tiempo-temperatura necesaria para la destrucción de los microorganismos ni un calentamiento homogéneo en su interior (Knutson et al., 1987).

Aunque esta metodología es muy eficaz para eliminar a *T. gondii*, cada vez es más frecuente la demanda de alimentos listos para el consumo (*Ready To Eat*, RTE) que no requieren de cocinado, por lo que es necesario evaluar otras tecnologías que aseguren la inocuidad de los alimentos.

En 1965, se describió por primera vez el efecto de las **bajas temperaturas o congelación** en la viabilidad de los quistes tisulares de *T. gondii* (Sommer, Rommel & Levetzow, 1965), siendo 2 días a -20°C suficiente para inactivar al parásito. Grossklaus & Baumgarten (1968) utilizaron carne de cerdos alimentados con ratones infectados con *T. gondii* y observaron que los quistes eran inactivados mediante congelación a -25°C durante 6-35 días.

Kotula et al. (1991) encontraron que a temperaturas ligeramente más altas, - 12°C durante al menos dos días, la congelación ya era eficaz para eliminar al parásito. Resultados similares fueron detectados por Dubey (1998), quien congeló carne porcina durante 3 días tanto a -12°C como a -21°C y encontró que los quistes tisulares eran inviables a ambas temperaturas; sin embargo, permanecían viables durante 22 días a -1°C y durante 11 días a -6,7°C.

No obstante, otros estudios indicaron que la congelación no era completamente efectiva aunque el almacenamiento a -20°C hubiese provocado cambios morfológicos y pérdida de infectividad (Work, 1968). Por lo general, la congelación puede eliminar estados infecciosos de *T. gondii*, pero para la inactivación completa del parásito son necesarios un período de tiempo y temperatura adecuados.

De igual manera, las tecnologías modernas de procesado de alimentos como las **altas presiones hidrostáticas** (HHP) o la **irradiación gamma** han resultado ser eficaces como tratamientos de inactivación de *T. gondii* (Aymerich, Picouet & Monfort, 2008). No obstante, ambas tecnologías ocasionan problemas en el color y la textura de la carne, que suelen dificultar la aceptabilidad del producto por parte del consumidor, por lo que hay que ser rigurosos a la hora de elegir los parámetros para no afectar a las características organolépticas (Aymerich, Picouet & Monfort, 2004; Kijlstra & Jongert, 2008).

En cuanto a la eficacia de las HPP, se demostró que una exposición a 300 MPa a 30s en carne cruda ya era suficiente para eliminar al parásito (Franssen et al., 2019; Lindsay et al., 2006). Por el contrario, un estudio reciente realizado por Gracia et al. (2020) señaló que un tratamiento a 100, 200, 300 y 400 MPa en carne cruda porcina infectada experimentalmente durante 1 min no fue efectivo a la hora de reducir la infectividad de *T. gondii* mientras que una exposición a 600 MPa durante 20 minutos consiguió la inactivación completa de los bradizoitos infecciosos. Este tratamiento fue eficaz tanto para carne cruda como en jamón curado. Las discrepancias entre ambos estudios podrían deberse al hecho de que Lindsay et al. (2006) utilizó para su trabajo carne porcina que no procedía de animales infectados (de forma natural o experimental) sino que había sido suplementada con cerebros de ratón que contenían quistes de *T. gondii* viables. Dado que el parásito estaba en el tejido cerebral del ratón y no en el músculo del cerdo, es posible que el proceso de digestión pudiese haber afectado a la viabilidad de los bradizoitos (Dubey, 2010). Otra posible razón de estas diferencias podría ser la técnica utilizada para confirmar la viabilidad. El bioensayo se considera la prueba de oro para la evaluación del tratamiento de los parásitos en los alimentos (Franssen et al., 2019). Tanto Lindsay et al. (2006) como el estudio de Gracia et al. (2020) han utilizado el bioensayo, no obstante, éste último trabajo confirmó la viabilidad analizando el cerebro de ratón por

qPCR, a diferencia de Lindsay et al. (2006), que han empleado la histología. La PCR es más específica y sensible para detectar la presencia del parásito que la detección histológica (Opsteegh, 2016).

Por otro lado, la **irradiación** con dosis entre 0,4 y 0,7 kGy fue óptima para controlar al patógeno, especialmente en la carne de cerdo (Dubey et al., 1994; Kuticic & Wikerhauser, 1996). No obstante, hay que apuntar que la dosis de irradiación necesaria para inactivar al parásito, dependerá de la cepa y del tipo de rayos gamma que se emplee (Aymerich, Picouet & Monfort, 2008; Dubey et al., 2000). Asimismo, el uso de este tratamiento como método de conservación de la carne no está autorizado por la Unión Europea.

Finalmente, cabe señalar que el proceso tecnológico de curado puede ser un factor determinante en la completa inactivación de los quistes tisulares de *T. gondii* gracias a la acción sinérgica entre el tiempo de maduración, la concentración de sal y la temperatura de almacenamiento (Bayarri et al., 2010; Condoleo et al., 2018; Kijlstra & Jongert, 2008; Hill et al., 2008).

14.1. Efecto del tratamiento tecnológico del curado

El jamón, paleta y embutidos curados son los productos más emblemáticos de la gastronomía española. Son productos cárnicos con elevado prestigio social, siendo habitual su presencia en la dieta mediterránea. El Código Alimentario Español (BOE, 2016) define el jamón como *producto cárnico elaborado con la extremidad posterior del cerdo, cortada a nivel de la sínfisis isquio-pubiana, con pata y hueso, que incluye la pieza osteomuscular íntegra, procedente de cerdos adultos, sometida al correspondiente proceso de salazón y curado-maduración*. Asimismo, define la paleta como *producto cárnico elaborado con la extremidad anterior, cortada a nivel de la escápula humeral hasta la húmero radial, con mano y hueso, que incluye la pieza osteomuscular íntegra, procedente de cerdos adultos, sometida al correspondiente proceso de salazón y curado-maduración* (RD 4/2014, del 10 de Enero).

Las etapas que se siguen en la elaboración del jamón curado son: preparación de los perniles, salazón, post-salado, secado y maduración (Guo et al., 2015). El Ministerio de Agricultura define un período mínimo de curado de 600 días para los jamones de entre 5,5 kg y 7 kg, y un período de 365 días para las paletas de cerdo. Hay tres designaciones diferentes dependiendo del tiempo de curado, “Jamón de Bodega”, “Jamón Reserva” y “Gran Reserva” con 12 meses, entre 12 y 15 meses, o más de 15 meses de curación respectivamente. La elaboración del jamón serrano implica un proceso de sangrado y salazón, en el que los perniles se cubren de sal marina y se mantienen a una temperatura de entre 1 y 5 °C. A este procedimiento le sigue

otro proceso de salado en el que la temperatura se eleva 15 °C para permitir la deshidratación y la penetración de la sal. Después, se lavan los perniles con agua caliente, se secan y se dejan madurar con un riguroso control de la ventilación y la temperatura, con temperaturas que oscilan entre los 15 y 20 °C. Finalmente, se curan en secadores industriales de 6 a 18 meses (Gómez-Samblás et al., 2016). Como resultado de este proceso se obtiene el jamón curado con un agua de alrededor del 50% y una pérdida de peso estimada del 33% (Antequera et al., 2007; Ventanas et al., 2007). En el caso del jamón serrano, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2014) define un contenido máximo de agua del 50% y un gradiente máximo de humedad del 12% entre el exterior y el interior de los jamones. Los diferentes tipos de jamón presentan diferencias en los niveles de sal, agua y grasa, siendo el jamón ibérico el que tiene más grasa y en general un menor contenido de sal que el jamón de cerdo blanco (Ventanas, 2012). En el caso de la especialidad tradicional garantizada (ETG) (European Community, 2006) se define un máximo de salinidad del 15% del peso total en seco para el jamón serrano.

Por otra parte, según el Real Decreto 474/2014, del 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos, bajo la denominación de embutidos curados o fermentados se encuentran *los productos elaborados con carnes y grasa, generalmente de cerdo, aunque también pueden ser elaborados con carnes y grasa de otros animales, con un grado de picado grueso o fino, sometidos a un proceso de salazón. Se les añade pimienta (al salchichón, fuet y salami) o pimentón (al chorizo, longaniza, chistorra y morcón) como ingrediente caracterizante, aunque se les puede añadir otras especias, condimentos, ingredientes y aditivos. Son amasados y embutidos, en tripas naturales o envolturas artificiales, y sometidos a un proceso de curado-madurado, acompañado o no de fermentación, y opcionalmente ahumados, lo que les proporciona un aroma y sabor típicos.*

Los esfuerzos de la UE por la comercialización de estos productos de calidad y por el aumento progresivo de las exportaciones, se ha traducido en la creación de las denominadas *figuras de calidad* y en el desarrollo de una legislación alimentaria específica, que ofrezca una garantía legal para el riguroso seguimiento de todos los procesos implicados en la elaboración de dichos productos, es decir, para una trazabilidad del proceso global. En relación con estas circunstancias, han adquirido especial relevancia los jamones curados con sellos de calidad protegida otorgados por la UE: Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) (como el jamón de Teruel), Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) (como el jamón de Trévelez) o Especialidades Tradicionales Garantizadas (ITG) (como el jamón serrano). Estas denominaciones también son extensibles a las paletas.

14.2. *Toxoplasma gondii* en el jamón curado

En 1996, Buffolano et al. (1996) realizó un estudio epidemiológico en el cual observó relación entre el consumo de productos curados y la infección de *T. gondii* en el hombre. Se les tomó una muestra de sangre a 3.765 mujeres que acababan de dar a luz en Nápoles y se les hizo una encuesta epidemiológica. Se encontró una relación estadísticamente significativa entre el consumo de jamón curado en las mujeres y la detección de anticuerpos frente al parásito en sus sangres. De igual manera, indicaron que el consumo de este producto por lo menos una vez al mes incrementaba por tres veces el riesgo de infectarse con *T. gondii*. Estudios posteriores como el de Kapperud et al. (1996) que se llevó a cabo en 37.000 mujeres embarazadas en Noruega o el de Cook et al. (2000) que se realizó a 960 mujeres en distintas ciudades europeas respaldaron esta teoría.

En relación a la prevalencia de *T. gondii* en estos productos, Warnekulasuriya et al. (1998) llevaron a cabo una investigación en Reino Unido de diversos productos cárnicos, entre ellos el jamón curado, donde detectaron un 1,5% de positividad en 67 muestras de carne curada analizadas mediante PCR. Sin embargo, Bayarri et al. (2012), mediante bioensayo en ratón, en un estudio sobre jamones curados de diferentes modalidades disponibles en el comercio, no se detectó el parásito en ninguna de las 25 muestras analizadas procedentes de comercios de la ciudad de Zaragoza.

Un estudio posterior llevado a cabo por Gomez-Samblas et al. (2015) en España analizaron 475 muestras comerciales de jamón serrano en dos formatos de presentación (piezas enteras y loncheados) mediante PCR y bioensayo en ratón. La prevalencia global fue del 8,84% mientras que los ensayos de infectividad revelaron que solo el 4,84% de las muestras positivas fueron infectivas.

Durante las últimas décadas, se han estudiado los posibles efectos parasiticidas del tratamiento tecnológico del curado (ahumado, salazón y fermentación), procedimiento que se introdujo históricamente para únicamente para preservar y aumentar la vida útil de la carne.

El uso del cloruro sódico (NaCl) está relacionado con cambios en la presión osmótica y la temperatura de maduración de la carne (Kijlstra & Jongert, 2009). Jacobs, Remington y Melton (1960) fueron los primeros en observar un ligero efecto parasiticida haciendo pequeños cambios en la concentración de sal, mientras que Sommer, Rommel & Levetzow (1965) encontraron quistes tisulares perfectamente viables a una concentración de 8% de NaCl durante 4 días. Posteriormente, Dubey (1997a) estudió el efecto del almacenamiento de quistes tisulares de *T. gondii* en distintas concentraciones de NaCl a diferentes temperaturas.

Para ello utilizó quistes tisulares de *T. gondii* contenidos en cerebros de ratones sometidos a soluciones acuosas de NaCl al 0,85%, 2%, 3,3% y 6% a diferentes temperaturas de almacenamiento (4-20°C) durante varios intervalos de tiempo, y observó que el tiempo de supervivencia variaba con la concentración de sal y la temperatura. Bajo condiciones de laboratorio, los quistes tisulares eran inactivados en soluciones de NaCl del 6% a todas las temperaturas (4-20°C), mientras que permanecían viables en soluciones salinas menos concentradas durante varias semanas. Ya en una matriz alimentaria, Navarro et al. (1992) estudiaron la resistencia de los quistes de *T. gondii* a NaCl a distintas concentraciones (1,25%, 2% y 2,5%) y a los condimentos (pimienta negra y ajo) en salchichas frescas preparadas con carne de cerdo infectada experimentalmente, e indicaron que la salazón no necesariamente eliminaba los quistes tisulares y que los condimentos no tenían ningún efecto sobre la viabilidad del parásito. En otro estudio, en este mismo alimento, los quistes tisulares de *T. gondii* fueron inactivados a concentraciones más elevadas y tiempos de refrigeración más largos, con un 3% de NaCl después de 3-7 días (Jamra, Martins, & Vieira, 1991). Este periodo es mucho más largo que el tiempo de almacenamiento habitual para las salchichas de cerdo y, por lo tanto, la salazón como único tratamiento sería insuficiente para evitar la transmisión a los humanos. Sin embargo, Hill et al. (2006) y Hill et al. (2018) encontraron que soluciones de 1,3% y 1,4%, respectivamente, fueron suficientes para eliminar completamente los protozoos viables. En un estudio reciente, se evaluó con qué rapidez se produce la inactivación de *T. gondii* en la masa de pepperoni durante la fermentación y se estudió qué parámetros de la preparación del alimento están implicados en la inactivación del parásito. Los resultados indicaron que se produce una rápida inactivación de los bradizoitos de *T. gondii* en la masa con bajo contenido en sal a las 4 horas siguientes al inicio de la fermentación (Fredericks et al., 2019).

El tratamiento tecnológico del curado no sólo implica la adición de NaCl sino una combinación de dicho componente con otros aditivos, como pueden ser, azúcar, nitritos o nitratos. Además, en algunos procesos de curado también incluyen el ahumado. La sal se emplea en el tratamiento tecnológico del curado por su efecto en el sabor, en la a_w y en la conservación del producto final. La concentración de sal siempre aumentará durante la maduración debido a la pérdida de agua. El nitrato de sodio y el nitrato de potasio provocan el desarrollo del color en productos cárnicos curados y se utilizan cuando el proceso de secado es a largo plazo. Además, los nitratos reducen la actividad de agua. Para ser eficaz, la reducción de nitratos a nitritos ha de estar bajo la influencia de enzimas bacterianas. Los nitritos afectan al color y al sabor del producto y ayudan en su preservación también. En la actualidad se conoce poco acerca de los

efectos de los nitratos y nitritos en la inactivación de *T. gondii*. Éstos pueden actuar por sí mismos o ayudar a la reducción del parásito viable en el tratamiento final (Mie et al., 2008). La pérdida de viabilidad de *T. gondii* durante el proceso de curación puede deberse a la deshidratación sufrida. La carne pierde peso durante el proceso de secado y a su vez un incremento de la concentración de NaCl y otros electrolitos que pueden afectar a la viabilidad de los quistes protozoarios (Dubey, 1997; Sommer, Mie et al., 2008; Rommel & Levetzow, 1965; Work, 1968). Asimismo, la acumulación de peróxidos junto con los ácidos grasos libres, pueden alterar la membrana de los quistes y los bradizoítos protozoarios resultando en una pérdida de infectividad. La deshidratación, el ambiente seco y la acumulación de ácidos grasos libres alcanzan su nivel máximo después de 14-15 meses de secado (Gómez-Samblas et al., 2015).

Lundén & Ugglá (1992) comprobaron que el uso conjunto del ahumado y salazón es mucho más eficaz en la destrucción de parásitos infectivos, incluso cuando el ahumado es llevado a cabo a una temperatura normalmente insuficiente para eliminar al patógeno. Ni Sommer, Rommel & Levetzow (1965) ni Work (1968) hallaron ningún parásito infectivo mediante varios métodos domésticos o industriales en carne de cerdo salada o ahumada.

Estudios más actuales mostraron que la adición de concentraciones de NaCl superiores al 2% y/o de soluciones de lactato al 1,4% en carne de cerdo infectada experimentalmente podrían eliminar al parásito, mientras que concentraciones inferiores al 1% de NaCl no aportaron resultados concluyentes. Soluciones de lactato o NaCl podrían inactivar al parásito mientras que soluciones de fosfato sódico no tienen el mismo efecto destructivo (Dubey et al., 2005). En definitiva, soluciones de NaCl, lactato de sodio y lactato potásico por encima del 1% son efectivas, al menos, para disminuir la viabilidad de los quistes tisulares (Hill et al., 2004).

La inactivación de los quistes tisulares de *T. gondii* mediante el tratamiento del curado depende de la interacción sinérgica entre la concentración de sal, el período de maduración y la temperatura de almacenamiento (Kijlstra et al., 2008; Mie et al., 2008). Aunque se trata de una metodología que disminuye el riesgo de infección por *T. gondii*, se ha demostrado que este proceso no inactiva completamente al parásito. Prueba irrefutable de ello fue la investigación llevada a cabo en la que se confirma que ocasionalmente algunos quistes tisulares pueden sobrevivir (Warnekeulasuriya et al., 1998). Aunque no reflejan las condiciones exactas bajo las cuales se producen los productos comerciales curados porcinos y no ha sido hasta el siglo XXI cuando han comenzado a realizarse estudios al respecto. De entre estos productos, el jamón curado, fabricado en España e Italia, comenzó a estudiarse debido a su posible implicación en la toxoplasmosis congénita. El jamón curado en seco es un producto no

ahumado; fabricado mediante curado con sal y nitritos, y estabilización a través de la disminución de actividad de agua. Todo el proceso lleva al menos 7 meses, aunque en algunos casos los jamones pueden dejarse envejecer durante más de un año.

En España, Bayarri et al. (2010) llevaron a cabo un trabajo pionero para evaluar la viabilidad del parásito en el que se seleccionaron 6 cerdos seropositivos infectados naturalmente para usar sus perniles en la elaboración de jamones curados. Tras el proceso del curado y el análisis de las muestras concluyeron que una concentración final de NaCl de 3,9%, 25mg/Kg de nitratos y 3 mg/kg de nitrito era suficiente para inactivar los quistes tisulares de *T. gondii*. Además, comprobaron que el tiempo de curación también fue un factor determinante a la hora de inactivar al parásito. Estos autores no detectaron parásitos viables en el producto final mediante bioensayo en ratón, y su posterior análisis por inmunofluorescencia indirecta, PCR e histología, después de 14 meses de curación pero sí se detectó seropositividad en ratón en los que habían sido sometidos a un tratamiento de curado de 7 meses. En la misma línea pero con otros tiempos de curación, Herrero et al. (2017) afirmaron que es más seguro consumir jamón curado con un periodo de maduración no inferior a 12 meses, al comprobar una incompleta inactivación del parásito a los 9 y 12 meses de curación. Una posible explicación podría ser la existencia de zonas en esta matriz alimentaria donde las concentraciones letales de sal no pueden llevar a cabo su efecto sobre los bradizoítos, posiblemente debido a la protección ejercida por la pared del quiste y la presencia de grasa (Herrero et al., 2017; Weiss & Kim, 2007). Otros factores que podrían afectar a la difusión de sal son la superficie, la presencia o ausencia de hueso, el pH (cuanto más bajo mayor es la velocidad de difusión de la sal en la muestra), la forma de hacer los cortes en la carne y colocar la pieza en la pila de salazón y congelación previa al salazón (Poma, 1989).

En estudios de infección experimental, Gomez-Samblas et al. (2016) utilizaron 20 perniles y paletas porcinas para determinar el efecto del curado en la destrucción de *T. gondii*. Se realizaron distintos tratamientos en estas piezas: Congelación a -20°C durante 3 días y posterior curación con sal marina; curado con sal marina; curado con sal marina y nitritos; y curado con sal marina durante 5 meses (paletas) o durante 7 meses (perniles) y congelado a -20 °C (las concentraciones de nitritos y de sal empleadas no se especifican en el estudio). La combinación del salado con la congelación fue el tratamiento más eficaz para la inactivación de los quistes viables de *T. gondii*. No obstante, estos autores realizaron en el estudio tomando porciones de 100 g de cada pernil antes de comenzar con los tratamientos de curación de 1, 3,5, y 7 meses. Asimismo, Genchi et al. (2017) tampoco encontraron *T. gondii* viable en

jamones, que habían sido curados según las guías de elaboración del jamón de Parma (DOP) durante 12, 14 y 16 meses de curación.

Cabe citar que no hay estudios en los que se conozca la viabilidad de *T. gondii* en jamón curado y otros productos listos para el consumo como los embutidos que se relacionen con datos de trazabilidad, por lo que sería necesario aportar datos científicos para poder detectar el riesgo, controlarlo y ofrecer al consumidor un producto más seguro.

15. Métodos de detección de *T. gondii*

La toxoplasmosis cursa de manera subclínica en la mayoría de las especies y de los casos, razón por la cual su detección es complicada e incluso puede pasar desapercibida. Debido a que la sintomatología es diversa, inespecífica y a veces incluso ausente (Webster, 2010), debe recurrirse a pruebas de laboratorio tanto indirectas como directas o a la combinación de ambas tanto para su detección como para estudios epidemiológicos. No obstante, existe una falta de estandarización de las técnicas por lo que urge evaluar en profundidad estas técnicas analíticas para disponer de una herramienta fiable de control para la detección de la presencia del parásito en animales vivos así como de su presencia y viabilidad en carne y productos cárnicos.

15.1. Métodos indirectos

Los métodos indirectos se basan en la demostración de anticuerpos específicos originados por la respuesta inmunitaria del huésped frente al patógeno *T. gondii*. Para la detección del parásito en animales vivos se suelen emplear técnicas serológicas ya que es una manera muy eficaz de estimar las tasas de infección exceptuando ganado vacuno y caballos (Berger-Schoch et al., 2011; EFSA, 2017; 2018). Para discernir si se trata de una infección aguda o crónica se detectan normalmente las inmunoglobulinas IgM e IgG respectivamente.

15.1.1. Prueba de Sabin y Feldman o Dye Test (DT)

En 1948, Sabin y Feldman desarrollaron la primera prueba serológica de diagnóstico, el dye test, lo que supuso un gran avance en el conocimiento de la toxoplasmosis (Sabin & Feldman, 1948). Esta prueba detecta anticuerpos IgG (Borbolla et al., 2005; Ovalle et al., 2000). En ella, los taquizoitos vivos se incuban con el complemento, el suero problema y el colorante azul de metileno (pH: 11) a 37 °C durante 1 hora (Webster, 2010). Si la reacción es positiva y por tanto, existen anticuerpos frente a *T. gondii* en el suero problema, éstos lisan y destruyen la membrana citoplasmática de los taquizoitos mediante la activación del complemento. Como consecuencia, los taquizoitos lisados no incorporan el azul de metileno y aparecen incoloros.

Por el contrario, si la reacción es negativa, los taquizoitos no son lisados e incorporan el reactivo que les otorga una coloración azul (Kijlstra et al., 2004; Webster, 2010).

Esta prueba serológica es considerada como sensible (99%) y específica (100%)(Ovalle et al., 2000) y algunos la consideran como prueba de referencia (Botero & Restrepo, 1998). Se ha empleado tanto en humanos como en animales (Dubey et al., 1985; Gómez-Lus, 1967; Sevilla, 1969; Vostalová et al., 2000), aunque algunos estudios han revelado que puede ser poco fiable en especies domésticas, incluidas las aves (Dubey et al., 1985, 1993).

Asimismo, su alto coste, la dificultad de manipulación y el peligro potencial que supone el uso de microorganismos vivos (Webster, 2010), ha provocado una utilización cada vez menor y actualmente está considerada como una metodología obsoleta.

15.1.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La técnica de inmunofluorescencia indirecta, también conocida por sus siglas IFI, fue utilizada por primera vez en 1957 por el investigador Goldman (Goldman, 1957). Esta técnica se fundamenta en la detección de anticuerpos IgG/IgM y, en este caso, los taquizoitos están muertos y fijados a los pocillos de los portaobjetos. Este test hace uso de dos anticuerpos: el anticuerpo primario, que es el que reconoce y se une a la molécula diana (taquizoito), y el secundario, que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo (fluoresceína), reconoce al anticuerpo primario y se une a él (Figura 14).

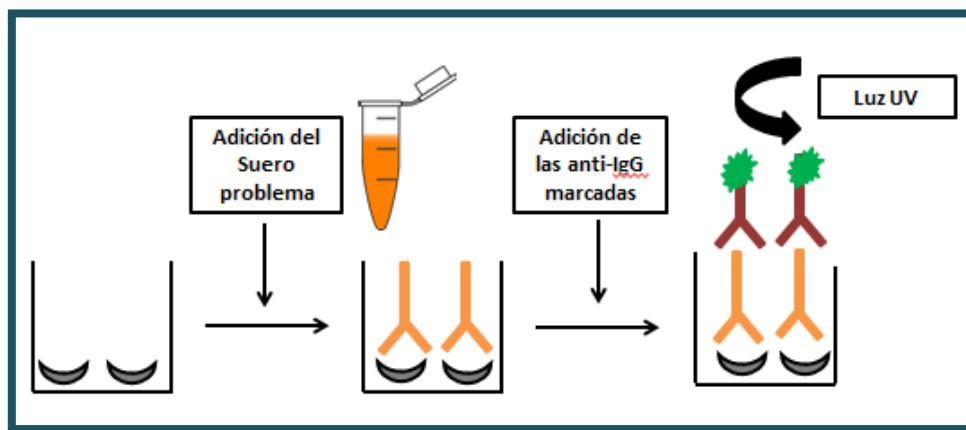


Figura 14. Esquema del fundamento de la IFI.

La reacción se lee al microscopio de fluorescencia y la dilución más alta, en la cual se observa fluorescencia verde en toda la periferia de los taquizoitos, se considera una reacción positiva a dicha dilución (Figura 15). Sin embargo, se considera reacción negativa cuando el parásito se

observa completamente rojo o si la fluorescencia se ve localizada en uno de los extremos de los parásitos, lo que se llama fluorescencia polar (Ues, 1998).

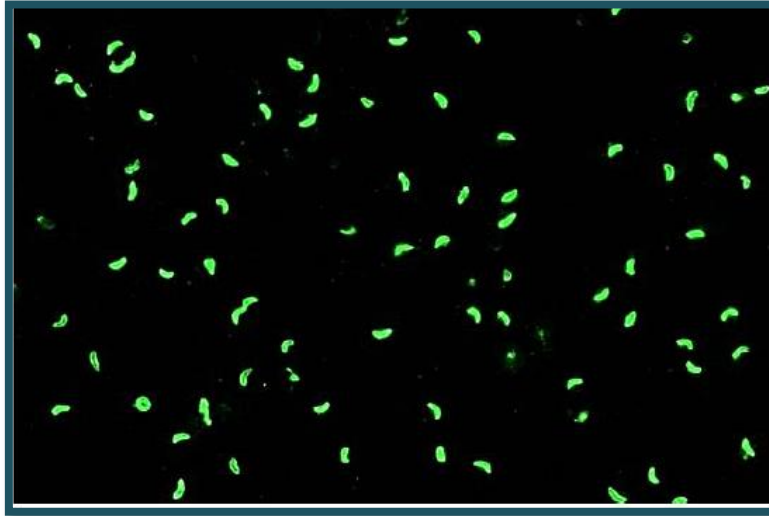


Figura 15. Imagen de una reacción positiva a *T. gondii* bajo el microscopio de fluorescencia. Fuente: Ficha técnica de la IFI de VMRD (Veterinary Medical Research & Development).

La prueba IFI es uno de los métodos más comunes para detectar anticuerpos anti-*T. gondii*. Por contra, requiere un microscopio de fluorescencia, personal altamente cualificado para la lectura de los resultados y una inmunoglobulina fluorescente específica para cada especie (Saraei et al., 2010). Sin embargo, la inmunofluorescencia indirecta es altamente sensible y específica, fácil de llevar a cabo y más segura y económica que otras, por lo que es elegida por varios autores como la prueba de referencia para el serodiagnóstico de *T. gondii* en cerdos (Benjamini & Leskowitz, 1991; Cavalcante et al. 2006; Garcia et al., 2006; Rahman et al., 2011; Sroka et al., 2008). Diversos estudios señalan que la IFI es capaz de detectar anticuerpos que aparecen en una etapa temprana de la infección reaccionando contra los componentes de la membrana del taquizoíto (Garcia et al., 2008; Hirvela-koski, 1990; Karim & Ludlam, 1975). En el estudio de Garcia et al. (2008) se hallaron valores de sensibilidad y especificidad elevados, del 95,7 % y 97,8.

15.1.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas') fue propuesta en 1971 por Engvall y Perlmann (Engvall & Perlmann, 1971). Esta prueba puede ser utilizada para detectar tanto antígenos (métodos directos) como anticuerpos (métodos indirectos).

La variante más usual para el diagnóstico de la toxoplasmosis es el ELISA indirecto, que consiste en la detección de anticuerpos IgG o IgM frente a *T. gondii* y consta de las siguientes etapas (Figura 16): Los antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio están fijados al soporte, se adiciona el suero problema de tal forma que los anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados, se realizan lavados para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado, se añaden anti-anticuerpos (anticuerpos secundarios) conjugados con una enzima, los cuales reaccionarán con los anticuerpos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos, se llevan a cabo lavados para eliminar los anticuerpos secundarios que no hayan reaccionado, se adiciona el sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima conjugada y finalmente, se procede a la lectura del producto final coloreado mediante espectrofotometría.

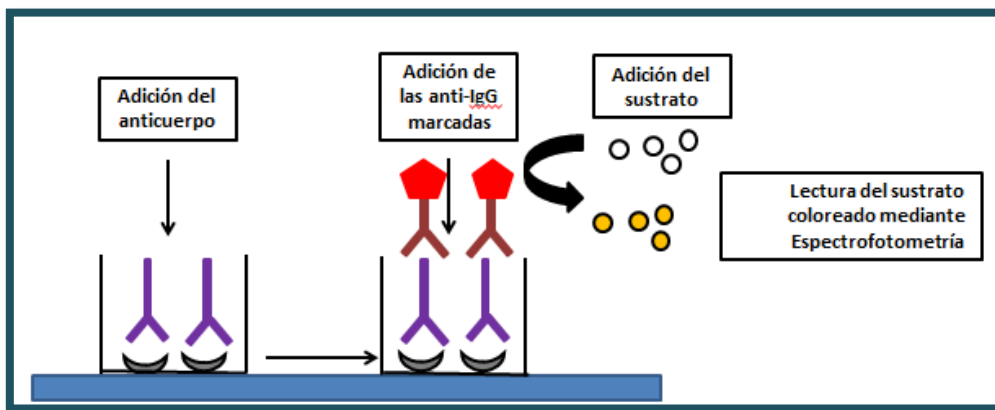


Figura 16. Esquema del fundamento de la técnica ELISA indirecta.

Esta técnica, aunque requiere de un espectrofotómetro, presenta varias ventajas, como la ausencia de riesgo de infección durante la manipulación al no utilizar taquizoítos vivos, la buena repetibilidad, la automatización y la sencillez de interpretación de resultados (Gamble, Dubey & Lambillotte, 2005; Hill et al., 2006).

Por estos motivos, ha sido utilizada para detectar anticuerpos IgG contra *T. gondii* en muestras de suero y tejido de cerdos en numerosos estudios (Basso et al., 2013; Felin et al., 2017; Gamble, Dubey & Lambillotte, 2005; Hill et al., 2006; Papatsiros et al., 2016; Ranucci et al., 2012; Steinparzer et al., 2015).

Sin embargo, al existir numerosas variantes ELISA, cuyas principales diferencias estriban en el antígeno utilizado y la enzima ligada, la sensibilidad y especificidad varían.

Durante los últimos años, varios estudios han empleado el uso de antígenos recombinantes para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis. Se han expresado numerosas proteínas

recombinantes para ser usadas como antígenos del parásito (antígenos de superficie, antígenos de gránulos densos u antígenos de roptrias) mediante las técnicas de clonación y expresión de genes con el fin de detectar específicamente los anticuerpos frente a *T. gondii*. El uso de estos antígenos recombinantes ha sido ampliamente descrito en las pruebas ELISA para la detección de la infección por parásitos Apicomplexa (Aubert et al., 2000; Ikadai et al., 1999; Martin et al., 1998; Suarez et al., 1993). No obstante, todavía hay muchos problemas a resolver cuando se utilizan antígenos recombinantes como antígenos de diagnóstico y algunos estudios han demostrado una menor sensibilidad al utilizar éstos frente a los ensayos que utilizan antígeno procedente de cultivos celulares (Zhang et al., 2016).

García et al. (2006) evaluaron un ELISA indirecto utilizando roptrias crudos de *T. gondii* como antígeno, hallando una sensibilidad del 94,3% y una especificidad del 100% en porcinos infectados experimentalmente. Posteriormente, Basso et al. (2013) determinaron una sensibilidad del 98,9% y una especificidad del 92,7% utilizando un kit comercial específico de la especie porcina que empleaba el taquizoito completo, encontrando una sensibilidad ligeramente menor que el empleado en el ELISA *in-house* que utilizaba el antígeno p30. Asimismo, Steinparzer et al. (2015) compararon este mismo kit comercial que probó Basso et al. (2013) con dos kits multiespecies en sueros porcinos obteniendo unas sensibilidades de entre 57,3 a 65,2% y especificidades de 97,4 a 99,4%, resultando ser menos sensibles los test multiespecies. Sin embargo, un estudio más actual no encontró diferencias al utilizar un antígeno u otro (Felin et al., 2017). Dubey et al. (1995a) y Gamble, Dubey & Lambillotte (2005) notificaron también sensibilidades elevadas del ELISA oscilando entre el 72,9 y el 100% en sueros porcinos procedentes de infección experimental, no obstante, no reportaron ni las dosis infecciosas ni los días post-infección a los que se evaluaron los sueros.

15.1.4. Test de aglutinación modificado (MAT)

Este test fue desarrollado por Fulton & Turk (1959) y modificado por Desmonts & Remington (1980), que le otorgaron el nombre de test de aglutinación modificado (MAT) (Webster, 2010). La técnica MAT, a diferencia de ELISA e IFI, detecta únicamente anticuerpos IgG (Lind et al., 1997). Esta técnica utiliza taquizoitos muertos, fijados con acetona o glutaraldehído (Cordero del Campillo & Rojo-Vázquez, 1999) o con formaldehído (Desmonts & Remington, 1980), un tampón de coloración y no requiere de reactivos específicos para cada especie (Al-Aldhami & Gajadhar, 2014; El-Nawawi et al., 2008; Macri et al., 2009).

La técnica MAT se fundamenta en la adición de taquizoitos de *T. gondii* fijados a pocillos de placas de microtitulación y se añaden también las diluciones de los sueros problema. Los

sueros son tratados con 2-mercaptoetanol para eliminar IgM específicas y no específicas y así evitar que interfieran en la detección de IgG. La lectura de resultados se realiza mediante la observación directa de la placa transcurridas 18-24 h (Figura 17).

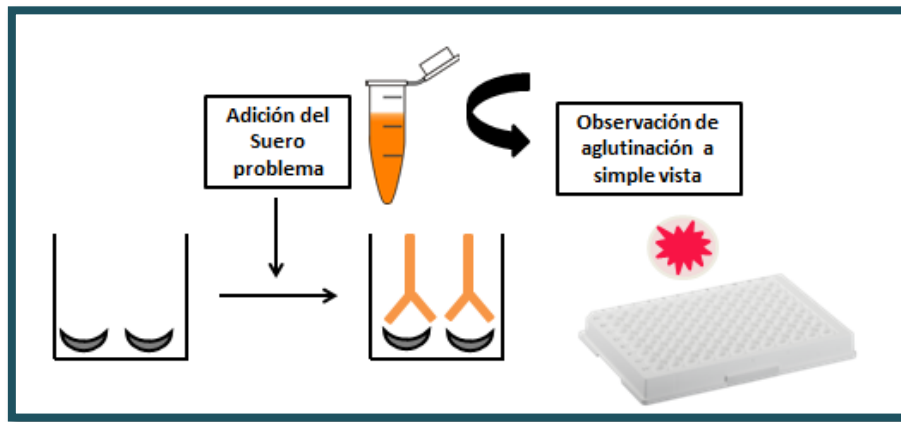


Figura 17. Esquema del fundamento de la técnica MAT.

Las muestras positivas en las que haya habido reacción antígeno – anticuerpo producirán aglutinación. Las reacciones positivas muestran una sedimentación en forma de velo tapizando aproximadamente la mitad del fondo del pocillo, mientras que una reacción negativa se traduce en la formación de un botón o anillo (Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003). La reacción límite ocurre cuando la aglutinación de los *T. gondii* en forma de velo está tapizando menos de la mitad del fondo del pocillo. En este último caso sería recomendable repetir el análisis (Figura 18).

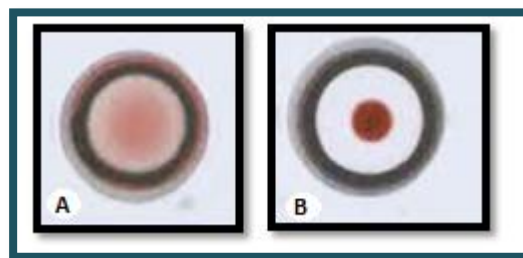


Figura 18. Observación a simple vista de los resultados del MAT: resultado positivo (A) y resultado negativo (B).

Esta prueba puede dar falsos negativos durante las primeras etapas de la infección aguda al sólo detectar anticuerpos IgG que no aparecen hasta las 2-3 semanas post-infección (Dubey & Crutchley, 2008).

El desarrollo de esta prueba de aglutinación directa ha sido de gran ayuda en el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis tanto en humanos como en animales. La sensibilidad y especificidad del MAT han sido validadas mediante la comparación de datos serológicos y el

aislamiento del parásito de cerdos infectados de manera natural y experimental (Al-Adhami et al., 2016; Dubey, 1997b; Dubey et al., 1995a). En un estudio realizado por Garcia et al. (2008) se hallaron valores de sensibilidad y especificidad elevados, del 95,7 % y 97,8 %, respectivamente. Este test es simple, no requiere de reactivos específicos para cada especie y el coste es relativamente bajo en comparación con otras pruebas serológicas (Dubey, 1997b; Hill et al., 2006). También ha sido empleado como prueba de referencia en varios estudios (Forbes, Parker & Gajadhar, 2012; Steinparzer et al., 2015). Sin embargo, el uso rutinario del MAT para el diagnóstico de la infección por *T. gondii* puede no ser tan sencillo, por el tiempo requerido hasta su interpretación y por la falta de kits comerciales fácilmente disponibles (Al-Adhami et al., 2016). Asimismo, a pesar de que este test es muy utilizado, no da resultados fiables para todas las especies (Aroussi et al., 2015).

15.1.5. Prueba de aglutinación en látex (AL)

Desarrollada inicialmente por Tsubota et al. (1977), utiliza el antígeno de *T. gondii* fijado a partículas de látex, reconoce anticuerpos IgG/IgM y cuando el suero es positivo se produce aglutinación (Figura 19). Es una técnica fácil y no requiere ningún equipo específico ni personal cualificado. La prueba de aglutinación tiene una resolución y sensibilidad deficiente en comparación con IFI, ELISA y MAT (Dubey et al., 1995a; Hirvela-Koski, 1990; Ishizuka et al., 1986). Aunque ha sido empleada en alguna investigación (Jakubek et al., 2006; Opel et al, 1991), no es muy común y se ha de intentar mejorar su sensibilidad, al menos en sueros de animales (Webster, 2010). Esta prueba fue considerada ineficaz a la hora de detectar la infección por *T. gondii* en cerdos (Dubey et al., 1997b).

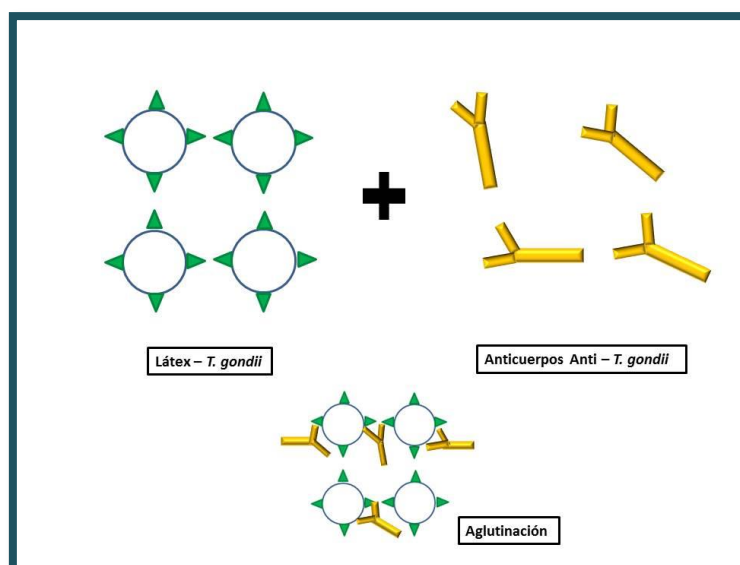


Figura 19. Esquema del fundamento de la prueba de aglutinación en látex.

15.1.6. Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI)

Esta metodología fue desarrollada por Jacobs & Lundé (1957). Su fundamento consiste en que los glóbulos rojos estabilizados y sensibilizados con antígenos de *T. gondii* se ponen en contacto con la muestra de suero a analizar. Si ésta posee anticuerpos IgG o IgM frente al parásito, se producirá el fenómeno de la hemaglutinación. La HAI detecta anticuerpos de forma más tardía que la DT y los títulos permanecen elevados durante un período prolongado, por lo que es probable que las infecciones agudas pasen desapercibidas (Webster, 2010). Aunque actualmente, está en desuso, se ha utilizado de forma rutinaria en muchos laboratorios para distintas especies (Hugh-Jones et al., 1999; Patton et al., 1990). Al igual que en la prueba de aglutinación en latex tiene una resolución y sensibilidad pobre en relación a las técnicas IFI, ELISA y MAT y además, es incapaz de detectar la infección por *T. gondii* en cerdos (Dubey et al., 1995a; Dubey et al., 1997b; Hirvela-Koski, 1990; Ishizuka et al., 1986).

15.1.7. Inmunotransferencia o Western Blot (WB)

Esta técnica fue diseñada por Burnette (1981) y conlleva la separación de proteínas del parásito mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, con posterior transferencia a una membrana adsorbente sobre la que se realiza una reacción inmunoenzimática de reconocimiento de anticuerpos IgG/IgM presentes en el suero. La inmunotransferencia se ha utilizado principalmente para el estudio de la estructura antigénica de *T. gondii* y de la respuesta del hospedador frente a la infección (Al-Qassab et al., 2009; Fekkar et al., 2008; Lundén, 1995; Nau et al., 2017; Stroehle et al., 2005). En porcino, Basso et al. (2013) compararon 4 metodologías serológicas distintas, en la que el test WB obtuvo una buena sensibilidad al igual que el resto, pero una especificidad significativamente más baja (77,2%).

15.2. Métodos directos

Los métodos directos consisten en detectar la presencia de *T. gondii* directamente en el órgano o tejido analizado.

15.2.1. Microscopía en tejidos u histología

Esta técnica permite la búsqueda de *T. gondii* en secciones histológicas de tejidos, normalmente teñidas (EFSA, 2007). Aunque los parásitos son visibles con tinción no específica como Giemsa o hematoxilina-eosina, el uso de tinción específica con enzima (inmunohistoquímica) o anticuerpos conjugados fluorescentes ayuda a su diferenciación de otros parásitos u estructuras apicomplexas y aumenta la sensibilidad (Opsteegh et al. 2016).

Casartelli - Alves et al. (2014) señalaron que la histología es una buena técnica para la detección de *T. gondii* debido a su alta especificidad. Sin embargo, otros autores en sus estudios no consiguieron encontrar *T. gondii* mediante esta metodología (García et al., 2006; Sarkari et al., 2014).

Sin embargo, la microscopía requiere tiempo y un técnico experimentado, pero la principal desventaja es el tamaño de la muestra que puede examinarse. El uso de la microscopía directamente en muestras de carne es limitado, aunque a menudo se usa de forma secundaria para demostrar la infección en ratones tras un bioensayo (taquizoitos en el líquido peritoneal en infecciones agudas o quistes tisulares en el cerebro en infecciones crónicas) (Opsteegh et al., 2016). El microscopio electrónico también se ha empleado para detectar quistes tisulares en el cerebro del ratón y esporozoitos en el intestino delgado del gato infectado, pero es difícil de aplicar para su uso rutinario (Figura 20).

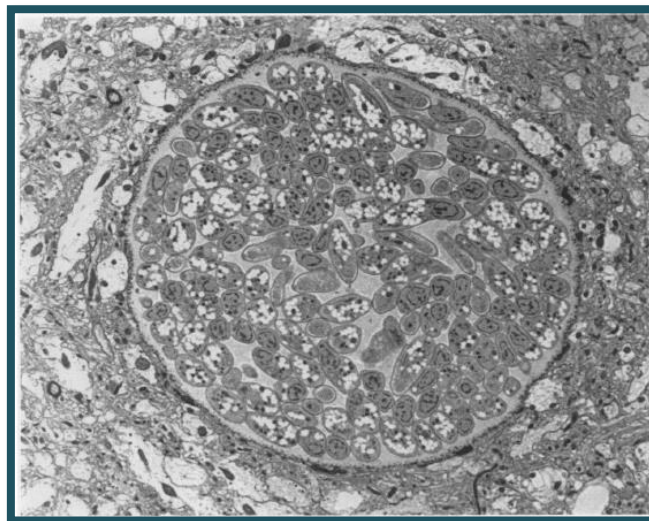


Figura 20. Fotografía de microscopio electrónico de baja potencia de un quiste tisular con bradizoitos densamente empaquetados en su interior. Fuente: Sims et al. (1989).

15.2.2. Inmunohistoquímica (IHC)

Esta técnica utiliza anticuerpos para detectar antígenos específicos de *T. gondii* en cortes tisulares. La unión antígeno-anticuerpo se revela mediante una reacción que da color al producto resultante. Los métodos más utilizados son el de la peroxidasa – antiperoxidasa (Conley et al., 1981; Uggla, Sjöland, & Dubey, 1987), el complejo avidina-biotina peroxidasa (Hsu et al., 1981) y la avidina-biotina conjugada (Guesdon, Ternynck, & Avrameas, 1979). Un ejemplo de esta técnica aparece en la Figura 21.

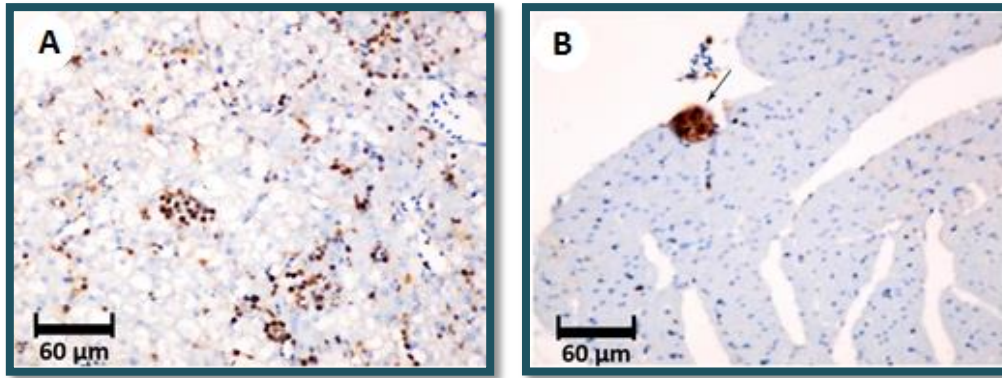


Figura 21. Fotografías de inmunohistoquímica. (A) Inmunohistoquímica del cerebro de una paloma que muestra un quiste de *T. gondii* teñido de color marrón oscuro. (B) Inmunohistoquímica del corazón de un pato que muestra un quiste de *T. gondii* teñido de color marrón oscuro. Fuente: Ibrahim et al. (2018).

Mediante esta técnica Kumagai et al. (1988) confirmó la toxoplasmosis neonatal en cerdos (Webster, 2010). Pero, al igual que la microscopía, esta metodología es poco sensible, principalmente por el escaso tamaño de muestra que puede examinarse. Se suele utilizar como complemento a otras técnicas.

15.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polimerase Chain Reaction, PCR*) es una técnica que ha revolucionado el trabajo en Biología Molecular. Descrita en 1983, supuso el Premio Nobel para Kary Mullis y desde entonces ha tenido un importante impacto en la investigación. Actualmente, la tecnología de la PCR constituye una de las herramientas importantes en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas. Son métodos sencillos, sensibles y reproducibles, que pueden aplicarse a una variedad de muestras tanto animales como humanas (Bastien et al., 2008; Calderaro et al., 2006; Contini et al., 2005).

Esta técnica se basa en la amplificación exponencial de un fragmento específico de DNA, utilizado como molde para generar millones de copias. El proceso requiere del conocimiento previo de la secuencia de dos regiones cortas que flanqueen al fragmento que se pretende amplificar llamadas *cebadores* o *primers*. La PCR está basada en la reacción de la DNA-polimerasa, que se desarrolla a través de sucesivos ciclos integrados constituidos por tres etapas (Figura 22):

1. Desnaturalización de la molécula de DNA molde: Requiere de un aumento de la temperatura por encima de los 90°C, para conseguir que las dos hebras se separen y así permitir la subsiguiente unión de los fragmentos cebadores.

2. Hibridación de cebadores o *primers*: Reduciendo la temperatura (50-60°C) se induce la unión de cebadores a las zonas complementarias del DNA desnaturalizado.

3. Elongación: Llevando la disolución a temperatura adecuada y en presencia de un gran exceso molar de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato dNTPs, la polimerasa elonga el sustrato cebado.

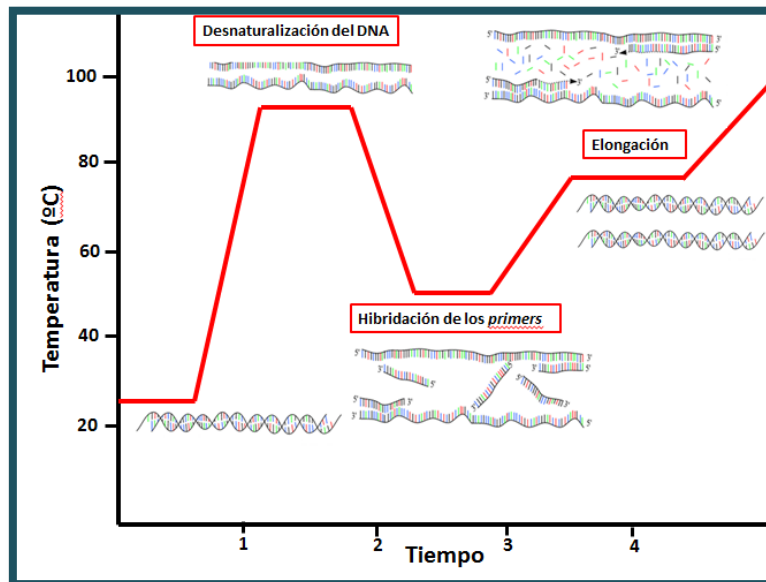


Figura 22: Etapas de la PCR (Elaboración propia).

Tras la aplicación de sucesivos ciclos de PCR, el producto mayoritario, en la mezcla de reacción es un fragmento de dsDNA (DNA de doble cadena) cuya secuencia resulta de la copia de aquella presente en la molécula diana delimitada por los cebadores utilizados y cuyo resultado es una amplificación del orden de 10^6 o superior. La definición de la secuencia de oligonucleótidos que han de funcionar como cebadores determina en gran medida el éxito del proceso (Perera & Garcia, 2002).

En la actualidad, la técnica posee numerosas variantes: PCR convencional, PCR anidada, PCR a tiempo real, etc.

La PCR anidada, a diferencia de la convencional, requiere de cuatro cebadores. En una primera ronda se amplifica de manera convencional con los dos cebadores más externos a la región que se desea amplificar. El producto de esta primera PCR se utiliza como molde para una segunda ronda que emplea cebadores internos a la región previamente amplificada. Gracias a esta segunda amplificación se aumenta la especificidad, ya que los cebadores van a hibridar en un fragmento dentro de la molécula de DNA, por lo que así se evitan posibles hibridaciones

inespecíficas de los primers. La desventaja de esta metodología es que existe la posibilidad de contaminación de la muestra y, además no permite cuantificar la cantidad inicial de DNA.

No obstante, la variante más utilizada es la PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (*real time-PCR*, *qPCR*) permite monitorizar en tiempo real la reacción de amplificación y por lo tanto, permite cuantificar la cantidad de DNA diana inicial, así como cuantificar el producto amplificado durante toda la reacción.

La cuantificación se logra mediante el empleo de fluoróforos, que son agentes intercalantes que se unen al DNA bicatenario, de manera que se produce un aumento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto amplificado.

La señal obtenida al final de cada ciclo de amplificación se representa en una gráfica frente al número de ciclos y se obtiene una curva que muestra el transcurso del proceso. Uno de los parámetros fundamentales en la PCR a tiempo real y a partir del cual se procede a los cálculos es el llamado Ciclo umbral (Ct o *Threshold Cycle*) que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo.

Las técnicas de PCR cuantitativa se pueden clasificar según se utilicen fluoróforos no específicos (típicamente el *SYBR Green*), o sondas moleculares dependientes de la secuencia (como tecnología *TaqMan*). Lemmon & Gardner (2008) llevaron a cabo la detección del DNA de *T. gondii* utilizando *Syber Green* como fluoróforo, ya que posee una mayor sensibilidad que las sondas taqman.

En el caso de utilizar fluoróforos inespecíficos, es necesario discriminar si las muestras con curva de amplificación positiva corresponden a productos específicos o a dímeros de primers o productos inespecíficos. Para ello, se lleva a cabo una curva de desnaturalización o *melting curve* al final de la reacción, incrementando la temperatura de 50 a 95°C y monitorizando continuamente la fluorescencia. A la temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza por completo se observa una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del fluoróforo.

A partir de esta curva se obtiene la temperatura de fusión o *melting temperature (Tm)*, que se define como la temperatura a la cual se desnaturaliza el 50% del DNA. Puesto que los productos de amplificación tienen diferente longitud y diferentes secuencias, se desnaturalizan a diferentes temperaturas, por lo que cada fragmento tiene una Tm característica que permite diferenciarlo.

Por lo general, esta técnica, con su multitud de procedimientos y diferentes genes diana empleados, ha sido ampliamente utilizada para la detección de *T. gondii* en tejidos porcinos (Herrero et al., 2017; Yai et al., 2003). Sin embargo, los quistes tisulares son escasos, se estima 1 quiste por cada 50 g de carne (Webster, 2010), y los kits comerciales de extracción de DNA generalmente están diseñados para cantidades muy pequeñas de tejido (en concreto, 25 mg), por lo que la probabilidad de detectar *T. gondii* en una muestra tan pequeña es baja. Por este motivo, el tratamiento de la muestra previo al aislamiento del DNA puede ser un factor fundamental para mejorar la sensibilidad de la PCR. Los tratamientos previos más utilizados en la literatura científica son: la digestión péptica (Bayarri et al., 2010; Dubey, 1998; Herrero et al., 2017; Hill et al., 2018), la homogeneización (Bacci et al., 2015; Rahumatullah, Khoo & Noordin., 2012), el aislamiento sobre gradientes de Percoll (Kul et al., 2013; Omata et al., 1997) y la captura magnética (Juránková et al., 2013; Genchi et al., 2017; Gomez-Samblas et al., 2016). Opsteegh et al. (2010) desarrollaron un sistema de captura magnética en PCR a tiempo real (MC-qPCR) que permite el análisis de muestras de tejido de hasta 100 g. Este método combina una extracción y concentración específica del DNA (basado en la hibridación de biotinas con el fragmento de DNA de *T. gondii* que se quiere detectar y la captura de este complejo biotina-sonda diana mediante bolas paramagnéticas unidas a estreptovidina) con una gran sensibilidad y especificidad. Sin embargo, un estudio reciente mostró discrepancias entre MC-qPCR y el bioensayo en ratón en muestras de tejido porcino (Opsteegh et al., 2016). Para ciertos microorganismos ha sido ampliamente empleada la liofilización como método para concentrar las células microbianas en la muestra sin necesidad de subir la temperatura (López & Fernández, 2000). No obstante, como se ha de congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante vacío, algunos autores afirman que esto podría acabar comprometiendo a la viabilidad del microorganismo (López & Fernández, 2000).

El diagnóstico molecular de la toxoplasmosis aún no se ha estandarizado en cerdos ni en otras especies animales, y no existe un consenso unánime sobre la mejor secuencia para amplificar. Sin embargo, varios estudios han demostrado que los genes de múltiples copias son mucho más adecuados que los genes de copia única (Fallahi et al., 2014) para el diagnóstico de infección por *T. gondii*. Hasta la fecha, el gen B1 (Burg et al., 1989) y el elemento repetitivo de 529 bp (529 bp-RE) (Homan et al., 2000) de los cuales hay 35 y 200-300 copias respectivamente en el genoma del parásito, representan las secuencias más comunes y fiables para la detección de *T. gondii* en tejidos (Franco-Hernandez et al., 2016; Garcia et al., 2006, 2017; Hill et al., 2006; Ortega-Pacheco et al., 2013).

Además de la PCR, se han desarrollado métodos de detección de DNA basados en la amplificación isotérmica mediada por bucle (*Loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) para superar la necesidad de un costoso termociclador (Lin et al., 2012; Qu et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2009; Zhuo et al., 2015). Wang et al. (2013) emplearon la técnica LAMP para detectar *T. gondii* en la sangre de cerdos a los dos días de haber sido infectados experimentalmente, sugiriendo así que esta metodología podría ser utilizada para el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis. No obstante, el rendimiento de esta técnica sólo suele ser comparable a la PCR en muestras enriquecidas con parásitos. Además, es extremadamente sensible a la contaminación, por lo que se ha de hacer un riguroso control de calidad para descartar falsos positivos (Liu et al., 2015). Asimismo, el método también tiene los mismos inconvenientes que la PCR con respecto al tamaño de muestra y la viabilidad (Opsteegh et al., 2016).

Para evaluar el riesgo hay que confirmar que el parásito está viable y aunque el desarrollo de la PCR para confirmar la viabilidad está en curso para varios patógenos, todavía no existen tales técnicas para *T. gondii* (Opsteegh et al., 2016). Se han intentado metodologías con el RNA pero los resultados no han sido del todo satisfactorios (Travaillé et al., 2016).

15.2.4. Bioensayo

Actualmente, el bioensayo es considerada la prueba de oro para confirmar la viabilidad de *T. gondii* en tejidos y es considerada técnica de referencia (EFSA, 2007). Esta técnica se basa fundamentalmente en la infección experimental y multiplicación del parásito en un hospedador (generalmente gatos o ratones).

El bioensayo en gato es considerado más sensible en la detección de *T. gondii* que el ratón (Gamble, Dubey & Lambillotte, 2005; Opsteegh et al., 2016), debido principalmente a la mayor cantidad de muestra que es posible procesar (500 gramos en el gato frente a 50-200 gramos en el ratón) (Opsteegh et al., 2016). No obstante, el uso de ratones es menos costoso y es totalmente eficaz, tal y como demuestran numerosos trabajos (Al-Qassab et al., 2009; Dubey et al., 2007; Dubey et al., 2017; Herrero et al., 2017; Richomme et al., 2009).

T. gondii puede ser aislado de diferentes muestras biológicas y en diferentes estadios de desarrollo, como por ejemplo, fluidos corporales infectados con taquizoitos o tejidos con bradizoitos contenidos en los quistes.

Generalmente, el procedimiento más habitual para analizar un tejido es la inoculación de una muestra homogeneizada y digerida artificialmente a ratones de experimentación (normalmente, por vía intraperitoneal o subcutánea) (Figura 23).

La digestión artificial previa a la inoculación es una forma de concentración del parásito, que resulta imprescindible por el escaso número de quistes en los tejidos (se estima que hay un quiste por cada 50g (Webster, 2010)). Las enzimas comúnmente utilizadas para la digestión son la pepsina o la tripsina, existiendo diferencias en la supervivencia de los bradizoitos y taquizoitos en ambas soluciones enzimáticas (Dubey, 1998). Habitualmente, se digieren de 50 a 200 g de tejido y se inocula una fracción del sedimento en ratones (a menudo se utilizan entre 2 y 5 ratones por muestra). Se usan diferentes cepas de ratones y se pueden administrar medicamentos inmunosupresores adicionales para aumentar la sensibilidad. Los ratones se controlan clínicamente y, cuando los ratones mueren o necesitan ser sacrificados al final del experimento, se examinan por microscopía o PCR los tejidos en busca de la presencia de *T. gondii* (Opsteegh et al., 2016).

Si la muestra a analizar contiene parásitos viables, éstos se diseminarán por todo el organismo, *T. gondii* tiene alta afinidad por tejidos neuronales (ojo y cerebro) además de los tejidos musculares (esquelético y cardíaco), (Cabezón et al., 2012; Cademartori et al., 2014; Dubey, 2009b; Hill et al., 2005; Ortega-Pacheco et al., 2013; Van der Giessen et al., 2007). En ratones sobre todo se analizan el líquido peritoneal o el cerebro. En cerdo se selecciona el corazón como sitio de predilección y el diafragma como tejido comestible representativo para la gran mayoría de estudios (Opsteegh et al., 2016). El bioensayo es una técnica eficaz y aporta resultados válidos, pero principalmente implica problemas éticos y de bienestar animal además de resultar laboriosa y cara. Para limitar el uso de ratones o gatos de experimentación, se suele realizar un screening a los animales usando una técnica indirecta y sólo los seropositivos se seleccionan para confirmar la viabilidad. Esta estrategia suele ser útil cuando hay una buena correlación entre los métodos directos e indirectos. La probabilidad de detectar el parásito en animales seropositivos es alta en cerdos, pollos, ovejas y cabras, y baja en caballos y en vacuno (Opsteegh et al., 2016).

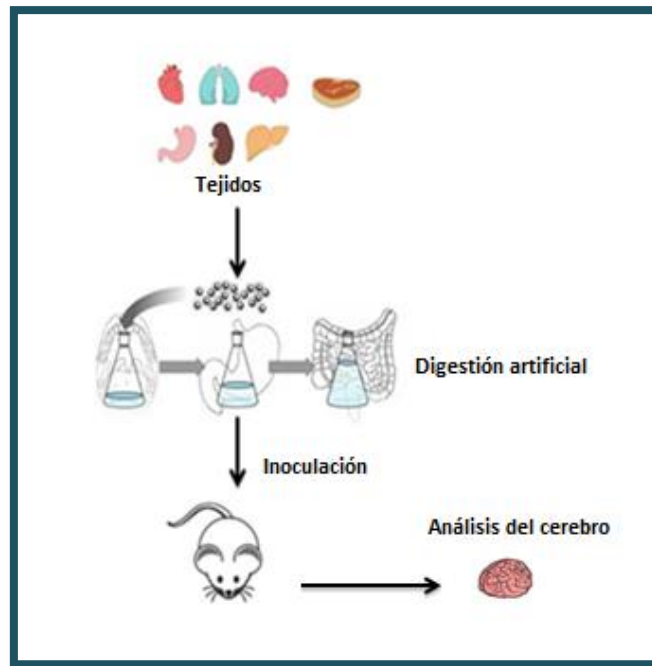


Figura 23. Procedimiento más común de Bioensayo en ratón.

15.2.5. Cultivo celular

Un cultivo celular es una técnica que permite el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniéndose sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Esta técnica ha sido muy utilizada por laboratorios e investigación científica, ya que permite estudiar toda la biología y bioquímica celular además de las interrelaciones celulares, aportando aplicaciones específicas en sectores como parasitología, virología, nuevos métodos de detección de patógenos, desarrollo de fármacos, siendo actualmente imprescindibles en el estudio oncológico.

Desde el primer cultivo *in vitro* para *T. gondii* se han desarrollado una amplia variedad de líneas celulares y métodos de cultivo para el aislamiento del parásito (Calicó et al., 1991; Derouin, Mazon, & Garin, 1987; Diab & El-Bahy, 2008; Domzig et al., 1993), para la producción de antígenos para pruebas inmunológicas (Al-Adhami et al., 2016; Ashburn et al., 2000; Meira et al., 2008; Verhofstede; Warren & Russ, 1948), fines terapéuticos (Bunetel et al., 1995; Fichera et al., 1995) y estudios de vacunación (Costa-Silva et al., 2008; Garcia et al., 2005; Lee et al., 2018; Xue et al., 2008).

Opsteegh et al. (2016) ha concluido que *T.gondii* se puede cultivar en varias líneas celulares, pero no se ha llegado a un consenso de cuál es la mejor (Saadatnia et al., 2010), aun así las más comúnmente utilizadas son las líneas continuas, Vero (Baba, Kitoh & Takashima, 2016; Dadimoghaddam et al., 2014; Zintl et al., 2009), HeLa (Değirmenci et al., 2011), THP1 (Cuéllar

et al., 2012), HEP-2 (Diab & El-Bahy, 2008), Marc-145 (Juránková et al., 2013) y HFF (Barbosa et al., 2012).

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo desventajas que hay que tener en consideración, como por ejemplo, que se trata de una técnica sensible: el crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes habituales (hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas) y además, dado que proceden de organismos pluricelulares, precisan para crecer una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial en unas condiciones concretas de pH, osmolaridad, temperatura, viscosidad y tensión superficial. Esto supone además, la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante tanto a nivel instrumental como del personal, que requiere de cualificación.

En cuanto a la biología de la célula en el cultivo, una vez se alcanza la confluencia celular es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Los taquizoitos sólo pueden desarrollarse y proliferar dentro de las células. Una vez dentro de la célula blanco, el taquizoito lleva a cabo su proliferación intracelular mediante endodiogenia. Los ratios de invasión y crecimiento varían dependiendo de la cepa y el tipo de célula huésped. Una vez los taquizoitos entran en una célula hospedadora, hay un período de latencia variable antes de que el parásito se divida, y esta fase de latencia es dependiente del parásito; cepas virulentas en ratón de *T. gondii* se multiplican más rápido en cultivo celular que las cepas avirulentas, y algunas forman más rosetas que otras (Dubey, 1998).

El desarrollo de ensayos de viabilidad para evaluar el riesgo de infección al ingerir matrices alimentarias, que no se basen en el uso de animales de experimentación sería muy valioso. El uso de métodos basados en el cultivo celular es limitado y se describe principalmente para muestras de fluidos en las que pueden esperarse taquizoitos (por ejemplo, exudado peritoneal o fluido amniótico). Se ha probado a cultivar los homogeneizados de carne o sedimentos de la digestión artificial, pero las tasas de éxito no han sido las esperadas (Opsteegh et al., 2016). Ejemplo de ello fue el estudio realizado por Warnekulasuriya et al. (1998) que llevaron a cabo dicho procedimiento con carne homogeneizada pero, tras evaluar los resultados, sugirieron que el proceso de purificación de taquizoitos o los contaminantes de la carne o embutidos, podrían tener efectos citopáticos y comprometer la evaluación de la viabilidad. Asimismo, Genchi et al. (2017) aplicaron esta misma técnica en jamones de Parma, y aunque los resultados sugirieron que la siembra del tejido muscular digerido podría ser un método para determinar la viabilidad del parásito, tuvieron múltiples problemas de contaminación que podrían aportar resultados poco fiables.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo una infección experimental porcina que se ha utilizado para alcanzar dos objetivos: evaluar metodologías de análisis de *T. gondii* en animales vivos y en carne; y estudiar la influencia del proceso tecnológico del curado del jamón y otros productos curados en la viabilidad de *T. gondii*.

Se ha realizado una evaluación de las técnicas indirectas (IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies) y directas (qPCR) con la finalidad de seleccionar las más adecuadas para la detección del parásito y así aplicarlas para el posterior estudio de evaluación del riesgo. Como técnica directa se ha empleado la qPCR, y con el fin de conseguir una mejora en la sensibilidad se han evaluado distintos tratamientos previos a la extracción del DNA (digestión péptica, liofilización y muestra sin tratar; el mejor tratamiento se ha utilizado para realizar el análisis de distintos tejidos y así conocer su distribución y el tejido idóneo para detectar la presencia de *T. gondii* en el cerdo.

Asimismo, y con el objetivo de aportar datos actuales de seroprevalencia porcina, así como de prevalencia de *T. gondii* en carne a nivel nacional, se han analizado sueros y diafragmas de cerdos blancos e ibéricos, obtenidos en mataderos de toda España.

Se ha llevado a cabo el curado de perniles procedentes de cerdos infectados experimentalmente, y se ha evaluado, mediante bioensayo en ratón, la viabilidad de *T. gondii* al final del proceso tecnológico. Por otro lado, se ha evaluado la técnica qPCR para la detección del parásito en los productos curados. Además, se ha realizado un estudio preliminar con embutidos procedentes de tejidos de dichos cerdos infectados. En ambos casos, se ha analizado la composición físico – química de los productos listos para el consumo (a_w , NaCl, nitratos, nitritos, grasa y pH) y se ha valorado la posible implicación de éstos en la supervivencia del parásito.

Finalmente, se ha realizado un estudio nacional analizando la presencia y viabilidad de *T. gondii* en jamón y embutidos curados listos para el consumo obtenidos de distintos comercios de venta al por menor y los resultados se han relacionado con la composición físico – química del producto y/o parámetros tecnológicos relacionados con el procesado que aparecen en el etiquetado.

Estos datos nos han permitido contribuir al proceso de evaluación del riesgo de *T. gondii* en la industria cárnica, concretamente en el de elaboración de productos curados, y aportar medidas para su gestión.

1. Infección experimental con *Toxoplasma gondii*

La infección experimental se realizó con ooquistes de la cepa VEG de *T. gondii* (genotipo III), que se caracteriza por su capacidad cigogénica. La cepa nos la suministró el Dr. J. L. García del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva de la Universidad Estadual de Londrina (Brasil). El envío y recepción de la cepa se realizó con la autorización del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad para la importación de muestras biológicas, y por medio de los diferentes trámites necesarios para su despacho en aduana.

1.1. Comprobación de la infectividad de la cepa VEG de *Toxoplasma gondii*

Se comprobó la viabilidad de la cepa VEG de *T. gondii* mediante bioensayo en ratón.

Todos los ensayos que conllevaron el uso de ratones de experimentación se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Estas instalaciones y servicios cumplen con todos los requisitos legales que marca la legislación vigente (Real Decreto 53/2013). Los ensayos realizados fueron autorizados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Informe favorable PI55_14) y los procedimientos de trabajo por el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Zaragoza.

Se emplearon ratones de laboratorio de la raza Swiss CD1 (hembras de 20-25 g), procedentes de la casa comercial Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Todos los animales recibidos llevaban un certificado sanitario de la empresa proveedora, garantizando la ausencia de patógenos. Una vez recibidos, se les aclimató durante una semana en las instalaciones.

Los animales se alojaron en cubetas convencionales ventiladas de forma individual con un filtro cobertor. Los cambios de cubeta se realizaron en una cabina de flujo laminar (Bio II A, Telstar), donde todo el material necesario para el alojamiento y mantenimiento de los animales se encontraba limpio y desinfectado. La dieta se trató con irradiación ionizante, y en ella se garantizaron los aportes necesarios de vitaminas, proteínas, fibra y grasa.

En la Figura 24, se muestra una fotografía de uno de los viales recibidos que contiene la suspensión de ooquistes de *T. gondii* en ácido sulfúrico al 2%.



Figura 24. Vial con la suspensión de ooquistes

Una vez recibidos los ooquistes, se llevó a cabo la preparación del inóculo con el fin de comprobar la infectividad de la cepa. Se procedió al recuento de ooquistes esporulados (infectivos) mediante cámara o hemocitómetro de Neubauer (BRAND™, Termofisher) con visualización en microscopio convencional (NIKON) con el objetivo de inmersión 100X (Figura 25) y se prepararon distintas soluciones en PBS.

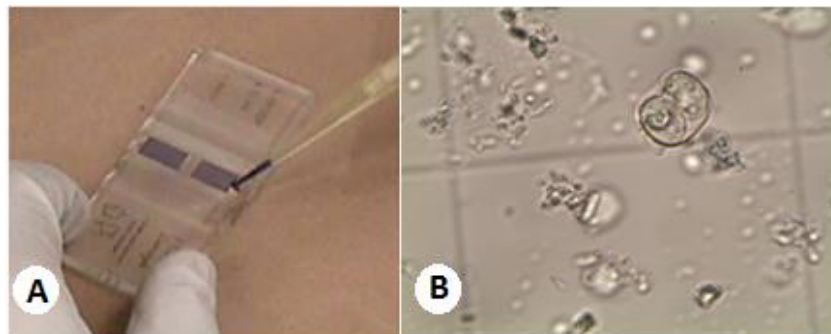


Figura 25. Recuento de ooquistes esporulados. A) Llenado del hemocitómetro. B) Imagen al microscopio de un ooquiste esporulado.

Se utilizaron 3 lotes de ratones de 4 animales cada uno (n=12) y cada lote recibió por vía oral una determinada dosis de ooquistes (100, 60 y 30 ooquistes).

Posteriormente, se llevó a cabo una vigilancia diaria de los animales para detectar posibles síntomas clínicos o signos de estrés, sufrimiento y angustia.

A los 60 días p.i. se extrajo sangre a los ratones. La extracción de sangre se realizó mediante punción de la vena mandibular con agujas estériles de 0,5 x 16 mm (Terumo) y recogiendo la muestra en Eppendorfs de 1,5 ml. Para la obtención de los sueros, las muestras de sangre se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Universal 32 R, Hettich) y el sobrenadante se transfirió a eppendorfs de 0,5 ml. Los sueros fueron rotulados con el código del ratón y se analizaron mediante la técnica IFI.

Seguidamente, se sacrificaron los animales introduciéndolos en una cámara con CO₂ situada dentro de una cabina de flujo laminar (Bio II A, Telstar). Posteriormente, se extrajeron los cerebros de los animales empleando material estéril para evitar posibles contaminaciones cruzadas. Estos órganos se introdujeron en eppendorfs de 5,0 ml, almacenándose a -20°C para su posterior análisis por qPCR con el objetivo de determinar DNA de *T. gondii* y así confirmar la viabilidad del parásito. Una vez confirmada la infectividad del parásito, los lotes de ratones se mantuvieron como reservorio de la cepa, y fueron utilizados en actividades posteriores como la evaluación de los tratamientos previos a la extracción del DNA.

A continuación, se detallan los protocolos de análisis de sueros mediante IFI y de análisis de cerebros mediante qPCR para la detección de *T. gondii*.

1.1.1. Análisis de sueros de ratón mediante IFI

El protocolo de análisis fue el siguiente (Figura 26):

1. Preparación de las diluciones séricas 1:20 con el buffer de dilución 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) (VMRD).
2. Adición de 10 µL de cada una de las diluciones en cada pocillo de los portaobjetos *MegaFLUO*[®] *TOXOPLASMA gondii* (Eurovet) donde se encuentran fijados los taquizoitos inactivados.
3. Incubación de los portaobjetos en una cámara húmeda, en oscuridad, en estufa Memmert durante 30 minutos a 37°C.
4. Lavado de los portaobjetos mediante PBS 1x (preparado a partir del 4X *FA Rinse Buffer* (VMRD)) colocándolos sumergidos en una jarra coplin en agitación con un agitador magnético (*Agimatic-N-Selecta*) durante 10 minutos para eliminar todos los anticuerpos no fijados al antígeno. Una vez desechado el tampón, realización de otro lavado igual al anterior.
5. Preparación de la anti-IgG de ratón de DakoCytomation a dilución 1:10 en PBS a pH 7,2 (bioMérieux), añadiendo una gota de azul de Evans al 0,2 % (bioMérieux). Una vez homogenizada la solución, preparación de alícuotas que son almacenadas en congelación a -20 °C hasta el momento de su utilización.
El azul de Evans es un reactivo que facilita el diagnóstico, ya que potencia el color rojo de los taquizoitos fijados de las muestras negativas en el microscopio de fluorescencia, y es este contraste cromático el que nos permite discernir claramente entre un resultado positivo y uno negativo.
6. Adición de 10 µl de la dilución de la anti-IgG del ratón (BioMérieux).

7. Incubación de los portaobjetos en cámara húmeda en oscuridad durante 30 minutos a 37°C.
8. Lavado de los portaobjetos de idéntica forma a la descrita en el paso 4 pero recubriendo la jarra para impedir que la luz dañe el fluorocromo que lleva conjugado la anti-IgG. Al terminar, realización de un último lavado de 10 minutos con agua destilada con las mismas condiciones.
9. Adición de gotas del líquido de montaje *FA mounting fluid* (VMRD) en el portaobjetos con el fin de colocar los cubreobjetos 24 x 50 mm (Deltalab).
10. Observación de los portaobjetos en un microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse 80i) con un objetivo de 40X aplicando luz ultravioleta.

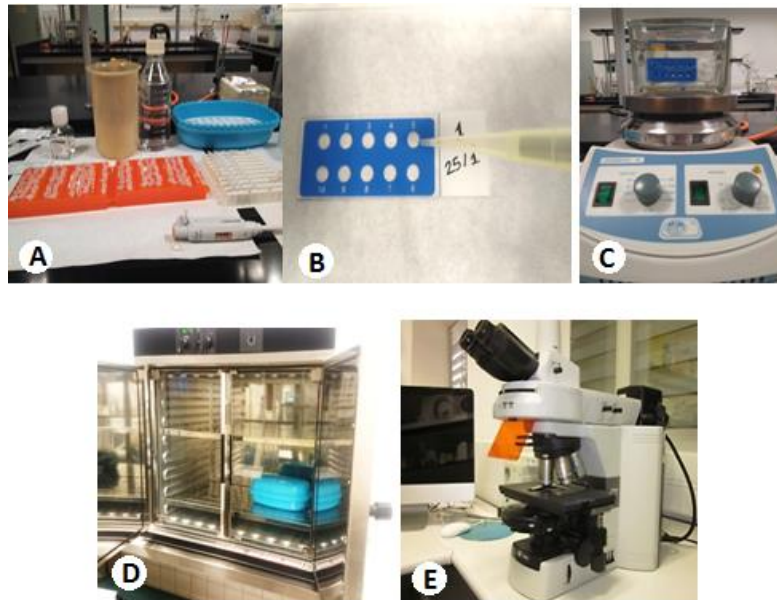


Figura 26. Imágenes de las distintas etapas del protocolo de análisis mediante IFI. A) Preparación de las diluciones séricas. B) Colocación de las muestras en los portaobjetos. C) Lavado de los portaobjetos. D) Incubación de los portaobjetos en cámara húmeda en estufa a 37°C. E) Observación de los portaobjetos al microscopio de fluorescencia.

Para la lectura e interpretación de resultados se siguen las siguientes consideraciones: cuando se observa fluorescencia verde a lo largo de toda la membrana del parásito en al menos el 80% de los taquizoitos fijados en el pocillo, la muestra se considera positiva. Por el contrario, cuando se observan los taquizoitos de color rojo o fluorescencia únicamente en la periferia, el resultado es considerado negativo (Figura 27). El punto de corte fue de 1:10. Éste fue seleccionado en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio (Herrero et al., 2016). Las muestras que presentaron fluorescencia en la dilución 1:10 o en diluciones superiores se consideraron positivas.

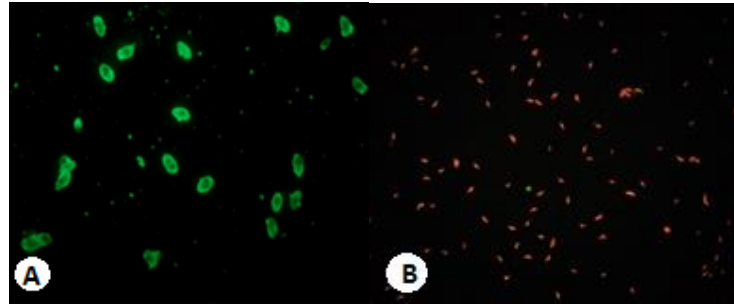


Figura 27. Observación al microscopio de fluorescencia de los resultados de la técnica IFI. A) Resultado positivo a *T. gondii*. B) Resultado negativo a *T. gondii*.

1.1.2. Análisis de cerebros de ratón mediante qPCR

1.1.2.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA se utilizó el kit *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification* y el aparato automatizado *Maxwell® 16* (Figura 28) de la casa comercial Promega.



Figura 28. Aparato automatizado *Maxwell®* para la extracción del DNA.

Todos los reactivos empleados a lo largo del protocolo fueron los proporcionados en el kit. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Homogenización de 15mg de tejido cerebral con un micropistilo con motor (Kimble) en eppendorfs de 0,5 ml en 300 μ L del buffer de lisis y 35 μ L de Proteinasa K.
2. Incubación de los tubos durante 1 hora a una temperatura de 65°C en un bloque calefactor (Life Technologies).
3. Colocación de cartuchos (incluidos en el kit) en la plataforma del aparato automatizado *Maxwell® 16* en función del número de muestras a extraer el DNA.
4. Colocación de los émbolos (incluidos en el kit) en la plataforma, 200 μ L de muestra y 100 μ L del buffer de elución e introducción de la plataforma lista en el aparato *Maxwell® 16* de Promega.

5. Tras 40 minutos, el aparato emite una señal acústica indicando que el proceso ha finalizado y podemos recoger los DNAs extraídos.

1.1.2.2. Evaluación de la pureza y concentración del DNA extraído

Una vez extraído el DNA, se debe comprobar la pureza y calidad del mismo antes de proceder a la amplificación del fragmento de DNA por qPCR. Para ello, se utilizó el espectrofotómetro *Nanodrop TM 2000 UV-Vis* (Thermo Scientific) (Figura 29), un equipo que mide la absorbancia a diferentes longitudes de onda.



Figura 29. Colocación de muestra en el espectrofotómetro *Nanodrop TM 2000 UV-Vis*.

Las longitudes de onda a la que absorben los ácidos nucleicos y las proteínas son 260 y 280 nm, respectivamente. Para determinar la pureza se calcula el ratio A_{260} / A_{280} . La calidad óptima de DNA tiene lugar cuando esta relación se encuentra entre 1,7 y 2,0. Valores superiores a 2 indican contaminación con RNA, mientras que datos inferiores a 1,7 reflejan una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas.

Además, como comprobación paralela a la espectrofotometría de la correcta extracción del DNA, se evaluó la cantidad presente del gen de la β -actina por qPCR en cada una las muestras. Este valor se utilizó como control interno (CI) de la extracción. Se observó que las curvas de amplificación y las temperaturas a las que aparecían los productos en la curva de disociación fueron muy similares entre sí. Los valores de los ciclos (Ct) del gen de la β -actina tuvieron un media de 24,22 y una desviación estándar de 0,21.

1.1.2.3. Condiciones de análisis por qPCR

1.1.2.3.1. Cebadores seleccionados

La amplificación del DNA del parásito se llevó a cabo utilizando Syber Green como fluoróforo. Los cebadores fueron seleccionados en un estudio previo (Herrero et al., 2017). Los cebadores (*forward*, *reverse*) que mostraron mejores resultados en la detección del control positivo fueron los que permitían la amplificación de la secuencia repetitiva de 529 bp (529RE), una secuencia que presenta 300 copias en el genoma de *T. gondii*. Asimismo, para confirmar la

especificidad de los cebadores durante la amplificación se eligió el par de cebadores SAG (AlquizVetek S.L.), que amplifican el fragmento de DNA que codifica una proteína de membrana del parásito que presenta una sola copia en su genoma.

Estos cebadores fueron desarrollados por la empresa AlquizVetek S.L. mediante la aplicación de OligoPerfect™ Designer de Thermofisher. Los ensayos para la elección de cebadores se realizaron con diluciones seriadas de un control positivo de DNA de *T. gondii* (10^4 taquizoitos de la cepa ME49). Este control fue comprado a la empresa SALUVET del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Tras las amplificaciones de las secuencias 529 bp (529RE) (Figura 30) y SAG (Figura 31) se observó que las curvas de amplificación y de disociación eran las esperadas en la detección de cada uno de los fragmentos de DNA de *T. gondii*.

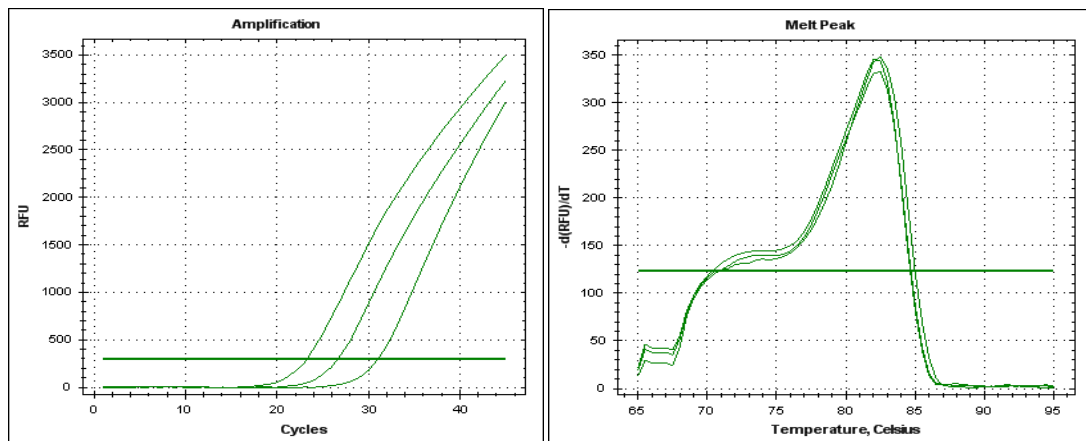


Figura 30. Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador repetitivo de 529 bp. Fuente: Herrero (2019).

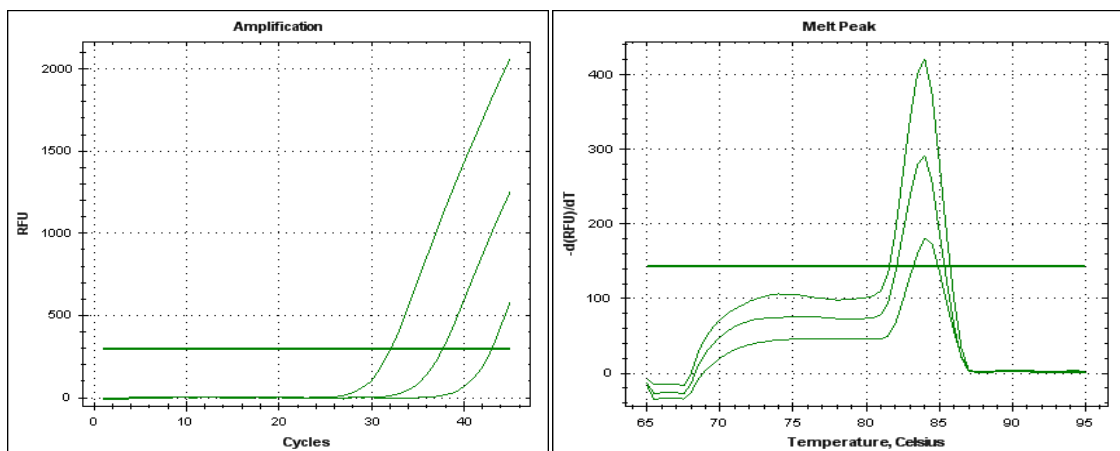


Figura 31. Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador SAG. Fuente: Herrero (2019).

En principio, se determinó que los cebadores que se iban a utilizar para la detección del DNA de *T. gondii* en las muestras de este estudio serían únicamente los que amplifican el fragmento repetitivo de 529 bp y el SAG. El primer fragmento se detecta aproximadamente a unas 6 Ct antes que el segundo debido al mayor número de copias en el genoma del parásito que posee. Las temperaturas de disociación son 81°C para el cebador repetitivo de 529 bp y 85 °C para el cebador SAG (Figura 32 (derecha)).

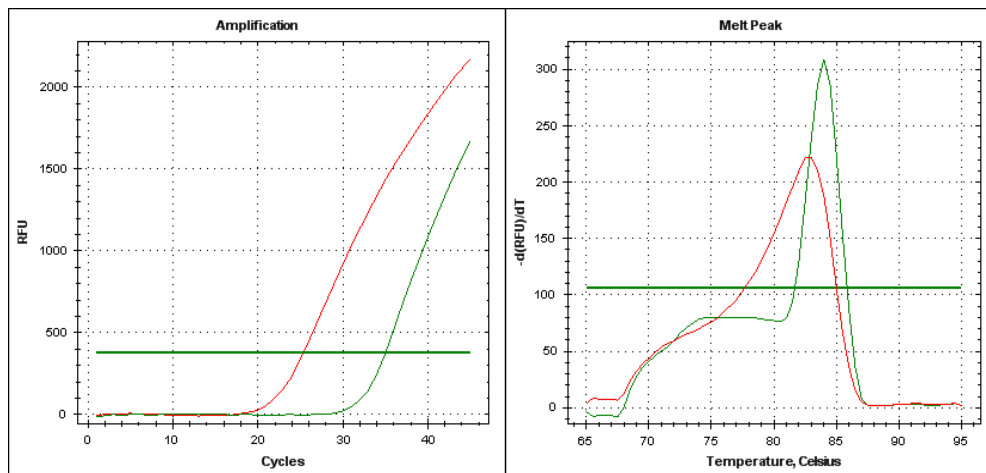


Figura 32. Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador repetitivo de 529 bp (en rojo) y el SAG (en verde). Fuente: Herrero (2019).

Sin embargo, debido a la posibilidad de que hubiera una baja carga parasitaria en las muestras y por tanto, la incapacidad de detección mediante los cebadores SAG, dada su baja sensibilidad, se añadió un tercer par de cebadores al diagnóstico. Los cebadores escogidos fueron los que amplifican el gen B1, una secuencia que presenta 20-30 copias en el genoma de *T. gondii*. Estos cebadores amplifican aproximadamente 3 Ct después de los cebadores 529RE y la temperatura de disociación es de 84°C (Figura 33).

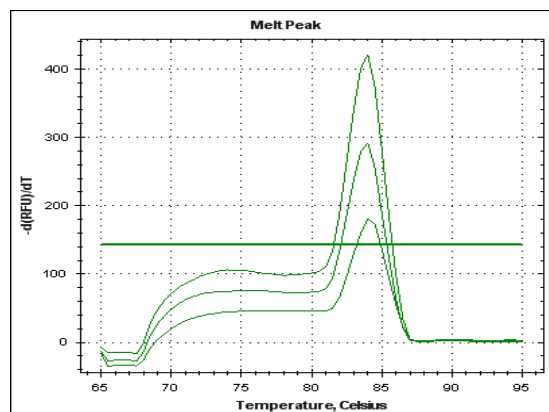


Figura 33. Curva de disociación con el cebador B1.

1.1.2.3.2. Protocolo qPCR y condiciones de amplificación

Para la amplificación del DNA diana o *target* mediante qPCR se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Preparación de la mezcla de reacción para cada pocillo de la placa: 10 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de Mastermix de Promega (Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, buffers para la reacción, SYBR Green) y 0,4 µl de cada uno de los cebadores (*Forward*, *Reverse*).
2. Adición de 2,25 µl del DNA de cada una de las muestras objeto de estudio en cada pocillo de la placa y en los pocillos contiguos una dilución 1:10 de cada una de las muestras.
3. Adición de 2,25 µl del DNA del control positivo en un pocillo y 2,25 µl del DNA del control negativo en otro pocillo de cada una de las placas.

Todo el proceso se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar vertical (Mini-V/PCR, Telstar). Una vez preparada la placa de 96 pocillos (Figura 34A), se colocó en el termociclador CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System de Bio-Rad (Figura 34B), previamente programado.

Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo ya optimizado en un estudio previo (Herrero et al., 2017):

1. Una etapa inicial de 94 °C durante 4 minutos.
2. 44 ciclos de 55 °C durante 5 segundos.
3. 79 °C durante 5 segundos.
4. 94 °C durante 4 segundos.
5. Curva de disociación desde los 60 °C a 94 °C con incrementos de 0,5 °C.

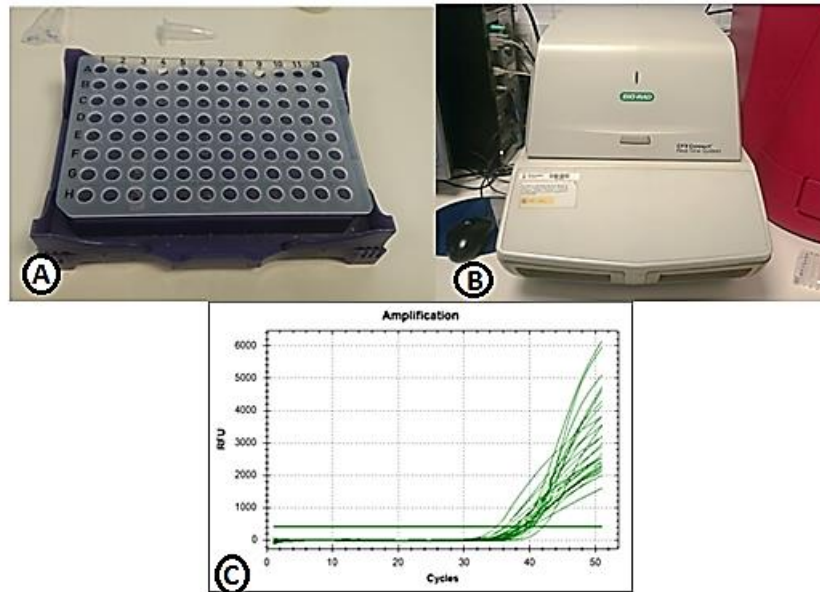


Figura 34. Imágenes del procedimiento de qPCR. A) Placas de 96 pocillos B) Termociclador CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System. C) Curva de amplificación. Fuente: Herrero (2019).

Se estableció el valor Ct del cebador repetitivo de 529 bp obtenido de la curva de amplificación como dato para calcular la concentración de DNA del parásito, ya que éste es el cebador más sensible. Los cebadores SAG/B1 fueron utilizados como confirmación de la positividad de la muestra. Por ello, para considerar una muestra positiva fue imprescindible que lo fuera al menos con uno de estos dos pares de cebadores.

1.1.2.3.3. Cuantificación de la carga parasitaria en las muestras

Para realizar la cuantificación de las muestras en la qPCR se utilizó la curva de calibrado (Figura 35) obtenida de un trabajo previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación (Herrero et al., 2017). En este estudio se realizaron rectas patrón de muestras a las que se le añadieron diluciones seriadas 1:10 de taquizoitos de la cepa ME49 de *T. gondii* suministrados por SALUVET. La ecuación de la curva de calibrado fue la siguiente: $Y = - 3,329 x + 38,76$.

La eficiencia obtenida fue del 99,7%, calculada a través de la pendiente de la recta y mediante la fórmula: $E = 10^{[-1/pendiente]} - 1$. En este caso la eficacia de la pendiente fue de 3,329 y estuvo muy cerca de la óptima (3,321). La medida de la bondad del ajuste realizado en la curva se determinó con el coeficiente de determinación, que fue $r^2 = 0,992$. Asimismo el punto de intersección de la curva en el eje Y fue a un ciclo de 38,76, por lo que se estimó que a partir de un ciclo 38 las muestras se consideraron negativas.

Para calcular las cargas parasitarias del parásito presentes en las muestras se empleó un software prestado por AlquizVetek S.L. En este programa informático se añadió la ecuación de la recta de calibrado y los valores de Ct obtenidos en cada uno de los análisis. El programa nos

proporcionó la equivalencia de estos ciclos de qPCR a la concentración de *T. gondii* en las muestras expresada en parásitos/gramo.

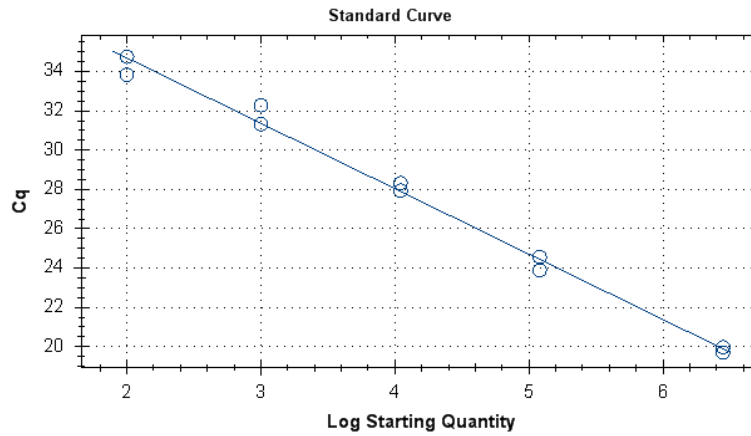


Figura 35. Curva de calibrado obtenida de las diluciones del control positivo.

Gracias a los valores de Ct obtenidos con los cebadores del gen de la β -actina se consiguió subsanar los posibles pequeños errores de pesada cometidos en la extracción del DNA. Una vez obtenidos los Cts de todas las muestras analizadas, se hizo la corrección con los ciclos obtenidos de actina de cada una de ellas. Los valores de Cts corregidos se obtuvieron al utilizar el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_T$) siguiendo la metodología descrita por Livak & Schmittgen (2001).

Para el cálculo de las copias de *T. gondii* presentes en las muestras se utilizó el software CFX Manager 2.1 de Bio-Rad, en el cual los valores de Ct de las muestras se interpolaron en la curva de calibrado (Figura 10).

1.2. Infección experimental porcina

Una vez comprobada la viabilidad, se llevó a cabo la infección experimental de los cerdos en las instalaciones P3 del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid.

El ensayo se realizó con 10 cerdos (5 hembras y 5 machos castrados) que al inicio de la experiencia tenían 4 meses de edad. Los cerdos provenían de una granja tipo A3 o indemne de Aujesky, acompañados de la correspondiente Guía de Origen y Sanidad Pecuaria. Los animales estuvieron alojados en salas controladas y/o confinadas de grado D, según las *buenas prácticas de fabricación* (BPM), donde entre otras medidas, el aire es filtrado tanto a la entrada como a la salida mediante filtros HEPA de alta eficacia. A su llegada a las instalaciones se identificaron con crotales con un número del 1 al 9 aquellos animales que iban a ser infectados, y con el número 10 al cerdo control negativo.

La dosis de inóculo utilizada fue de 4000 ooquistes para cada cerdo (dosis recomendada por el Dr. J. L. García). La administración del inóculo se realizó por vía oral. Al cerdo control negativo se le administró únicamente PBS. A los 5 días post-infección (p.i.), a todos los cerdos se les inyectó una solución de sulfadiacina (350 mg) y trimetoprim (70 mg), a una dosis de 0,6 ml/10 kg/día durante 2-3 días, para paliar los posibles síntomas clínicos y favorecer el enquistamiento (Alexander & Hunter, 1998; García et al., 2006; Tsutsui et al., 2007). Tras la inoculación de los cerdos con *T. gondii* se realizó una observación diaria de posible sintomatología: fiebre, diarrea, tos, disnea, apetito, apatía y estado general.

1.2.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre los días 0, 8, 15, 22, 29, 36, 50 y 63 p.i. Para la obtención de los sueros, las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Universal 32 R, Hettich) y el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf de 0,6 ml. Éstos se mantuvieron en congelación a - 20° C hasta su análisis.

Los cerdos se sacrificaron a los 63 días p.i. en las instalaciones P3 de VISAVET. De cada cerdo se tomaron los 4 perniles, corazón, lengua, diafragma y lomo. El transporte hasta Zaragoza se realizó en un vehículo refrigerado.

2. Evaluación de técnicas de análisis de *T. gondii*

Se realizó una evaluación de técnicas indirectas y directas de análisis de *T. gondii* con el fin de seleccionar las más idóneas para la detección del parásito y así aplicarlas para el posterior estudio de evaluación del riesgo. Dicha evaluación se llevó a cabo mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos tanto por técnicas indirectas y directas, como del estudio comparativo realizado entre ambas.

2.1. Técnicas indirectas

Se realizó la evaluación de las técnicas IFI (*MegaFLUO*[®] *TOXOPLASMA gondii* (Eurovet)), MAT (Toxo – Screen DA[®] (Biomérieux)), ELISA monoespecie (ELISA PRIOCHECK[®] Toxoplasma Ab porcine) y ELISA multiespecies (ID Screen[®] Toxoplasmosis Indirect Multi species) para el análisis serológico de *T. gondii*. Para ello, se emplearon tanto sueros procedentes de cerdos sometidos a la infección experimental como de cerdos no infectados experimentalmente. Los análisis mediante las técnicas IFI, MAT y ELISA monoespecie se realizaron en nuestro laboratorio, mientras que los análisis mediante la técnica ELISA multiespecies fueron realizados por personal del grupo VISAVET.

Para analizar las diferentes técnicas se utilizaron los sueros recogidos a los 10 animales (9 cerdos infectados y un cerdo control negativo) en los días 0, 8, 15, 22, 29, 36, 50 y 63 p.i. Los análisis se hicieron por triplicado y en total se analizaron 80 sueros. Se estudió la cinética de respuesta de anticuerpos a lo largo del tiempo de infección con *T. gondii* con cada uno de los test serológicos utilizados.

Para llevar a cabo la evaluación de las diferentes técnicas en cerdos no infectados experimentalmente, se utilizaron 40 sueros porcinos procedentes de un estudio de seroprevalencia previo realizado por nuestro grupo de investigación. Los sueros se habían analizado previamente por IFI (20 sueros negativos y 20 positivos con títulos de 1:80-1:1280) (Herrero et al., 2016). Los análisis se realizaron por triplicado.

Todas las muestras de suero fueron conservadas en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

2.1.1. Análisis mediante la técnica IFI

El protocolo de la técnica IFI fue el mismo que el utilizado en el punto 1.1 para analizar la presencia de *T. gondii* en ratones mediante el análisis de los sueros, aunque en este caso se utilizó una anti-IgG específica de cerdo (VMRD) y que el punto de corte fue el establecido previamente en un estudio realizado en nuestro laboratorio y que se situaba en 1:20.

2.1.2. Análisis mediante la técnica MAT

Se utilizó el kit Toxo – Screen DA® (Biomérieux), siguiendo el protocolo de análisis descrito por el fabricante que se describe a continuación.

1. Preparación de diluciones 1:20 en PBS de los sueros a analizar y los sueros control (positivo y negativo).
2. Adición de 25 µl de cada uno de los sueros problema a los distintos pocillos de la placa proporcionada en el kit.
3. Adición de 25 µl de 2-Mercaptoetanol 0´2 mol/l a todos los pocillos, que diluye los sueros a 1:40.
4. Agregación de 50 µl de la suspensión de antígeno proporcionado por el kit y diluido al 1:5 en todos los pocillos, homogeneizando la mezcla varias veces.
5. Reserva de un pocillo para el control del antígeno en el que se añaden 25 µl de 2-Mercapto-etanol 0´2 mol/l, 25 µl de PBS y el antígeno diluido al 1:5.
6. Tapado de la placa con hoja autoadhesiva. Se deja a temperatura ambiente y protegido de la desecación.

7. Lectura a las 24 horas (Figura 36).

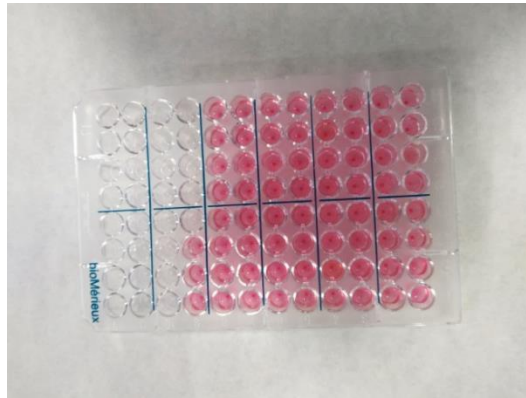


Figura 36. Imagen de una placa de microtitulación de MAT a las 24 horas de incubación.

Para la lectura e interpretación de resultados se siguen las siguientes consideraciones: cuando se observa aglutinación de los *T. gondii* en forma de velo tapizando aproximadamente la mitad del pocillo, la reacción se considera positiva. En cambio, cuando se observa sedimentación de los *T. gondii* en forma de botón, la reacción se considera negativa. En el pocillo reservado para el control de antígeno ha de haber sedimentación de los parásitos en forma de botón, indicando así el perfecto estado del antígeno y la validez de los resultados.

Si el resultado del screening es positivo, se cogen estas diluciones séricas a 1:20 y se efectúan diluciones seriadas a razón de 1/3 para conocer el título de anticuerpo. El punto de corte 1:40 es el establecido por el fabricante, de forma que las muestras que presentan aglutinación en la dilución 1:40 o en diluciones superiores se consideran positivas.

2.1.3. Análisis mediante la técnica ELISA monoespecie

Se utilizó el kit ELISA PRIOCHECK® Toxoplasma Ab porcine específico para la especie porcina. Todos los reactivos empleados a lo largo del protocolo fueron los proporcionados en el kit. El protocolo llevado a cabo fue el recomendado por el fabricante:

1. Preparación de las diluciones séricas en una placa sin tapizar: Adición en cada pocillo de 10 μ L de cada una de los sueros problema en cada pocillo y 90 μ L del líquido diluyente. Se procede de igual forma con el control positivo, el control positivo débil y el control negativo (cada uno de los controles se realiza el análisis por duplicado según las instrucciones del fabricante). Posteriormente, transferencia de 20 μ L de cada una de las diluciones realizadas en la placa sin tapizar a la placa de ensayo tapizada con taquizoitos y adición de 90 μ L del diluyente a cada pocillo.
2. Incubación de las muestras en la placa de ensayo durante 1 hora a temperatura ambiente.

3. Lavados de la placa de ensayo cuatro veces con 300 µL del líquido de lavado 1X. Eliminación del líquido restante golpeando la placa sobre un papel absorbente ya que la solución de lavado sobrante podría afectar a la reacción del sustrato.
4. Adición a cada pocillo de la placa de ensayo de 100 µL del conjugado diluido previamente al 1X (Adición de 400 µl de conjugado 30X a 11,6ml del diluyente del conjugado para una placa completa). Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Repetición del punto 3 del protocolo.
6. Adición de 100 µL del sustrato cromógeno (TMB) a cada pocillo de la placa de ensayo e incubación de la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Adición de 100 µL de la solución de frenado a cada pocillo de la placa de ensayo para detener el desarrollo del color. El color de los controles positivos cambiará de azul a amarillo (Figura 37 (A)).
8. Programación de la agitación de la placa de ensayo en el lector de placas ELISA (MULTISKAN EX, Thermo Labsystems) (Figura 37 (B)) durante 10 segundos y lectura a la densidad óptica de 450 nm antes de 15 minutos. Realización también de una lectura a la densidad óptica de 620 nm como filtro de referencia.

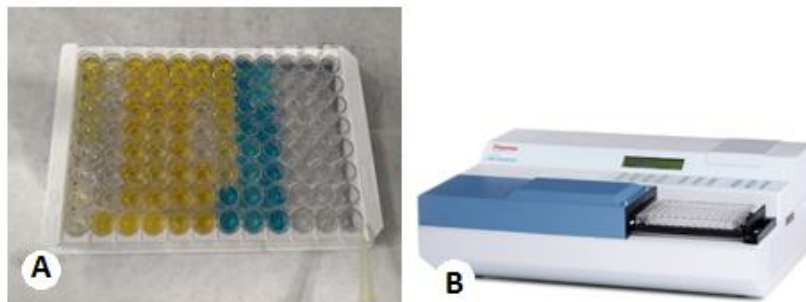


Figura 37. Imágenes del procedimiento de la técnica ELISA. (A) Adición de la solución de frenado a la placa de ensayo. (B) Espectrofotómetro MULTISKAN EX, Thermo Labsystems.

Los resultados, obtenidos en Densidad Óptica (DO) en el espectrofotómetro, se expresan como porcentaje de positividad (PP) aplicando la siguiente fórmula: $PP = \frac{(DO_{450nm} \text{ suero problema} - DO_{450nm} \text{ control negativo})}{(DO_{450nm} \text{ control positivo} - DO_{450nm} \text{ control negativo})} \times 100$.

Los criterios para asegurar la validez de los resultados son los siguientes: La densidad óptica media de los duplicados del control positivo a 450 nm (DO_{450nm}) debe ser superior a 1,2. El porcentaje de positividad (PP) promedio de los duplicados del control positivo débil debe ser superior a 35%. La DO_{450nm} media de los duplicados del control negativo debe ser inferior a 0,15.

Si no se cumplen estos criterios, los resultados no son válidos y se deben volver a realizar las pruebas. Se toma como punto de corte un valor de PP de 20%. Los resultados iguales o superiores del 20 de PP se consideran positivos. Los resultados inferiores al 20 de PP son negativos.

2.1.4. Análisis mediante la técnica ELISA multiespecies

Se utilizó el kit ELISA, ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi species, comercializado no sólo para detectar anticuerpos anti-IgG frente a *T. gondii* en la especie porcina sino también en rumiantes, perros y gatos. Todos los reactivos empleados fueron los proporcionados en el kit y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante:

1. Adición de 90 µL del líquido diluyente a cada pocillo de la placa tapizada con taquizoitos de *T. gondii* y 10 µL de cada uno de los sueros problema. Se procede de igual forma con el control positivo y el control negativo (cada uno de estos controles se realiza el análisis por duplicado según las instrucciones del fabricante).
2. Incubación de las muestras en la placa de ensayo durante 45 minutos ± 4 minutos a 21°C (± 5°C).
3. Lavados de los pocillos 3 veces con aproximadamente 300 µL de la solución de lavado.
4. Preparación del conjugado 1X diluyendo el conjugado 10X con el diluyente 3.
5. Adición de 100 µL del conjugado 1X a todos los pocillos.
6. Incubación de la placa de ensayo 30 minutos ± 3 minutos a 21°C (± 5°C).
7. Lavados de los pocillos 3 veces con aproximadamente 300 µL de la solución de lavado.
8. Adición de 100 µL de solución de revelación a todos los pocillos.
9. Lectura a 450 nm en el espectrofotómetro.

Los resultados, obtenidos en Densidad Óptica (DO) en el espectrofotómetro, se expresan como porcentaje S/P (%S/P) mediante la siguiente la fórmula: $\%S/P = (DO_{450nm} \text{ suero problema} - DO_{450nm} \text{ control negativo} / DO_{450nm} \text{ control positivo} - DO_{450nm} \text{ control negativo}) \times 100$.

Sólo son válidos los resultados si: La densidad óptica a 450 nm (DO_{450nm}) media de los duplicados del control positivo es superior a 0,350 y el cociente entre las DO_{450nm} medias de los duplicados del control positivo y del control negativo es superior a 3.

Si no se cumplen estos criterios, los resultados no son válidos y se debe volver a analizar las pruebas. Un resultado inferior o igual a 40% se considera negativo, entre 40 - 50% dudoso e igual o superior al 50% positivo.

2.2. Técnicas directas

Se utilizó como técnica directa la qPCR para la detección en carne de *T. gondii*. Con el fin de conseguir una mejora en la sensibilidad de la qPCR, ésta se empleó inicialmente para evaluar distintos tratamientos previos a la extracción del DNA (digestión péptica, liofilización y muestra sin tratar). El tratamiento previo que dió los mejores resultados se utilizó para analizar la presencia del parásito en diferentes tejidos procedentes de los cerdos infectados experimentalmente: corazón, lengua, pilares de diafragma y músculo (lomo y pernil) y conocer su distribución en los mismos

2.2.1. Evaluación de tratamientos previos a la extracción del DNA

El principal factor limitante de la sensibilidad de la metodología PCR para la detección de *T. gondii* en carne es la cantidad de muestra que puede ser analizada. En este sentido, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha informado sobre la existencia de métodos de concentración previos a la extracción del DNA del parásito, con objeto de aumentar la sensibilidad de la técnica (Opstreegh et al., 2016). Por este motivo, se evaluaron dos métodos de concentración de la muestra frente a la muestra sin tratar: digestión péptica y liofilización.

El protocolo seguido fue el siguiente: se utilizaron 9 ratones de experimentación y a cada uno se les administró oralmente entre 30-100 ooquistes de la cepa VEG de *T. gondii*. A los 60 días p.i., se sacrificaron los animales y la carne de éstos se picó, se mezcló y se homogenizó obteniendo un peso total de 196,8 g. La muestra de carne de ratón se mezcló con 253,2 g de carne de cerdo comercial. La muestra total tuvo un peso de 450 g.

El pool se dividió en 3 lotes de 150 g para cada uno de los Tratamientos: digestión péptica, liofilización y carne sin tratar. Se realizaron 3 réplicas de 50 g para cada uno de ellos que fueron procesadas individualmente.

El procedimiento de evaluación de los tratamientos previos y la carne sin tratar se resume en la Figura 38. Los protocolos de digestión péptica y liofilización se describen a continuación.

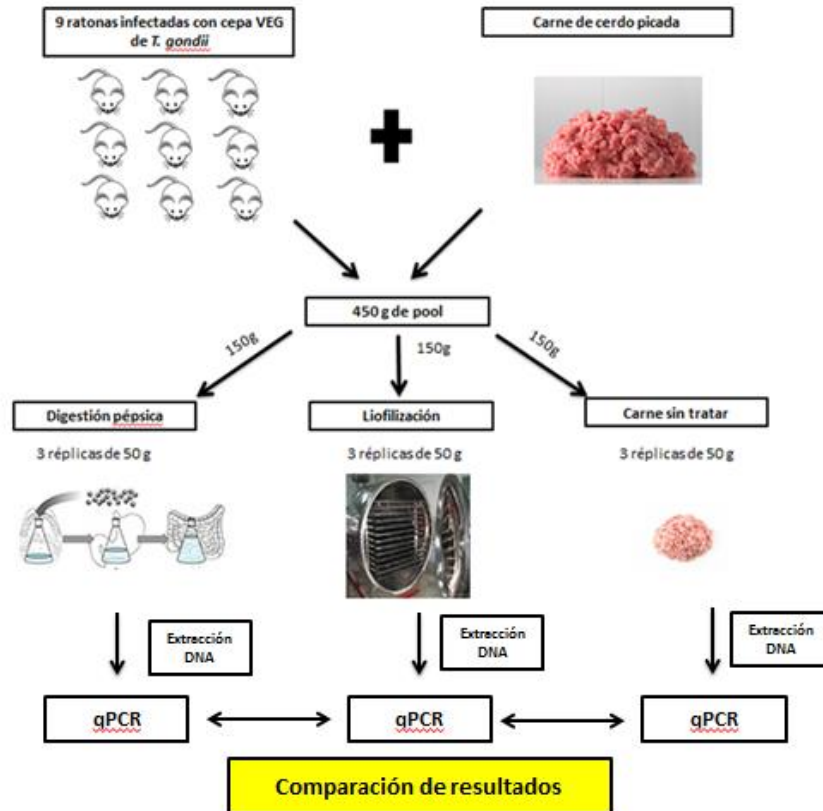


Figura 38. Esquema del procedimiento de evaluación de tratamientos previos a la extracción del DNA.

2.2.1.1. Digestión péptica

La digestión péptica de los tejidos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Dubey (1998) y modificado por Bayarri et al. (2010), que se describe a continuación (Figura 39):

1. Pesado de 50 g de tejido en un vaso de precipitados de 600 ml.
2. Adición de 125 ml de solución salina al 0,85 % (Panreac) a cada muestra. A continuación, homogeneización de la mezcla con ayuda de una batidora durante 30 segundos.
3. Lavado de los restos de muestra de la batidora con otros 125 ml de la solución salina (Panreac) y trasvasado de todo el contenido del vaso de precipitados a un matraz Erlenmeyer de 1.000 ml.
4. Adición de 250 ml de una solución péptica atemperada a 37 °C (pH ≈1), preparada con 5,2 g de pepsina con actividad 1:10.000 (Panreac), 10 g de cloruro sódico (Panreac), 14 ml de ácido clorhídrico al 25 % (Panreac) y agua destilada hasta completar los 1.000 ml.

El pH óptimo para la activación de la pepsina debe ser ≤ 2 , ya que a partir de un $pH > 3$ pierde su efecto proteolítico. Por ese motivo, una vez mezcladas las muestras con la solución péptica, se controló el pH de la solución final para

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

comprobar que estuviera en el rango de pH correcto. En el caso de que el pH no fuera el adecuado se corrigió con una solución de HCl o NaOH (Panreac).

5. Incubación del homogeneizado durante una hora a 37 °C en un baño termostático con agitación (Agimatic-N, Selecta).
6. Filtrado con un tamiz de 180 μm de poro (CISA) y recoger la muestra en un vaso de precipitados de 600 ml.
7. Centrifugación a 2.800 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Consul 21, Orto Alresa).
8. Tras descartar el sobrenadante, suspensión del sedimento con 20 ml de solución buffer fosfato a pH 7,2 (Panreac).
9. Adición de 15 ml de solución reciente de bicarbonato sódico al 1,2 % a pH 8,3 (Sigma-Aldrich).

El bicarbonato sódico sirve para neutralizar la pepsina y alcalinizar la solución a valores de pH cercanos a 6,5. Con ello se consigue detener la posible destrucción de los bradizoitos por el ácido.

10. Centrifugación de la mezcla a 2.800 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Rotofix 32, Hettich) y eliminación del sobrenadante.
11. Suspensión del sedimento obtenido con 3 ml de agua destilada.

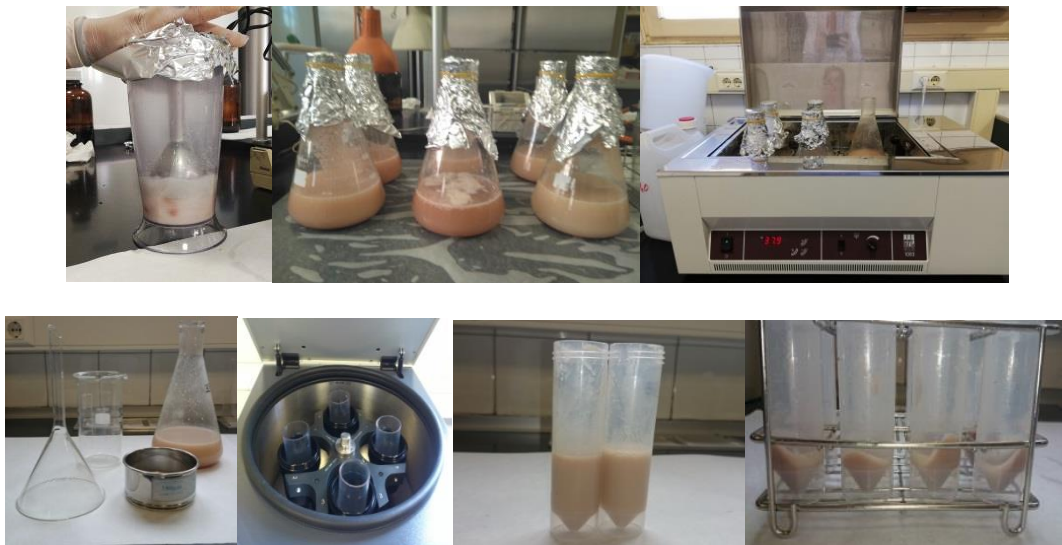


Figura 39. Fases del procedimiento de la digestión péptica.

Para evitar la contaminación cruzada, se llevó a cabo entre muestra y muestra un lavado del material empleado con jabón y agua caliente a una temperatura por encima de 82°C. Finalmente, se aclaró todo el material con agua destilada.

2.2.1.2. Liofilización

Tres muestras de 50g se sometieron a liofilización en un equipo de liofilización Heto-Holten Modelo FD8 de la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CTA) de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (Figura 40). La duración del programa fue de 36 horas, observándose una reducción de peso del 70% en cada una de las muestras tras la liofilización.



Figura 40. Equipo de liofilización (Heto-Holten Modelo FD8) de la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CTA) de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

2.2.1.3. Extracción del DNA y qPCR

Todas las muestras de los tratamientos y las réplicas de la muestra sin tratar se sometieron posteriormente a la extracción del DNA y posterior qPCR.

Para la extracción del DNA se utilizó el kit *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification* y el aparato automatizado Maxwell® 16 de la casa comercial Promega. Todos los reactivos empleados a lo largo del protocolo fueron los proporcionados en el kit. El protocolo para la extracción del DNA fue el siguiente:

1. Adición de 15 mg (muestra liofilizada o no tratada) o 200 μ L (muestra procedente de la digestión péptica), 300 μ L del buffer de lisis y 35 μ L de Proteinasa K a tubos con “estructuras esféricas de granate”, *Dry Bead Tubes* (Mo Bio).

La combinación de una lisis celular física y una lisis química mejora la eficiencia de la extracción del DNA cuando el tejido es más complejo.

2. Incubación de los tubos durante 20 horas en agitación a 400 r.p.m. La primera hora a una temperatura de 56°C y las 19 horas restantes a temperatura ambiente (Figura 14 B).
3. Colocación de cartuchos (incluidos en el kit) en la plataforma del aparato automatizado Maxwell® 16 en función del número de muestras a extraer el DNA.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

6. Colocación de los émbolos (incluidos en el kit) en la plataforma, 200 µL de muestra y 100 µL del buffer de elución e introducción de la plataforma lista en el aparato Maxwell® 16 de Promega.
7. Tras 40 minutos, el aparato emite una señal acústica indicando que el proceso ha finalizado y podemos recoger los DNAs extraídos.

El protocolo de qPCR una vez extraído el DNA fue el mismo que en el punto 1.1.2.3.2.

La evaluación de la eficiencia de cada uno de los tratamientos se realizó comparando entre los tres tratamientos los datos de carga parasitaria. Al partir de la misma muestra infectada con el mismo nivel de parasitación, una obtención de mayor cantidad de parásitos, indicaría que ese tratamiento es mejor en la extracción del parásito de la matriz, y por tanto sería el tratamiento idóneo para poder detectar *T.gondii* en matrices más complejas.

2.2.2. Aplicación de la qPCR a distintos tejidos porcinos

Con el fin de estudiar la posible afinidad de *Toxoplasma* por determinados tejidos se aplicó la qPCR a diferentes tejidos de los 9 cerdos infectados experimentalmente. Para ello, se preparó un pool de 150g para cada tejido a analizar (corazón, lengua, pilares de diafragma, lomo y pernil). Cada pool procedía de la mezcla de los tejidos correspondientes a los 9 cerdos infectados experimentalmente. Los análisis se hicieron por triplicado.

Los tejidos se sometieron a una digestión péptica (descrito en el punto 2.2.1.1). El protocolo de qPCR es el descrito en el apartado 1.1.2.

2.2.2.1. Análisis de sangre

Asimismo, se aplicó la qPCR al análisis de sangre de los cerdos infectados experimentalmente los días: 8, 15, 22, 29,36, 50 y 63 p.i. En este caso no se realizó ningún tratamiento previo de digestión péptica sino que se analizaron estas muestras directamente por qPCR.

El protocolo de qPCR seguido es el descrito en el apartado 1.1.2. salvo el proceso de extracción del DNA que fue el siguiente:

1. Adición de 200 µl de sangre en eppendorfs de 0,5 ml en 300 µL del buffer de lisis y 35 µL de Proteinasa K (kit *Maxwell® 16 Blood DNA Purification*).
2. Incubación de los tubos durante 1 hora a una temperatura de 65°C en un bloque calefactor (Life Technologies).

3. Colocación de un número determinado de cartuchos (incluidos en el kit) en la plataforma del aparato automatizado Maxwell® 16 de la casa comercial Promega en función del número de muestras a extraer el DNA.
4. Colocación de los émbolos (incluidos en el kit) en la plataforma, 200 µL de muestra y 100 µL del buffer de elución e introducción de la plataforma lista en el aparato Maxwell® 16 de Promega.
5. Tras 40 minutos, el aparato emite una señal acústica indicando que el proceso ha finalizado y podemos recoger los DNAs extraídos.

2.3. Análisis estadístico de los resultados

Para la evaluación de las técnicas serológicas se estudiaron los siguientes parámetros: repetibilidad, concordancia, sensibilidad, especificidad y veracidad relativas. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa estadístico IBM SPSS 19.0 para Windows.

La repetibilidad dentro de cada una de las pruebas indirectas se evaluó mediante el *coeficiente de correlación intra-clase* para las técnicas cuantitativas (ELISA monoespecie y ELISA multiespecies) y mediante el *alfa de Cronbach* para las técnicas semi-cuantitativas (IFI y MAT). Ambos se interpretan de igual forma y se considera que un resultado igual o superior a 0,8 es satisfactorio.

Debido a que los resultados obtenidos en las distintas técnicas no se expresan en las mismas unidades, se determinó la correlación existente entre los resultados de títulos de anticuerpo de las técnicas IFI y MAT por un lado, y la correlación entre resultados de porcentajes de positividad para los tests ELISA monoespecie y ELISA multiespecies, por otro.

Para el primer caso, al tratarse de dos variables ordinales, los resultados se analizaron con la *d de Somers simétrica*. Cuanto más cercano a 1 es este valor, más correlación positiva (y cuanto más cercano a -1 mayor correlación negativa). Para el segundo caso, al tratarse de dos variables cuantitativas se calculó en primer lugar la normalidad de las variables analizadas usando la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. En función del resultado de este test se calculó la correlación con el *coeficiente de correlación de Pearson (r)*, que es la prueba paramétrica de elección cuando la distribución de las variables es normal, o el *coeficiente de correlación de Spearman (rho o ρ)* como alternativa no paramétrica cuando una o las dos variables no siguen una distribución normal. Cuanto más cercano a 1 es este valor mayor es la correlación.

La concordancia entre todas las metodologías indirectas se determinó mediante el cálculo del coeficiente de concordancia *Kappa*. Según sea este valor las técnicas tendrán una concordancia muy buena, buena, moderada, débil o pobre (Tabla 10) (Greiner & Gardner, 2000).

Tabla 10. Valores de kappa y la fuerza de la concordancia

Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0,20	Pobre
0,21-0,40	Débil
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Buena
0,81-1	Muy buena

La técnica IFI es considerada por muchos autores como la prueba de mayor fiabilidad para el serodiagnóstico en cerdo (Langoni et al., 2011; Obwaller et al., 1995; Sroka et al., 2008), por lo que se consideró como técnica de referencia. Los resultados se emparejaron en una tabla de contingencia (Tabla 11), y en base a la norma ISO 16140-2:2016, así como otros organismos internacionales como NordVal International (2017), se calcularon los siguientes parámetros:

- Especificidad relativa (SP) para determinar la capacidad del método alternativo para no detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia. $SP\% = 100 * [NA/N-]$ (siendo N- es el número total de resultados negativos con el método de referencia).
- Sensibilidad relativa (SE) con el fin de conocer la capacidad del método alternativo para detectar el analito cuando es detectado por el método de referencia. $SE\% = 100 * [PA/N+]$ (siendo N+ el número total de resultados positivos con el método de referencia).
- Veracidad relativa (RT) para conocer el grado de concordancia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo con muestras idénticas. $AC\% = 100 * [(PA+NA)/N]$ (siendo N el número total de muestras analizadas).

Tabla 11. Tabla de resultados emparejados obtenidos por la técnica de referencia y las técnicas alternativas (ISO 2016).

	Método de referencia positivo (R+)	Método de referencia positivo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	R+/A+ Concordancia positiva (PA)	R-/A+ Desviación positiva (PD)
Método alternativo negativo (A-)	R+/A- Desviación negativa (ND)	R-/A- Concordancia negativa (NA)

Para la comparación de los resultados obtenidos con los distintos tratamientos previos a la determinación de *T. gondii* por qPCR, se ha aplicado el test no paramétrico de Friedman para muestras de medidas repetidas. Asimismo, se ha aplicado el test de Wilcoxon para medidas repetidas dos a dos.

Por otro lado, para observar si hay diferencias en la carga parasitaria entre los tejidos porcinos, se ha aplicado una prueba de normalidad para muestras pequeñas (Shapiro-Wilk) que ha establecido normalidad al 95%, por lo que se ha aplicado ANOVA, con un post-hoc (se ha elegido Scheffé & Duncan).

Se ha analizado la repetibilidad de la qPCR en sangre mediante el *coeficiente de correlación intra-clase* por tratarse de una técnica cuantitativa, siendo un resultado igual o superior a 0,8 idóneo.

Finalmente, puesto que las metodologías serológicas y la técnica qPCR en sangre no determinan el mismo analito, se estudió la concordancia entre las técnicas serológicas y la qPCR en las muestras procedentes de cerdos de infección experimental mediante el cálculo del coeficiente de concordancia *Kappa*. Como ya se ha dicho anteriormente, según sea este valor las técnicas tendrán una concordancia muy buena, buena, moderada, débil o pobre (Tabla 10) (Greiner & Gardner, 2000).

En todos estos análisis se estableció el error alfa en 0,050. Se consideraron significativos aquellos valores de p inferiores a 0,050.

3. Prevalencia de *T. gondii* en porcino en España

Se ha realizado un muestreo de sangre y tejido diana (diafragma) de cerdos de producción intensiva y extensiva de mataderos de España. Dicho muestreo fue llevado a cabo por dos grupos de investigación colaboradores del proyecto en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral: el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISA-VET), y el grupo de investigación del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL). Las muestras de diafragma se recibieron congeladas en nuestro laboratorio. Se analizaron un total de 1382 sueros y 488 diafragmas porcinos.

Para la obtención de los sueros, las muestras de sangre se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Universal 32 R, Hettich) y el sobrenadante se transfirió a eppendorfs de 0,5 ml. Una vez recogidos los sueros se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Los análisis serológicos se llevaron a cabo mediante la técnica IFI (punto de corte 1:20), el protocolo empleado fue el mismo que en el punto 1.1. con las modificaciones del 2.1.1. Los

pilares de diafragma se analizaron por qPCR previa digestión péptica. El protocolo de la digestión péptica seguido es el mismo que el detallado en el apartado 2.2.1.1. Asimismo, el protocolo de qPCR es el descrito en el apartado 1.1.2. con las modificaciones del punto 2.2.2.

Concretamente, se analizaron 616 sueros de cerdo blanco, sacrificados en mataderos de 35 provincias españolas pertenecientes a 11 Comunidades Autónomas. Asimismo, se analizaron 244 diafragmas de cerdo blanco. Hay que indicar que, en este caso, el muestreo no permitió obtener suero y diafragma del mismo animal.

Con respecto a cerdo ibérico, se han analizado un total de 766 sueros y 244 diafragmas. Los cerdos fueron sacrificados en mataderos de 4 Comunidades Autónomas, así como de Portugal. A diferencia del muestreo en cerdo blanco, en este caso, las muestras de suero y diafragma proporcionadas procedían del mismo animal.

3.1. Análisis estadístico de resultados

Con los resultados obtenidos se calculó la seroprevalencia y la prevalencia en carne de *T. gondii* a nivel nacional. Además, el muestreo llevado a cabo en cerdo ibérico nos permitió estudiar la relación entre la seroprevalencia y la prevalencia en tejidos. Asimismo, se estudió la diferencia entre seroprevalencia de cerdo blanco e ibérico, y la diferencia entre la prevalencia en diafragmas de cerdo blanco e ibérico. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS 19.0 para Windows.

La seroprevalencia porcina frente a *T. gondii* se calculó a partir del número de resultados positivos con respecto al número total de sueros porcinos analizados de cada uno de los sistemas de producción (intensiva o extensiva).

Para determinar si la seropositividad de los cerdos blanco e ibérico y los distintos títulos de anticuerpos hallados eran dependientes u independientes de las regiones y provincias analizadas, se comprobó si existía asociación entre las variables. Estas relaciones de dependencia se analizaron con los estadísticos de contraste Chi-cuadrado (χ^2) y Razón de Verosimilitud (cuando la prueba de Chi-cuadrado no fue válida al observarse más de un 20 % de frecuencias esperadas inferiores a 5). Estos métodos estadísticos permitieron contrastar la hipótesis nula (H_0) que presupone que las dos variables que se estudian son independientes, comparando las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas. Ambos estadísticos se distribuyen e interpretan igual, por lo que se pueden aplicar indistintamente pues se llega a la misma conclusión.

De igual forma, la prevalencia porcina frente a *T. gondii* en carne (diafragma) se calculó en función del número de resultados positivos por qPCR con respecto al número total de diafragmas porcinos analizados de cada uno de los sistemas de producción.

Para comprobar si la positividad en carne de los cerdos blanco e ibérico y las distintas cargas parasitarias halladas eran dependientes u independientes de las regiones y provincias analizadas, se comprobó si existía asociación entre las variables. Estas relaciones de dependencia, al igual que para la seropositividad, se analizaron con los estadísticos de contraste Chi-cuadrado (χ^2) y Razón de Verosimilitud.

Además, se quiso conocer el grado de relación lineal entre los gramos de tejido analizados y la carga parasitaria. Para ello, por tratarse de dos variables cuantitativas, se determinó en primer lugar la normalidad de dichas variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov o la prueba de Shapiro-Wilk (cuando el tamaño de muestra era inferior a 15). Posteriormente y en función del resultado, se calculó el grado de dependencia mediante uno de estos dos coeficientes de correlación: el coeficiente de correlación de Pearson (r), que es la prueba paramétrica cuando la distribución de las variables fuese normal, o el coeficiente de correlación de Spearman (ρ o r_s) como alternativa no paramétrica cuando una o las dos variables no siguiesen una distribución normal.

Por otro lado, gracias al muestreo llevado a cabo en cerdo ibérico, se pudo estudiar el grado de concordancia entre la seroprevalencia y la prevalencia en tejidos mediante el cálculo del coeficiente de concordancia *kappa*. Según sea este valor las técnicas tendrán una concordancia muy buena, buena, moderada, débil o pobre (Tabla 10) (Greiner & Gardner, 2000).

Finalmente, se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas de seroprevalencia y prevalencia en tejidos de manera global entre ambos sistemas de producción porcina. Estas diferencias se evaluaron con los estadísticos de contraste Chi-cuadrado (χ^2) y Razón de Verosimilitud anteriormente citados. La existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes títulos de anticuerpos hallados en los distintos sistemas de producción también se halló con estos estadísticos.

Asimismo se evaluaron estadísticamente las diferencias en cuanto a carga parasitaria según el sistema de producción. Para estudiar la asociación entre la variable cuantitativa y la variable dicotómica se procedió a determinar la normalidad de la variable cuantitativa mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. En el caso de que la variable siguiera una distribución normal se compararon las medias utilizando la prueba T de Student para muestras independientes y se describió la variables mediante la media \pm Desviación estándar, y cuando

la hipótesis de normalidad fue rechazada, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney como alternativa no paramétrica y la variable se describió mediante la media \pm Desviación estándar (mediana).

En todos los análisis se asumió un error α con valor igual a 0,05, de forma que si el valor de p era menor que 0,05 se consideró que la hipótesis nula (H_0) no podía aceptarse, y por lo tanto se pudo decir que las variables analizadas eran dependientes entre ellas. En el caso que el valor de p fuera igual o superior a 0,05 la H_0 no se pudo rechazar, por lo que se asumió que las variables eran independientes y sus diferencias no eran significativas.

4. Influencia del curado del jamón y embutidos en la viabilidad de *T. gondii*

Para comprobar el efecto del tratamiento tecnológico del curado en la supervivencia del parásito, se llevó a cabo el curado de perniles procedentes de los cerdos infectados experimentalmente, y se ha evaluado, mediante bioensayo en ratón, la viabilidad de *T. gondii* al final del proceso. Asimismo, se realizó un estudio preliminar con embutidos procedentes de tejidos de dichos cerdos infectados.

Además, se analizó la composición físico – química de los productos listos para el consumo (a_w , NaCl, nitratos, nitritos, grasa y pH) y se valoró la posible implicación de éstos en la supervivencia del parásito.

4.1. Curado de jamones y paletas

Se analizaron un jamón y una paleta en fresco de un cerdo infectado experimentalmente que se utilizó como control positivo. De igual manera, se analizaron un jamón y una paleta en fresco de un cerdo no infectado como control negativo.

El resto de piezas (n = 36) fueron sometidas a un proceso tecnológico de curado en un secadero industrial de jamones.

El proceso de curación ha comprendido las siguientes etapas: salado, post-salado, secado y maduración. Los pesos de los perniles al inicio del proceso se situaron entre 12,1 y 16,7 Kg, y los pesos de las paletas de 6,3 a 9,4 Kg. En el salado, se frotaron los perniles y las paletas con sal curante (sal y nitrificantes) y se añadió sal común. Las perchas con los perniles se colocaron en la cámara de salazón (2,8°-3,5°C/HR 85%-95%) donde permanecieron un tiempo variable dependiendo del peso del producto. Posteriormente se procedió a la retirada de la sal superior, lavado de las piezas, moldeado y pesaje de cada pieza (el dato se almacenó en la base de datos y se relacionó con el chip identificativo de cada pieza). Seguidamente se realizó

el post-salado, con unos rangos de humedad relativa y temperatura en la cámara variables con el tiempo: humedad relativa 75-95%; temperatura 3°-16°C (mínimo primeros 90 días a 3°C ± 1°C, prorrogable a 120 días). La temperatura se fue subiendo desde 3°C hasta 16°C aproximadamente, de forma escalonada. Posteriormente, las piezas entraron en la línea de enmantecado, y a continuación se trasladaron a la bodega/secadero, para llevar a cabo la etapa de secado-maduración. Las características ambientales aproximadas en esta sala fueron: temperatura 13°-28°C; humedad relativa 60-70%. El tiempo de estancia en esta fase vino determinado por la consecución de las características óptimas de curado de las piezas, y cuando la merma del producto hubo alcanzado el 35-40% aproximadamente.

Los productos curados fueron descortezados y deshuesados en la Planta Piloto de CTA. Cada pieza se dividió en dos partes: parte interna y parte externa del producto. Para cada parte por separado se procedió a su picado y envasado al vacío; fueron almacenadas en refrigeración hasta el momento de su análisis (Figura 41).



Figura 41. Imágenes del proceso de curado, picado y envasado de los jamones y paletas curadas.

4.2. Curado de embutidos

Se elaboraron 3 tipos de embutidos: chorizo, salchichón y longaniza, y se empleó como materia prima 9 lomos de los cerdos infectados experimentalmente. Asimismo, se analizó un lomo del cerdo control negativo.

La elaboración la llevó a cabo el grupo técnico de la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. La formulación de cada uno de los embutidos se detalla en la Tabla 12. Parte de cada una de estas mezclas (salchichón, longaniza y chorizo) se reservó para su análisis en fresco.

Tabla 12. Formulación del salchichón, la longaniza y el chorizo.

Ingredientes	Salchichón (kg)	Longaniza (kg)	Chorizo (kg)
Carne	8	6,3	6,3
Grasa	2	2,7	2,7
Mezcla de aditivos	0,7	0,63	0,54
Starters	0,001	0,0009	0,0009
Total	10,7	9,63	9,54

Antes del proceso de elaboración, se midió el pH en varios puntos de las muestras, obteniendo una media de 6,05. Los aditivos comunes para los distintos embutidos fueron sal, lactosa, especias, leche desnatada, dextrina de maíz, proteína de soja, dextrosa, azúcar, potenciador del sabor E-621, conservadores E-250 y E-252 y colorante E-120. Además, a cada uno de los embutidos se le añadieron otros aditivos distintivos; los antioxidantes E-331 iii y E-316 y el emulgente E-452 i al chorizo, los antioxidantes E-331 iii, E-316 y E-301 al salchichón y los antioxidantes E-331 iii y E-301 a la longaniza. Los fermentos fueron de la marca AMEREX, tipo SAGA AF3, que incluyeron los microorganismos *P. pentosaceus*, *L. sake*, *M. Varians* I y *S. Carnosus*. Se utilizaron tripas naturales de cerdo de diámetro de 32 y 34 mm y conservadas en sal y refrigeración hasta su utilización.

El proceso de curación de embutidos conlleva las siguientes etapas: picado de la carne y grasa, mezcla y amasado, reposo, embutido, y secado y maduración.

Una vez picada la materia prima, se amasó durante unos 3 minutos con la amasadora de cárnicos a vacío en primer lugar el salchichón, seguido de la longaniza y por último, el chorizo. Tras el amasado, se procedió al reposo en la cámara de refrigeración a 2°C durante 48 horas. Tras este periodo, se volvió a medir el pH: salchichón (pH = 6,10), longaniza (pH = 6,03) y chorizo (pH = 5,90).

A continuación, se procedió a realizar el embutido. Las tripas se enjuagaron abundantemente con agua de la red y se dejaron un par de horas en agua a 30°C para que se rehidrataran.

Posteriormente, se utilizó la embudidora en el mismo orden que el amasado. Se obtuvieron piezas de entre 400 y 500 g elaborándose unas 20 piezas de cada embutido, las cuales se colgaron en el carro de cárnicos. Finalmente, se dejaron estas piezas en la cámara de maduración inicialmente a una temperatura de 10°C y un 75% de humedad relativa. Las condiciones del proceso fueron cambiando según avanzaba el secado y disminuía el pH. Se llevó un registro de los cambios de peso y pH, y se calculó el nivel de secado mediante el pesado de las piezas control y el cálculo de la merma. El final del proceso de secado se produjo cuando la merma estuvo comprendida entre 31 y 38%. El pH final se controló para finalizar el proceso y estuvo comprendido entre 5,08 y 6,1. El tiempo de maduración hasta alcanzar estas condiciones fue de 26 días. En la figura 42 se presentan imágenes del proceso de elaboración de los embutidos.



Figura 42. Imágenes del proceso de elaboración de embutidos en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

4.3. Análisis de *T. gondii*

4.3.1. Presencia y viabilidad de *T. gondii*

En el día 0 se analizaron un pernil y una paleta procedentes de los cerdos infectados para comprobar la positividad y viabilidad del parásito en carne fresca (control positivo). Asimismo, se analizaron un pernil y una paleta del cerdo control negativo para confirmar los resultados

negativos. Al final del proceso de curación, de cada paleta y jamón curados, tanto de su parte interna como externa, se llevó a cabo una digestión péptica, por quintuplicado. Asimismo, se llevó a cabo el análisis de un jamón y una paleta curados procedentes del cerdo control negativo. La digestión péptica se realizó tal y como se detalla en el apartado 2.2.1.1, con la salvedad del punto 10 del protocolo, en el que el sedimento obtenido se resuspendió en 3 ml de una solución de antibiótico de 1.000 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich) y 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma-Aldrich). En total se realizaron 350 digestiones pépticas.

Por otro lado, se analizó cada tipo de embutido tras la homogeneización de las piezas individuales por triplicado realizándose un total de 15 digestiones pépticas.

Una vez recogidos los extractos de las digestiones pépticas para cada una de las muestras en tubos falcón, se homogenizaron y se dividieron en dos alícuotas en eppendorfs, una de ellas destinada para hacer el análisis qPCR y la otra para el bioensayo en ratón. El resto de muestra se conservó en refrigeración hasta el resultado de las pruebas por si hubiese que hacer más repeticiones.

4.3.1.1. qPCR para determinar la presencia de *T. gondii*

Para confirmar la presencia de *T. gondii* en la matriz se analizó por qPCR una alícuota del extracto de digestión de cada una de las muestras (Figura 43). El protocolo de qPCR fue el descrito en el apartado 2.2.2.

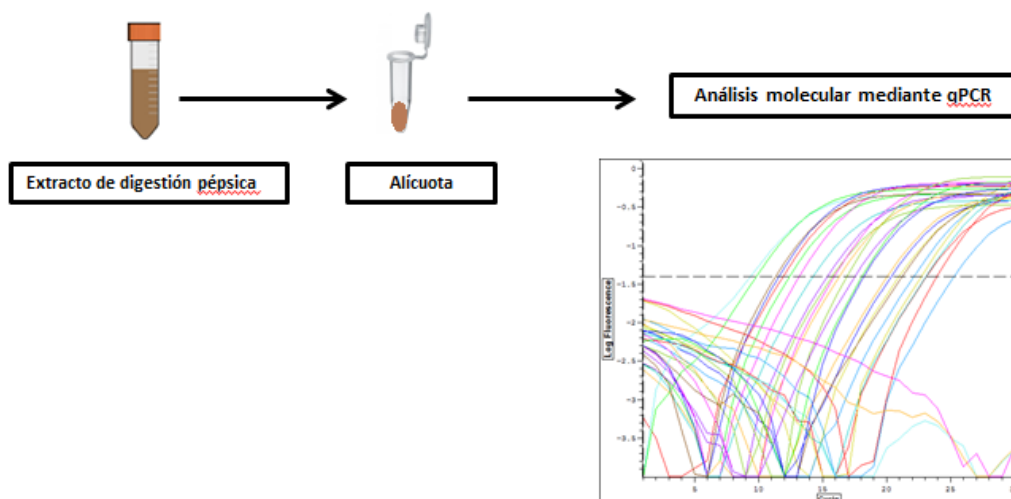


Figura 43. qPCR para determinar la presencia de *T. gondii* en la matriz.

4.3.1.2. Bioensayo en ratón para determinar la presencia y viabilidad de *T. gondii*

Para determinar la presencia y viabilidad de *T. gondii* mediante bioensayo en ratón se inocularon parte de los extractos de las digestiones pépsicas por vía intraperitoneal y también por vía oral (0,1 ml) a los ratones de experimentación. La inoculación se realizó en un tiempo inferior a las 3h de haber realizado la digestión péptica. Todos los experimentos incluyeron ratones de control negativo. Las re-inoculaciones a un mismo animal se realizaron con al menos 48 horas de diferencia entre cada una de ellas para favorecer su recuperación y no comprometer el bienestar animal. A cada ratón se le designó con un código individual identificativo.

Tras 60 días desde la última inoculación se extrajo sangre a los ratones y se obtuvieron los sueros de cada uno de ellos como se detalla en el apartado 1.1. y posteriormente se analizaron mediante la técnica IFI (protocolo 1.1.1.). Un resultado positivo nos indicaba presencia del parásito.

Para determinar la viabilidad del parásito se analizaron por qPCR los cerebros de los ratones seropositivos. El protocolo de qPCR seguido fue el mismo que en el apartado 1.1.2. En la Figura 44 se muestra un esquema del proceso seguido.

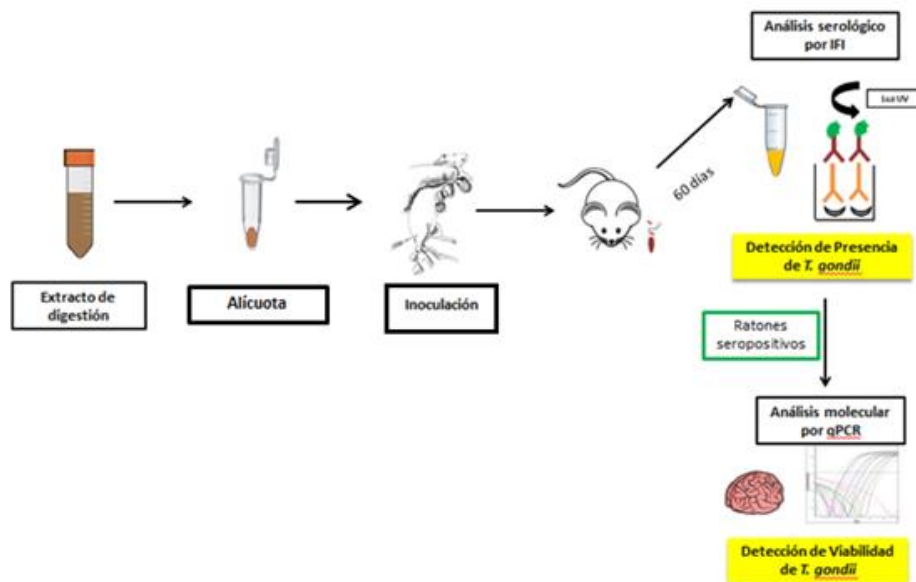


Figura 44. Esquema del procedimiento del bioensayo en ratón para determinar la presencia y viabilidad de *T. gondii*.

4.4. Análisis de la composición físico – química de los productos curados

Se procedió al análisis físico-químico de las paletas, jamones y embutidos curados con la determinación de los siguientes parámetros: humedad, grasa, cloruros, nitratos, nitritos, pH y actividad de agua (a_w). Estos análisis fueron llevados a cabo por el laboratorio SAYCI S.L. mediante la aplicación de protocolos normalizados de trabajo:

1. Humedad: método gravimétrico ISO 1442.
2. Grasa: método gravimétrico (Soxhlet) ISO 1443.
3. Cloruros: método volumétrico (Carpentier – Vohlard) ISO 1841-1.
4. Nitratos: método espectrofotométrico.
5. Nitritos: método espectrofotométrico.
6. pH: electrometría.
7. a_w : método AOAC 978.

4.5. Análisis estadístico de resultados

Con los datos obtenidos de viabilidad de *T. gondii* en las paletas y jamones curados, se calculó el efecto de este tratamiento tecnológico. La evaluación de factores que pudieran influir en los resultados, como el tipo de pieza (jamón o paleta) y la localización de la toma de muestra (interior/exterior), se realizó mediante el test Chi-cuadrado o Razón de Verosimilitud cuando el test de Chi-cuadrado no fue válido. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Para evaluar la influencia de cada uno de los parámetros físico-químicos (cloruros (%), nitratos (mg/Kg), nitritos (mg/Kg), a_w , pH, humedad (%) y grasa con hidrólisis (%)) (variables cuantitativas dependientes) en la viabilidad en relación al tipo de pieza y la localización de la toma de muestra en la pieza (interior/exterior) (variables cualitativas independientes) se realizó un análisis multivariante mediante los *modelos lineales generalizados (GLM)*. En este modelo se tuvo que tener en cuenta que la significación fuera $< 0,05$ y la potencia superior al 80%.

Finalmente, se calculó el porcentaje de error (n° errores/ total de muestras x 100) obtenido con la técnica qPCR para detectar el DNA del parásito en los jamones y paletas curados, con la finalidad de comprobar la fiabilidad de esta técnica para la detección del parásito.

5. Estudio de *T. gondii* en productos curados de comercios de venta al por menor

5.1. Muestreo

Se realizó un muestreo de jamones/paletas y embutidos curados de distintos comercios de venta al por menor de España. El muestreo lo llevó a cabo el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid entre los años 2016-2018. Las muestras de productos cárnicos curados se recibieron en refrigeración en nuestro laboratorio y se analizaron antes de finalizar la fecha de consumo preferente.

El número de muestras de productos cárnicos curados analizadas fue de 552: 311 jamones/paletas (56,3%) y 241 embutidos (43,7%).

En cuanto al formato del producto, 116 fueron productos enteros, 424 loncheados y 12 en taquitos. En concreto, en jamones y paletas curados, se tomaron 299 muestras en formato loncheado (96,1%) y 12 en taquitos (3,9%). De los embutidos curados, 116 fueron enteros (48,1%) y 125 loncheados (51,9%).

De todos los productos, se recogió la información que venía especificada en el etiquetado (Reglamento (UE) nº 1169/2011; Real Decreto 474/2014; Real Decreto 4/2014). Así, los campos incluidos en la base de datos fueron los siguientes: código de identificación de la muestra, denominación del producto (incluida la raza del cerdo), formato, tiempo de curado, número de lote, peso neto, ingredientes, incluyendo aditivos y especias, fecha de consumo preferente, identificación de la empresa, número de autorización y datos del etiquetado nutricional, entre los que se encuentran la grasa y la sal.

Con respecto a los tiempos de curación, cuando este dato no estaba presente en el etiquetado, se estimó en base a la denominación del producto tal y como establece la Norma de Calidad de derivados cárnicos (Real Decreto 474/2014) y la Norma Calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico (Real Decreto 4/2014).

5.2. Análisis de *T. gondii*: presencia y viabilidad

Para evaluar la presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos curados listos para el consumo las muestras se sometieron inicialmente a una digestión péptica y el extracto se analizó por qPCR (protocolos descritos en los apartados 2.2.1.1. y 2.2.2., respectivamente). Posteriormente, las muestras positivas se analizaron por bioensayo en ratón para determinar la viabilidad del parásito (protocolo especificado en el punto 3.4.1).

Los productos cárnicos fueron analizados antes de finalizar su fecha de consumo preferente.

5.3. Análisis estadístico de resultados

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS 19.0 para Windows.

Con los resultados obtenidos del análisis de los productos curados por qPCR y bioensayo en ratón, se evaluó la prevalencia del parásito (nº muestras positivas y nº muestras con el parásito viable) en este tipo de productos (% de positividad).

Los resultados obtenidos de la presencia y viabilidad de *Toxoplasma* en las muestras de productos curados, se relacionaron estadísticamente con las variables cualitativas y cuantitativas recogidas en la base de datos. Se comprobó si existía una asociación estadísticamente significativa entre la raza del cerdo, el formato del producto y la información que aparece en el etiquetado en cuanto a composición físico – química del producto y/o parámetros tecnológicos relacionados con el procesado (sal, grasa, especias, conservantes, antioxidantes y tiempos de curación) y la presencia y viabilidad de *T. gondii*.

En el caso de las variables cualitativas (formato del producto, raza de cerdo, intervalos de tiempos de curación, especias y conservantes/ antioxidantes), los análisis estadísticos se realizaron mediante los estadísticos de contraste Chi-cuadrado o Razón de Verosimilitud (cuando la prueba de Chi-cuadrado no fue válida al observarse más de un 20 % de frecuencias esperadas inferiores a 5). Estos métodos estadísticos permitieron contrastar la hipótesis nula (H_0) que presupone que las dos variables que se estudian son independientes, comparando las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas. Ambos estadísticos se distribuyen e interpretan igual. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

En la descripción de las variables cuantitativas (sal y grasa), si la variable seguía una distribución normal ésta se describía en función de su media y su desviación estándar, mientras que si no seguía una distribución normal se utilizaba la mediana. Para estudiar la asociación entre variables cuantitativas se determinó en primer lugar la normalidad de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Shapiro-Wilk (cuando el tamaño de muestra fue inferior a 15). En el caso de que las variables mostraran una distribución normal se compararon usando la prueba T de Student para muestras independientes y cuando se rechazó la hipótesis de normalidad, se utilizó la prueba de Mann-Whitney como alternativa no paramétrica.

6. Contribución a la evaluación del riesgo de *Toxoplasma gondii* en el sector cárnico porcino, en especial en la industria del jamón curado, y aportación de medidas para su gestión

Los datos obtenidos en la consecución de los objetivos anteriores nos han permitido establecer conclusiones y contribuir al proceso de evaluación del riesgo actual de *Toxoplasma gondii* derivado del consumo de jamón y productos cárnicos curados, así como plantear medidas que se recogen en una serie de recomendaciones específicas para el control de *Toxoplasma gondii*, integradas dentro de la gestión del riesgo en el sector cárnico porcino.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Infección experimental con *T. gondii*

1.1. Resultados

1.1.1. Comprobación de la infectividad de la cepa VEG de *T. gondii* en ratón

Los resultados serológicos de todos los ratones inoculados con las distintas dosis de ooquistes de la cepa VEG de *T. gondii* fueron positivos. Las titulaciones de los ratones fueron altas, se situaron entre 1:1280 y 1:12560.

Por otro lado, se obtuvieron mediante qPCR valores de Ct de entre 28 (10.916,06 parásitos/g) y 30,1 (2547,04 parásitos/g) en los cerebros de los ratones. La presencia de *T. gondii* en el cerebro de ratón confirmó la viabilidad de los ooquistes inoculados y por tanto su infectividad. En la figura 45 se presenta un quiste tisular de *T. gondii* en el cerebro de uno de los ratones inoculados visto bajo microscopio.

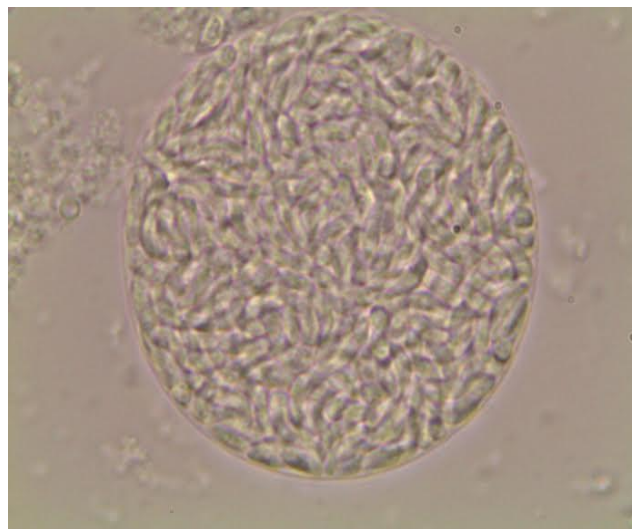


Figura 45. Quiste tisular de *T. gondii* en el cerebro de uno de los ratones inoculados.

1.1.2. Comprobación de la infección por *T.gondii* en los cerdos

La seroconversión de todos los cerdos fue confirmada a los 8 días p.i mediante la técnica IFI con una media de títulos de anticuerpos de $\approx 1/80$ y ninguno de ellos tuvo sintomatología clínica.

El análisis por qPCR de una paleta y un jamón en fresco, en el día 0, dio un resultado de Ct de $34,23 \pm 0,62$ (145,56 parásitos/g) y $35,09 \pm 0,52$ (80,21 parásitos/g) respectivamente. Asimismo, la inoculación de estos productos en fresco reveló seropositividad en 2 de los 3 ratones inoculados y se pudo confirmar la viabilidad del parásito al detectar Cts de entre 31 y

33 en los cerebros de los ratones seropositivos. Todos estos resultados confirmaron así el éxito de la infección experimental porcina (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados de confirmación de la infección por *T. gondii* mediante IFI, qPCR y bioensayo en ratón.

Cerdo	Confirmación de la infección mediante la técnica serológica IFI			Confirmación de la infección mediante análisis de la carne en fresco por qPCR y Bioensayo en ratón		
	Títulos de anticuerpo			qPCR (Ct) (parásitos/g)	Bioensayo en ratón	
					Nº ratones seropositivos/ratones totales	qPCR (Ct) de los cerebros (parásitos/g)
1	1:80	1:80	1:80			
2	1:80	1:80	1:80			
3	1:40	1:80	1:80			
4	1:80	1:80	1:80	34,23 ± 0,62 (168,01)	2/3	31,02 (1346,32) 32,10 (639,95)
5	1:80	1:80	1:80			
6	1:80	1:80	1:80			
7	1:80	1:80	1:160			
8	1:80	1:80	1:80			
9	1:80	1:80	1:80	35,09 ± 0,52 (80,21)	2/3	32,98 (346,14) 33,03 (334,35)
10 (Cerdo control negativo)	<1:20	<1:20	<1:20	38,7 ± 0,23	0/4	0

1.2. Discusión

La infección experimental fue realizada con éxito en los 9 cerdos, detectándose positividad tanto en todos los animales vivos mediante la técnica IFI como en la carne fresca de los dos cerdos controles positivo por medio de su análisis por qPCR y bioensayo en ratón. No obstante, se pudo observar que el cerdo 6 presentó los menores niveles de anticuerpos para todos los días p.i. frente a *T. gondii* y una menor carga parasitaria en sangre en comparación con el resto de animales infectados. Forbes, Parker & Gajadhar (2012) observaron también una menor carga de la esperada en un cerdo control positivo frente al resto de animales inoculados con la misma dosis. Estos autores atribuyeron esta situación a la posibilidad de que durante la inoculación oral unos pocos ooquistes podrían haber sido derramados en el ambiente o permanecer durante muy poco tiempo en la cavidad oral, y ser transferidos a otros cerdos a través de interacciones sociales como lamer, luchar o alimentarse en un comedero común. Por el contrario, Al-Aldhami & Gajadhar (2014) afirman que no todos los cerdos sufren la misma seroconversión y la misma parasitación, ya que la respuesta inmunitaria de cada huésped es diferente a pesar de haber sido infectados con la misma dosis, la misma cepa y sean de la misma especie.

No se observaron signos clínicos de toxoplasmosis durante el tiempo que duró el estudio, a pesar de que normalmente la enfermedad clínica se suele producir durante la fase aguda de la infección como resultado de procesos necróticos e inflamatorios durante la multiplicación de los taquizoitos en varios tejidos (Dubey et al., 2009). Estos datos coinciden con los aportados por García et al. (2006, 2017) en los que no se encontró sintomatología clínica en ninguno de los 10 cerdos infectados con ooquistes utilizando la misma dosis y la misma cepa de *T. gondii* que en nuestro estudio. Basso et al. (2017) tampoco observaron signos clínicos en ninguna de las cerdas infectadas con 100000 ooquistes de la cepa tipo II. En la misma línea, Moura et al. (2007) no detectaron manifestaciones clínicas ni hematológicas en los cerdos adultos machos infectados con 15000 ooquistes (cepa P) o 1000000 taquizoítos (cepa RH). Con una dosis más alta y con otra cepa no virulenta, Yai et al. (2003) tampoco observaron alteraciones clínicas importantes en los animales infectados, salvo una moderada elevación de la temperatura rectal. Esta leve sintomatología pero en corderos infectados tanto con 5000 como con 500000 ooquistes esporulados de la cepa M4 fue descrita también por Benavides et al. (2011). La dosis sólo afectó a la duración de la fiebre; los corderos infectados con la dosis más alta permanecieron febriles cuatro días más que los inoculados con menor número de ooquistes.

Sin embargo, otras investigaciones sí que han señalado la existencia de sintomatología clínica importante. En el estudio realizado por Miranda et al. (2015) dos cerdos se volvieron apáticos y letárgicos a los 0-2 días p.i. para el grupo inoculado con la cepa RH y a los 4-11 días p.i. para el grupo al que se le administró la cepa ME-49. Asimismo, uno de los cerdos del grupo RH presentó agresividad durante la fase crónica de la enfermedad, lo que probablemente podría ser un indicio de las alteraciones neurológicas causadas por la infección. No se encontró ninguna lesión oftálmica en los cerdos de ambos grupos infectados. Wingstrand et al. (1997) observaron signos clínicos más graves como inapetencia, fiebre transitoria y diarrea entre 3 y 6 días p.i. cuando los cerdos fueron infectados con 10000 ooquistes (cepa SSI-119) y quistes contenidos en medio cerebro de ratón (cepas SSI-119 y R92). Sin embargo, los autores utilizaron cerdos muy jóvenes, de ocho semanas de edad, que son más susceptibles a la infección por *T. gondii*. En el estudio llevado a cabo por Genchi et al. (2017) los cerdos mostraron los mismos síntomas junto con pérdida de peso tras ser infectados con una cepa de tipo II. Bugni et al. (2008) observaron que los cerdos de 21 días de edad que estaban infectados con la cepa RH presentaban secreción ocular y elevación de la temperatura a los 3-5 días p.i.

El género de los animales también se ha estudiado como un supuesto factor de riesgo de toxoplasmosis clínica aunque sólo se ha estudiado ocasionalmente. Los estudios

experimentales en los ratones y conejillos de indias mostraron una mayor susceptibilidad de las hembras a la infección por *T. gondii* (Kittas & Henry, 1979, 1980; Roberts, Cruickshank & Alexander, 1995; Roberts et al., 2001). Las infecciones por *T. gondii* suelen estar asociadas con el fallo reproductivo en cerdas como aborto, momificación fetal, mortalidad neonatal (Basso et al., 2015; Dubey, 1986b, 2009a; Dubey & Beattie, 1988).

Así pues, según Jungersen et al. (1999), las diferentes sintomatologías clínicas que se observan entre estos estudios pueden deberse a la dosis, el estadio, la cepa del parásito y también a la edad y al sexo de los cerdos. Estos autores observaron diferencias en la sintomatología entre las cepas de *T. gondii* inoculadas. Los cerdos a los que se les inoculó 10000 taquizoitos de la cepa NED (tipo III) desarrollaron fiebre algunos días, mientras que los animales a los que se les inoculó la cepa de baja patogenicidad, SVS (tipo II), mostraron una temperatura corporal normal durante todo el periodo de observación. En contraste con lo afirmado por Jurgersen et al (1999) acerca de los factores que influyen en el desarrollo de signos clínicos, autores como Dubey et al. (1997) sugieren que el desarrollo de *T. gondii* tras la inoculación oral es independiente de la dosis administrada. Asimismo, investigaciones llevadas a cabo en ratones endogámicos revelaron que la genética del huésped desempeña un papel importante en la susceptibilidad del huésped y la gravedad de la infección (Mcleod et al., 1989; Suzuki et al., 1993; Williams et al., 1978). A pesar de que la infección experimental con el estadio de ooquiste ha sido la más eficaz y más empleada en los diversos estudios, Garcia et al. (2017) encontraron una mayor virulencia de los quistes con respecto a los ooquistes y sugirió que podía ser debido a que los quistes podrían contener cientos o miles de bradizoitos mientras que un ooquiste contiene ocho esporozoitos.

No obstante, las discrepancias en cuanto a signos clínicos también pueden ser debidas a que tanto en nuestro estudio como en el de Garcia et al. (2006) se les administró sulfadiazina y trimetoprim justo después de la infección a diferencia de las investigaciones en las que se detectó sintomatología clínica. Fueron tratados con esta medicación intramuscularmente debido a que Alexander & Hunter (1998) confirmaron que este tratamiento favorecía la enquistación de parásitos e interrumpía los síntomas clínicos.

En definitiva, la infección experimental fue llevada a cabo con éxito en los 9 cerdos inoculados permitiendo así la consecución del resto de objetivos del presente trabajo y sin comprometer el bienestar animal, ya que ninguno de ellos desarrolló sintomatología clínica.

2. Evaluación de técnicas de análisis de *T. gondii*

2.1. Resultados

2.1.1. Técnicas indirectas

Los resultados serológicos obtenidos mediante IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecie a partir de sueros procedentes de cerdos infectados y no infectados experimentalmente, se presentan en los anexos 1 y 2 respectivamente.

En la figura 46 se presenta la cinética de la respuesta de anticuerpos de los cerdos infectados experimentalmente para cada una de las técnicas evaluadas.

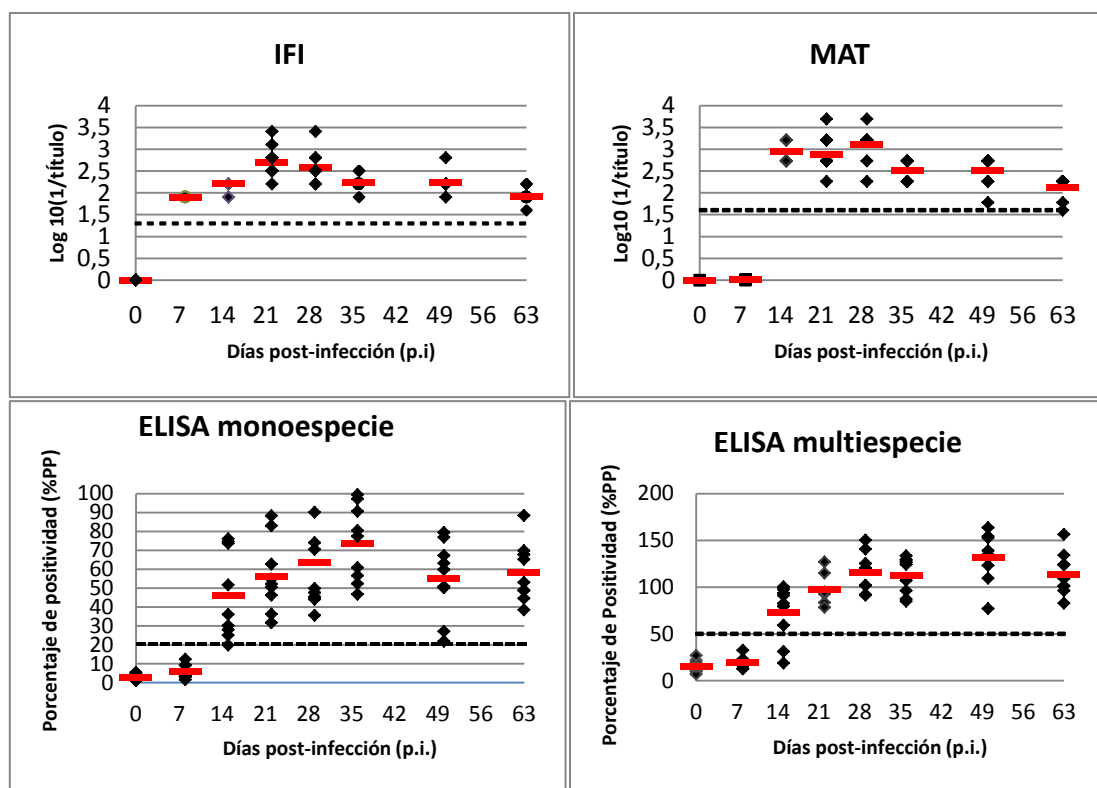


Figura 46. Cinética de la respuesta de anticuerpos IgG en cerdos infectados experimentalmente analizados mediante las cuatro técnicas. Se utilizó el título más frecuente en las técnicas IFI y MAT o la media de los porcentajes de positividad en los test ELISA. Las líneas horizontales discontinuas indican los puntos de corte de cada test. Los rombos representan los resultados de cada uno de los cerdos y la línea gruesa la media de todos los cerdos para cada día p.i. Los resultados del cerdo control negativo no fueron incluidos en estas gráficas.

La seroconversión de los animales infectados experimentalmente fue detectada con todas las técnicas. Los niveles de anticuerpos IgG siguieron la misma tendencia con todas las técnicas: una curva ascendente hasta llegar a un máximo para posteriormente sufrir un ligero y progresivo descenso hasta el día del sacrificio.

La técnica IFI reveló la infección antes que las técnicas MAT y los tests ELISA (monoespecie y multiespecies). Esta técnica detectó anticuerpos frente a *T. gondii* ya en el día 8 p.i. con una

media de títulos de anticuerpos de 1,9 (Log10 = 1,9) ($\approx 1/80$). Las técnicas MAT y los tests ELISA hasta el día 15 p.i. no detectaron positividad.

A partir del día 15 p.i., se observó un aumento progresivo de los niveles de anticuerpos con las cuatro técnicas. Los niveles medios más elevados a lo largo de la infección se obtuvieron en los días 22 para IFI (2,68 (Log10=2,68)) ($\approx 1/2560$), 29 para MAT (3,10 (Log 10 = 3,10)) ($\approx 1/4860$), 36 para ELISA monoespecie (73,45%P.P) y 50 para ELISA multiespecies (131,37% P.P.). Una vez alcanzados los valores más altos, éstos fueron disminuyendo progresivamente hasta llegar a los niveles más bajos el día del sacrificio (día 63 p.i.).

Los sueros del cerdo control negativo fueron negativos todos los días con todas las técnicas.

En el análisis de los sueros porcinos, 20 infectados naturalmente y 20 no infectados (confirmados inicialmente por IFI), se detectaron discrepancias en dos animales que eran positivos por IFI (títulos 1:80) pero negativos con las otras técnicas analizadas y en tres animales que eran positivos por IFI, MAT y ELISA monoespecie pero negativos con ELISA multiespecies (anexo 2).

Los sueros con titulaciones inferiores a 1:20 confirmadas por IFI dieron un resultado negativo con las tres técnicas alternativas. En el anexo 2 se presentan los resultados de la respuesta de anticuerpos en los cerdos no infectados experimentalmente.

Los resultados de las técnicas indirectas revelaron una buena repetibilidad de todas las pruebas, tanto en los sueros procedentes de la infección experimental como en los sueros procedentes de cerdos no infectados experimentalmente, con valores cercanos a 1 (0,987 – 0,998) (Tabla 14).

Tabla 14. Repetibilidad de las técnicas serológicas IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies.

Técnicas	Infección experimental	Infección natural	Total
IFI	0,995 (p<0,001)	0,996 (p<0,001)	0,996 (p<0,001)
MAT	0,998 (p<0,001)	0,997 (p<0,001)	0,997 (p<0,001)
ELISA monoespecie	0,996 (p<0,001)	0,996 (p<0,001)	0,997 (p<0,001)
ELISA multiespecies	0,988 (p<0,001)	0,987 (p<0,001)	0,987 (p<0,001)

Los resultados de correlación se realizaron entre las técnicas IFI y MAT y entre las dos técnicas ELISA. La correlación de los títulos de anticuerpo entre IFI y MAT fue muy buena ($d = 0,822$, $p<0,001$). Se obtuvieron mejores resultados en infección natural ($d = 0,922$, $p<0,001$) que en infección experimental ($d = 0,764$, $p<0,001$). En todos los casos se trató de una correlación positiva, a mayor título de anticuerpos en IFI mayor título en MAT (Tabla 15).

Tabla 15. Valores de *d de Somers* para evaluar la correlación entre títulos de anticuerpo en IFI y MAT.

Técnicas	Infección Experimental	Infección natural	Total
IFI x MAT	0,764 (p<0,001)	0,922 (p<0,001)	0,822 (p<0,001)

La correlación entre ambas técnicas ELISA fue buena ($\rho = 0,743$, $p < 0,001$) (Tabla 16), existiendo mayor correlación en los sueros de infección experimental ($\rho = 0,832$ ($p < 0,001$)) que en los de infección natural ($\rho = 0,662$ ($p < 0,001$)).

Tabla 16. Valores de *coeficiente de correlación de Spearman (rho o ρ)* para evaluar la correlación entre las técnicas ELISA mono especie y ELISA multiespecies

Técnicas	Infección experimental	Infección natural	Total
ELISA mono especie x ELISA multiespecies	0,832 (p<0,001)	0,662 (p<0,001)	0,743 (p<0,001)

En relación a la concordancia entre metodologías, los valores de *kappa* obtenidos se situaron entre 0,65 y 0,9 ($p < 0,001$), por lo que la concordancia fue buena o muy buena en todos los casos (Tabla 17). Salvo en el caso de las técnicas ELISA, se obtuvo mayor concordancia en infección natural que en infección experimental. En ambas infecciones, las técnicas que mejores resultados de concordancia proporcionaron fueron MAT y ELISA mono especie, $k = 0,983$, ($p < 0,001$).

Tabla 17. Valores de *kappa* para las técnicas serológicas IFI, MAT, ELISA mono especie y ELISA multiespecies.

Técnicas	Infección experimental	Infección natural	Total
IFI x MAT	0,718 (p<0,001)	0,900 (p<0,001)	0,801 (p<0,001)
IFI x ELISA mono especie	0,693 (p<0,001)	0,900 (p<0,001)	0,785 (p<0,001)
IFI x ELISA multiespecie	0,652 (p<0,001)	0,750 (p<0,001)	0,713 (p<0,001)
MAT x ELISA mono especie	0,972n(p<0,001)	1 (p<0,001)	0,983 (p<0,001)
ELISA mono especie x ELISA multiespecie	0,942 (p<0,001)	0,846 (p<0,001)	0,912 (p<0,001)

Tomando como referencia la técnica IFI, los valores de sensibilidad, especificidad y veracidad relativas de las técnicas alternativas se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores de sensibilidad, especificidad y veracidad relativa de las técnicas MAT, ELISA mono especie y ELISA multiespecies usando la IFI como técnica de referencia.

Técnicas	Sensibilidad Relativa (%) (IC ¹)	Especificidad Relativa (%) (IC ¹)	Veracidad Relativa (%) (IC ¹)
MAT	86,75 (77,81 – 92,44)	100 (90,59 – 100)	90,83 (84,33 – 94,80)
ELISA mono especie	85,54 (76,41 - 91,53)	100 (90,59 – 100)	90 (83,33 – 94,19)
ELISA multiespecies	80 (69,95 - 87,30)	100 (90,36 – 100)	83,33 (75,65 – 88,94)

¹Intervalo de Confianza (IC): 95%

Todas las técnicas alternativas presentaron buenos resultados de especificidad (100% en todas las técnicas evaluadas). Sin embargo, los valores de sensibilidad y veracidad relativas obtenidos fueron más bajos, en especial con la técnica ELISA multiespecies (80% y 83,33%, respectivamente).

2.1.2. Técnicas directas

2.1.2.1. Evaluación de tratamientos previos a la extracción del DNA

Los tres tratamientos permitieron detectar el parásito en carne, no apreciándose diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Tabla 19). No obstante, con la digestión péptica los valores de ct fueron más bajos y por tanto se detectó mayor carga parasitaria en comparación con la liofilización y la carne sin procesar.

Tabla 19. Valores de qPCR de los distintos tratamientos previos a la extracción del DNA.

Tratamiento previo	qPCR (Ct)			\bar{x} Ct \pm DE Carga parasitaria/g
Digestión péptica	28,38	32,45	32,00	30,94 \pm 2,23 (1423,1)
Liofilizado	32,43	33,48	35,37	33,76 \pm 1,49 (201,60)
Sin procesar	32,39	32,65	33,96	33,00 \pm 0,841(341,38)

2.1.2.2. Aplicación de la qPCR a distintos tejidos porcinos

Los resultados del análisis de diferentes tejidos mediante la metodología de digestión péptica y análisis mediante qPCR del extracto, se presentan en la Tabla 20.

T. gondii se distribuyó en todos los tejidos porcinos, detectándose valores de Ct entre 35,1 (79,65 parásitos/g) y 36,7 (26,29 parásitos/g). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la carga parasitaria detectada en diafragma, lengua y lomo. En corazón y pernil se determinaron valores de Ct significativamente menores ($p < 0,05$) que en el grupo de tejidos anteriormente citados.

Tabla 20. Resultados del análisis de diferentes tejidos mediante la metodología de la digestión péptica y análisis de qPCR.

Órgano	Resultados qPCR (Ct)			\bar{x} Ct \pm DE(carga parasitaria/g)
Corazón	35,78	35,42	35,33	35,51 \pm 0,24 (59,95)
Diafragma	36,38	36,45	36,31	36,38 \pm 0,07 (32,81)
Lengua	36,33	36,67	37	36,67 \pm 0,34 (26,83)
Músculo (lomo)	36,18	36,36	36,10	36,20 \pm 0,13 (37,17)
Músculo (pernil)	35,3	34,9	35,07	35,09 \pm 0,52 (80,21)

2.1.2.2.1. Análisis de sangre

Los resultados de Ct y de carga parasitaria obtenidos por qPCR se encuentran en la tabla 21. La detección del parásito fue intermitente. Por lo general hubo una clara presencia del parásito en sangre los días 8 y 15 p.i., el día 22 p.i. comenzó a disminuir y en los días 29 y 36 p.i. desapareció por completo para de nuevo aparecer los días 50 y 63 p.i. La mayor carga parasitaria se detectó el día 50 p.i. y se mantuvo por lo general similar el día del sacrificio.

Tabla 21. Resultados de qPCR de las sangres procedentes de cerdos infectados experimentalmente.

Día de infección	Cerdo	qPCR (Ct)			\bar{x} Ct \pm DE (Carga parasitaria/ ml)	Resultado global (positivo/negativo)
8	1	35,86	35,64	35,70	35,73 \pm 0,114 (51,47)	Positivo
	2	39,00	41,32	40,22	40,18 \pm 1,161 (0)	Negativo
	3	38,00	39,52	40,30	39,27 \pm 1,170 (0)	Negativo
	4	30,59	29,87	30,37	30,28 \pm 0,369 (2248,34)	Positivo
	5	29,41	28,81	29,49	29,24 \pm 0,372 (4622,40)	Positivo
	6	30,35	29,79	29,94	30,03 \pm 0,290 (2673,65)	Positivo
	7	28,87	28,72	29,32	28,97 \pm 0,312 (5573,51)	Positivo
	8	30,34	30,38	29,76	30,16 \pm 0,347 (2443,31)	Positivo
	9	30,52	30,34	30,51	30,46 \pm 0,101 (1984,67)	Positivo
	10	39,40	40,39	39,39	39,73 \pm 0,574 (0)	Negativo
15	1	31,41	31,49	31,40	31,43 \pm 0,049 (1013,33)	Positivo
	2	31,34	31,76	38,1	31,55 \pm 0,297 (932,47)	Positivo
	3	32,51	33,39	38,3	32,95 \pm 0,622 (353,41)	Positivo
	4	31,22	31,01	30,93	31,05 \pm 0,150 (1318)	Positivo
	5	38,44	38,39	38,38	38,40 \pm 0,032 (0)	Negativo
	6	40,40	42,42	40,4	41,07 \pm 1,166 (0)	Negativo
	7	36,51	35,38	35,29	35,73 \pm 0,680 (51,47)	Positivo
	8	32,18	31,62	38,20	31,90 \pm 0,396 (731,64)	Positivo
	9	30,53	31,46	29,86	30,62 \pm 0,804 (1776,37)	Positivo
	10	41,44	40,40	41,38	41,07 \pm 0,584 (0)	Negativo
22	1	34,80	34,15	34,99	34,65 \pm 0,440 (108,80)	Positivo
	2	41,39	41,4	42,39	41,73 \pm 0,574 (0)	Negativo
	3	32,87	33,65	33,49	33,34 \pm 0,412 (269,72)	Positivo
	4	42,4	41,39	43,43	42,41 \pm 1,020 (0)	Negativo
	5	30,94	30,84	31,12	30,97 \pm 0,142 (1393,78)	Positivo
	6	42,4	42,39	41,38	42,06 \pm 0,586 (0)	Negativo
	7	33,79	33,85	33,88	33,84 \pm 0,046 (190,73)	Positivo
	8	42,43	41,43	39,42	41,09 \pm 1,533 (0)	Negativo
	9	38,38	41,42	40,42	40,07 \pm 1,549 (0)	Negativo
	10	39,44	39,42	41,42	40,09 \pm 1,149 (0)	Negativo

Tabla 21. Resultados de qPCR de las sangres procedentes de cerdos infectados experimentalmente (Continuación)

29	1	38,44	40,39	38,41	39,08 ± 1,135 (0)	Negativo
	2	42,42	40,39	42,42	41,74 ± 1,172 (0)	Negativo
	3	42,39	43,41	38,4	41,40 ± 2,648 (0)	Negativo
	4	43,4	42,43	40,39	42,07 ± 1,536 (0)	Negativo
	5	44,44	42,42	40,43	42,43 ± 2,000 (0)	Negativo
	6	38,39	39,39	38,38	38,72 ± 0,580 (0)	Negativo
	7	42,39	41,43	42,43	42,08 ± 0,566 (0)	Negativo
	8	44,39	38,42	43,42	42,08 ± 3,204 (0)	Negativo
	9	44,43	40,4	40,4	41,74 ± 2,327 (0)	Negativo
	10	43,42	42,41	40,43	42,09 ± 1,521 (0)	Negativo
36	1	38,4	38,39	39,43	38,74 ± 0,598 (0)	Negativo
	2	43,38	42,41	39,41	41,73 ± 2,070 (0)	Negativo
	3	42,43	40,38	40,4	41,07 ± 1,178 (0)	Negativo
	4	39,43	42,42	41,4	41,08 ± 1,520 (0)	Negativo
	5	42,41	38,43	40,4	40,41 ± 1,990 (0)	Negativo
	6	39,39	42,42	39,43	40,41 ± 1,738 (0)	Negativo
	7	39,44	39,39	38,39	39,07 ± 0,592 (0)	Negativo
	8	43,42	40,39	39,38	41,06 ± 2,102 (0)	Negativo
	9	31,53	31,63	32,03	31,73 ± 0,265 (823,12)	Positivo
	10	42,4	40,38	43,41	42,06 ± 1,543 (0)	Negativo
50	1	33,73	32,01	31,30	32,35 ± 1,249 (535,33)	Positivo
	2	30,28	29,97	31,58	30,61 ± 0,854 (1788,73)	Positivo
	3	32,24	31,89	33,30	32,48 ± 0,734 (489,48)	Positivo
	4	32,03	33,03	32,87	32,64 ± 0,537 (438,11)	Positivo
	5	32,40	32,76	31,37	32,18 ± 0,721 (602,60)	Positivo
	6	29,60	29,28	29,31	29,40 ± 0,177 (4137,26)	Positivo
	7	30,36	28,97	30,17	29,83 ± 0,754 (3071,12)	Positivo
	8	33,03	32,49	33,12	32,88 ± 0,341 (370,98)	Positivo
	9	31,84	31,32	31,37	31,51 ± 0,287 (958,68)	Positivo
	10	40,42	43,42	39,42	41,09 ± 2,082 (0)	Negativo
63	1	32,66	32,22	32,86	32,58 ± 0,327 (456,71)	Positivo
	2	30,24	30,83	31,03	30,70 ± 0,411 (1680,57)	Positivo
	3	29,97	30,24	29,29	29,83 ± 0,490 (3071,12)	Positivo
	4	31,59	31,77	31,23	31,53 ± 0,275 (945,48)	Positivo
	5	29,32	29,44	29,87	29,54 ± 0,289 (3754,72)	Positivo
	6	38,39	41,4	41,38	40,39 ± 1,732 (0)	Negativo
	7	34,99	33,13	33,09	33,74 ± 1,086 (204,42)	Positivo
	8	30,86	30,96	30,88	30,90 ± 0,053 (1463,06)	Positivo
	9	30,98	31,19	32,15	31,44 ± 0,624 (1006,36)	Positivo
	10	39,43	39,38	38,4	39,07 ± 0,581 (0)	Negativo

Por otro lado, el resultado obtenido en la evaluación de la repetibilidad de la técnica qPCR en sangre fue de 0,972 ($p < 0,001$), un valor muy próximo a 1, por lo que la repetibilidad fue buena.

Los resultados de concordancia (valores *kappa*) entre las técnicas serológicas y la qPCR se situaron entre 0,043 y 0,211, de manera que la concordancia fue prácticamente nula (Tabla 22) y además la mayoría no fueron significativos. No hubo una relación directa entre los días de detección de mayor carga parasitaria en sangre y los días de mayor título de anticuerpo; es decir, los días de mayor respuesta de anticuerpos hubo menor detección de *T. gondii* en sangre y viceversa.

Tabla 22. Valores de *kappa* para las técnicas serológicas IFI, MAT, ELISA mono especie y ELISA multiespecies con la qPCR en sangre.

Técnicas	Infección experimental
IFI x qPCR	0,211 (p = 0,04)
MAT x qPCR	0,071 (p = 0,484)
ELISA mono especie x qPCR	0,043 (p = 0,679)
ELISA multiespecie x qPCR	0,045 (p = 0,669)

2.2. Discusión

Los resultados de evaluación de las técnicas indirectas en los sueros de los animales infectados revelaron que la técnica IFI detectó la infección antes que las técnicas MAT y los tests ELISA. La técnica IFI detectó anticuerpos frente a *T. gondii* ya en el día 8 p.i., mientras que con MAT y los test ELISA se detectó positividad a los 15 días p.i. Estos resultados coinciden con los observados en el estudio de García et al. (2006) en porcino en el que detectaron positividad de manera más temprana con IFI. Sin embargo, estos autores, a diferencia de nosotros, mediante el test MAT detectaron seropositividad en una fase más avanzada de la infección, a los 21 días p.i. Posteriormente, Pardini et al. (2012) corroboró la idoneidad de la técnica IFI para revelar la infección de *T. gondii* con anterioridad con respecto a la técnica ELISA. Se encontraron observaciones similares, aunque en otras especies, en las investigaciones de Maksimov et al. (2011) durante la evaluación de un ELISA respecto a MAT e IFI con sueros de patos y gansos infectados experimentalmente con *T. gondii*.

Los niveles medios más elevados a lo largo de la infección se obtuvieron en los días 22 para IFI (2,68 (Log10 = 2,68)) ($\approx 1/2560$), 29 para MAT (3,10 (Log 10 = 3,10)) ($\approx 1/4860$), 36 para ELISA mono especie (73,45%P.P) y 50 para ELISA multiespecies (131,37% P.P.). Sin embargo, autores como García et al. (2006) encontraron las mayores titulaciones, aunque similares a las nuestras, en una etapa más tardía de la infección, a los 35 días p.i. con las técnicas IFI y MAT y a los 42 días p.i con la técnica ELISA mono especie.

Tal y como apuntan diversos estudios y acorde a nuestros resultados, la técnica IFI es capaz de detectar anticuerpos que aparecen en una etapa temprana de la infección reaccionando contra los componentes de la membrana del taquizoíto, en cambio las técnicas ELISA y MAT detectan anticuerpos posteriores, como los que reconocen antígenos citosólicos o metabólicos (García et al., 2008; Hirvelä-Koski, 1990; Karim & Ludlam, 1975). En cerdos no infectados experimentalmente, Hirvelä-Koski (1990) también encontró diferencias entre la técnica ELISA e IFI; algunos sueros daban resultados bajos de absorbancia con ELISA y sin embargo, títulos altos de IFI, por lo que asumieron que estos sueros correspondían a las primeras etapas de infección.

Dentro de una misma técnica serológica, los resultados de los 9 cerdos infectados para un mismo día p.i. fueron muy dispares. Una posible razón es que tal y como afirman Al-Aldhami & Gajadhar (2014) no todos los cerdos sufren la misma seroconversión, ya que la respuesta inmunitaria de cada huésped es diferente a pesar de que se hayan infectado con la misma dosis, la misma cepa y sean de la misma especie. No obstante, los niveles medios de anticuerpos IgG de todos los cerdos detectados con todas las técnicas a lo largo de la infección siguieron la misma tendencia: una curva ascendente, para después sufrir un ligero y progresivo descenso hasta el día del sacrificio al igual que en el estudio de García et al. (2006). Una tendencia semejante fue detectada por Basso et al. (2013) al evaluar el mismo kit ELISA mono especie que en nuestras investigaciones, con la salvedad de que a las 11 semanas aún persistían los anticuerpos a un nivel parecido a las semanas previas. Aunque en nuestro estudio sólo se evaluó hasta los 63 días p.i., Dubey (1997) & Onyiche et al. (2015) están de acuerdo en que esta concentración de anticuerpos puede persistir en un nivel elevado incluso de por vida. Según la EFSA (2016), la razón por la que podemos detectar los anticuerpos específicos en el suero en la mayor parte de los días p.i. evaluados es por el hecho de que el sistema inmunológico se ve constantemente afectado por los bradizoitos de quistes rotos que luego se transforman a taquizoitos (EFSA, 2016). Lyons et al. (2002) considera que este proceso de interconversión de taquizoitos-bradizoitos es fundamental para la patogénesis y la longevidad de la infección (Lyons et al., 2002).

En el análisis de los sueros porcinos no infectados experimentalmente, la técnica IFI confirmó la positividad en el 100% de los casos. Dos sueros positivos por IFI fueron negativos por el resto de técnicas. Por otro lado, tres sueros positivos por IFI, MAT y ELISA mono especie fueron negativos por ELISA multiespecie.

En nuestro estudio, se consideró la IFI como la prueba de referencia para el serodiagnóstico de *T. gondii* en cerdos puesto que es utilizada como prueba de oro por varios autores (Elsaid et

al., 1995; Ishizuka et al., 1986; Langoni et al., 2011; Obwaller et al., 1995, Pradhan et al., 2007; Rahman et al., 2011; Sroka et al., 2008). Nuestros resultados en cuanto a la evaluación de las técnicas alternativas a nivel global, es decir, tanto en infección experimental como en natural, revelaron una especificidad relativa del 100% para todas las técnicas, lo que confirmó que la positividad era debida a *T. gondii* y no a ningún otro parásito del filo *Apicomplexa*. Sin embargo, los valores de sensibilidad y veracidad relativas fueron más bajos en especial con la técnica ELISA multiespecies.

Estas discrepancias en cuanto a la sensibilidad de estas técnicas en el análisis de sueros pueden surgir por varios motivos: variaciones en el antígeno empleado en los tests, los diferentes puntos de corte propuestos por los fabricantes y las diferentes metodologías empleadas (Zhan et al., 2016).

Las técnicas IFI y MAT suelen emplear como antígenos parásitos enteros (Dard et al., 2016). Se logra una mayor sensibilidad en la detección temprana de inmunoglobulinas frente a *T. gondii* con técnicas que usan parásitos enteros y antígenos de superficie porque la respuesta inmunitaria se dirige primero contra éstos. Los kits de MAT e IFI empleados en esta investigación utilizan parásitos enteros de la cepa RH cultivada en ratones. Sin embargo, el kit ELISA mono especie comercial utiliza un antígeno de superficie del taquizoíto de *T. gondii* (no especifica cuál) aislado de cultivo celular y el kit ELISA multiespecie utiliza el antígeno de superficie P30 (SAG1). A pesar de que todas las metodologías utilizan parásitos enteros o antígenos de superficie, el aislamiento del parásito nativo también influye en la variabilidad de los resultados. En MAT, IFI y ELISA mono especie, el antígeno se obtuvo a partir de cultivos de tejidos o de ratones y los diversos métodos de preparación realizados por los diferentes fabricantes pueden estar contaminados por materiales extraparasitarios, tales como medio de cultivo o células huéspedes eucariotas, que pueden dar lugar a variabilidad interensayo (Holec – Gasior, 2013; Kotresha & Noordin, 2010). Por lo tanto es necesario un sistema más estandarizado con métodos de preparación estándar (Zhang et al., 2016). Asimismo, Gamble, Dubey, & Lambillotte (2005) informaron que la sensibilidad de la prueba ELISA es menor cuando se utiliza el antígeno de superficie P30. Similares resultados fueron obtenidos por Basso et al. (2013). Puesto que el antígeno P30 también fue empleado en la fabricación de nuestra técnica ELISA multiespecie, ésta podría ser la razón de una menor sensibilidad con respecto al resto de técnicas. Por el contrario, un estudio más actual no encontró diferencias al utilizar un antígeno u otro (Felin et al., 2017). Cabe citar que los resultados obtenidos con el ELISA multiespecies fueron realizados por otro analista y en otro laboratorio en colaboración

con nuestro estudio, por lo que podría ser también la causa de estas diferencias con respecto al resto de técnicas.

Por otro lado, todas las técnicas presentaron unos resultados muy buenos de repetibilidad (0,987 – 0,998) y una concordancia buena o muy buena (0,65 y 0,9 ($p < 0,001$)). En ambas infecciones (natural y experimental), las técnicas que mejores resultados de concordancia proporcionaron fueron MAT y ELISA monoespecie, $k = 0,983$, ($p < 0,001$). En estudios previos los valores de concordancia entre técnicas fueron similares (Dubey et al., 1995a; Garcia et al., 2006). Concretamente, García et al. (2006) también encontraron los mejores resultados de concordancia entre ELISA y MAT aunque ligeramente inferiores a los obtenidos por nosotros, $k = 0,88$ ($p < 0,001$). Empleando también IFI como prueba de oro, García et al. (2006) obtuvieron los mismos resultados de especificidad relativa para el MAT y ELISA monoespecies (100%) pero una sensibilidad superior del ELISA (94,3%) frente al MAT (87%) en sueros porcinos de infección experimental. Por el contrario, Dubey et al. (1995a) al evaluar también estas técnicas, pero en sueros de cerdos no infectados experimentalmente, obtuvieron una sensibilidad y especificidad relativas del 82,9 y 90,2% mediante MAT y 72,9 y 85,9% por medio de la técnica ELISA, ligeramente inferiores a las encontradas en nuestro estudio. Por otra parte, Steinparzer et al. (2015) compararon el mismo kit ELISA monoespecie que en nuestro estudio con dos kits multiespecies en sueros porcinos obteniendo unas sensibilidades de entre 57,3 a 65,2% y especificidades de 97,4 a 99,4%, resultando ser menos sensibles los test multiespecies, como corroboran nuestros resultados. Aún así, la comparación entre estudios es complicada debido a los distintos títulos o porcentajes de absorbancia de corte que emplea cada autor (Aroussi et al., 2015; EFSA, 2007; Felin et al., 2017). Concretamente en estudios llevados a cabo con la técnica IFI se han determinado una amplia variedad de puntos de corte: 1:16 (Magalhães et al., 2017; Veronesi et al., 2011), 1:20 (Correa et al., 2008), 1:25 (Dos Santos et al., 2005), 1:50 (Basso et al., 2013; Pardini et al., 2012) u incluso 1: 64 (Ferreira et al., 2014; Minho et al., 2004). En cuanto a la veracidad relativa, no se puede hacer una comparativa con nuestros resultados ya que no existen estudios que evalúen este parámetro.

En definitiva, en vista de los resultados obtenidos, la técnica IFI permite la detección precoz de la infección, es precisa y de fácil manejo. Ya que es considerada por muchos autores como la prueba de mayor fiabilidad para el serodiagnóstico en cerdo y, dada la experiencia de nuestro grupo de investigación en anteriores proyectos, ha sido la técnica utilizada como referencia en el presente trabajo para determinar la serología porcina. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que existe una buena concordancia entre las técnicas serológicas IFI, MAT y ELISA. Esto, unido a que la repetibilidad de las técnicas ha sido buena, permitiría la

obtención de resultados comparables con todas ellas. Sin embargo, la técnica ELISA multiespecie proporcionó los peores resultados.

El único problema al utilizar las metodologías indirectas para la monitorización en matadero reside en que los parásitos pueden estar presentes en la primera semana sin que haya aparecido todavía la respuesta inmunitaria y por tanto no sea detectable por ninguna de las técnicas. Asimismo, las técnicas serológicas indican que el animal ha estado en contacto con el parásito pero no implica que éste esté viable. Aún así, Herrero et al. (2016) demostró que existía una alta probabilidad de detectar formas viables de *T. gondii* en tejidos de cerdos de infección natural con títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:80, pudiendo ser este título serológico idóneo para discriminar a los animales de mayor riesgo.

La evaluación de la qPCR como metodología de detección directa en sangre proporcionó muy buenos resultados dado que se reveló la presencia del parásito en el 100% de los cerdos infectados. Por lo general, esta técnica con su multitud de variantes y genes diana empleados, ha sido ampliamente utilizada para la detección de *T. gondii* en tejidos porcinos (García et al., 2017; Herrero et al., 2017; Wang et al., 2012; Yai et al., 2003; Yu et al., 2013). Pese a que el diagnóstico molecular de la toxoplasmosis aún no se ha estandarizado hasta la fecha, el gen B1 (Burg et al., 1989) y el elemento repetitivo 529 (529 bp – RE) (Homan et al., 2000) representan las secuencias más fiables para la detección de *T. gondii* en tejidos (Franco-Hernández et al., 2016; García et al., 2006; Hill et al., 2006; Ortega-Pacheco et al., 2013; Veronesi et al., 2017).

Algunos autores consideran que la parasitemia, es decir, la permanencia del parásito en la sangre, no dura más de dos semanas, sin embargo, los resultados observados en este estudio no coinciden con esta afirmación, ya que se detectó presencia de *T. gondii* a los días 8, 15 y 21 p.i., desapareció durante los días 29 y 36 p.i. y reapareció en todos los cerdos el día 50 p.i. hasta el día del sacrificio.

La carga parasitaria en sangre fue muy parecida durante toda la infección y para todos los cerdos (en las ocasiones en las que hubo detección), sin embargo el número de días en los que se detectó el parásito fue variable según el cerdo, detectándose un único día en el cerdo 6. Ésto podría ser debido a que durante la inoculación oral unos pocos ooquistes podrían haber sido derramados en el ambiente o permanecer durante muy poco tiempo en la cavidad oral, y ser transferidos a otros cerdos a través de interacciones sociales como apuntan Forbes, Parker & Gajadhar (2012). Otra de las posibles razones en cuanto a las discrepancias de resultados del cerdo 6 en comparación con el resto, podría ser que tal y como afirman autores como William et al. (1978), Mcleod et al. (1989), Suzuki et al. (1993) y Al-Aldhami & Gajadhar (2014) la

genética del huésped desempeña un papel importante en su susceptibilidad y la gravedad de la infección aunque hayan sido infectados con la misma dosis, la misma cepa y sean de la misma especie.

Apoyando nuestros resultados, los primeros estudios que evaluaron la evolución del parásito en la sangre, mostraron infección recurrente en ratones, conejos y cerdos guinea hasta ocho meses después de la infección experimental (Remington et al., 1961). Djurković-Djaković et al. (2012) examinaron la distribución de *T. gondii* en la sangre de los ratones durante la infección aguda y crónica mostrando que la propagación del parásito era dependiente de la cepa y de la dosis. En la infección con parásitos de cepas virulentas, en caso de una alta dosis infecciosa, se detectó el DNA de *Toxoplasma* dentro de las 24 horas p.i. Por el contrario, en caso de una dosis infecciosa baja, la parasitemia era indetectable en las primeras horas p.i., pero alcanzaba niveles muy altos a medida que la infección progresaba. Con ambas dosis infecciosas, las cargas del parásito antes de la muerte eran más altas en la sangre que en los tejidos. En la infección con parásitos de cepas no virulentas, se observó parasitemia baja pero detectable en todo momento. Por lo que nuestros resultados podrían deberse a una baja dosis para su detección en sangre y al uso de la cepa no virulenta VEG pero necesaria para nuestro trabajo por ser cistogénica. Asimismo, la reaparición de *T. gondii* en la sangre a los 50 días p.i. podría ser debido a que en ocasiones los quistes se pueden romper y liberar bradizoitos que luego se transformarían a taquizoitos y este proceso de interconversión de taquizoitos-bradizoitos es fundamental para la patogénesis y la longevidad de la infección (Lyons et al., 2002). Tal y como dice la EFSA (2016) y al igual que ocurre en nuestro estudio, aunque existe poca literatura científica acerca de ello, la detección directa en tejidos fetales, sangre y leche parece ser la menos idónea para revelar la infección por *T. gondii*.

En general, los días en los que se detectó mayor respuesta de anticuerpo con las 4 técnicas serológicas (28 y 35 p.i.), no se detectó el parásito en sangre mediante qPCR. La concordancia entre las técnicas serológicas y la qPCR en sangre fue prácticamente nula. Además, no hubo una relación directa entre los días de detección de mayor carga parasitaria en sangre y los días de mayor título de anticuerpo; es decir, los días de mayor respuesta de anticuerpos hubo menor detección de *T. gondii* en sangre y viceversa. Se pudo observar que en el cerdo 9 fue en el que se llegó a alcanzar una mayor respuesta de anticuerpos (1:2560) a lo largo de la infección pero aunque fue en el que se detectó más días el parásito en sangre el nivel de carga parasitaria fue similar. Mientras que en el cerdo 6, en el que por lo general la respuesta inmunitaria fue baja alcanzándose 1:640 como valores más altos de título de anticuerpo en

comparación al resto que revelaron valores de 1:1280- 1:2560, únicamente se detectó *T. gondii* en sangre en 2 días a lo largo de la infección.

Hay pocas investigaciones acerca de la asociación entre la carga parasitaria de *T. gondii* encontrada en sangre y los niveles de anticuerpos. De entre estos pocos estudios, Klun et al. (2011), al igual que nosotros, no encontraron asociación significativa entre un aumento general en la carga de *T. gondii* en sangre y un mayor nivel de anticuerpos en cerdos. De manera similar, pero en caprino, Vitor et al. (1999) detectaron la parasitemia hasta los 64 días después de la infección experimental sin relación aparente con anticuerpos específicos detectados mediante ELISA y Western blot. Algunos estudios apuntan que al desarrollarse la respuesta inmune disminuye la parasitemia y los parásitos escapan a los tejidos nervioso, cardíaco, músculos y la retina, donde formarán quistes y a partir de ahí se establece un equilibrio entre los parásitos y los títulos de anticuerpos (Cai, Kastelein & Hunter, 2000).

En conclusión, las técnicas serológicas evaluadas podrían ser una metodología de screening y de monitoreo rutinario a nivel de matadero. El único problema reside en que los parásitos pueden estar presentes en las primeras semanas sin que haya aparecido todavía la respuesta inmunitaria. Por ello, la detección directa mediante qPCR en las primeras semanas podría revelar la infección para seronegativos. En base a nuestros resultados tanto de las técnicas serológicas como las de detección molecular serían útiles para la monitorización de *T. gondii* en matadero como técnicas complementarias.

Los resultados de evaluación de tratamientos previos a la extracción del DNA con el fin de mejorar la sensibilidad de la qPCR fueron similares, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. No obstante, el hecho de que se obtuvieran valores de Ct más bajos con la digestión péptica puede hacer pensar que, con un número mayor de muestras que permitiera la aplicación de test paramétricos, estas diferencias podrían ser significativas. Este hecho, unido a la recomendación de la EFSA (Opsteegh et al., 2016) de aplicar esta metodología para aumentar la sensibilidad de la qPCR, así como su amplia utilización en investigaciones científicas (Bayarri et al., 2010; Dubey, 1998; Herrero et al., 2017; Hill et al., 2018), nos ha llevado a seleccionarla como técnica de tratamiento previo para el análisis de las muestras de carne y productos cárnicos.

Otra de las razones por las que se seleccionó la digestión péptica artificial es porque es la ruta que más se asemeja a una infección natural y el parásito continúa viable. Sroka et al. (2020) confirmaron que los resultados dependían en gran medida del método de procesamiento de la muestra. Estos autores encontraron una concordancia pobre ($\kappa = 0,048$) y moderada ($\kappa = 0,281$)

entre las muestras digeridas y no digeridas de diafragma y tejido cardiaco, respectivamente, arrojando los mejores resultados las muestras digeridas. Aunque la liofilización es un buen método de concentración de microorganismos primero se ha de congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, pero esto podría acabar afectando a la viabilidad del microorganismo (López & Fernández, 2000).

T. gondii tiene una alta predilección por los tejidos neuronales y musculares incluyendo el cerebro, los ojos y los músculos esqueléticos y cardiacos (Dubey et al., 1986, 1998b; Juránková et al., 2014; Guo et al., 2015). Según una evaluación de la EFSA (2016) de todos los artículos publicados hasta la fecha, el cerebro y el corazón son los órganos diana idóneos para la detección del parásito en el cerdo, seguidos de la lengua, el diafragma y el resto de musculatura estriada. Órganos como el hígado, los pulmones, los riñones y el bazo fueron los menos parasitados, a pesar de que fueron examinados en un número razonable de estudios.

En nuestro estudio, la aplicación de la qPCR al análisis de distintos tejidos porcinos (diafragma, lengua, corazón, lomo y pernil), ha mostrado que el parásito se distribuye en todos ellos, determinándose la mayor carga parasitaria en corazón y pernil. El cerebro fue descartado del estudio ya que lo que queríamos era valorar un tejido de fácil recogida en matadero y para obtener éste hay que romper el cráneo.

Verhelst et al. (2015) observaron una distribución casi similar entre los tejidos porcinos infectados experimentalmente analizados (cerebro, corazón, *musculus gastrocnemius* y *musculus longissimus dorsi*). Tras el análisis, estos autores concluyeron que el corazón era el tejido más fiable para demostrar la presencia y la viabilidad del parásito. Corroborando dicha afirmación, Bebbler et al. (2015) sólo pudieron visualizar los quistes en los cerebros de los ratones que habían sido inoculados con corazones procedentes de cerdos y no con el resto de tejidos. De hecho, varios trabajos emplearon el tejido cardiaco para determinar el éxito de la infección experimental por *T. gondii* (Gómez-Samblás, 2016; Genchi et al., 2017).

No obstante, entre los tejidos seleccionados evaluados por Verhelst et al. (2015) no estuvo el pernil. En realidad, hay poca información acerca de la presencia de *T. gondii* en pernil y por lo general se ha observado bajas cargas del parásito hasta en perniles procedentes de cerdos infectados experimentalmente al igual que en nuestro trabajo (Juranková et al., 2014; Genchi et al., 2017; Gómez-Samblás et al., 2016).

En cuanto a órganos diana, Herrero (2019) y Dubey et al. (2012) encontraron una presencia del parásito elevada, un 71,1% y 90,9%, respectivamente. No obstante, a pesar de que las cargas

parasitarias notificadas en órganos diana han sido bajas, constituyen un riesgo para el consumidor (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Guo et al., 2015; Hill, Chirukandoth & Dubey, 2005). Los valores encontrados han sido desde 0,2 hasta 124, 7 parásitos/ g en muestras de corazones al igual que en nuestro trabajo (Herrero, 2019; Juránková et al., 2014; Paredes et al., 2016). Sin embargo, en tejidos cerebrales sí que han encontrado mayores cargas como 1.234 parásitos/g en el estudio de Opsteegh et al. (2010) y 553, 7 parásitos/g en el trabajo de Juránková et al. (2014).

Aun así, no se puede llevar a cabo una correcta comparación debido a la falta de estandarización y de las metodologías empleadas y al gran abanico de métodos de detección molecular.

Herrero (2019) al no observar diferencias estadísticamente significativas en relación a la presencia y a la viabilidad del parásito entre el pernil y los órganos diana, concluyó que los órganos diana podrían ser una buena opción para un sistema de vigilancia y monitorización ya que tienen un menor precio de mercado. Así pues, la detección en los órganos diana se podría emplear como herramienta de control del parásito en los mataderos, sobre todo en los cerdos cuyos tejidos estén destinados a la elaboración de productos curados.

3. Prevalencia de *T. gondii* en porcino en España

3.1. Resultados

En este estudio se detectó a nivel nacional una seroprevalencia total de 28,2% (390/1382) y una prevalencia en carne porcina del 11,88 % (58/488).

3.1.1. Prevalencia de *T. gondii* en cerdo blanco

De los 616 sueros analizados se detectaron anticuerpos frente a *T. gondii* en el 27,6% (170/616) con un título de corte de 1:20. Con un título de corte de 1:80 la seroprevalencia fue del 2,6% (16/616). Los títulos de anticuerpo obtenidos fueron mayoritariamente bajos (1:20) y no se hallaron sueros con titulaciones iguales o superiores a 1:640 (Tabla 23). El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas en cuanto a seropositividad ni en cuanto a títulos de anticuerpo ni por provincias ni por regiones ($p = 0,140$, $p = 0,120$).

Tabla 23. Resultados del análisis serológico de cerdo blanco por provincias y por regiones

Provincias*	Porcentaje de seropositividad por títulos de anticuerpo (muestras positivas/muestras analizadas) (%)						Seroprevalencia total por Regiones (%)
	<1:20	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
A Coruña (n = 3)	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	Galicia 20,69 (6/29)
Lugo (n = 4)	75 (3/4)	0 (0/4)	25 (1/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	
Ourense (n = 15)	80 (12/15)	6,7 (1/15)	0 (0/15)	6,7 (1/15)	6,7 (1/15)	0 (0/15)	
Pontevedra (n = 7)	85,7 (6/7)	14,3(1/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	
Huesca (n = 106)	69,8 (74/106)	20,8 (22/106)	6,6 (7/106)	1,9(2/106)	0,9 (1/106)	0 (0/106)	Aragón 27,44 (45/164)
Teruel (n = 20)	85 (17/20)	15 (3/20)	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)	0 (0/20)	
Zaragoza (n = 38)	73,7 (28/38)	21,1 (8/38)	5,3 (2/38)	0 (0/38)	0 (0/38)	0 (0/38)	
Alicante (n = 1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	C. Valenciana 18,18 (4/22)
Castellón (n = 14)	78,6 (11/14)	14,3 (2/14)	7,1 (1/14)	0 (0/14)	0 (0/14)	0 (0/14)	
Valencia (n = 7)	85,7 (6/7)	14,3 (1/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	
Almería (n = 16)	56,3 (9/16)	12,5 (2/16)	18,8 (3/16)	6,3 (1/16)	6,3 (1/16)	0 (0/16)	Andalucía 38,18 (21/55)
Córdoba (n = 1)	0 (0/1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	
Granada (n = 5)	40 (2/5)	20 (1/5)	40 (2/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	
Jaén (n = 1)	0 (0/1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	
Málaga (n = 11)	81,8 (9/11)	18,2 (2/11)	0 (0/11)	0 (0/11)	0 (0/11)	0 (0/11)	
Sevilla (n = 21)	66,7 (14/21)	23,8 (5/21)	4,8 (1/21)	0 (0/21)	0 (0/21)	4,8 (1/21)	
Barcelona (n = 52)	57,7 (30/52)	30,8 (16/52)	5,8 (3/52)	5,8 (3/52)	0 (0/52)	0 (0/52)	Cataluña 32,18 (65/202)
Girona (n = 37)	73 (27/37)	24,3 (9/37)	0 (0/37)	2,7 (1/37)	0 (0/37)	0 (0/37)	
Lleida (n = 108)	73,1 (79/108)	20,4(22/108)	4,6 (5/108)	1,9(2/108)	0 (0/108)	0 (0/108)	
Tarragona (n = 5)	20 (1/5)	60 (3/5)	20 (1/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	
Badajoz (n = 1)	0 (0/1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	Extremadura 100 (1/1)
Burgos (n = 2)	100 (2/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	Castilla y León 20 (6/30)
Palencia (n = 2)	50 (1/2)	50 (1/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	
Segovia (n = 10)	60 (6/10)	30 (3/10)	10 (1/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	
Valladolid (n = 4)	100 (4/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	
Soria (n = 7)	100 (7/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	
León (n = 1)	0 (0/1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	
Salamanca (n = 1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	
Zamora (n = 3)	100 (3/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	
La Rioja (n = 1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	La Rioja 0 (0/1)
Ciudad Real (n = 1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	Castilla La Mancha 20 (7/35)
Toledo (n = 28)	78,6 (22/28)	10,7 (3/28)	10,7 (3/28)	0 (0/28)	0 (0/28)	0 (0/28)	
Cuenca (n = 6)	83,3 (5/6)	0 (0/6)	16,7 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	
Murcia (n = 61)	82 (50/61)	11,5 (7/61)	3,3 (2/61)	3,3 (2/61)	0 (0/61)	0 (0/61)	Murcia 18,03 (11/61)
Navarra (n = 16)	68,8 (11/16)	31,3 (5/16)	0 (0/16)	0 (0/16)	0 (0/16)	0 (0/16)	Navarra 31,25 (5/16)
Total (n =616)	72,2 (445/616)	19,8 (122/616)	5,4 (33/616)	1,9(12/616)	0,5(3/616)	0,2(1/616)	

*Provincia donde está ubicado el matadero

En relación a la presencia de *T. gondii* en diafragmas de cerdo blanco, se detectó el parásito en el 9,8% de los diafragmas analizados (24/244). La carga parasitaria media en estos tejidos fue baja con valores de Ct de $35,685 \pm 1,024$ (36,090) (40,11 parásitos/g) (Tabla 24). No hubo diferencias significativas en cuanto a una mayor o menor prevalencia en carne ni por provincias ni por regiones ($p=0,143$, $p=0,125$). El peso medio de los diafragmas analizados fue de $13,008 \pm 2,846$ g (10,000). La correlación entre los gramos analizados y la carga parasitaria fue de $\rho = 0,315$, lo que supone una correlación muy baja.

Tabla 24. Resultados del análisis por qPCR de diafragmas de cerdo blanco por provincias y por regiones.

Provincias*	% prevalencia (muestras positivas/ muestras analizadas)	Ct (parásitos/g)	% prevalencia por Regiones
A Coruña (n = 1)	0 (0/1)	-	Galicia 26,67 (4/15)
Lugo (n = 2)	0 (0/2)	-	
Ourense (n = 9)	33,33 (3/9)	36,64 (27,40)	
		34,04 (166,05)	
		33,97 (174,30)	
Pontevedra (n = 3)	33,33 (1/3)	36,33 (33,96)	
Aragón			
Huesca (n = 42)	4,76 (2/42)	36,23 (36,40)	Aragón 9,68 (6/62)
		35,09 (80,21)	
Teruel (n = 11)	27,27 (3/11)	35,47 (61,64)	
		36,82 (24,18)	
		34,39 (130,28)	
Zaragoza (n = 9)	11,11 (1/9)	35,19 (74,84)	
C. Valenciana			
Alicante (n = 1)	0 (0/1)	-	C. Valenciana 0 (0/13)
Castellón (n = 8)	0 (0/8)	-	
Valencia (n = 4)	0 (0/4)	-	
Andalucía			
Almería (n = 5)	0 (0/5)	-	Andalucía 12 (3/25)
Granada (n = 2)	50 (1/2)	33,01 (339,02)	
Jaén (n = 1)	0 (0/1)	-	
Málaga (n = 7)	14,29 (1/7)	36,38 (32,81)	
Sevilla (n = 10)	10 (1/10)	36,02 (42,10)	

Tabla 24. Resultados del análisis por qPCR de diafragmas de cerdo blanco por provincias y por regiones (Continuación).

Barcelona (n = 27)	14,81 (4/27)	36,86 (23,52)	Cataluña 11,84 (9/76)
		36,25 (35,90)	
		36,18 (37,68)	
		35,94 (44,50)	
Girona (n = 14)	0 (0/14)	-	
Lleida (n = 35)	14,29 (5/35)	36,77 (25,04)	
		34,71 (104,37)	
		36,28 (35,16)	
		35,74 (51,12)	
		36,16 (38,21)	
Castilla y León			
Burgos (n = 1)	100 (1/1)	36,53 (29,57)	5,88 (1/17)
Segovia (n = 5)	0 (0/5)	-	
Valladolid (n = 3)	0 (0/3)	-	
Soria (n = 5)	0 (0/5)	-	
León (n = 1)	0 (0/1)	-	
Zamora (n = 2)	0 (0/1)	-	
Castilla La Mancha			
Toledo (n = 7)	0 (0/7)	-	0 (0/10)
Cuenca (n = 3)	0 (0/3)	-	
Murcia			
Murcia (n = 23)	4,35 (1/23)	35,44 (62,93)	4,35 (1/23)
Navarra			
Navarra (n = 3)	0 (0/3)	-	0 (0/3)
Total(n = 244)			
9,8 (24/244)			

*Provincia donde está ubicado el matadero

3.1.2. Prevalencia de *T. gondii* en cerdo ibérico

De los 766 sueros analizados se detectaron anticuerpos frente a *T. gondii* en el 28,7% (220/766) con un título de corte de 1:20. Con un título de corte de 1:80 la seroprevalencia fue del 10,8% (83/766). Los títulos de anticuerpo obtenidos fueron principalmente bajos (1:20), no obstante se hallaron sueros con titulaciones hasta 1:1280 (Tabla 25). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a positividad y negatividad, y en cuanto a títulos de anticuerpo por provincias y por regiones ($p < 0,001$, $p < 0,001$). En concreto, en Murcia se detectaron más animales seropositivos y en Ciudad Real y Toledo más seronegativos. También se encontraron diferencias en cuanto a títulos de anticuerpo, en Murcia los títulos obtenidos fueron estadísticamente muy superiores al resto de provincias, el 13,8% fueron de 1:160 y el 15,4% de 1:320.

Tabla 25. Resultados serológicos de cerdo ibérico en cuanto a títulos de anticuerpo por provincias y regiones.

Provincias*	Porcentaje de seropositividad por títulos de anticuerpo (muestras positivas/muestras analizadas) (%)								Seroprevalencia total por Regiones (%)
	<1:20	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
Córdoba (n =212)	66,5 (141/212)	15,1 (32/212)	8,0 (17/212)	2,4 (5/212)	2,4 (5/212)	3,3 (7/212)	1,4 (3/212)	0,9 (2/212)	Andalucía 32,20 (85/264)
Sevilla (n = 52)	73,1 (38/52)	9,6 (5/52)	1,9 (1/52)	0 (0/52)	3,8 (2/52)	3,8 (2/52)	5,8 (3/52)	1,9 (1/52)	
Badajoz** (n = 314)	72,9 (229/314)	12,4 (39/314)	8,9 (28/314)	6,4 (2/314)	1,6 (5/314)	1,3 (4/314)	1,3 (4/314)	0,1 (3/314)	Extremadura 25,82 (102/395)
Cáceres (n = 81)	79,0 (64/81)	3,7 (3/81)	4,9 (4/81)	1,2 (1/81)	1,2 (1/81)	2,5 (2/81)	4,9 (4/81)	2,5 (2/81)	
Ciudad real (n=10)	100 (10/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	Castilla La Mancha 0 (0/32)
Toledo (n = 22)	100 (22/22)	0 (0/22)	0 (0/22)	0 (0/22)	0 (0/22)	0 (0/22)	0 (0/22)	0 (0/22)	
Murcia (n = 65)	56,9 (37/65)	3,1 (2/65)	1,5 (1/65)	3,1 (2/65)	13,8 (9/65)	15,4 (10/65)	3,1 (2/65)	3,1 (2/65)	Murcia 43,08 (28/65)
Portugal** (n = 10)	0,5 (5/10)	0,4 (4/10)	0,1 (1/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	Portugal 50 (5/10)
Total (n = 766)	71,3 (546/766)	11,1 (85/766)	6,8 (52/766)	1,3 (10/766)	2,9 (22/766)	3,3 (25/766)	2,1 (16/766)	1,3 (10/766)	

*Provincia donde está ubicado el matadero. **Elvas se sitúa a 20 km de Badajoz

En relación a la presencia de *T. gondii* en diafragmas de cerdo ibérico, se detectó el parásito en el 13,9% de los 244 diafragmas analizados (34/244). La carga parasitaria media en estos tejidos obtenida mediante qPCR fue de Cts de $34,457 \pm 0,599$ (34,45) (124,98 parásitos/g) (Tabla 26). No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a una mayor o menor prevalencia en carne ni por provincias ni por regiones ($p= 0,455$, $p= 0,322$). El peso medio de los diafragmas analizados fue de $20,147 \pm 5,147$ g (20,00). La correlación entre los gramos analizados y la carga parasitaria fue de $p = 0,134$, lo que supone una correlación muy baja.

Tabla 26. Resultados del análisis por qPCR de diafragmas de cerdo ibérico por provincias y por regiones .

Provincias	% prevalencia (muestras positivas/ muestras analizadas)	Ct (parásitos/g)	% prevalencia por Regiones
Córdoba (n =93)	17,20 (16/93)	34,97 (87,16)	<u>Andalucía</u> 17,20 (16/93)
		34,62 (111,09)	
		34,58 (114,21)	
		34,27 (141,58)	
		34,23 (145,56)	
		33,72 (207,27)	
		33,64 (219,09)	
		34,03 (167,20)	
		34,03 (167,20)	
		34,13 (156,01)	
		34,83 (96,04)	
		34,89 (92,13)	
		35,12 (78,56)	
		33,66 (216,07)	
33,89 (184,24)			
33,86 (188,11)			
Lleida (n = 1)	0 (0/1)	-	<u>Cataluña</u> 0 (0/1)
Badajoz (n = 113)	10,62 (12/113)	34,72 (103,65)	<u>Extremadura</u> 12,5 (18/144)
		34,34 (134,88)	
		34,63 (110,32)	
		34,09 (160,39)	
		34,83 (96,04)	
		34,91 (90,86)	
		34,32 (136,76)	
		33,76 (201,60)	
		34,09 (160,39)	
		34,13 (156,01)	
		33,76 (201,60)	
		34,09 (160,39)	
		34,72 (103,65)	
		34,34 (134,88)	
Cáceres (n = 31)	19,35 (6/31)	33,95 (176,73)	
		34,56 (115,80)	
		34,6 (112,64)	
		34,84 (95,38)	
		36,76 (25,21)	
		35,01 (84,78)	
Ciudad real (n = 1)	0 (0/1)	-	<u>Castilla La Mancha</u> 0 (0/1)
Portugal (n = 5)	0 (0/5)	-	<u>Portugal</u> 0 (0/5)
Total (n = 244)	13,93 (34/244)		

La concordancia entre la seroprevalencia y la prevalencia en tejidos fue débil (valor kappa de $0,222 \pm 0,046$ ($p < 0,001$)). Sin embargo, se detectó una mayor probabilidad de detectar DNA de *T. gondii* en diafragma en animales con títulos de anticuerpos iguales o superiores a 1:80 (37,84%) con respecto a animales con títulos de anticuerpos inferiores a 1:80 (9,66%) ($p < 0,001$).

3.1.3. Comparativa de prevalencia de *T. gondii* en cerdo blanco e ibérico

El estudio comparativo entre cerdo blanco e ibérico demostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a títulos serológicos ($p < 0,001$). Así, los títulos de anticuerpo en cerdo ibérico fueron significativamente más elevados que las titulaciones serológicas en cerdo blanco.

En cuanto a la seroprevalencia del parásito, el análisis estadístico reveló que no hubo diferencias significativas entre cerdo blanco (27,7%) y cerdo ibérico (28,7%) con un punto de corte 1:20 ($p = 0,674$). No obstante, sí que hubo diferencias significativas cuando los puntos de corte eran mayores o iguales a 1: 40 ($p < 0,001$). La Tabla 27 muestra la seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo blanco e ibérico calculada teniendo en cuenta diferentes puntos de corte en función de la titulación.

Tabla 27. Seroprevalencia de *T. gondii* en función de distintos puntos de corte por titulación.

	Títulos de anticuerpo (Seroprevalencia, %)				
	≥ 1:20	≥ 1:40	≥ 1:80	≥ 1:160	≥ 1:320
Cerdo blanco	171/616 (27,8)	49/616 (8,0)	16/616 (2,6)	4/616 (0,7)	1/616 (0,2)
Cerdo ibérico	220/766 (28,7)	135/766 (17,6)	83/766 (10,8)	73/766 (9,5)	51/766 (6,7)

Con relación a la prevalencia en carne, no se encontraron diferencias significativas entre cerdo ibérico (13,9%) y blanco (9,8%) ($p = 0,162$), pero sí en cuanto a carga parasitaria ($p < 0,001$), con menos en cerdo blanco que en ibérico (Figura 47).

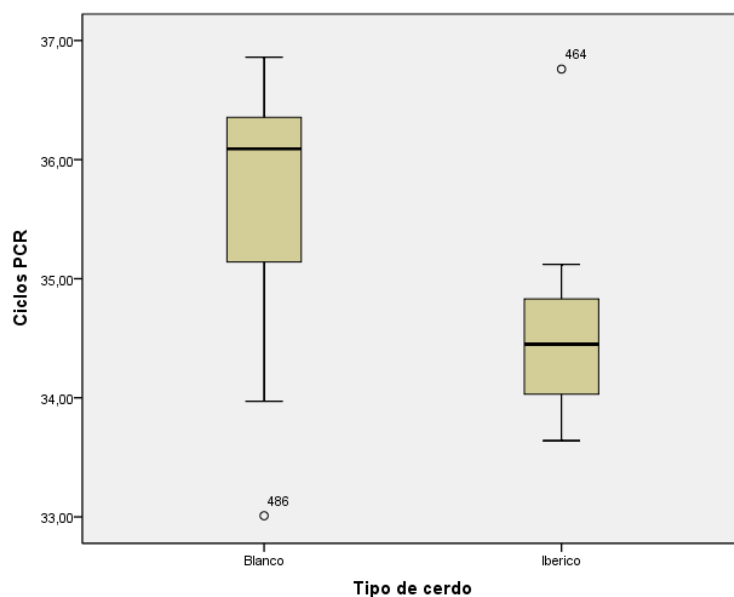


Figura 47. Ciclos de qPCR de las muestras de diafragma en función de la raza del cerdo.

3.2. Discusión

Existen numerosos estudios de seroprevalencia que proporcionan información en relación a la infección por *T. gondii* de los cerdos en diferentes áreas geográficas. Las cifras de seroprevalencia a nivel mundial son muy heterogéneas tanto entre países como dentro de un mismo país, variando entre el 0% y el 95,8%.

En concreto en España, los datos de seropositividad porcina son limitados. Tan sólo se ha realizado un estudio a nivel nacional (García-Bocanegra et al., 2010) y 5 regionales (Castillo - Cuenca et al., 2019; García - Bocanegra et al., 2010c; Hernández et al., 2014; Herrero et al., 2016 Sánchez-Murillo et al., 2004).

En este estudio se detectó una seroprevalencia nacional total de 28,2%. Este valor procede de la media de los valores obtenidos en cerdo blanco (27,8%) y en cerdo ibérico (28,7%). Esta seroprevalencia nacional total supone un porcentaje superior al informado por García - Bocanegra et al. (2010) en España (16,6%), pero similares a los señalados en otros estudios realizados en Rumanía (23,1%) (Paștiu et al., 2013), Polonia (26,4%) (Sroka et al., 2008), Serbia (28,9%) (Klun et al., 2006), Brasil (25,5%) (De Sousa et al., 2014), Antillas (24,3%) (Sharma et al., 2015) y Burkina Faso (29%) (Bamba et al., 2016). En regiones españolas como Cataluña, Extremadura, Aragón y Comunidad Valenciana también se registraron cifras similares, 21,2 %, 23,3 %, 24,5% y 27,3 % respectivamente (García-Bocanegra et al., 2010a, Herrero et al., 2016). Valores más bajos fueron detectados en otras Comunidades Autónomas de España (0,5 % - 18,5 %) como Galicia, Murcia y Castilla y León (García Bocanegra et al., 2010a), y en otros países como Italia (0,5 % - 2,1 %), Dinamarca (3,1 %), Inglaterra (3,6 %), Letonia (4,2 %), Estonia

(5,8 %) o Portugal (7,1 % - 9,8 %) (Deksne & Kirjušina, 2013; Gazzonis et al., 2018; Esteves et al., 2014; Grønbech et al., 2017; Limon et al., 2017; Lopes et al., 2013; Papini et al., 2017; Santoro et al., 2017;). Sin embargo, se han notificados datos de seropositividad más elevados en algunos países como República Checa (36 %), Nigeria (45,2 %), Inglaterra (47,4 %), China (70 %) o México (95,8 %) (Balea et al., 2012; Bártoová & Sedlák, 2011; Gamble, Brady & Dubey, 1999; Li et al., 2015; Ortega-Pacheco et al., 2013).

Ahora bien, la diversidad de pruebas serológicas empleadas en todos estos estudios y los diferentes valores de corte seleccionados, que no siempre son indicados por los autores, hacen que una comparación entre estudios de seroprevalencia sea difícil. Además, son escasos los trabajos de validación de estas metodologías que aporten resultados sobre sensibilidad, especificidad y grado de concordancia entre las distintas técnicas (Aroussi et al., 2015). En algunos estudios, una baja especificidad de las pruebas serológicas puede haber sobrestimado la seroprevalencia o una baja sensibilidad puede haber llevado a una subestimación. Así pues, para poder contrastar correctamente los datos aportados por los distintos estudios sería imprescindible que en ellos se realizara una mayor descripción de los métodos serológicos y de los antígenos empleados. Asimismo, las granjas muestreadas, la zona geográfica y la climatología en la que se sitúen, el sistema de producción empleado, la edad de los cerdos y la tecnificación y la gestión de estas instalaciones también pueden ser la razón de la variabilidad de los datos (Alvarado-Esquivel et al., 2014; Djokic et al., 2016; Foroutan et al., 2019).

En nuestro estudio encontramos una seroprevalencia en cerdo blanco del 27,7%. En las regiones que registran mayores temperaturas durante todo el año, climas más cálidos y precipitaciones y humedad moderadas, podría darse una mayor esporulación de los ooquistes y supervivencia del parásito (Dubey & Beattie, 1988; Hernández et al., 2014; Foroutan et al., 2019). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en cuanto a positividad ni en cuanto a títulos de anticuerpos en cerdo blanco ni por provincias ni por regiones y la mayoría fueron bajos, detectándose en su mayoría titulaciones de 1:20. También es importante recalcar que el muestreo que se nos fue dado no fue homogéneo entre provincias, por lo que una comparación en cuanto a porcentajes es difícil. Autores como García- Bocanegra et al. (2010) a pesar de encontrar una mayor seroprevalencia en la Comunidad Valenciana (27,3 %), Extremadura (23,3 %) y Cataluña (21,2 %), recalcaron que las granjas de cerdo blanco en España están en su mayoría bajo manejo intensivo, lo cual implica que las condiciones climáticas internas de las granjas están relativamente controladas y por lo tanto, las condiciones climáticas externas, aunque importantes para la supervivencia y la esporulación de los ooquistes como se ha mencionado anteriormente, no serían un factor tan

importante como se ha observado para la vida silvestre. Otros factores (no evaluados en este estudio), como la presencia de gatos en las granjas y pueblos de los alrededores, la falta de control de roedores, la edad de los cerdos y el tamaño y la gestión de las condiciones de cada granja (Herrero, 2019) podrían ser la causa de la baja- moderada seroprevalencia observada en este trabajo. El gato es el principal responsable de la permanencia de la infección por *T. gondii* en las instalaciones a través de la eliminación de ooquistes y la contaminación del pienso y agua (Dubey & Beattie, 1988; García-Bocanegra et al., 2010a, 2010c; Du et al., 2012; de Sousa et al., 2014; EFSA, 2017). Es más, la presencia de gatos puede incrementar el riesgo relativo de contagio con el parásito en las granjas en más de once veces (García-Bocanegra et al., 2010a). Los gatos pueden excretar hasta 20 millones de ooquistes al día a lo largo de una infección primaria y hasta 1 millón al día durante una infección secundaria en función de la cepa del parásito, la edad del gato y la cantidad de quistes ingeridos (Dubey et al., 1995b; Dawson et al., 2005). Asimismo, los ooquistes pueden sobrevivir y permanecer infectivos en condiciones climatológicas adversas durante más de 18 meses (Du et al, 2012; Ortega-Pacheco et al, 2013). Se ha comprobado también que la seroprevalencia porcina incrementa con la edad de los cerdos debido a que aumenta el tiempo de exposición a *T. gondii* (Djokic et al., 2016; Feitosa et al., 2014; Jennes & Cox, 2017; Kijlstra & Jongert, 2008; De Sousa et al., 2014; Xu et al., 2015). Asimismo, una mala conservación de las instalaciones y la ausencia de un sistema de control de roedores, animales que también son un reservorio del parásito y son ingeridos por los cerdos, implica a una mayor exposición a *T. gondii* (Dubey et al, 1995b; Hill et al., 2005; Veronesi et al., 2011; Weigel et al., 1995). Finalmente, otro aspecto que se ha observado que provoca un aumento de la seroprevalencia es la existencia de una menor tecnificación de las granjas. Al haber mayor concentración de animales criados en espacios pequeños, cuando ocurre algún fallo y hay una fuente de contaminación, la cantidad de cerdos expuestos es mayor (Herrero, 2019).

Por otra parte, los títulos de anticuerpo frente a *T.gondii* observados en cerdo blanco en este estudio fueron mayoritariamente bajos (1:20) y no se hallaron sueros con titulaciones iguales o superiores a 1:640. García - Bocanegra et al. (2010), aún utilizando distinta técnica serológica (MAT) y distinto punto de corte (1:25) también encontraron mayoritariamente títulos bajos y en el punto de corte, 158 sueros de los 228 cerdos seropositivos fueron títulos de anticuerpo de 1:25. No obstante, a diferencia de nosotros, observaron algunas titulaciones superiores a 1:640, alcanzando niveles incluso superiores a 1:1600. Años más tarde, Herrero et al. (2016), en un estudio serológico realizado mediante IFI en Aragón, encontraron titulaciones también bajas de 1:20 pero no llegaron a detectar animales con un título serológico superior a 1:160.

Por otro lado, encontramos una seroprevalencia a nivel nacional del 28,7% en cerdo ibérico. En este caso, sí que hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a positividad y negatividad, y en cuanto a títulos de anticuerpo por provincias y por regiones. En Murcia se detectaron más animales seropositivos (43,08%) y en Castilla La Mancha más seronegativos (100%). En cuanto a títulos de anticuerpo, en Murcia fueron estadísticamente muy superiores, el 13,8% fueron de 1:160 y el 15,4% de 1:320 con respecto al total de sueros analizados en esta región. A nivel regional, Castillo - Cuenca et al. (2019) y Hernández et al. (2014) encontraron seroprevalencias similares a las encontradas en nuestro trabajo en cerdos de cría extensiva. Castillo - Cuenca et al. (2019) detectaron una seropositividad de *T. gondii* del 24,3% en el suroeste de España (Andalucía y Extremadura), regiones con mayor producción de cerdo ibérico, en el 86% de los 114 rebaños analizados. En estas mismas regiones entre el 2008 y el 2009, Hernández et al. (2014) notificaron una seroprevalencia del 27,9 % en cerdo ibérico. Por el contrario, Sánchez - Murillo et al. (2004) detectaron seropositividades superiores (61 %) en cerdos ibéricos en Extremadura. Valores significativamente más bajos fueron obtenidos en un estudio actual realizado por Gómez-Samblás et al. (2020), de tan sólo el 10 % en Aracena (Huelva), los autores achacaron esta baja seroprevalencia a la baja presencia de gatos en la "Dehesa". Por otra parte, a diferencia del cerdo blanco, no se puede hacer una comparación entre estudios en cuanto a títulos de anticuerpo por no ser aportados por los autores.

En nuestro estudio, Murcia, en la que se detectó mayor seroprevalencia, no se trata de la Comunidad Autónoma más cálida ni la más húmeda, por lo que no podríamos atribuir las condiciones climatológicas a este porcentaje superior respecto al resto de regiones. Una de las razones podría ser que al tratarse de un sistema de producción extensiva, los animales en concreto en esa región tengan un contacto más estrecho con otras especies animales silvestres, que en el resto de Comunidades Autónomas españolas lo que facilite la libre circulación y transmisión de *T. gondii* (Astorga et al., 2010). El territorio de Murcia y las áreas colindantes son los hábitats de cría, refugio y alimentación de un importante número de vertebrados terrestres destacando el Gato montés (*Felis sylvestris*) y el Tejón (*Meles meles*). Otros mamíferos presentes en el municipio son el jabalí (*Sus scrofa*), la rata de agua (*Arvicola sapidus*) y el zorro (*Vulpes vulpes*). Entre las aves, aparecen hasta 1241 especies nidificantes de las cuales 76 se incluyen en alguna de las categorías de amenaza a escala nacional o europea. El área más importante a escala europea para la protección de las aves es el Monte de El Valle y las Sierras de Altaona-Escalona, junto con los campos de Sucina situados todos ellos en esta región. Dado que los gatos, roedores y jabalís son una importante fuente de infección, podría ser necesario un control más exhaustivo de los alrededores de las instalaciones de cría de

cerdo para así minimizar el riesgo de infección en esta Comunidad. Asimismo, puesto que la infección por *T. gondii* en aves en libertad suele ser indicador de la contaminación ambiental con ooquistes del parásito (Dubey, 2010), realizar un análisis serológico periódico en esta Zona de Especial protección para las Aves (ZEPA) podría ser útil para prevenir futuras infecciones por *T. gondii* en cerdos de granjas de alrededores.

Asimismo, la edad de los animales y si se trata de cerdos de engorde o cerdas reproductoras también influye en la seroprevalencia de *T. gondii* (Dubey, 2009b; Gazzonis et al., 2018; Guo et al., 2015). La seropositividad del parásito es normalmente superior en cerdos adultos y criados al aire libre que en lechones y cerdos criados en granjas de producción intensiva (Basso et al., 2015; Blagojevic & Antic, 2014; Dubey, 2010; García-Bocanegra et al., 2010b). Asimismo, Grønbech et al. (2017) señalaron que las cerdas adultas de cría tienen 10,8 veces más riesgo de ser infectados que los cerdos de engorde.

Por otra parte, en nuestra investigación no hubo diferencias significativas de seroprevalencia entre cerdo ibérico (27,7%) y cerdo blanco (28,72%) con un punto de corte 1:20, aunque sí que hubo diferencias significativas en cuanto a títulos de anticuerpo. Éstos fueron significativamente más elevados en cerdo ibérico que en cerdo blanco. Tan sólo un 2,6% de los sueros totales analizados fue de titulación igual o superior a 1:80 en cerdo blanco, mientras que en cerdo ibérico fue de un 10,9%. A pesar de que en el sistema de cría en instalaciones porcinas es más seguro ya que limitan la posibilidad de contacto con el parásito presente en el medio ambiente y la prevalencia suele ser más baja (Dubey, 2009; Fernandes et al., 2012; Limon et al., 2017; Muraro et al., 2010; Piassa et al., 2010), en nuestro caso la diferencia entre el manejo intensivo y extensivo tan sólo fue de un 1 %. Gómez-Samblás et al. (2020) también encontraron valores de seroprevalencia similares en explotaciones ganaderas extensivas e intensivas en el sur de España indicando que el entorno natural donde se criaron los cerdos ibéricos estaba alejado de las zonas urbanas habitadas donde la población de gatos infectados con *T. gondii* puede alcanzar hasta el 74% (Tenter, Heckeroth, & Weiss, 2000). La seroprevalencia en España varía dependiendo del tipo de granja de ganado. Pablos-Tanarro et al. (2018) obtuvo valores por lo general más bajos en ambos sistemas de producción que en nuestro estudio aunque ligeramente superiores en granjas extensivas en el sur de España, 11,7% frente a un 1,1 % en granjas con acceso al exterior y a un 3,2% en intensivas en interiores. Estos autores concluyeron que se la razón de estos resultados era debida a la ausencia definitiva del gato, que normalmente vive en un ambiente doméstico.

No obstante, sí que hubo diferencias significativas de seroprevalencia entre cerdo ibérico y cerdo blanco con un punto de corte 1:80. En nuestro estudio, con este punto de corte, la

seroprevalencia en cerdo blanco disminuiría a un 2,6% frente a un 10,9% en cerdo ibérico. Autores como Herrero et al. (2016) indicaron que aquellos animales con una titulación igual o mayor a 1:80 tienen más riesgo de tener el parásito viable en sus tejidos (pernil).

Para conocer más acerca del papel que tiene la carne como fuente de infección de *T. gondii* para el ser humano es importante tener datos de prevalencia de quistes tisulares en la carne fresca (Opsteegh et al., 2016).

En nuestro estudio se detectó una prevalencia total en diafragmas porcinos del 11,88% a nivel nacional. Valores similares fueron señalados en Escocia (12,3%) (Plaza et al., 2020), Irlanda (13%) (Hálová et al., 2013), Brasil (14,2%) (Belfort-Neto et al., 2007) y China (13,56%) Zhuo et al. (2015). Prevalencias más bajas fueron detectadas en EE.UU. con un 0,3 % (Dubey et al., 2005) y México con un 2,1 % (Galván-Ramírez et al., 2010). No obstante, se han notificado cifras más elevadas de detección en carne del 50 al 65 % en países como Japón o Brasil (Belfort-Neto et al., 2007; Bezerra et al., 2012; Fernandes et al., 2012; Frazão-Teixeira et al., 2006; Zakimi et al., 2006).

No obstante, al igual que en los estudios de seroprevalencia, comparar entre los diferentes estudios de prevalencia en carne publicados es complicado, ya que se utilizan múltiples metodologías de detección directa, distintos protocolos de PCR y distintos genes diana (Bacci et al., 2015; Bayarri et al., 2012; Herrero et al., 2017; Klun et al., 2011; Plaza et al., 2020; Veronesi et al., 2017; Zhuo et al., 2015). Por lo que resulta imprescindible una estandarización de estas metodologías para llevar a cabo una adecuada evaluación y comparación entre estudios.

En España contamos únicamente con los datos aportados por Bayarri et al. (2012) que detectaron a *T. gondii* en el 8% de las muestras de carne fresca porcina procedentes de distintos establecimientos localizados en la ciudad de Zaragoza. Existen pocos estudios de viabilidad y la probabilidad de encontrar a *T. gondii* viable es baja. En nuestro trabajo no se pudo evaluar la viabilidad del parásito en los diafragmas ya que recibimos estas muestras en congelación, únicamente pudimos detectar la presencia de *T. gondii* en estos tejidos. Galván-Ramírez et al. (2010) sí que pudieron analizar la viabilidad de *T. gondii* en muestras de carne de cerdo de carnicerías en México, detectando 2.1% de positividad. A su vez, Dubey et al. (2005) informó de una prevalencia de *T. gondii* viable en la carne de cerdo al por menor de tan sólo el 0,5% en EE.UU. En todos estos estudios se evaluó la viabilidad del parásito mediante la técnica del bioensayo. Por el contrario, Aspinall et al. (2002) únicamente aportó datos de presencia,

mediante qPCR y obtuvo un 34,5% de positividad en productos de venta al por menor en Reino Unido.

El dato de prevalencia en carne a nivel nacional obtenido en nuestra investigación fue del 9,8% en cerdo blanco y del 13,9% en cerdo ibérico, datos muy inferiores al señalado por Aspinall et al. (2002). En cuanto a provincias y regiones, no influyeron significativamente en cuanto a más o menos detección del parásito en la carne ni en cerdo blanco ni en ibérico.

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a cerdo ibérico y blanco a nivel de positividad y negatividad, sí que fueron observadas en cuanto a carga parasitaria, habiendo menos carga parásita en cerdo blanco (36,09) que en ibérico (34,45). Este mayor nivel de carga parasitaria en cerdo ibérico probablemente es la razón de encontrar títulos de anticuerpo más elevados, debido a una mayor estimulación antigénica.

En los seres humanos no se ha establecido una dosis infectiva de *T. gondii*, extrapolando los resultados obtenidos en animales se señaló que la dosis infectiva sería de 10^4 parásitos, aunque si bien es cierto variaría según la cepa de la que se tratara (Warnekulasuriya et al., 1998; Vargas-Villavicencio et al., 2016). En este aspecto autores como Opsteegh et al. (2011) y Guo et al. (2016, 2017) están desarrollando modelos de dosis-respuesta para predecir la probabilidad de infección en las personas por *T. gondii* a causa del consumo de productos cárnicos infectados. No obstante, en base a nuestros resultados, habría mayor riesgo de infección al consumir cerdo ibérico en comparación con la ingestión de cerdo blanco.

En general, la seropositividad es un buen indicador de la presencia del parásito en los tejidos y algunos autores mencionan que el nivel de detección aumenta cuanto mayor es el título de anticuerpos en el cerdo (Dubey & Jones, 2008; Herrero et al., 2016; Opsteegh et al., 2016). Únicamente pudimos evaluar la relación entre seroprevalencia y prevalencia en carne en cerdo ibérico porque el muestreo en cerdo blanco no permitió obtener suero y diafragma del mismo animal. Según la EFSA (2016), la probabilidad de detectar parásitos en los seropositivos es mayor en los cerdos (58,8%), seguido pollos (53,4%), ovejas y cabras (39,4% y 34,9%) y más baja en caballos y ganado. Sin embargo, la concordancia entre nuestros resultados de seroprevalencia y la prevalencia en tejidos de cerdo ibérico fue débil, con un valor *kappa* de $0,222 \pm 0,046$ ($p < 0,001$). No obstante, hubo una probabilidad significativamente mayor de detectar DNA de *T. gondii* en diafragma cuando los títulos de anticuerpo eran superiores a 1:80. Hecho que coincide con lo mencionado por algunos autores: la detección aumenta cuanto mayor es el título de anticuerpos en el cerdo (Dubey & Jones, 2008; Herrero et al., 2016; Opsteegh et al., 2016). Similares resultados fueron recogidos por la EFSA (2016), pues

aunque en otras especies las tasas de detección en los seronegativos fueron bajas, en cerdos fue de hasta el 4,9%. Por lo general se obtuvo una seroprevalencia y una mayor carga parasitaria en cerdo ibérico. Esta mayor carga parasitaria en carne correspondiente a altos títulos de anticuerpo en suero podría implicar un mayor porcentaje de *T. gondii* viable en el tejido tal y como apunta Herrero et al. (2016), aunque en nuestro trabajo no se ha llevado a cabo el bioensayo para determinar dicha viabilidad ya que las muestras de diafragma estaban congeladas.

En conclusión, nuestros resultados indican una amplia y heterogénea distribución de *T. gondii* en las explotaciones de cerdo españolas en ambos sistemas de producción. A pesar de que la seroprevalencia detectada ha sido de baja a moderada, ha sido superior a la notificada por García-Bocanegra et al. (2010b) en el único estudio realizado a nivel nacional en España 10 años atrás. Por otro lado, aunque no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a seropositividad ni positividad en carne en ambos sistemas de producción, sí que se han obtenido mayores títulos de anticuerpo y cargas parasitarias en carne de cerdo ibérico, por lo que podría haber mayor riesgo de infección al consumir carne procedente de esta raza. Puesto que el consumo de productos procedentes de estas especies se suelen consumir poco cocinados o curados inadecuadamente podría tener implicaciones en la Salud Pública. Por ello, es fundamental implementar un programa de prevención y vigilancia para detectar granjas de mayor riesgo y realizar procesos de gestión adecuados para minimizar la infección, por lo que resulta imprescindible conseguir “Granjas Libres de *T. gondii*” para proporcionar materia prima más segura al consumidor.

4. Influencia del curado de productos cárnicos en la viabilidad de *T. gondii*

4.1. Resultados

4.1.1. Paletas y jamones curados

Los resultados de la influencia del curado en la viabilidad de *T. gondii* en jamones y paletas procedentes de cerdos infectados experimentalmente se presentan en la tabla 28.

T. gondii se detectó, por qPCR y/o bioensayo en ratón, en todos los jamones y paletas procedentes de los 9 cerdos infectados experimentalmente. El promedio de Cts obtenidos en los extractos de digestión de las paletas fue de $34,87 \pm 0,58$ (93,68 parásitos/g) y de los jamones de $34,46 \pm 0,80$ (124,11 parásitos/g). Los títulos de anticuerpos obtenidos por bioensayo en ratón fueron bajos, se situaron entre 1:10 y 1:20. No se detectó el parásito en el jamón y paleta utilizados como controles negativos.

En relación a la localización de la muestra (interior/exterior), se detectó el parásito en todas las piezas. El estudio estadístico demostró que no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos de la parte interior y de la exterior de los jamones y paletas ($p = 0,511$).

Con respecto a la aplicación de la qPCR para la detección del parásito en las matrices curadas, el porcentaje de error de dicha metodología analítica, teniendo en cuenta las partes interiores y exteriores de las piezas, fue muy bajo, del 4,4% en los jamones/paletas procedentes de los cerdos infectados experimentalmente y del 0% en los controles negativos

El tratamiento del curado fue eficaz frente a *T.gondii*, ya que el parásito no fue viable en el 52,9% de los jamones y paletas. Sin embargo, el parásito permaneció infectivo en 6 paletas y 10 jamones pero no hubo diferencias significativas de viabilidad entre las paletas y los jamones ($p = 0,189$). El promedio de Cts obtenidos en los cerebros de los ratones seropositivos a los que se les había inoculado extractos de paletas fue de $32,99 \pm 1,38$ (343,75 parásitos/g) y de $32,04 \pm 2,01$ (663,99 parásitos/g) a los que se les había inoculado extractos de jamones.

En relación a la localización de la toma de muestra (interior/exterior), se detectó mayor viabilidad de *T. gondii* en el interior ($n= 12, 17,7\%$) que en el exterior ($n=8, 11,8 \%$) sin embargo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas ($p=0,431$).

Tabla 28. Resultados de presencia y viabilidad de *T. gondii* en jamones y paletas curados procedentes de cerdos infectados experimentalmente.

Identificación			Paletas curadas				Jamones curados					
			Presencia		Viabilidad		Presencia		Viabilidad			
			PCR extracto ¹	Bioensayo en ratón ²	PCR Cerebro ³		Viabilidad de <i>T. gondii</i> en paletas ⁴	PCR extracto	Bioensayo en ratón	PCR cerebro	Viabilidad de <i>T. gondii</i> en jamones	
1	1.1.	Interior	34,57 ± 0,34 (115,00)	1/4	1/1	32,21 (590,20)	Positivo	34,76 ± 0,21 (100,82)	0/3		Positivo	
		Exterior	34,8 ± 0,54 (98,06)	1/4	0/1			34,31 ± 0,33 (137,71)	2/4	1/2		30,56 (1851,79)
	1.2.	Interior	34,7 ± 0,23 (105,10)	1/3	1/1	31,03 (1337,02)	Positivo	38,30 ± 0,33	1/4	0/1	Positivo	
		Exterior	34,23 ± 0,48 (145,56)	2/2	1/2	31,66 (864,03)		33,61 ± 0,48 (223,69)	2/4	2/2		31,95 (706,72) 29,19 (4785,37)
2	2.1.	Interior	34,47 ± 0,76 (123,26)	1/4	0/1		Negativo	35,33 ± 0,52 (67,92)	1/3	1/1	33,81 (194,74)	Positivo
		Exterior	35,12 ± 0,38 (78,56)	1/4	0/1			33,11 ± 0,75 (316,32)	1/4	0/1		
	2.2.	Interior	35,2 ± 0,22 (74,32)	1/4	0/1		Negativo	33,61 ± 0,32 (223,69)	0/4		Negativo	
		Exterior	35,72 ± 0,33 (51,84)	2/4	0/2			34,42 ± 0,28 (127,60)	0/4			
3	3.1.	Interior	34,22 ± 0,41 (146,57)	2/4	0/2		Negativo	38,55 ± 0,33	4/4	2/4	33,18 (301,34) 34,46 (124,11)	Positivo
		Exterior	34,23 ± 0,55 (145,56)	0/4				33,98 ± 0,43 (173,10)	3/4	2/3	33,62 (222,14) 34,22 (146,57)	
	3.2.	Interior	34,9 ± 0,48 (91,50)	3/4	0/3		Negativo	33,98 ± 0,39 (173,10)	2/4	0/2		Negativo
		Exterior	35,17 ± 0,39 (75,88)	1/3	0/1			34,51 ± 0,23 (118,89)	4/4	0/4		
4.1.	Interior	34,22 ± 0,57	2/2	0/2		Negativo	34,81 ± 0,41	2/3	2/2	32,02 (673,26)	Positivo	

Tabla 28. Resultados de presencia y viabilidad de *T. gondii* en jamones y paletas curados procedentes de cerdos infectados experimentalmente (Continuación).

4			(146,57)					(97,38)			34,1 (159,28)	
		Exterior	34,15 ± 0,43 (153,86)	1/1	0/1			35,09 ± 0,52 (80,21)	0/1			
	4.2.	Interior	Utilizada toda la pieza en fresco⁵					34,18 ± 0,37 (150,69)	2/4	1/2	29,64 (3503,33)	Positivo
		Exterior	34,23 ± 0,62 (126,8)					32,25 ± 0,33 (574,06)	1/4	1/1	31,22 (1172,07)	
5	5.1.	Interior	35,31 ± 0,35 (68,87)	2/4	0/2			34,1 ± 0,28 (158,18)	1/4	1/1	34,22 (146,57)	Positivo
		Exterior	35,77 ± 0,45 (50,07)	1/3	1/1	32,7 (420,27)		38,68 ± 0,33	1/4	0/1		
	5.2.	Interior	35,8 ± 0,39 (49,04)	2/4	0/2			34,94 ± 0,23 (88,99)	2/3	0/2		Negativo
		Exterior	35,37 ± 0,60 (66,06)	1/4	0/1			33,75 ± 0,31 (203,00)	3/3	0/3		
6	6.1.	Interior	35,64 ± 0,21 (54,79)	3/4	1/3	34,33 (135,82)		34,77 ± 0,60 (100,12)	0/3			Negativo
		Exterior	35,62 ± 0,54 (55,55)	0/4				34,88 ± 0,51 (92,77)	1/4	0/1		
	6.2.	Interior	35,69 ± 0,60 (52,92)	1/4	0/1			34,41 ± 0,38 (128,49)	2/4	2/2	33,72 (207,27) 29,81 (3113,99)	Positivo
		Exterior	35,54 ± 0,25 (58,72)	0/4				34,62 ± 0,28 (111,09)	0/4			
7	7.1.	Interior	34,3 ± 0,42 (138,67)	3/4	0/3			34,88 ± 0,43 (92,77)	2/4	0/2		Positivo
		Exterior	34 ± 0,24 (170,71)	1/4	0/1			34,4 ± 0,38 (129,38)	2/4	1/2	34,01 (169,33)	
	7.2.	Interior	34,8 ± 0,47 (98,06)	2/4	0/2			34,43 ± 0,29 (126,52)	3/4	3/3	28,77 (6402,09) 29,77 (3201,51) 30,58 (1826,30)	Positivo
		Exterior	35,23 ± 0,34 (72,79)	2/4	0/2			35,86 ± 0,41 (47,04)	2/4	0/2		

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

Tabla 28. Resultados de presencia y viabilidad de *T. gondii* en jamones y paletas curados procedentes de cerdos infectados experimentalmente (Continuación).

8	8.1.	Interior	34,42 ± 0,27 (127,70)	2/4	0/2		Negativo	36,44 ± 0,39 (31,47)	0/4			Negativo
		Exterior	35,23 ± 0,42 (72,79)	2/4	0/2			35,17 ± 0,41 (75,88)	1/4	0/1		
	8.2.	Interior	34,26 ± 0,12 (142,57)	1/4	1/1	33,02 (336,68)	Positivo	35,22 ± 0,24 (73,30)	0/4			Negativo
		Exterior	35,4 ± 0,51 (64,70)	1/4	0/1			34,38 ± 0,31 (131,19)	1/2	0/1		
9	9.1.	Interior	34,4 ± 0,26 (129,38)	3/3	1/3	35,05 (82,46)	Positivo	Utilizada toda la pieza en fresco⁵				
		Exterior	34,38 ± 0,28 (131,19)	3/3	1/3	33,94 (177,96)		35,09 ± 0,52 (80,21)				
	9.2.	Interior	34,48 ± 0,33 (122,41)	0/2			Negativo	34,2 ± 0,36 (148,62)	3/4	0/3		Negativo
		Exterior	34,11 ± 0,41 (158,18)	1/1	0/1			33,74 ± 0,32 (204,42)	3/3	0/3		
10			38,3 ± 0,21 (0)	0/4			Negativo	39,2 ± 0,11 (0)	0/4			Negativo

¹Presencia de *T. gondii* en los extracto de digestión detectada mediante qPCR. Valores de Ct ± DE (parásitos/g). Valores positivos: Ct < 38

²Ratones seropositivos por IFI/ Total de ratones.

³Cerebros de ratón positivos por qPCR (Ct < 38)/ Total de ratones seropositivos por IFI. Valores de Ct ± DE (parásitos/g).

⁴Resultado cualitativo de viabilidad por pieza.

⁵Análisis de la paleta y el jamón en fresco para la comprobación de la viabilidad de *T. gondii* en el producto al día 0.

4.1.2. Embutidos curados

Los resultados de la influencia del curado en la viabilidad de *T. gondii* en los distintos embutidos procedentes de cerdos infectados experimentalmente se presentan en la Tabla 29.

En los tres tipos de embutidos se detectó *T. gondii* tanto por bioensayo en ratón como por qPCR. Los títulos de anticuerpo de los ratones se situaron entre 1:10 y 1:20. El valor de Ct obtenido mediante qPCR en el extracto de digestión del chorizo fue 35,22 (73,30 parásitos/g), de la longaniza 34,33 (135,82 parásitos/g) y del salchichón 33,95 (176,73 parásitos/g).

En cuanto a viabilidad, el parásito permaneció infectivo en salchichón y longaniza pero no en chorizo. El valor de Ct obtenido en los cerebros de los ratones a los que se les inoculó el extracto de longaniza fue de 35,48 (61,21 parásitos/g) y en el salchichón de 33,92 (180,45 parásitos/g).

Tabla 29. Resultados de presencia y viabilidad de *T. gondii* en embutidos procedentes de cerdos infectados experimentalmente.

Identificación	Presencia		Viabilidad		
	PCR extracto ¹	Bioensayo en ratón ²	PCR Cerebro ³		Viabilidad de <i>T. gondii</i> ⁴
Chorizo curado	35,22 (73,20)	1/14	0/1		Negativo
Longaniza curada	34,33 (135,82)	6/15	2/6	35,50 (60,37) 35,46 (60,07)	Positivo
Salchichón curado	33,95 (176,73)	2/15	1/2	33,92 (180,45)	Positivo

¹ Presencia de *T. gondii* en los extracto de digestión detectada mediante qPCR. Valores de Ct (parásitos/g).
Valores positivos: Ct < 38

² Ratones seropositivos por IFI/ Total de ratones.

³ Cerebros de ratón positivos por qPCR (Ct < 38) / Total de ratones seropositivos por IFI. Valores de Ct (parásitos/g).

⁴ Resultado final cualitativo por pieza

4.1.3. Influencia de la composición físico – química de los productos curados en la viabilidad de *T. gondii*

4.1.3.1. Jamones y paletas curados

Los resultados de la composición físico-química: cloruros (%), nitratos (mg/kg), nitritos (mg/kg), a_w , pH, humedad (%) y grasa (%) de cada una de las piezas de jamón y paleta curados junto con el resultado de viabilidad del parásito se presentan en la Tabla 30.

Los resultados globales de los análisis físico-químicos en paletas fueron los siguientes: $5,814 \pm 1,019$ % de cloruros, $215,459 \pm 40,582$ mg/kg de nitratos, $5,505 \pm 2,793$ mg/Kg de nitritos, $0,879 \pm 0,142$ de a_w , $6,020 \pm 0,119$ de pH, $49,606 \pm 4,739$ de % en humedad y $11,119 \pm 2,991$ % en grasa. Por otro lado, en jamón, los resultados globales fueron: $6,733 \pm 0,735$ % de cloruros,

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

171,044 ± 29,561 mg/kg de nitratos, 2,949 ± 1,173 mg/kg de nitritos, 0,851 ± 0,142 de a_w , 5,788 ± 0,053 de pH, 44,854 ± 8,297 de % de humedad y 11, 645 ± 3,309 de % en grasa.

Tabla 30. Composición físico-química de los jamones y paletas curados y viabilidad de *T. gondii*.

Identificación	Localización	Cloruros (%)	Nitratos (mg/Kg)	Nitritos (mg/Kg)	a_w	pH	Humedad (%)	Grasa (%)	Viabilidad de <i>T. gondii</i>
Paletas									
1.1.	Exterior	4,72	235,2	19,10	0,872	6,13	47,7	14,80	Negativo
	Interior	5,63	341,2	3,80	0,886	6,09	59,0	7,05	Positivo
1.2.	Exterior	5,21	154,6	4,50	0,865	6,09	45,5	11,80	Positivo
	Interior	6,37	198,3	3,13	0,887	6,16	54,2	7,89	Positivo
2.1.	Exterior	5,57	159,3	5,26	0,869	6,07	47,4	14,10	Negativo
	Interior	5,15	178,4	10,00	0,858	6,10	53,7	10,60	Negativo
2.2	Exterior	4,12	209,6	3,45	0,875	5,94	45,3	15,70	Negativo
	Interior	5,39	254,4	5,52	0,873	6,07	52,8	10,20	Negativo
3.1.	Exterior	5,28	293,5	5,99	0,898	6,12	49,4	12,40	Negativo
	Interior	6,40	223,6	5,53	0,878	6,09	53,7	8,68	Negativo
3.2.	Exterior	4,86	185,2	5,2	0,893	6,08	44,4	15,90	Negativo
	Interior	5,81	257,2	4,83	0,887	6,08	51,6	9,79	Negativo
4.1.	Exterior	4,86	205,6	7,12	0,895	6,19	47,3	13,80	Negativo
	Interior	7,02	236	6,93	0,893	6,07	53,1	9,52	Negativo
4.2. ¹	Analizada en fresco								
5.1.	Exterior	5,04	207,8	6,65	0,884	6,06	44,3	13,10	Positivo
	Interior	5,96	222,4	6,24	0,86	6,10	52,5	8,04	Negativo
5.2.	Exterior	6,13	231,6	5,90	0,878	6,13	44,0	15,00	Negativo
	Interior	6,85	258,2	5,60	0,882	6,11	52,1	9,71	Negativo
6.1.	Exterior	4,86	153,3	5,32	0,883	6,12	43,6	12,60	Negativo
	Interior	7,50	204,7	5,75	0,896	6,10	53,5	7,72	Positivo
6.2.	Exterior	4,58	221,8	4,9	0,899	6,06	47,1	13,30	Negativo
	Interior	4,97	174,9	3,82	0,899	6,07	54,6	9,36	Negativo
7.1.	Exterior	4,10	188,9	5,81	0,882	5,92	43,8	11,90	Negativo
	Interior	4,85	163,6	3,32	0,883	5,89	56,9	5,68	Negativo
7.2.	Exterior	5,36	210,3	4,65	0,872	5,89	45,4	10,60	Negativo
	Interior	6,86	248,9	5,26	0,865	5,90	55,0	5,04	Negativo
8.1.	Exterior	7,64	256,5	2,67	0,851	5,79	57,9	10,60	Negativo
	Interior	7,42	250,6	3,15	0,859	5,9	50,7	7,50	Negativo
8.2.	Exterior	7,15	223,5	4,05	0,843	5,65	41,8	12,00	Negativo
	Interior	6,77	193,5	6,42	0,871	5,99	50,2	8,75	Positivo
9.1.	Exterior	5,62	182,5	4,26	0,89	5,88	43,8	15,40	Positivo
	Interior	6,56	215,8	4,25	0,889	5,96	52,8	10,50	Positivo
9.2.	Exterior	5,60	173,4	4,58	0,888	5,97	45,5	15,00	Negativo
	Interior	7,46	211,3	4,20	0,874	5,90	46,0	14,00	Negativo
10*	Exterior	6,23	210,4	6,31	0,912	6,00	50,1	10,20	Negativo
	Interior	5,72	223,2	4,38	0,869	6,123	47,9	12,58	Negativo

Tabla 30. Composición físico-química de los jamones y paletas curados y viabilidad de *T. gondii* (Continuación)

Total de paletas	$\bar{x} \pm DE$	5,814 ± 1,019	215,45 9 ± 40,582	5,505 ± 2,793	0,879 ± 0,142	6,020 ± 0,119	49,606 ± 4,739	11,11 9 ± 2,991	
Jamones									
Identificación ¹	Localización	Cloruros (%)	Nitratos (mg/Kg)	Nitritos (mg/Kg)	a _w	pH	Humedad (%)	Grasa (%)	Viabilidad
1.1.	Exterior	5,97	160,0	2,90	0,860	5,75	41,6	15,50	Positivo
	Interior	7,05	189,4	3,35	0,853	5,83	49,1	8,56	Negativo
1.2.	Exterior	5,01	123,5	3,13	0,877	5,75	45,0	11,70	Positivo
	Interior	5,98	131,6	2,65	0,882	5,87	51,5	11,60	Negativo
2.1.	Exterior	6,79	156,5	1,73	0,877	5,77	44,9	15,40	Negativo
	Interior	7,41	165,7	3,48	0,854	5,80	47,2	13,70	Positivo
2.2.	Exterior	5,87	136,5	2,95	0,859	5,80	41,2	18,20	Negativo
	Interior	6,68	151,1	2,37	0,857	5,81	48,5	10,80	Negativo
3.1.	Exterior	6,53	146,4	4,70	0,835	5,71	39,4	15,90	Positivo
	Interior	7,34	187,3	3,24	0,84	5,67	48,3	11,50	Positivo
3.2.	Exterior	6,74	157,4	4,98	0,831	5,72	37,3	14,90	Negativo
	Interior	7,80	165,3	2,66	0,822	5,75	45,6	13,20	Negativo
4.1.	Exterior	6,54	165,7	5,13	0,849	5,77	41,8	11,10	Negativo
	Interior	7,41	200,9	5,20	0,846	5,87	47,6	12,80	Positivo
4.2.	Exterior	6,41	196,5	4,91	0,841	5,75	40,5	14,60	Positivo
	Interior	7,87	196,7	5,70	0,842	5,85	49,2	8,87	Positivo
5.1.	Exterior	6,44	158,4	2,38	0,848	5,72	46,1	10,60	Negativo
	Interior	7,66	151,0	1,59	0,846	5,74	48,4	9,83	Positivo
5.2.	Exterior	6,78	192,6	2,41	0,837	5,73	4,1	14,20	Negativo
	Interior	7,48	221,4	1,93	0,839	5,77	45,6	8,82	Negativo
6.1.	Exterior	5,57	122,6	2,53	0,863	5,79	43,9	15,50	Negativo
	Interior	6,06	135,7	1,79	0,861	5,82	47,9	11,70	Negativo
6.2.	Exterior	5,90	152,1	2,99	0,874	5,79	47,2	15,50	Negativo
	Interior	6,15	197,2	2,44	0,863	5,83	47,9	12,10	Positivo
7.1.	Exterior	7,02	183,2	2,69	0,851	5,78	43,2	11,30	Positivo
	Interior	7,90	177,9	1,79	0,832	5,79	48,0	8,88	Negativo
7.2.	Exterior	6,76	173,2	3,31	0,837	5,82	46,2	8,96	Negativo
	Interior	6,49	126,5	2,06	0,862	5,79	52,8	7,94	Positivo
8.1.	Exterior	5,68	207,3	2,73	0,846	5,79	44,5	7,58	Negativo
	Interior	7,70	214,1	1,46	0,852	5,85	53,6	5,37	Negativo
8.2.	Exterior	6,57	203,5	2,41	0,839	5,81	50,0	5,68	Negativo
	Interior	7,22	147,7	3,29	0,862	5,83	53,8	5,65	Negativo
9.1. ¹	Analizado en fresco								
9.2.	Exterior	6,54	186,0	1,00	0,860	5,93	37,5	16,20	Negativo
	Interior	7,60	234,6	2,38	0,847	5,75	45,6	11,80	Negativo

Tabla 30. Composición físico-química de los jamones y paletas curados y viabilidad de *T. gondii* (Continuación)

10 (C-)	Exterior	6,72	131,9	2,54	0,852	5,78	42,1	12,90	Negativo
	Interior	6,73	173,8	1,00	0,836	5,94	45,3	13,90	Negativo
Total de jamones	$\bar{x} \pm DE$	6,733	171,044	2,949	0,851	5,788	44,854	11,645	
		\pm 0,735	\pm 29,561	\pm 1,173	\pm 0,142	\pm 0,053	\pm 8,297	\pm 3,309	

¹ Paleta 4.2. y jamón 9.1. fueron analizados en fresco.

Los valores promedio de cada uno de los componentes físico-químicos, significación (p) y potencia para cada uno de ellos en función de la pieza, localización y viabilidad para las paletas y los jamones curados procedentes de cerdos infectados se presentan en la Tabla 31. A pesar de que sí que hubo diferencias significativas en cuanto al porcentaje de cloruros por pieza y localización, esto no influyó en la viabilidad del parásito. En definitiva, ninguno de estos parámetros influyó significativamente en la viabilidad de *T. gondii*, en todos los casos la potencia fue inferior al 0,8 (80%) y la significación superior al 0,05.

Tabla 31. Valores promedio de cada uno de los componentes físico-químicos, y significación (p) y potencia para cada uno de ellos en función de la pieza, localización y viabilidad.

Parámetros	$\bar{X} \pm DE$	P y potencia		
		Pieza (jamón/paleta)	Localización (interior/exterior)	Viabilidad de <i>T. gondii</i>
Cloruros (%)	6,273 \pm 0,996	p < 0,001 Potencia=0,998	p < 0,001 Potencia=0,997	p=0,928 Potencia=0,051
Nitratos (mg/Kg)	193,251 \pm 41,739	p < 0,001 Potencia=0,999	p=0,413 Potencia=0,433	p=0,531 Potencia=0,128
Nitritos (mg/Kg)	4,227 \pm 2,486	p < 0,001 Potencia=0,997	p=0,346 Potencia=0,155	p=0,936 Potencia=0,051
aW	0,865 \pm 0,020	p < 0,001 Potencia=1,000	p=0,346 Potencia=0,155	p=0,185 Potencia=0,262
pH	5,904 \pm 0,148	p < 0,001 Potencia=1,000	p=0,225 Potencia=0,227	p=0,806 Potencia=0,057
Humedad (%)	47,230 \pm 7,120	p=0,001 Potencia=0,927	p < 0,001 Potencia=1,000	p=0,626 Potencia=0,077
Grasa con Hidrólisis (%)	11,382 \pm 3,142	p=0,479 Potencia=0,108	p < 0,001 Potencia=1,000	p=0,265 Potencia=0,198

4.1.3.2. Embutidos curados

Los resultados de composición físico-química de los embutidos procedentes de cerdos infectados experimentalmente junto a la viabilidad de *T. gondii* se presentan en la Tabla 32. El porcentaje de cloruros y la concentración de nitratos fue menor en el chorizo que en la longaniza y el salchichón. Sin embargo, la concentración de nitritos mayor en el chorizo que en las otras dos matrices alimentarias.

Tabla 32. Composición físico-química y viabilidad del parásito en cada uno de los embutidos curados infectados.

Tipo de pieza	Cloruros (%)	Nitratos (mg/Kg)	Nitritos (mg/Kg)	aW	Viabilidad de <i>T. gondii</i>
Chorizo	3,48	239,7	3,88	0,86	Negativo
Longaniza	4,10	253,3	2,10	0,84	Positivo
Salchichón	4,29	253,10	2,90	0,84	Positivo

No se pudo evaluar la influencia de los componentes físico-químicos en la viabilidad en embutidos curados infectados mediante un análisis estadístico dado el bajo número de muestras.

4.2. Discusión

La inactivación de los quistes tisulares de *T. gondii* mediante el tratamiento del curado depende de la interacción sinérgica entre la concentración de sal, el período de maduración y la temperatura de almacenamiento (Kijlstra et al., 2008; Mie et al., 2008).

Un punto muy importante de esta parte del estudio fue evaluar la eficiencia del proceso de curación de estos productos cárnicos porcinos en la inactivación del parásito *T. gondii*. En dicha investigación, hemos podido comprobar que el tratamiento tecnológico del curado produjo una significativa reducción en la viabilidad del parásito, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en la presencia como en la viabilidad según fuese jamón o paleta. Sin embargo, *T. gondii* fue viable en el 47,1% de los jamones y paletas, por lo que el proceso de curación no eliminó por completo el riesgo de infección.

Existen pocos estudios y disparidad de opiniones en cuanto a la eficacia del tratamiento tecnológico del curado a la hora de inactivar al parásito (Hill et al., 2004; Hill et al., 2006). En nuestro trabajo no se consigue inactivar completamente el parásito, sin embargo, Gómez-Samblás et al. (2016) y Genchi et al. (2017), también en animales infectados experimentalmente, confirmaron que el proceso de curación inactivaba por completo a *T. gondii*. Otros autores detectaron una viabilidad que oscilaba entre 0 % y el 4,8 % en cerdos de infección natural (Bayarri et al., 2012; Gomez-Samblas et al., 2015; Warnekulasuriya, Johnson & Holliman, 1998). Valores superiores fueron observados por Herrero et al. (2017) con un 15,4 % pero hay que tener en cuenta que en este trabajo los animales utilizados eran seropositivos frente a *T. gondii* e infectados naturalmente a diferencia de los estudios de Warnekulasuriya, Johnson & Holliman, 1998, Bayarri et al., 2012 y Gomez-Samblas et al., 2015 en los que no se conocían los títulos serológicos de los cerdos.

Si bien es cierto, que el riesgo de infección depende no sólo de la viabilidad de *T. gondii* sino también de la cantidad del parásito presente en el producto curado. Los niveles de carga

parasitaria en carnes curadas en el Reino Unido se estimaron en 5×10^3 bradizoitos/g (Warnekulasuriya et al., 1998) y los investigadores concluyeron que había suficientes bradizoitos del parásito para ocasionar infección después del consumo de una porción normal de carne curada. Sin embargo, los niveles detectados en nuestro trabajo fueron bajos de entre 31,47 y 316,32 parásitos/g. Herrero (2019) también encontraron cifras similares a las nuestras, de entre 23,3 y 153,3 parásitos/g pero en cerdos infectados naturalmente.

Existen numerosas limitaciones a la hora de comparar nuestros resultados con los publicados por otros autores. Como el tipo de infección, natural o experimental, y los pasos seguidos en los procesos tecnológicos a los que se sometían las piezas. En algunas ocasiones, las muestras eran congeladas antes o después del proceso de curación, y posteriormente tratadas a diferentes tiempos de curación. En otros casos, la toma de muestra para el análisis se realizó tomando pequeños fragmentos de las piezas (Gómez-Samblás et al., 2016) mientras que en nuestro trabajo se llevó a cabo picando el jamón por completo. Asimismo, en algunos estudios el proceso de elaboración de los jamones se hizo siguiendo las normas de algunas DOP y por lo tanto difiere al empleado en nuestro estudio (Genchi et al., 2017).

Un aspecto importante en la inactivación de *T. gondii* en productos curados es el tiempo de curación (Bayarri et al., 2010; Genchi et al., 2017; Gomez-Samblas et al., 2016; Herrero et al., 2017; Herrero, 2019).

Bayarri et al. (2010) evaluaron la viabilidad del parásito en función del tiempo de curación en jamones procedentes de infección natural empleando la técnica de bioensayo en ratón. Se estudió el producto en fresco, a los 7 y a los 14 meses de curación, no encontrando viabilidad a los 14 meses. En esta misma línea pero con otros tiempos de curación, Herrero et al. (2017) indicaron en base a sus resultados que desde un punto de vista de seguridad alimentaria que no se recomienda el consumo de jamón curado que haya sido sometido a periodos de curación inferiores o iguales a los 12 meses. La pérdida de viabilidad de *T. gondii* durante el proceso de curación puede deberse a la deshidratación sufrida. La carne pierde peso durante el proceso de secado y a su vez un incremento de la concentración de NaCl y otros electrolitos que pueden afectar a la viabilidad de los quistes protozoarios (Dubey, 1997a; Mie et al., 2008; Sommer, Rommel & Levetzow, 1965; Work, 1968). Asimismo, la acumulación de peróxidos junto con los ácidos grasos libres, pueden alterar la membrana de los quistes y los bradizoitos protozoarios resultando en una pérdida de infectividad. La deshidratación, el ambiente seco y la acumulación de ácidos grasos libres alcanzan su nivel máximo después de 14-15 meses de secado. Esto podría ser una explicación de la necesidad de tiempos de curación superiores a 12 meses para asegurar la inactivación de *T. gondii* (Gómez-Samblas et al., 2015).

Por el contrario, en estudios de infección experimental, Gomez-Samblas et al. (2016) observaron que el proceso tradicional de curado con salado en seco seguido de maduración de al menos 7 meses en el caso de los jamones, y de al menos 5 meses para las paletas conducía a la pérdida de viabilidad del parásito. Asimismo, Genchi et al. (2017) tampoco encontraron *T. gondii* viable en jamones de 12, 14 y 16 meses de curación. No obstante, Gomez-Samblás et al. (2016) tomaron sólo 100 gramos de cada pieza para llevar a cabo los análisis, mientras que tanto en nuestro trabajo como en el de Herrero et al. (2017) se empleó todo el jamón, teniendo así una muestra homogénea y representativa del producto.

Por otra parte, Genchi et al. (2017) confirmaron la inactivación de *T. gondii* tras el proceso de curado dado que ningún ratón fue seropositivo en el bioensayo y puesto que no observaron quistes en el cerebro de los ratones mediante una preparación al microscopio. La técnica serológica empleada en dicho estudio fue el ELISA multiespecies que, en base a nuestros datos respaldados por estudios como Basso et al. (2015) y Steinparzer et al. (2015), aportan los peores resultados en cuanto a sensibilidad en comparación con el resto de técnicas, lo que podría influir en que los resultados serológicos fuesen negativos. Asimismo, fue utilizada la microscopía para comprobar la presencia o ausencia de quistes de *T. gondii* en los cerebros de ratón, técnica mucho menos sensible que la qPCR (EFSA, 2016). No obstante, también cabe citar que la elaboración de estos jamones de Parma es diferente al de nuestro estudio.

Es importante señalar también que a diferencia de todos estos trabajos en nuestro estudio no se realizó la curación en función de tiempos concretos sino según merma en función del tamaño de la pieza.

De forma novedosa, se hizo una separación de interior/exterior de las piezas con la finalidad de comprobar si el proceso de curación daba como resultado una concentración uniforme de sal en toda la pieza o no, de tal forma que si no era el caso, estudiar cómo podían afectar estas variaciones de sal a la supervivencia del parásito. No observamos diferencias significativas entre ambas partes aunque sí que se encontró más viabilidad en el interior. Genchi et al. (2017) tampoco encontraron diferencias significativas entre interior y exterior en cuanto a la viabilidad de *T. gondii*. No obstante, Genchi et al. (2017) realizaron esta parte del estudio con una porción de la pieza curada y no con su totalidad, y el análisis de la viabilidad de *T. gondii* se realizó en cultivo celular y no en bioensayo. Ellos mismo sugirieron que aunque la siembra del tejido muscular digerido podría ser un método fiable para determinar la viabilidad del parásito a pesar de los múltiples problemas de contaminación, los diversos componentes de la carne podrían tener efectos citopáticos y comprometer la evaluación de la viabilidad por lo que estos resultados no serían concluyentes.

Otro objetivo importante de este trabajo fue evaluar la influencia de los parámetros físico-químicos (NaCl, nitratos, nitritos), a_w , pH, humedad y contenido en grasa en la supervivencia de *T. gondii* en cerdos procedentes de infección experimental.

Estudios anteriores realizados por otros autores sobre el efecto de estos factores físico-químicos sobre *T. gondii* carecían u aportaban una información limitada (Contenido de NaCl, a_w , pH y contenido de NaCl) sobre las características de los productos cárnicos y su relación con la supervivencia del parásito en el jamón curado (Genchi et al., 2017; Gomez-Sambblas et al., 2016; Hill et al., 2018; Neumayerová et al., 2014). Cabe citar que el trabajo realizado por Herrero et al. (2017) fue el primero en realizar un amplio análisis de estos factores físico-químicos. Sin embargo, este estudio se realizó en animales infectados naturalmente, valorando tiempos de curación y con menor número de muestras. Por el contrario, nuestro trabajo se ha realizado en cerdos infectados experimentalmente, se realizó en función de la merma y con un mayor número de muestras. Las concentraciones medias de estos factores encontradas en nuestro estudio fueron 6,273 % de NaCl, 193,251 mg/kg de nitratos, 4,227 mg/kg de nitritos, a_w de 0,865, un pH de 5,904, una humedad del 47,230 % \pm y una cantidad de grasa de 11,382.

El cloruro sódico (NaCl) está relacionado con cambios en la presión osmótica y la temperatura de maduración de la carne (Kijlstra & Jongert, 2009) y Jacobs, Remington y Melton (1960) fueron los primeros en observar un ligero efecto parasiticida haciendo pequeños cambios en la concentración de sal. El cloruro de sodio se emplea en el tratamiento tecnológico del curado por su influencia en el sabor, la a_w y la conservación del producto final. El nitrato de sodio y el nitrato potásico son los responsables del desarrollo del color en los productos cárnicos y se emplean en el proceso de secado. Asimismo, los nitratos también producen la reducción de la a_w . Existe todavía información limitada acerca del efecto de los nitratos y nitritos en la inactivación de *T. gondii*, pero sí que se ha observado que éstos pueden por sí mismos o en combinación con otros factores, propiciar la disminución de *T. gondii* en el producto final (Mie et al., 2008).

Bayarri et al. (2010) evaluaron el jamón curado elaborado de forma tradicional e indicaron que en las condiciones de su estudio, a una concentración final de NaCl del 3,9%, 25 mg/kg de nitrato y 3 mg/kg de nitrito y tras 14 meses de curación, no se detectaron formas viables de *T. gondii*. Neumayerová et al. (2014) analizaron carne de cabra envasada al vacío y concluyeron que la cantidad inicial de nitrito de sodio del 2,5 % era efectiva para eliminar a *T. gondii* en 14 días. Estos autores también concluyeron que los siguientes parámetros físico-químicos eran letales para el parásito: 1,9 % de contenido en sal, 5,825 de pH y 0,960 de a_w de la carne. Sin

embargo, en el estudio de Herrero et al. (2017) se detectaron parásitos viables en un producto final con un valor de a_w de 0,903 – 0,942 y una mayor concentración de NaCl (2,7-2,9), y tampoco encontraron ninguna relación significativa entre la viabilidad de *T. gondii* y la a_w , el contenido de NaCl, pH, nitratos y nitritos.

A lo largo del proceso de curación, el pH por lo general disminuye aunque el descenso no suele ser muy acusado ej jamones y paletas curados, sin embargo sí que es más considerable en embutidos crudo-curados pues sufren un proceso de fermentación. No es muy probable que el descenso de pH sea un efecto letal para el parásito, pues se ha encontrado que éste puede sobrevivir a $\text{pH} < 1$ (Dubey, 1998). Genchi et al. (2017) con concentraciones de sal ligeramente superiores del producto final de aproximadamente 5,1 % tampoco detectaron *T. gondii* viable. En nuestro estudio aún con concentraciones de sal superiores, mayores cantidades de nitritos y nitratos y a_w inferiores se detectaron formas viables del parásito.

No obstante, ninguno de los parámetros físicoquímicos evaluados en este estudio influyó de forma estadísticamente significativa en la viabilidad de *T. gondii*. Genchi et al. (2017), al igual que nosotros, tampoco encontraron diferencias significativas entre los parámetros físico-químicos (pH, a_w y concentración de NaCl) y la supervivencia del protozoo. Sin embargo, Gomez-Samblas et al. (2016) mostraron que no hubo diferencias estadísticas en cuanto a parámetros como el pH y a_w , pero sí en relación a la concentración de sal y la viabilidad de parásito. De forma novedosa, Herrero et al. (2017) en su estudio en infección natural encontraron una asociación significativa entre la pérdida de viabilidad de *T. gondii* y un menor contenido de grasa, pudiéndose ser ésta una barrera de protección de los quistes tisulares frente a la sal. No obstante, en nuestro trabajo en infección experimental no encontramos esta relación, a pesar de que nuestros porcentajes de grasa (5,05 – 15,9 %) fueron superiores a los encontrados por Herrero et al. (2017) (3,3 – 7,5%).

Finalmente otros factores como la superficie, la presencia o ausencia de hueso, la forma de hacer los cortes en la carne y colocar la pieza en la pila de salazón podrían afectar a una mala difusión de la sal, que podría provocar que hubiese áreas donde las concentraciones letales de sales y demás componentes no hubiesen sido distribuidas uniformemente y que fuesen incapaces de ejercer su efecto sobre los bradizoitos por estar protegidos por la pared del quiste (Poma, 1989).

En relación al análisis de *T. gondii* en embutidos curados elaborados mediante la materia prima infectada experimentalmente, en la longaniza y salchichón se detectó *T. gondii* viable mientras que en el chorizo no. También se analizaron el % de cloruros, mg/Kg de nitratos y nitritos y la

a_w de estos productos pero debido al bajo número de muestras, no se pudo analizar la posible relación estadística entre la composición físico-química y la viabilidad del parásito, y por tanto, no se pueden extraer conclusiones precisas sino que únicamente podemos tratar estos datos como un estudio preliminar para futuras investigaciones. Nuestros embutidos se elaboraron con concentraciones de entre 3,48 – 4,29% de NaCl. Aunque en el chorizo, el porcentaje de NaCl y la concentración de nitratos fueron menores y la concentración de nitritos mayor que en las otras dos matrices alimentarias, no se detectó viabilidad del parásito.

Hay pocos estudios acerca de la contribución de los embutidos crudo-curados en la variedad de productos RTE a la infección por *T. gondii* en humanos por lo que no podemos realizar una correcta comparación. Hill et al. (2018) evaluaron el efecto de la concentración de sal, la a_w , el pH, la temperatura y tiempo de inactivación de *T. gondii* en salchichas de cerdo curadas en seco procedentes de cerdos infectados con 10000 ooquistes de la cepa VEG. El procedimiento de fermentación eliminó rápidamente la infectividad de los bradizoítos, eliminando la viabilidad en 6 horas después del comienzo de la fermentación. Es decir, la infectividad fue eliminada con concentraciones más inferiores de sal que en nuestro estudio, 1,3-2,8 %, y antes de que la fermentación se completara. Estos datos son similares a estudios previos realizados por Hill et al. (2004, 2006a) que identificaron que concentraciones de NaCl, lactato de potasio o lactato de sodio del 1,4% eran efectivas en la inactivación de los bradizoítos de *T. gondii* en los quistes de tejido en la carne de cerdo fresca. No obstante, estas discrepancias con nuestro estudio podrían deberse a que emplearon la histología para comprobar la presencia o ausencia de quistes de *T. gondii* en los cerebros de ratón, la cual se conoce que es menos sensible que la qPCR (EFSA, 2016).

En la misma línea, Fredericks et al. (2019) indicaron que se produce una rápida inactivación de los bradizoítos en las salchichas de cerdo curadas en seco en un tiempo inferior al notificado por Hill et al. (2018), a las 4 horas tras el inicio de la fermentación y ya a una concentración de sal (1,3%) menor de la que típicamente se emplea para la preparación de este producto RTE. Estos autores encontraron una mayor rapidez en la inactivación en la masa de pH 4,6 en comparación con la masa de pH 5,2 y sugirieron que podría deberse a la contribución del azúcar a una deshidratación más rápida y por tanto, a la inactivación del patógeno. No encontraron asociación ni con la a_w ni con el pH.

En definitiva, se observó que el proceso de curación tiene un papel importante en la inactivación del parásito pero no lo elimina por completo. A pesar de que no se encontró asociación significativa entre los distintos parámetros fisicoquímicos y la viabilidad de *T. gondii*, desde un punto de vista de seguridad alimentaria y salud pública es necesario seguir con la

investigación en este campo y poder proponer barreras complementarias para conseguir la destrucción del parásito, que puedan incluirse en el sistema de autocontrol basado en el APPCC de la industria de elaboración del jamón curado.

Actualmente, el bioensayo es considerada la prueba de oro para confirmar la viabilidad de *T. gondii* en tejidos (EFSA, 2007). Se trata de una técnica eficaz que aporta resultados válidos, pero implica principalmente problemas éticos y de bienestar animal (Mainar-Jaime & Barberán, 2007). El bajo porcentaje de error obtenido con la técnica PCR, demuestra que es una buena alternativa al bioensayo en ratón para detectar la presencia del parásito en productos curados, de forma que podría utilizarse como técnica de cribado para posteriormente aplicar el bioensayo en ratón solamente en aquellas muestras positivas para confirmar la viabilidad del parásito. Opsteegh et al. (2010) encontró que los resultados obtenidos mediante la metodología de la qPCR fueron comparables con los de bioensayo en ratón para carne procedente de cerdos infectados experimentalmente. Observaciones similares pero en carne procedente de otros animales, se obtuvieron en los estudios de Redondo et al. (1999) y Wastling et al. (1993).

5. Estudio de *T. gondii* en productos curados de comercios de venta al por menor

5.1. Resultados

De los 552 productos curados recogidos un 56,3% correspondían a jamones /paletas (n=311) y un 43,7% a embutidos (n=241). En cuanto al formato del producto, 116 fueron productos enteros, 424 loncheados y 12 en taquitos. En concreto, en jamones y paletas curados, se tomaron 299 muestras en formato loncheado (96,1%) y 12 en taquitos (3,9%). De los embutidos curados, 116 fueron enteros (48,1%) y 125 loncheados (51,9%).

5.1.1. Información del etiquetado

En la Tabla 33 se presentan todos los productos analizados e información presente en el etiquetado. Con respecto a los tiempos de curación, cuando este dato no estaba presente en el etiquetado, se ha estimado en base a la denominación del producto tal y como establece la Norma de Calidad de derivados cárnicos (Real Decreto 474/2014) y la Norma Calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico (Real Decreto 4/2014).

Del total de muestras analizadas 452 procedían de cerdo blanco (81,9%) y 100 de cerdo ibérico (18,1%). Los rangos de tiempos de curación en jamones y paletas fueron mayoritariamente de 5 a 9 meses (180/311, 32,8%) y en menor proporción de tiempos de curación de 10 a 14 meses

(51/311, 9,3%), 15 a 19 meses (40/311, 7,3%) y superior a 20 meses (36/311, 6,6%). Para todos los embutidos analizados se estimó un tiempo de curación inferior a 5 meses.

El valor promedio de sal en jamón y paleta fue de $4,526 \pm 0,928$ g sal/100 g y en embutidos de $3,8328 \pm 0,637$ g sal/100 g. El producto con mayor cantidad de sal fue el jamón con $4,53 \pm 0,928$ g sal/100 g. En cuanto a embutidos, el más salado fue el fuet con $4,170 \pm 0,449$ g sal/100 g y el que presentaba menor cantidad de sal fue el chorizo con $3,490 \pm 0,733$ g sal/100 g).

El valor promedio de grasa en jamón y paleta fue de $16,832 \pm 9,482$ g grasa/100 g y en embutidos de $26,805 \pm 11,201$ (30) g grasa/100 g. En embutidos, el salchichón fue el más magro ($24,670 \pm 9,943$ (28,00) g grasa/100 g), mientras que el chorizo el más graso ($28,400 \pm 12,319$ g grasa/100 g).

La información sobre el contenido de especias venía especificado en el etiquetado de 196 embutidos, en 140 muestras sí que había especias en su formulación, mientras que en 56 aparecía indicado que no había. En 45 embutidos no constaba información al respecto.

Las especias especificadas en el etiquetado fueron pimentón, ajo, nuez moscada, pimienta, orégano, romero y cayena. Las muestras de embutidos analizadas poseían en su formulación estas especias solas o en combinación.

El número total de productos en los que se utilizaron conservantes en su formulación fue de 498 lo que supone el 90,22% (498/552). Los conservantes utilizados fueron: E-202, E-235, E-270, E-251, E-250 y E-252, siendo estos dos últimos los encontrados con mayor frecuencia (90,76 y 95,58%, respectivamente).

El número total de productos en los que se utilizaron antioxidantes en su formulación fue de 403, el 73,01% (403/552). Los antioxidantes utilizados fueron: E-306, E-327, E-326, E-316, E-325, E-392, E-331, E-300 y E-301. Los antioxidantes más empleados en la elaboración de los productos según la información del etiquetado fueron el ascorbato sódico E-301 que supone el 68,73% y el Ácido ascórbico E-300 el 37,22%

Tabla 33. Datos del etiquetado y otros parámetros tecnológicos de los productos curados.

N	Raza de cerdo		Tipo de formato			Rangos de tiempos de curación*					g sal/100 g	g grasa/100 g	Especias		Conservantes		Antioxidantes	
	Blanco	Ibérico	Entero	Lonchado	Taquitos	< 5 Meses	5-9 Meses	10-14 Meses	15-19 Meses	> 20 Meses			sí	No	sí	No	sí	No
298 54%	248 83,2%	50 16,8%	0 0%	286 96%	12 4%	0 0%	172 58,3%	48 16,3%	39 13,2%	36 12,2%	4,53 ± 0,928 (4,50)	16,78 ± 9,534 (12,20)	0 0%	298 100%	279 93,62%	19 6,38%	190 63,76%	108 36,24%
13 2,4%	8 61,5%	5 38,5%	0 0%	13 100%	0 0%	0 0%	8 66,7%	3 25%	1 8,3%	0 0%	4,24 ± 0,985	18,513 ± 7,883	0 0%	13 100%	12 92,31%	1 7,69%	9 69,23%	4 30,77%
76 13,8%	62 81,6%	14 18,4%	31 40,8%	45 59,2%	0 0%	76 100%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	3,49 ± 0,733 (3,45)	28,40 ± 12,319 (34,00)	46 74,2%	16 25,8%	49 64,47%	27 35,53%	47 61,84%	29 38,16%
73 13,2%	69 94,5%	2 2,7%	73 100%	0 0%	0 0%	73 100%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	4,17 ± 0,449 (4,00)	28,40 ± 11,171 (34,00)	42 72,4%	16 27,6%	73 100%	0 0%	72 98,63%	1 1,37%
2 0,4%	2 100%	0 0%	2 100%	0 0%	0 0%	2 100%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	4,15 ± 0,212 (4,15)	25	0 0%	1 100%	2 100%	0 0%	2 100%	0 0%
90 16,3%	61 67,8%	29 32,2%	10 11,1%	80 88,9%	0 0%	90 100%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	3,84 ± 0,526 (3,80)	24,67 ± 9,943 (28,0)	52 69,3%	23 30,7%	83 92,22%	7 7,78%	83 92,22%	7 7,78%
552 100%	452 81,9%	100 18,1%	116 21,0%	424 76,8%	12 2,17%	241 44%	180 32,8%	51 9,3%	40 7,3%	36 6,6%	4,30 ± 2,22	21,135 ± 11,378	140 31,3%	308 68,8%	498 90,22%	54 9,78%	403 73,01%	149 26,99%

5.1.2. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados

En la figura 48 y en la tabla 34 se presentan el número de productos cárnicos curados en los que se detectó la presencia y viabilidad de *T. gondii* según el tipo de producto, la raza de cerdo, el formato del producto y la información que aparece en el etiquetado en cuanto a la composición físico-química del producto y/o parámetros tecnológicos relacionados con el procesado (sal, grasa, especias, conservantes, antioxidantes y tiempos de curación). La tabla 35 contiene los resultados de presencia y viabilidad de los productos cárnicos curados con datos de Ct e IFI.

En el 10,3 % (57/552) de los productos curados analizados se detectó la presencia de *T. gondii*. Según el tipo de producto, se detectó positividad en el 12,8% de jamones (38/298), 15,4 % de paletas (2/13), 1,3% de chorizos (1/76), 16,4 % de fuetos (12/73), y 4,4% de salchichones (4/90). La carga parasitaria se situó entre 28,05 y 35,66 cts, lo que correspondería a 3,20 parásitos/g y 0,91 parásitos/g respectivamente.

El parásito se detectó más en jamones y paletas (12,08% (40/311) que en embutidos (7,05% (17/241), siendo las diferencias significativas. Según el tipo de producto, se detectó significativamente más presencia en el jamón, y menos en el chorizo y salchichón. Asimismo, hubo mayor presencia de *T. gondii* en los salchichones con mayor cantidad de sal y menor cantidad de grasa, sin embargo, en el resto de productos no influyeron significativamente ninguna de las dos variables.

Por otro lado, no influyeron significativamente en la presencia de *T. gondii* el formato, la raza del cerdo, los tiempos de curación, las especias totales, los conservantes ni los antioxidantes.

En cuanto a la viabilidad detectada, de las 57 muestras en las que se había detectado el parásito, éste estaba viable en 6 productos, lo que supone el 1,1% del total de muestras analizadas. Según el tipo de producto, se detectó el parásito viable en el 1% de jamones (3/298) y en el 3,3% de salchichones (3/90). Tras administrar los extractos de digestión de estos 6 productos a los ratones, éstos seroconvirtieron con títulos de anticuerpo de 1:10. Los valores de Cts obtenidos mediante qPCR en los cerebros de los ratones seropositivos se situaron entre 33,20 (297,19 parásitos/g) – 36,04 (41,52 parásitos/g).

Aunque se detectó más viabilidad en salchichón que en el resto de las muestras analizadas, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, no influyeron de forma significativa en la viabilidad del parásito el formato del producto, la raza, los tiempos de curación, la sal, la grasa, los conservantes ni los antioxidantes. Por otro lado, sí que se encontró

T. gondii viable en mayor número en productos con ausencia de pimienta. Sin embargo, con presencia o ausencia de especias en su conjunto no hubo diferencias significativas.

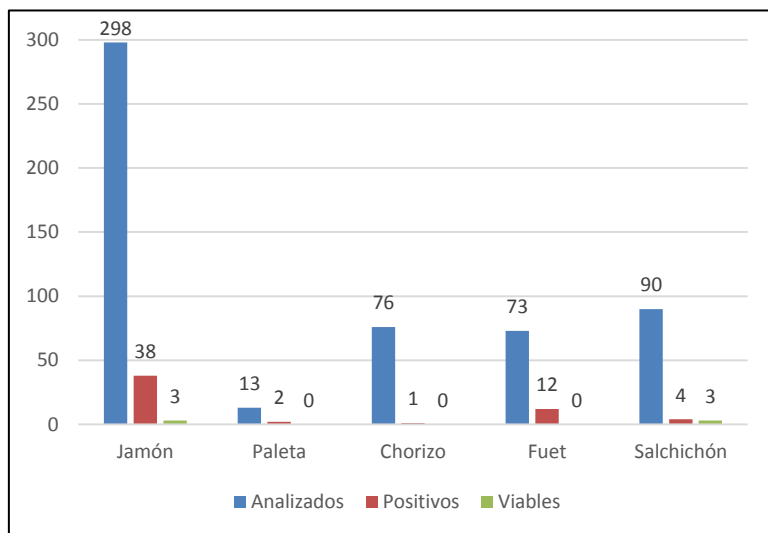


Figura 48. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados.

Tabla 34. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados.

Tipo de producto		Presencia de <i>T. gondii</i>	Viabilidad de <i>T. gondii</i>
	Jamón	12,8% (38/298) (p = 0,02)	1% (3/298) (p = 0,275)
Paleta	15,4% (2/13) (p = 0,02)	0% (0/13) (p = 0,275)	
Chorizo	1,3% (1/76) (p = 0,02)	0% (0/76) (p = 0,275)	
Fuet	16,4% (12/73) (p = 0,02)	0% (0/73) (p = 0,275)	
Longaniza	0% (0/2) (p = 0,02)	0% (0/2) (p = 0,275)	
Salchichón	4,4% (4/90) (p = 0,02)	3,3% (3/90) (p = 0,275)	
Total	10,3% (57/552) (p = 0,02)	1,1% (6/552) (p = 0,275)	

Grupo de productos		Presencia de <i>T. gondii</i>	Viabilidad de <i>T. gondii</i>
	Jamón/Paleta	12,9% (40 / 311) (p = 0,026)	1% (3/311) (p = 0,754)
	Embutidos	7,1% (17 /241) (p = 0,026)	1,2% (3/241) (p = 0,754)
Total	10,3% (57/552) (p = 0,026)	1,1% (6/552) (p = 0,754)	

Raza del cerdo		Presencia de <i>T. gondii</i>	Viabilidad de <i>T. gondii</i>
	Blanco	10,6% (48/452) (p = 0,630)	1,1% (5/452) (p = 0,925)
	Ibérico	9% (9/100) (p = 0,630)	1% (1/100) (p = 0,925)
Total	10,3% (57/552) (p = 0,630)	1,1% (6/552) (p = 0,925)	

Tabla 34. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados (Continuación).

Formato de producto		Presencia de <i>T. gondii</i>		Viabilidad de <i>T. gondii</i>	
	Entero	11,2% (13/116) (p=0,460)		0,9% (1/116) (p = 0,945)	
	Loncheado	9,7% (41/424) (p=0,460)		1,2% (5/424) (p = 0,945)	
	Taquitos	25% (3/12) (p=0,460)		0% (0/12) (p = 0,945)	
	Total	10,3% (57/552) (p=0,460)		1,1% (6/552) (p = 0,945)	

Rangos de tiempos de curación		Presencia de <i>T. gondii</i>		Viabilidad de <i>T. gondii</i>	
	< 5 meses	7,1% (17/241) (p=0,194)		1,2% (3/241) (p = 0,734)	
	5 – 9 meses	11,7% (21/180) (p=0,194)		1,1% (2/180) (p = 0,734)	
	10 – 14 meses	13,7% (7/51) (p=0,194)		2% (1/51) (p = 0,734)	
	15 – 19 meses	17,5% (7/40) (p=0,194)		0% (0/40) (p = 0,734)	
	>20 meses	11,1% (4/36) (p=0,194)		0% (0/36) (p = 0,734)	
	Total	10,2% (56/548 ¹) (p=0,194)		1,1% (6/548) (p = 0,734)	

g sal / 100g en función del tipo de producto		Presencia de <i>T. gondii</i>		Viabilidad de <i>T. gondii</i>	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
	Jamón	3,958 ± 2,226 g (p = 0,894)	4,348 ± 3,174 g (p = 0,894)	3,257 ± 2,838 g (p = 0,946)	4,309 ± 3,074 g (p = 0,946)
	Paleta	3,950 ± 0,354 g (p = 0,921)	3,362 ± 2,334 g (p = 0,921)		3,452 ± 2,145 g
	Chorizo	3,5 g (p = 0,732)	3,394 ± 0,922 g (p = 0,732)		3,396 ± 0,916 g
	Fuet	3,983 ± 0,346 g (p = 0,095)	4,206 ± 0,460 g (p = 0,095)		4,169 ± 0,449 g
	Longaniza	3,590 ± 1,106 g (p = 0,041)	4,150 ± 0,212 g (p = 0,041)		4,150 ± 0,212 g
	Salchichón	3,590 ± 1,106 g (p = 0,041)	2,438 ± 1,692 g (p = 0,041)		3,579 ± 1,105 g (p = 0,133)

g grasa / 100g en función del tipo de producto		Presencia de <i>T. gondii</i>		Viabilidad de <i>T. gondii</i>	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
	Jamón	13,226 ± 6,372 g (p = 0,036)	17,306 ± 9,816 g (p = 0,036)	12g (p = 0,946)	16,803 ± 9,542 g (p = 0,946)
	Paleta	18,400 ± 11,738 g (p = 1)	18,558 ± 7,665 g (p = 1)		18,513 ± 7,883 g
	Chorizo	10 g (p = 0,134)	28,717 ± 12,181 g (p = 0,134)		28,400 ± 12,139 g
	Fuet	29,667 ± 11,370 g (p = 0,806)	27,885 ± 11,232 g (p = 0,806)		28,171 ± 11,172 g
	Longaniza		12 g		12 g
	Salchichón	11,133 ± 4,606 g (p = 0,021)	25,551 ± 9,707 g (p = 0,021)	13,100 ± 4,384 g (p = 0,133)	24,996 ± 9,873 g (p = 0,133)

Tabla 34. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados (Continuación).

Tipo de especia		Presencia especia	Presencia de <i>T. gondii</i>	Viabilidad de <i>T. gondii</i>	
			No	11,1% (p = 0,045)	12,8% (6/47) (p = 0,117)
Pimentón		No específica ²	8% (p = 0,045)	0% (0/88) (p = 0,117)	
		Sí	0% (p = 0,045)		
		No	0% (p = 0,196)	10,9% (5/46) (p = 0,035)	
Pimienta		No específica	6,6% (p = 0,196)	0% (0/10) (p = 0,035)	
		Sí	10% (p = 0,196)	100% (1/1) (p = 0,035)	
		No	11,1% (p = 0,092)	12,8% (6/47) (p = 0,117)	
Ajo		No específica	7,2% (p = 0,092)	0% (0/10) (p = 0,117)	
		Sí	0% (p = 0,092)		
		No	3,2% (p = 0,550)	12,8% (6/47) (p = 0,117)	
Nuez moscada		No específica	6,7% (p = 0,550)	0% (0/10) (p = 0,117)	
		Sí	0% (p = 0,550)		
		No	3,7% (p = 0,445)	12,8% (6/47) (p = 0,117)	
Orégano		No específica	6,8% (p = 0,445)	0% (0/10) (p = 0,117)	
		Sí	0% (p = 0,445)		
		No	3% (p = 0,628)	12,8% (6/47) (p = 0,117)	
Cayena		No específica	6,7% (p = 0,628)	0% (0/10) (p = 0,117)	
		Sí	0% (p = 0,628)		
		No	3% (p=0,586)	12,8% (6/47) (p = 0,117)	
Romero		No específica	6,7% (p=0,586)	0% (0/10) (p = 0,117)	
		Sí	0% (p=0,586)		
		No	12% (p=0,040)	12,8% (6/47) (p = 0,117)	
Especias totales		Sí	5,7% (p=0,040)	0% (0/10) (p = 0,117)	
		Sí			
Tipo de conservante	E-202	Presencia conservante	Presencia de <i>T. gondii</i>	Viabilidad de <i>T. gondii</i>	
			Sí	0% (0/9) (p = 0,160)	
			No	10,5% (57/543) (p = 0,160)	10,5% ¹ (6/57)
	E-235		Sí	0% (0/3) (p = 0,418)	
			No	10,4% (57/549) (p = 0,418)	10,5% ¹ (6/57)

Tabla 34. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados (Continuación).

Tipo de conservante	E-270	Sí	16,7% (1/6) (p = 0,634)		
		No	10,3% (56/546) (p = 0,634)	10,7% (6/56) (p = 0,636)	
	E-251	Sí	33,3% (2/6) (p = 0,125)	50% (1/2) (p = 0,149)	
		No	10,1% (55/546) (p = 0,125)	9,1% (5/55) (p = 0,149)	
	E-250	Sí	10,2% (46/452) (p = 0,807)	13% (6/46) (p = 0,098)	
		No	11,0 % (11/100) (p = 0,807)	0% (0/11) (p = 0,098)	
	E-252	Sí	11,1% (53/476) (p = 0,118)	9,4% (5/53) (p = 0,389)	
		No	5,3% (4/76) (p = 0,118)	25% (1/4) (p = 0,389)	
	E-256	Sí	0 % (0/1) (p = 0,640)		
		No	10,3 % (57/552) (p = 0,640)	10,5% ¹ (6/57)	
	E-249	Sí	0 % (0/2) (p = 0,509)		
		No	10,4% (57/550) (p = 0,509)	10,5% ¹ (6/57)	
	Tipo de antioxidante	E-306	Presencia antioxidante	Presencia de <i>T. gondii</i>	Viabilidad de <i>T. gondii</i>
			Sí	0% (0/3) (p = 0,418)	
E-327		No	10,4% (57/549) (p = 0,418)	10,5% ¹ (6/57)	
		Sí	0% (0/1) (p = 0,640)		
E-300		No	10,3% (57/551) (p = 0,640)	10,5% ¹ (6/57)	
		Sí	0% (0/15) (p = 0,069)		
E-301		No	10,6% (57/537) (p = 0,069)	10,5% ¹ (6/57)	
		Sí	11,2% (31/277) (p = 0,503)	6,5% (2/31) (p = 0,272)	
E-316		No	9,5% (26/275) (p = 0,503)	15,4% (4/26) (p = 0,272)	
		Sí	7,5% (8/107) (p = 0,281)	25% (2/8) (p = 0,198)	
E-325		No	11% (49/445) (p = 0,281)	8,2% (4/49) (p = 0,198)	
		Sí	0% (0/4) (p = 0,349)		
E-325		No	10,4% (57/548) (p = 0,349)	10,5% ¹ (6/57)	

Tabla 34. Presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos cárnicos curados (Continuación).

Tipo de antioxidante	E-392	Sí	0% (0/18) (p = 0,050)	
		No	10,7% (57/534) (p = 0,050)	10,5% ¹ (6/57)
E-331	Sí	14,1% (10/71) (p = 0,284)	0% (0/10) (p = 0,117)	
	No	9,8% (47/481) (p = 0,284)	12,8% (6/47) (p = 0,117)	
E-326	Sí	0% (0/2) (p = 0,631)	0% (0/2) (p = 0,509)	
	No	10,3% (57/550) (p = 0,631)	10,4% (57/550) (p = 0,509)	

¹ Hay 4 muestras en las que se desconoce el tiempo de curación.

² En el etiquetado aparece que hay especias naturales pero no especifica cuáles.

³ No se calcula ningún estadístico porque el conservante es una constante.

Tabla 35. Resultados de presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos curados con datos de Ct e IFI.

Tipo de producto	Presencia	Viabilidad			
	PCR extracto ¹	Bioensayo en ratón ²	PCR Cerebro ³	Viabilidad de <i>T. gondii</i> ⁴	
Jamón	28,05 (10544,30)	1/4	0/1	Negativo	
	28,05 (10544,30)	4/4	0/4	Negativo	
	28,91 (5810,14)	2/4	0/2	Negativo	
	29,86 (3007,93)	3/4	0/3	Negativo	
	29,91 (2905,49)	0/4		Negativo	
	30,51 (1917,08)	0/4		Negativo	
	30,56 (1851,79)	3/3	1/3	33,20(297,19)	Positivo
	30,61 (1788,33)	0/4			Negativo
	31 (1365,11)	2/4	0/2		Negativo
	31,52 (952,06)	4/4	0/4		Negativo
	31,74 (817,43)	2/4	0/2		Negativo
	32,05 (659,40)	2/4	0/2		Negativo
	32,08 (645,84)	0/4			Negativo
	32,18 (602,60)	2/4	0/2		Negativo
	33,16 (305,55)	1/2	0/1		Negativo
	33,71 (208,71)	2/4	0/2		Negativo
	33,78 (198,73)	2/4	0/2		Negativo
	33,28 (281,17)	1/3	0/1		Negativo
	32,02 (673,26)	1/1	0/1		Negativo
	29,97 (2787,16)	1/1	0/1		Negativo
	35,66 (54,06)	1/4	0/1		Negativo
	28,95 (5691,29)	1/1	0/1		Negativo
	31,32 (1093,60)	2/4	0/2		Negativo
	31,32 (1093,60)	2/4	0/2		Negativo
	30,27 (2263,98)	0/4			Negativo
	34,91 (90,86)	2/4	0/2		Negativo

Tabla 35. Resultados de presencia y viabilidad de *T. gondii* en productos curados con datos de Ct e IFI (Continuación)

	34,92 (90,24)		1/4		0/1	Negativo
	35,53 (59,13)		0/4			Negativo
	35,3 (69,34)		2/4		0/2	Negativo
	34,8 (98,06)		3/4	1/3	34,14 (154,93)	Positivo
	35,23 (72,79)		2/4		0/2	Negativo
	35,16 (76,41)		1/4		0/1	Negativo
	35,34 (67,45)		2/4		0/2	Negativo
	32,72 (414,48)		2/4		0/2	Negativo
	34,91 (90,86)		1/4		0/1	Negativo
	34,57 (115,01)		1/4		0/1	Negativo
	34,51 (119,89)		2/4		0/2	Negativo
	35,4 (64,70)		1/4	0/1	35,13 (78,01)	Positivo
Paleta	33,78 (198,83)		2/4		0/2	Negativo
	30,62 (1776,37)		0/4			Negativo
Chorizo	30,02 (2692,24)		0/4			Negativo
Fuet	28,34 (8624,57)		1/1		0/1	Negativo
	29,12 (50,2324)		3/4		0/3	Negativo
	30,32 (2186,87)		0/1			Negativo
	30,51 (1917,08)		2/4		0/2	Negativo
	30,9 (1463,06)		4/4		0/4	Negativo
	32,23 (582,07)		1/4		0/1	Negativo
	32,32 (546,88)		1/4		0/1	Negativo
	32,53 (472,81)		3/4		0/3	Negativo
	32,87 (373,56)		2/4		0/2	Negativo
	33,82 (193,39)		1/4		0/1	Negativo
	35,29 (68,83)		3/3		0/3	Negativo
	30,62 (1776,37)		0/4			Negativo
Salchichón	33,47 (246,48)		1/1	1/1	33,10 (318,52)	Positivo
	30,92 (1442,93)		2/4		0/2	Negativo
	31,63 (882,18)		3/4	2/3	36,04 (41,52) /34,95 (88,38)	Positivo
	33,33(271,59)		1/4	1/1	33,98 (173,10)	Positivo

¹ Presencia de *T. gondii* en los extracto de digestión detectada mediante qPCR. Valores de Ct (carga parasitaria/g).

² Ratones seropositivos por IFI/ Total de ratones.

³ Cerebros de ratón positivos por qPCR / Total de ratones seropositivos por IFI. Valores de Ct (carga parasitaria/g).

⁴ Resultado final cualitativo por producto.

5.2. Discusión

Este es el primer estudio nacional de prevalencia de *Toxoplasma gondii* en productos cárnicos curados que incluye un elevado número de muestras, tanto de jamón y paleta como de embutidos curados. Se trata de un estudio completo que evalúa tanto la presencia como la

viabilidad de *T. gondii* y además relaciona los datos de composición y parámetros tecnológicos descritos en el etiquetado con el riesgo de infección con *T. gondii*.

En este estudio de prevalencia de productos curados listos para el consumo se detectó *T. gondii* en el 10,3% de las muestras analizadas, un porcentaje ligeramente superior al encontrado por Gómez-Samblás et al. (2015) (8,84%) aunque hay que destacar que estos autores realizaron su estudio únicamente en muestras de jamón curado.

En cuanto a la viabilidad, Warnekulasuriya et al. (1998) llevaron a cabo una investigación en Reino Unido de diversos productos cárnicos, entre ellos el jamón curado, donde detectaron valores similares a los detectados en nuestro estudio (1,1%), de un 1,5% de viabilidad, un valor muy bajo y muy positivo desde el punto de vista de seguridad alimentaria y sanidad Pública. También en España, en un estudio sobre jamones curados de diferentes modalidades disponibles en el comercio, no se detectó el parásito viable en ninguna de las muestras analizadas (Bayarri et al., 2012), aunque hay que destacar que este estudio se realizó únicamente sobre 25 muestras. Gómez-Samblás et al. (2015), por el contrario, encontraron una viabilidad superior a la encontrada en nuestro estudio, 4,84%. En este estudio no aportaron datos de trazabilidad. Asimismo, estos autores encontraron unas cargas parasitarias significativamente más altas que las obtenidas en este estudio (54,06 – 10544,33 bradizoitos/g) de unos $6,35 \times 10^4$ taquizoitos/100 g en los trozos de jamón y $1,18 \times 10^7$ taquizoitos/ 100 g en el jamón en lonchas envasado al vacío. No obstante, los trozos de jamón que poseían una baja carga de parásitos (185,82 veces menos parásitos que el jamón en lonchas), mantuvieron una mayor carga de parásitos infecciosos que las muestras envasadas al vacío y loncheadas ($2,27 \times 10^5/100$ g frente a $5,56 \times 10^4/100$ g), aunque el análisis estadístico reveló que no existían diferencias significativas. En nuestro estudio tampoco influyó de forma significativa el formato del producto. Es más, ninguno de los factores físico-químicos evaluados tuvo influencia, ni la raza, ni los tiempos de curación, la sal, la grasa, los conservantes ni los antioxidantes. Por otro lado, aunque sí que se encontró *T. gondii* viable en mayor número en productos con ausencia de pimienta, con presencia o ausencia de especias en su conjunto no hubo diferencias significativas.

En relación a los embutidos curados, detectamos presencia de *T. gondii* en los distintos tipos de embutidos (fuet, chorizo y salchichón). No obstante sólo se encontraron formas viables de *Toxoplasma* en salchichón. En el análisis de los embutidos elaborados a partir de los cerdos infectados experimentalmente, el parásito estuvo viable en todos salvo el chorizo. En esta parte del estudio tampoco encontramos formas viables de *T. gondii* en chorizo. Al igual que en jamones y paletas curadas, ninguno de los factores evaluados influyó significativamente en la

viabilidad de *T. gondii*. Por otro lado, aunque sí que se encontró *T. gondii* viable en mayor número en productos con ausencia de pimienta, con presencia o ausencia de especias en su conjunto no hubo diferencias significativas. No obstante, Navarro et al. (1992) en su estudio en salchichas frescas preparadas con carne de cerdo infectada experimentalmente indicó que los condimentos como la pimienta no tenían ningún efecto sobre la viabilidad del parásito. No existen más estudios que evalúen la viabilidad de *T. gondii* en estos embutidos curados.

6. Contribución a la evaluación del riesgo de *Toxoplasma gondii* en el sector cárnico porcino, en especial en la industria del jamón curado, y aportación de medidas para su gestión

Los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral nos permiten contribuir al proceso de evaluación del riesgo actual de *Toxoplasma gondii* en la industria cárnica, así como plantear una serie de medidas que podrían integrarse en los sistemas de autocontrol basados en el APPCC implantados en los establecimientos del sector cárnico porcino para la gestión del riesgo.

El análisis de peligros conlleva la recopilación y evaluación de información sobre los peligros que pueden presentarse en las distintas etapas de la cadena de producción, en este caso *T. gondii*, y las condiciones que los originan. Los datos científicos obtenidos en el presente estudio que aportan información a la industria cárnica, y que puede utilizar directamente en el análisis de *T. gondii* como agente de peligro, son los que se indican a continuación:

- La seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo blanco es del 27,6% (2,6% con un punto de corte de 1:80) y en cerdo ibérico del 28,7% (10,9% con un punto de corte de 1:80).
- Se ha detectado el parásito en el 9,8% de diafragmas de cerdo blanco y en el 13,9% de cerdo ibérico.
- Tras la infección experimental porcina se ha comprobado la distribución del parásito en todos los tejidos objeto de estudio (lengua, diafragma, corazón, lomo y pernil), con una carga parasitaria mayor en corazón y pernil.
- En los cerdos infectados experimentalmente, el parásito se ha detectado en sangre de forma intermitente. La mayor carga parasitaria se detectó el día 52 p.i. y se mantuvo similar el día del sacrificio.

- El estudio de la influencia del curado sobre *T. gondii* con pernils infectados experimentalmente, demuestra que este proceso tecnológico, en las condiciones descritas, sin ningún tratamiento de la materia prima (como la congelación), no elimina el riesgo ya que se detectó el parásito viable en el 47% de las paletas y jamones curados. Asimismo, en las condiciones de este estudio, se han detectado formas viables de *Toxoplasma* tras el proceso de curado de longaniza y salchichón.
- El estudio de prospección de productos cárnicos curados comerciales ha revelado que el riesgo asociado a *T. gondii* es bajo, ya que solo se detectó el parásito viable en el 1% de los productos. Hay que señalar que, en este caso, se desconocen las características de la materia prima (presencia y viabilidad del parásito, congelación, entre otros factores), así como posibles operaciones adicionales sobre el producto final, no indicadas en el etiquetado, y que han podido tener un efecto de reducción del riesgo.

Una vez identificados los peligros significativos, el sistema APPCC requiere el establecimiento de medidas preventivas o de control (acciones o actividades que pueden usarse para eliminar, prevenir o reducir a niveles aceptables un peligro para la seguridad alimentaria). En el caso que nos ocupa, proponemos las siguientes medidas que pueden incluirse en las etapas correspondientes del diagrama de flujo de la empresa:

- Especificaciones de la materia prima (Prerrequisitos: plan de control de materias primas y homologación de proveedores):
 - Carne procedente de cerdos seronegativos o con titulaciones que impliquen una baja probabilidad de encontrar el parásito en carne.
 - Para comprobar esta especificación pueden utilizarse indistintamente las técnicas IFI, MAT o ELISA, pues aportan resultados comparables. Esta analítica puede exigirse al proveedor o utilizarla la propia industria cárnica en sus controles periódicos (auditorías).
 - Control analítico en carne: este estudio indica que el parásito se distribuye en todos los tejidos analizados, aunque la mayor carga parasitaria se ha determinado en corazón y pernil. Por ello, se propone realizar este control en órganos diana como diafragma, lengua y corazón, de menor valor comercial que los pernils.
 - Para este control analítico recomendamos el uso de la digestión péptica previamente a aplicar la técnica qPCR para la determinación del parásito en carne.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

- Inclusión en el etiquetado de información sobre factores que pueden influir en la viabilidad de *Toxoplasma gondii*: meses de curación, congelación de la materia prima, entre otros.
- El análisis aleatorio del producto final mediante qPCR para comprobar su inocuidad en relación a *T. gondii*.
- El análisis por qPCR, previa digestión péptica, es una técnica que ha mostrado un bajo porcentaje de error, por lo que puede ser utilizada como técnica de cribado para la detección del parásito. Ello permite reducir el uso de animales de experimentación con las implicaciones bioéticas que ello conlleva, utilizándose la técnica de bioensayo en ratón solamente en las muestras positivas con el fin de determinar la viabilidad de *T. gondii*.
- Inclusión de nuevas etapas en el diagrama de flujo que contribuyan a controlar el peligro: establecimiento de barreras tecnológicas adicionales, como la congelación o la tecnología basada en altas presiones hidrostáticas (de la misma manera que ya se viene haciendo para *Listeria monocytogenes*), entre otras.

Los resultados obtenidos pueden aplicarse también en el marco del control oficial alimentario, basado en una categorización de los riesgos para establecer prioridades, y por consiguiente, procedimientos de control más eficaces. En concreto, los datos obtenidos en el estudio de seroprevalencia, distribución anatómica del parásito, efecto del curado, presencia en carne y productos cárnicos curados, contribuyen a la categorización del riesgo de *T. gondii*. En cuanto a los procedimientos de control, podrían tener aplicación los resultados obtenidos sobre las metodologías analíticas y tejidos a analizar, entre otros.

V. CONCLUSIONES

Primera: La administración de una dosis de 4.000 ooquistes / cerdo de la cepa VEG (genotipo III) de *Toxoplasma gondii* es adecuada para infectar experimentalmente a los animales; se consigue la infección de los cerdos y no se ve comprometida su salud.

Segunda: La inmunofluorescencia indirecta es una técnica adecuada para el análisis serológico de *Toxoplasma gondii*. Permite la detección precoz de la infección (8 días p.i.), es precisa y de fácil manejo y se ha considerado como técnica de referencia para la realización de esta tesis doctoral.

Tercera: La especificidad de las técnicas serológicas MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecie, con respecto a la IFI, ha sido buena, siendo inferior la sensibilidad y veracidad relativas. La buena repetibilidad, correlación y concordancia de las técnicas permiten obtener resultados comparables.

Cuarta: El análisis mediante qPCR constituye una herramienta adecuada para confirmar la presencia y carga parasitaria de *Toxoplasma gondii* tanto en tejidos frescos (cerebro, corazón, sangre, diafragma, lengua y lomo y pernil) como en curados.

Quinta: Tras la infección experimental de los cerdos, *Toxoplasma gondii* se localiza en todos los tejidos porcinos analizados (corazón, diafragma, lengua, lomo y pernil), obteniéndose las mayores cargas parasitarias en corazón y pernil. En sangre, *Toxoplasma gondii* está presente de forma intermitente hasta el día del sacrificio de los animales (63 días p.i.).

Sexta: El tratamiento de la carne, previo al análisis por qPCR, con dos tratamientos de concentración (digestión péptica y liofilización), así como el análisis de la carne sin concentrar dan resultados similares en la detección de *Toxoplasma gondii*.

Séptima: La elevada seroprevalencia obtenida (28,2%) pone de manifiesto la amplia distribución de *Toxoplasma gondii* en el ganado porcino a nivel nacional. En cerdo blanco, con una seroprevalencia del 27,6%, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas de seropositividad ni de los títulos de anticuerpos en relación a las provincias o regiones. En cerdo ibérico, la seropositividad fue del 28,7% y sí que se hallaron diferencias en cuanto a seropositividad y títulos de anticuerpos por provincias y regiones.

Octava: Con respecto a la presencia de *Toxoplasma gondii* en carne, se detectó el parásito en el 11,85% de los diafragmas analizados. Tanto en cerdo blanco (prevalencia del 9,8% y una carga parasitaria de 40,11 parásitos/gramo) como en cerdo ibérico (prevalencia del 13,9% y carga parasitaria de 124,98 parásitos/gramo) no hubo diferencias estadísticamente

significativas en cuanto a una mayor o menor prevalencia en carne por provincias ni por regiones.

Novena: En cerdo ibérico, el análisis de los sueros y los diafragmas del mismo animal ha permitido confirmar que hay una mayor probabilidad de detectar a *Toxoplasma gondii* en los diafragmas de los cerdos que tienen títulos serológicos iguales o superiores a 1/80, proponiendo este título para discriminar a aquellos animales de mayor riesgo.

Décima: Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sistemas de producción tanto en los títulos de anticuerpos como en las cargas parasitarias; siendo ambos superiores en el cerdo ibérico. No se detectaron diferencias entre cerdo blanco e ibérico en cuanto a la prevalencia en tejidos ni en la seroprevalencia cuando el título de corte fue de 1/20; sin embargo la seroprevalencia era más alta en cerdo ibérico con respecto al cerdo blanco (10,9% vs 2,6%) cuando el título de corte era $\geq 1/40$.

Decimoprimer: El proceso de curación, realizado en las condiciones de este estudio, ha reducido el riesgo de *Toxoplasma gondii*, sin embargo, no lo elimina, ya que no ha garantizado la destrucción del parásito en todos los productos curados. No se detectaron diferencias de viabilidad entre los dos productos curados analizados (paletas vs jamones) ni entre la localización de la muestra (zona externa vs zona interna de la pieza). El análisis de los parámetros físico-químicos de los productos curados no identifica ninguna variable que influya de manera significativa en la viabilidad de *Toxoplasma gondii*.

Decimosegunda: Este estudio aporta datos preliminares sobre la influencia del proceso de curado en embutidos elaborados con carne de cerdo infectada experimentalmente. *Toxoplasma gondii* sobrevive en salchichón y longaniza, aunque son necesarios estudios adicionales, con un mayor número de muestras, para evaluar el riesgo.

Decimotercera: La técnica qPCR, previa digestión péptica, es una buena alternativa al bioensayo en ratón para detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en productos curados y puede ser utilizada como técnica de cribado, utilizando el bioensayo solo para confirmar la viabilidad de las muestras positivas por qPCR.

Decimocuarta: Este estudio evalúa por primera vez a nivel nacional la presencia y viabilidad de *Toxoplasma gondii* en productos curados de venta al por menor y su relación con los datos de composición y parámetros tecnológicos descritos en el etiquetado. *Toxoplasma gondii* está presente en el 10,3% de los productos analizados, aunque es viable solo en el 1,1%; lo que supone un bajo riesgo para el consumidor. No han influido de forma significativa en la

“Toxoplasma gondii en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

viabilidad del parásito el formato del producto, la raza, los tiempos de curación, la sal, la grasa, las especias, los conservantes ni los antioxidantes.

Decimoquinta: Este estudio proporciona recomendaciones específicas que podrían integrarse en los sistemas de autocontrol basados en el APPCC implantados en los establecimientos del sector cárnico porcino, incluyendo datos para el análisis de peligros, así como medidas para el control de *Toxoplasma gondii*.

VI. CONCLUSIONS

First: The administration of a dose of 4,000 oocysts/pigs of the VEG strain (genotype III) of *Toxoplasma gondii* is suitable for experimentally infecting the animals; infection of the pigs is achieved and their health is not compromised.

Second: Indirect immunofluorescence is a suitable technique for serological analysis of *Toxoplasma gondii*. It allows the early detection of the infection (8 days p.i.), it is accurate and easy to use and it has been considered as a reference technique for the accomplishment of this Doctoral Thesis.

Third: The specificity of the MAT, monospecies ELISA and multispecies ELISA serological techniques, with respect to IFA, has been good, with lower relative sensitivity and veracity. The good repeatability, correlation and agreement of the techniques allow comparable results to be obtained.

Fourth: Analysis by qPCR is a suitable tool to confirm the presence and parasitic load of *Toxoplasma gondii* both in fresh tissues (brain, heart, blood, diaphragm, tongue and loin and hind leg) and in cured ones.

Fifth: After the experimental infection of the pigs, *Toxoplasma gondii* is located in all the analysed pig tissues (heart, diaphragm, tongue, loin and hind leg), obtaining the highest parasitic loads in heart and hind leg. In blood, *Toxoplasma gondii* is intermittently present until the day the animals are slaughtered (63 days p.i.).

Sixth: The treatment of the meat, prior to analysis by qPCR, with two concentration treatments (acid pepsin digestion and freeze-drying), as well as analysis of unconcentrated meat, gives similar results in the detection of *Toxoplasma gondii*.

Seventh: The high seroprevalence (28.2%) shows the wide distribution of *Toxoplasma gondii* in pigs on a national level. In white pigs, with a seroprevalence of 27.6%, no statistically significant differences in seropositivity or antibody titers were found in relation to provinces or regions. In Iberian pigs, seropositivity was 28.7%, and differences were found in seropositivity and antibody titers by provinces and regions.

Eighth: With regard to the presence of *Toxoplasma gondii* in meat, the parasite was detected in 11.85% of the diaphragms analysed. Both in white pigs (prevalence of 9.8% and parasitic load of 40.11 parasites/gram) and in Iberian pigs (prevalence of 13.9% and parasitic load of 124.98 parasites/gram) there were no statistically significant differences in terms of higher or lower prevalence in meat by province or region.

Ninth: In Iberian pigs, analysis of the sera and diaphragms of the same animal has confirmed that there is a greater probability of detecting *Toxoplasma gondii* in the diaphragms of pigs with serological titers of 1/80 or more, proposing this titer to differentiate those animals at greater risk.

Tenth: Statistically significant differences were detected between both production systems in antibody titers and in parasitic loads, being higher in the Iberian pig. No differences were detected between white and Iberian pigs in terms of prevalence in tissues or in seroprevalence when the cut off value was 1/20; nevertheless, seroprevalence was higher in Iberian pigs with respect to white pigs (10.9% vs. 2.6%) when the cut off value was $\geq 1/40$.

Eleventh: The curing process, carried out under the conditions of this study, has reduced the risk of *Toxoplasma gondii*, however, it doesn't eliminate it, as it has not guaranteed the destruction of the parasite in all cured products. No differences in viability were detected between the two cured products analysed (shoulders vs. hams) nor between the location of the sample (external area vs. internal area of the piece). The analysis of the physical-chemical parameters of the cured products does not identify any variable that significantly influences the viability of *Toxoplasma gondii*.

Twelfth: This study provides preliminary data on the influence of the curing process in sausages made with experimentally infected pork. *Toxoplasma gondii* survives in *longaniza* and *salchichón*, although further studies, with a larger number of samples, are needed to assess the risk.

Thirteenth: The qPCR technique, after acid pepsin digestion, is a good alternative to mouse bioassay to detect the presence of *Toxoplasma gondii* in cured products and it can be used as a screening technique, using the bioassay only to confirm the viability of qPCR positive samples.

Fourteenth: This study evaluates for the first time at a national level the presence and viability of *Toxoplasma gondii* in cured retail products as well as its relationship with composition data and technological parameters described in the labelling. *Toxoplasma gondii* is present in 10.3% of the products analysed, although it is viable in only 1.1%; these results represent a low risk for the consumer. Product format, breed, curing times, salt, fat, spices, preservatives and antioxidants have not significantly influenced the viability of the parasite.

Fifteenth: This study provides specific recommendations that could be integrated into the HACCP-based self-monitoring systems implemented in pig meat establishments, including data for hazard analysis, as well as measures for the control of *Toxoplasma gondii*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology: with student consult Online Access. Elsevier Health Sciences.*
2. Abbasi, M., Kowalewska-Grochowska, K., Bahar, M. A., Kilani, R. T., Winkler-Lowen, B., & Guilbert, L. J. (2003). Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases, 188*(4), 608-616.
3. Abgrall, S., Rabaud, C., Costagliola, D., & Clinical Epidemiology Group of the French Hospital Database on HIV. (2001). Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. *Clinical infectious diseases, 33*(10), 1747-1755.
4. Acha, P., & Szyfres, B. (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: clamidiosis, rickettsiosis y virosis. 3.* Pan American Health Organization.
5. Aguilar, G., Beshah, E., Vengroski, K., Zarlenga, D., Jauregui, L., Cosio, M. & Lunney, J. (2001). Cytokine and lymphocyte profiles in miniature swine after oral infection with *Toxoplasma gondii* oocysts. *International journal for parasitology, 31*(2), 187-195.
6. Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M. H., Thulliez, P., Filisetti, D. & Dardé, M. L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of infectious diseases, 186*(5), 684-689.
7. Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P. & Dardé, M. (2010). Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology, 48*(12), 4641-4645.
8. Ajzenberg, D., Dumètre, A., & Dardé, M. L. (2005). Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of clinical microbiology, 43*(4), 1940-1943.
9. Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J. & Pelloux, H. (2009). Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *The Journal of infectious diseases, 199*(8), 1155-1167.
10. Al-Adhami, B. H., Simard, M., Hernández-Ortiz, A., Boireau, C. & Gajadhar, A. (2016). Development and evaluation of a modified agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection using tachyzoites cultivated in cell culture. *Food and Waterborne Parasitology, 2*, 15-21.
11. Al-Aldhami, B., & Gajadhar, A. (2014). A new multi-host species indirect ELISA using protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies with comparison to ELISA-IgG, agglutination assay and Western blot. *Veterinary*

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

Parasitology, 200(1–2), 66–73.

12. Alexander, J., & Hunter, C. (1998). Immunoregulation during toxoplasmosis. In *Immunology of intracellular parasitism* (Vol. 70, pp. 81-102). Karger Publishers.
13. Al-Qassab, S., Reichel, M., Su, C., Jenkins, D., Hall, C., Windsor, P. & Ellis, J. (2009). Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. *Veterinary parasitology*, 164(2-4), 335-339.
14. Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Martínez, S., Pizarro-Villalobos, H., Arce-Quiñones, M., Liesenfeld, O. & Dubey, J. (2011). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in general population in a northern Mexican city. *The Journal of parasitology*, 97(1), 40-43.
15. Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Malacón, M., Reyes-Hernández, S., Pérez-Ramírez, J., Trujillo-López, J., Villena, I., & Dubey, J. (2012). High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in Oaxaca State, Mexico. *The Journal of parasitology*, 98(6), 1248-1250.
16. Alvarado-Esquivel, C., Romero-Salas, D., García-Vázquez, Z., Crivelli-Díaz, M., Barrientos-Morales, M., Lopez-de-Buen, L. & Dubey, J. P. (2014). Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Veracruz State, Mexico. *Tropical animal health and production*, 46(4), 705-709.
17. Amouei, A., Sarvi, S., Sharif, M., Aghayan, S. A., Javidnia, J., Mizani, A. & Nayeri Chegeni, T. (2020). A systematic review of *Toxoplasma gondii* genotypes and feline: Geographical distribution trends. *Transboundary and emerging diseases*, 67(1), 46-64.
18. Angel S., Figueras M., Alomar M., Echeverria P., Deng B. 2014. *Toxoplasma gondii* Hsp90: potential roles in essential cellular processes of the parasite. *Parasitology*, 141(9), 1138–1147.
19. Antequera, T., Caro, A., Rodríguez, P., & Pérez, T. (2007). Monitoring the ripening process of Iberian ham by computer vision on magnetic resonance imaging. *Meat Science*, 76(3), 561-567.
20. Arko-Mensah, J., Bosompem, K., Canacoo, E., Wastling, J. & Akanmori, B. (2000). The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. *Acta Tropica*, 76(1), 27-31.
21. Aroussi, A., Vignoles, P., Dalmay, F., Wimel, L., Dardé, M., Mercier, A. & Ajzenberg, D. (2015). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. *Parasite*, 22.
22. Artigas, R. & Amores, W. (2012). Aspectos básicos sobre la patogenicidad, respuesta inmune y bioseguridad en el trabajo con el *Toxoplasma gondii*. *Correo Científico*, 16(1).

23. Ashburn, D., Evans, R., Chatterton, J., Joss, A. & Ho-Yen, D. (2000). *Toxoplasma* dye test using cell culture derived tachyzoites. *Journal of clinical pathology*, 53(8), 630-633.
24. Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE) (2019). Disponible en: https://www.anice.es/industrias/area-de-prensa/el-sector-carnico-espanol_213_1_ap.html (consultado: 11/10/2020).
25. Aspinall, T., Marlee, D., Hyde, J., & Sims, P. (2002). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction—food for thought?. *International journal for parasitology*, 32(9), 1193-1199.
26. Astorga, R., Gómez - Laguna, J., Moreno, P., Hernández, M. & Carrasco, L. (2010). 'Sanidad animal en el cerdo ibérico'. En: Especial "'Solo cerdo ibérico 25 Aniversario',"' *Tomo II, S*, 128–135.
27. Aubert, D., Maine, G., Villena, I., Hunt, J., Howard, L., Sheu, M. & Pinon, J. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1144-1150.
28. Aubert, D., Ajzenberg, D., Richomme, C., Gilot-Fromont, E., Terrier, M., De Gevigney, C. & Villena, I. (2010). Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Veterinary parasitology*, 171(3-4), 346-349.
29. Ayinmode, A. & Abiola, J. (2016). Investigating potential sources of toxoplasmosis for humans from slaughtered food animals in Ibadan, Nigeria. *Folia Veterinaria*, 60(2), 34-40.
30. Aymerich, T., Picouet, P. & Monfort, J. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat science*, 78(1-2), 114-129.
31. De Azevedo, S., Pena, H., Alves, C., Guimarães Filho, A., Oliveira, R., Maksimov, P. & Gennari, S. (2010). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(2), 80-84.
32. Baba, M., Kitoh, K. & Takashima, Y. (2016). Removal of extracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites from suspended cell culture. *Parasitology international*, 65(5), 536-538.
33. Bacci, C., Vismarra, A., Mangia, C., Bonardi, S., Bruini, I., Genchi, M. & Brindani, F. (2015). Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *International journal of food microbiology*, 202, 54-56.
34. Bahia-Oliveira, L. M. G., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C., Oréfica, F. & Addiss,

- D. G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 9(1), 55.
35. Balea, A., Paștiu, A., Györke, A., Mircean, V. & Cozma, V. (2012). The dynamics of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies (IgG) in small ruminants and pigs from Cluj County, Romania. *Sci. Parasitol*, 13(4), 163–168.
36. Bamba, S., Bazié, W., Lingani, M., Sourabié, Y., Sombié, I., Ndiaye, J. & Tarnagda, Z. (2017). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection among slaughtered pigs, cattle and goats for human consumption in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 9(8), 106-110.
37. Bamba, S., Halos, L., Tarnagda, Z., Alanio, A., Macé, P., Moukoury, S., Sangaré, I., Guiguemdé, R., Costa, J. & Bretagne, S. (2016). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 10-15.
38. Barbosa, B., Gomes, A., Ferro, E., Napolitano, D., Mineo, J. & Silva, N. (2012). Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. *Veterinary parasitology*, 187(1-2), 44-52.
39. Barragan, A. & Sibley, L. (2002). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *The Journal of experimental medicine*, 195(12), 1625-1633.
40. Bártová, E. & Sedlák, K. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs in the Czech Republic. *Parasitology*, 138(11), 1369.
41. Basso, W., Grimm, F., Ruetten, M., Djokic, V., Blaga, R., Sidler, X. & Deplazes, P. (2017). Experimental *Toxoplasma gondii* infections in pigs: Humoral immune response, estimation of specific IgG avidity and the challenges of reproducing vertical transmission in sows. *Veterinary parasitology*, 236, 76-85.
42. Basso, W., Handke, M., Sydler, T., Borel, N., Grimm, F., Sidler, X., & Deplazes, P. (2015). Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms. *Parasitology international*, 64(2), 157-160.
43. Basso, W., Hartnack, S., Pardini, L., Maksimov, P., Koudela, B., Venturini, M. & Deplazes, P. (2013). Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach. *International journal for parasitology*, 43(7), 565-570.
44. Bastien, C., St-Jean, G., Morin, C., Turcotte, I. & Carrier, J. (2008). Chronic psychophysiological insomnia: hyperarousal and/or inhibition deficits? An ERPs

- investigation. *Sleep*, 31(6), 887–898.
45. Bayarri, S., Gracia, M. J., Lazaro, R., Perez-Arquillue, C., Barberan, M. & Herrera, A. (2010). Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* in cured ham using bioassay: influence of technological processing and food safety implications. *Journal of food Protection*, 73(12), 2239-2243.
46. Bayarri, S., Gracia, M. J., Perez-Arquillue, C., Lazaro, R., & Herrera, A. (2012). *Toxoplasma gondii* in commercially available pork meat and cured ham: a contribution to risk assessment for consumers. *Journal of food Protection*, 75(3), 597-600.
47. Belfort, R. N., Nussenblatt, V., Rizzo, L., Muccioli, C., Silveira, C., Nussenblatt, R. & Sibley, L. D. (2007). High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(1), 111-114.
48. Belli, S. I., Smith, N. C., & Ferguson, D. J. (2006). The coccidian oocyst: a tough nut to crack!. *Trends in parasitology*, 22(9), 416-423.
49. Benavides, J., Maley, S., Pang, Y., Palarea, J., Eaton, S., Katzer, F. & Chianini, F. (2011). Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), 209-215.
50. Benjamini, E. & Leskowitz, S. (1991). *Immunology: a short course* (No. 577.27 BEN).
51. De Berardinis, A., Paludi, D., Pennisi, L., & Vergara, A. (2017). *Toxoplasma gondii*, a foodborne pathogen in the swine production chain from a European perspective. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(11), 637-648.
52. Berger-Schoch, A., Bernet, D., Doherr, M., Gottstein, B. & Frey, C. (2011). *Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle. *Zoonoses and Public Health*, 58(7), 472-478.
53. Bessieres, M., Roques, C., Berrebi, A., Barre, V., Cazaux, M. & Seguela, J. (1992). IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *Journal of clinical pathology*, 45(7), 605-608.
54. Bezerra, R., Carvalho, F., Guimarães, L., Rocha, D., Silva, F., Wenceslau, A. & Albuquerque, G. (2012). Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. *Parasitology research*, 110(2), 509-514.
55. Bezerra, R., Paranhos, E., Del'Arco, A., & Albuquerque, G. (2009). Detection anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in swines bred and abated in the Bahia State, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria= Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 18(3), 78-80.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

56. Bobic, B., Šibalić, D., & Djurkovic-Djakovic, O. (1991). High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary *toxoplasma* infection. *Gynecologic and obstetric investigation*, 31(3), 182-184.
57. Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. & Heesemann, J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Molecular Microbiology*, 16(6), 1221–1230.
58. Bonhomme, A., Pingret, L. & Pinon, J. M. (1992). *Toxoplasma gondii* cellular invasion. *Parassitologia*, 34(1-3), 31-43.
59. Bonna, I, Figueiredo, F., da Costa, T., Vicente, R., Santiago, C., Nicolau, J. & Amendoeira, M. (2006). Estudo soroepidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 13(3).
60. Del Bono, V., Canessa, A., Bruzzi, P., Fiorelli, M. & Terragna, A. (1989). Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Journal of Clinical Microbiology*.
61. Borbolla, M., Izquiero, R., Piña, O., Martinez, G., Lopez, D. & Ulan, J. (2005). Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. *Salud Tab*, 11(3), 394–399.
62. Botero, D., & Restrepo, M. (1998). Parasitosis Humanas: Conceptos Generales Sobre Parasitología. *CIB, Medellín, CO*.
63. Botterel, F., Ichai, P., Feray, C., Bouree, P., Saliba, F., Raspa, R. & Romand, S. (2002). Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1648-1650.
64. Boyer, K., Holfels, E., Roizen, N., Swisher, C., Mack, D., Remington, J. & McLeod, R. (2005). Toxoplasmosis Study Group: 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.
65. Brandão, G., Ferreira, A., Melo, M. & Vitor, R. (2006). Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite*, 13(2), 143-149.
66. Brewer, S. (2004). Irradiation effects on meat color—a review. *Meat Science*, 68(1), 1-17.
67. Buffolano, W., Gilbert, R., Holland, F., Fratta, D., Palumbo, F., & Ades, A. (1996). Risk factors for recent *Toxoplasma* infection in pregnant women in Naples. *Epidemiology & Infection*, 116(3), 347-351.
68. Bugni, F., De, M., Da, M., Pacheco, G., Silva, P. & Garcia, J. (2008). Action of β -glucan in

- pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria= Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 17, 249-259.
69. Bulow, R. & Boothroyd, J. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *The Journal of Immunology*, 147(10), 3496–3500.
70. Bunetel, L., Guerin, J., Andre, P., Robert, R. & Deunff, J. (1995). Calibration of an in vitro assay system using a non-adherent cell line to evaluate the effect of a drug on *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 25(6), 699-704.
71. Burg, J., Grover, C., Pouletty, P. & Boothroyd, J. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(8), 1787–1792.
72. Burnette, W. (1981). Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112(2), 195-203.
73. Cabezón, O., Bocanegra, I. & De la Merce, S. (2012). Estudios de seroprevalencia y factores de riesgo asociados a *Toxoplasma gondii* en porcino en España. *Avances En Tecnología Porcina*, 9(94), 28–35.
74. Cademartori, B., Santos, L., Oliveira, F., Quevedo, P., Oliveira, P., Ramos, T. & Farias, N. (2014). Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. *Veterinary parasitology*, 203(1-2), 207-211.
75. Cai, G., Kastelein, R. & Hunter, C. (2000). Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, 68(12), 6932-6938.
76. Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Peruzzi, S., Zerbini, L., Bommezzadri, S. & Chezzi, C. (2006). Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 77(2), 75.
77. Calero-Bernal, R. & Gennari, S. (2019). Clinical Toxoplasmosis in Dogs and Cats: An Update. *Frontiers in veterinary science*, 6, 54.
78. Calero-Bernal, R., Saugar, J., Frontera, E., Pérez-Martín, J., Habela, M., Serrano, F. & Fuentes, I. (2015). Prevalence and genotype identification of *Toxoplasma gondii* in wild animals from Southwestern Spain. *Journal of wildlife diseases*, 51(1), 233-238.
79. Calico, I., Caballero, E., Martinez, O., Arce, L. A., Juste, C., Lopart, L. & Ocaña, I. (1991). Isolation of *Toxoplasma gondii* from immunocompromised patients using tissue culture. *Infection*, 19(5), 340-342.

80. Canada, N., Meireles, C., Rocha, A., Correia da Costa, J., Erickson, M. & Dubey, J. P. (2002). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses. *Journal of Parasitology*, *88*(6), 1247-1248.
81. Carlier, Y., Truysens, C., Deloron, P. & Peyron, F. (2012). Congenital parasitic infections: a review. *Acta tropica*, *121*(2), 55-70.
82. Casartelli-Alves, L., Boechat, V., Macedo-Couto, R., Ferreira, L., Nicolau, J., Neves, L. & Bonna, I. C. F. (2014). Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. *Veterinary Parasitology*, *204*(3-4), 346-351.
83. Castillo-Cuenca, J., Díaz-Cao, J., Martínez-Moreno, Á., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Almería, S. & García-Bocanegra, I. (2020). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in extensively raised Iberian pigs in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, *175*, 104854.
84. Cavaillès, P., Sergent, V., Bisanz, C., Papapietro, O., Colacios, C., Mas, M. & Faraut, T. (2006). The rat Toxo1 locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(3), 744-749.
85. Cavalcante, G., Aguiar, D., Chiebao, D., Dubey, J., Ruiz, V. A., Dias, R. & Gennari, S. (2006). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural Western Amazon, Brazil. *Journal of Parasitology*, *92*(4), 863-865.
86. Chang, Q. C., Zheng, X., Qiu, J. H., Wang, C. R., & Zhu, X. Q. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs in northeast China. *The Journal of parasitology*, *99*(3), 544-545.
87. Chatton, E. & Blanc, G. (1917). Notes et reflexions sur le toxoplasme and le toxoplasme du gondi. (*Toxoplasma gundii* Ch. Nicolle et Manceaux 1909). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, *10*, 1-41.
88. Chen, L., Han, X., Li, F., Yao, Y., Fang, J., Liu, X. & Chen, X. (2018). Comparative studies of *Toxoplasma gondii* transcriptomes: insights into stage conversion based on gene expression profiling and alternative splicing. *Parasites & vectors*, *11*(1), 402.
89. Chiari, C., & Neves, D. (1984). Human toxoplasmosis acquired by ingestion of goat's milk. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *79*(3), 337-340.
90. Condoleo, R., Rinaldi, L., Sette, S. & Mezher, Z. (2018). Risk assessment of human toxoplasmosis associated with the consumption of pork meat in Italy. *Risk Analysis*, *38*(6), 1202-1222.
91. Conley, F., Jenkins, K. & Remington, J. (1981). *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system: use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate

- toxoplasma* in formalin fixed, paraffin embedded tissue sections. *Human pathology*, 12(8), 690-698.
92. Contini, C., Seraceni, S., Cultrera, R., Incorvaia, C., Sebastiani, A. & Picot, S. (2005). Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *International journal for parasitology*, 35(3), 275-283.
93. Cook, A., Holliman, R., Gilbert, R., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E. & Dunn, D. (2000). Sources of *toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. Commentary: Congenital toxoplasmosis—further thought for food. *Bmj*, 321(7254), 142-147.
94. Cook, T., Brenner, L., Cloninger, C., Langenberg, P., Igbide, A., Giegling, I., & Groer, M. (2015). “Latent” infection with *Toxoplasma gondii*: association with trait aggression and impulsivity in healthy adults. *Journal of psychiatric research*, 60, 87-94.
95. Cordero del Campillo, M., & Rojo-Vásquez, F. A. (1999). Parasitología Veterinaria Mc Craw-Hill. *Interamericana. Capitulo*, 18, 260-12.
96. Correa, R., Cedeño, I., de Escobar, C. & Fuentes, I. (2008). Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. *Veterinary parasitology*, 153(1-2), 9-11.
97. Costa-Silva, T. A., Meira, C. S., Ferreira, I. M., Hiramoto, R. M., & Pereira-Chioccola, V. L. (2008). Evaluation of immunization with tachyzoite excreted–secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Experimental parasitology*, 120(3), 227-234.
98. Costa, J., Tavares, A., Silva, D., Pinto, L., Baraviera, R., Noviello, M. & Vitor, R. (2018). Kinetics of parasite distribution after reinfection with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. *Experimental parasitology*, 184, 22-30.
99. Cuéllar, J., Hernández, A., Villegas, E., & Gómez, J. (2012). [Efficiency of in vitro culture of *Toxoplasma gondii* in THP1 and Vero cell lines]. *Biomedica*, 32(3), 461–466.
100. Dadimoghaddam, Y., Daryani, A., Sharif, M., Ahmadpour, E. & Hossienikhah, Z. (2014). Tissue tropism and parasite burden of *Toxoplasma gondii* RH strain in experimentally infected mice. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(7), 521-524.
101. Damriyasa, I. M., Bauer, C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E. & Zahner, H. (2004). Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Veterinary Parasitology*, 126(3), 271-286.
102. Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M. & Pelloux, H. (2016). Relevance of

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

- and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends in parasitology*, 32(6), 492-506.
103. Dardé, M. (2008). *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence.
104. Darde, M., Bouteille, B. & Pestre-Alexandre, M. (1988). Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 39(6), 551-558.
105. Dardé, M. L., Bouteille, B. & Pestre-Alexandre, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *The Journal of parasitology*, 786-794.
106. Dawson, H., Beshah, E., Nishi, S., Solano-Aguilar, G., Morimoto, M., Zhao, A. & Urban, J. (2005). Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infection and immunity*, 73(2), 1116-1128.
107. Dawson, H., Royae, A., Nishi, S., Kuhar, D., Schnitzlein, W., Zuckermann, F. & Lunney, J. (2004). Identification of key immune mediators regulating T helper 1 responses in swine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 100(1-2), 105-111
108. Dehkordi, F. S., Haghghi Borujeni, M. R., Rahimi, E., & Abdizadeh, R. (2013). Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2), 120-125.
109. Deksne, G. & Kirjušina, M. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Latvia. *The Journal of parasitology*, 99(1), 44-47.
110. Değirmenci, A., Döşkaya, M., Caner, A., Çiçek, C., Korkmaz, M., Gürüz, Y., & Üner, A. (2011). *Toxoplasma gondii* RH Ankara: Production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Experimental parasitology*, 128(1), 1-8.
111. Demar, M., Ajzenberg, D., Maubon, D., Djossou, F., Panchoe, D., Punwasi, W. & Cottrelle, B. (2007). Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clinical Infectious Diseases*, 45(7), e88-e95.
112. Denkers, E. (1999). T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes and infection*, 1(9), 699-708.
113. Derouin, F., Mazon, M. & Garin, V. (1987). Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(9), 1597-1600.

- 114.Desmonts, G. & Couvreur, J. (1974). Congenital toxoplasmosis a prospective study of 378 pregnancies. In *Problems of Birth Defects* (pp. 187-193). Springer, Dordrecht.
- 115.Desmonts, G., Couvreur, J. & Benrachi, M. (1965). Le Toxoplasme la mere et lenfant. *Archives Francaises de Pediatrie*, 22(10), 1183.
- 116.Desmonts, G. & Remington, J. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of clinical microbiology*, 11(6), 562-568.
- 117.Diab, M. & El-Bahy, M. (2008). *Toxoplasma gondii*: virulence of tachyzoites in serum free media at different temperatures. *Experimental parasitology*, 118(1), 75-79.
- 118.Djokic, V., Fablet, C., Blaga, R., Rose, N., Perret, C., Djurkovic-Djakovic, O., Boireau, P., y Durand, B. (2016). "Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds". *Parasites & Vectors*, 9(1), pp. 466-473.
- 119.Djurković-Djaković, O., Bobić, B., Nikolić, A., Klun, I. & Dupouy-Camet, J. (2013). Pork as a source of human parasitic infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(7), 586-594.
- 120.Domzig, W., Séguéla, J. P., & Binz, H. (1993). A method to obtain large quantities of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with extreme purity. *The Journal of parasitology*, 613-615.
- 121.Dorny, P., Praet, N., Deckers, N. & Gabriël, S. (2009). Emerging food-borne parasites. *Veterinary parasitology*, 163(3), 196-206.
- 122.Dressman, J., Berardi, R., Dermentzoglou, L., Russell, T., Schmaltz, S., Barnett, J. & Jarvenpaa, K. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical research*, 7(7), 756-761.
- 123.Du, F., Zhang, Q., Yu, Q., Hu, M., Zhou, Y. & Zhao, J. (2012). Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms in central China. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), 53-56.
- 124.Dubey, J. P. (1994). Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*, 205, 1593–1598.
- 125.Dubey, J. P. (1996). Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *The Journal of parasitology*, 957-961.
- 126.Dubey, J. P. (1997a). Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C. *The Journal of parasitology*, 83(5), 946-949.
- 127.Dubey, J. P. (1997b). Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Veterinary parasitology*, 71(4), 307-310.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

128. Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 28(7), 1019-1024.
129. Dubey, J. P. (2001). Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *Journal of Parasitology*, 87(1), 215-219.
130. Dubey, J. P. (2009a). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 39(8), 877-882.
131. Dubey, J. P. (2009b). Toxoplasmosis in pigs—the last 20 years. *Veterinary parasitology*, 164(2-4), 89-103.
132. Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC press.
133. Dubey, J. P. & Beattie, C. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc.
134. Dubey, J. P., Brown, J., Verma, S. K., Cerqueira-Cézar, C. K., Banfield, J., Kwok, O. C. H., ... & Su, C. (2017). Isolation of viable *Toxoplasma gondii*, molecular characterization, and seroprevalence in elk (*Cervus canadensis*) in Pennsylvania, USA. *Veterinary Parasitology*, 243, 1-5.
135. Dubey, J. & Crutchley, C. (2008). Toxoplasmosis in wallabies (*Macropus rufogriseus* and *Macropus eugenii*): blindness, treatment with atovaquone, and isolation of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 94(4), 929–933.
136. Dubey, J. P., Desmonts, G., McDonald, C., & Walls, K. W. (1985). Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. *American Journal of Veterinary Research*.
137. Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *The Journal of protozoology*, 23(4), 537-546.
138. Dubey, J. P., Hill, D. E., Jones, J. L., Hightower, A. W., Kirkland, E., Roberts, J. M., & Gamble, H. R. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *Journal of Parasitology*, 91(5), 1082-1093.
139. Dubey, J. P., Hill, D. E., Rozeboom, D. W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L. R. & Su, C. (2012). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2), 14-18.
140. Dubey, J. P., Huong, L. T. T., Sundar, N. & Su, C. (2007). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. *Veterinary parasitology*, 146(3-4), 347-351.
141. Dubey, J. P., & Jones, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals

- in the United States. *International journal for parasitology*, 38(11), 1257-1278
142. Dubey, J., Kotula, A., Sharar, A., Andrews, C., & Lindsay, D. (1990). Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *The Journal of Parasitology*, 201–204.
143. Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 267-299.
144. Dubey, J. P., Lunney, J. K., Shen, S. K., Kwok, O. C. H., Ashford, D. A., & Thulliez, P. (1996). Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *The Journal of parasitology*, 438-443.
145. Dubey, J. P., Miller, N. L. & Frenkel, J. K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *Journal of Experimental Medicine*, 132(4), 636-662.
146. Dubey, J. P., Patitucci, A. N., Su, C., Sundar, N., Kwok, O. C. H., & Shen, S. K. (2006). Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Veterinary parasitology*, 140(1-2), 76-82.
147. Dubey, J. P., Ruff, M. D., Camargo, M. E., Shen, S. K., Wilkins, G. L., Kwok, O. C., & Thulliez, P. (1993). Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *American Journal of Veterinary Research*.
148. Dubey, J. P., Sundar, N., Hill, D., Velmurugan, G. V., Bandini, L. A., Kwok, O. C. H., ... & Su, C. (2008). High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *International journal for parasitology*, 38(8-9), 999-1006.
149. Dubey, J. P., & Thayer, D. W. (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *The Journal of parasitology*, 764-767.
150. Dubey, J. P., Thulliez, P., & Powell, E. C. (1995a). *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *The Journal of parasitology*, 48-53.
151. Dubey, J. P., Weigel, R. M., Siegel, A. M., Thulliez, P., Kitron, U. D., Mitchell, M. A. & Todd, K. S. (1995). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *The Journal of parasitology*, 723-729.
152. Duffy, A. R., Beckie, T. M., Brenner, L. A., Beckstead, J. W., Seyfang, A., Postolache, T. T. & Groer, M. W. (2015). Relationship between *Toxoplasma gondii* and mood disturbance in women veterans. *Military medicine*, 180(6), 621-625.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

153. Dumètre, A., & Dardé, M. L. (2003). How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?. *FEMS microbiology reviews*, 27(5), 651-661.
154. Dumètre, A., Dubey, J. P., Ferguson, D. J., Bongrand, P., Azas, N., & Puech, P. H. (2013). Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), 11535-11540.
155. Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C. & Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *The Lancet*, 353(9167), 1829-1833.
156. Dzib-Paredes, G. F., Rosado-Aguilar, J. A., Acosta-Viana, K. Y., Ortega-Pacheco, A., Hernández-Cortázar, I. B., Guzman-Marín, E., & Jiménez-Coello, M. (2016). Seroprevalence and parasite load of *Toxoplasma gondii* in Mexican hairless pig (*Sus scrofa*) tissues from the Southeast of Mexico. *Veterinary parasitology*, 229, 45-49.
157. Dzierszinski, F. (2001). Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol*, 309, 1017–1027.
158. Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M. F., & Tomavo, S. (2000). Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Molecular microbiology*, 37(3), 574-582.
159. EcoSure(2008). 2007 U.S. Cold Temperature Evaluation Design and Study Summary. Disponible en: <https://www.foodrisk.org/files/EcoSure%202007%20Cold%20Temperature%20Report.pdf> (Consultado 13/10/2018).
160. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Cacciolo S, Chalmers R, Deplazes P, Devleeschauwer B, Innes E, Romig T, van der Giessen J, Hempen M, Van der Stede Y and Robertson L, 2018. Scientific Opinion on the public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA Journal* 2018;16(12):5495, 113 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5495>.
161. El-Nawawi, F. A., Tawfik, M. A., & Shaapan, R. M. (2008). Methods for inactivation of *Toxoplasma gondii* cysts in meat and tissues of experimentally infected sheep. *Foodborne pathogens and disease*, 5(5), 687-690.
162. Elsaid, M., Bahia, M., Machado-Coelho, G., & Vitor, R. (1995). Diagnosis of human toxoplasmosis by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 37(2), 117–122.

163. Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
164. Esteves, F., Aguiar, D., Rosado, J., Costa, M. L., de Sousa, B., Antunes, F., & Matos, O. (2014). *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. *Veterinary Parasitology*, 200(1-2), 8-12.
165. European Community, 2006. Council regulation of 20 March 2006 on Agricultural Products and Foodstuffs as Traditional Specialities Guaranteed. *Official Journal of the European Union*, Brussels.
166. European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans food and animals". *The EFSA Journal*, 583, 1-64.
167. European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). *EFSA Journal*, 15(12), 2351-2496.
168. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 201. *EFSA Journal*, 16(12), 1-228.
169. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), 1-128.
170. Fallahi, S., Kazemi, B., Bandehpour, M., Lasjerdi, Z., Taghipour, N., Zebardast, N. & Ebrahimzadeh, F. (2014). Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection in children with cancer. *Parasitology international*, 63(1), 37-41.
171. Feitosa, T. F., Vilela, V. L. R., de Melo, L. R. B., de Almeida Neto, J. L., de Oliveira Souto, D. V., de Moraes, D. F. & de Jesus Pena, H. F. (2014). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Veterinary parasitology*, 202(3-4), 305-309.
172. Fekkar, A., Bodaghi, B., Touafek, F., Le Hoang, P., Mazier, D. & Paris, L. (2008). Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 46(6), 1965-1967.
173. Felin, E., Näreaho, A., & Fredriksson-Ahomaa, M. (2017). Comparison of commercial ELISA tests for the detection of *Toxoplasma* antibodies in the meat juice of naturally infected pigs. *Veterinary parasitology*, 238, 30-34.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

174. Fernandes, E. F., Samico Fernandes, M. F., Kim, P. C., de Albuquerque, P. P., de Souza Neto, O. L., de S. Santos, A. & Mota, R. A. (2012). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil. *Journal of Parasitology*, 98(3), 690-691.
175. Fichera, M. E., Bhopale, M. K. & Roos, D. S. (1995). In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(7), 1530-1537.
176. Flausino, W., de Jesus, V. L. T., Bezerra, R. A., Albuquerque, G. R., Jorge, J. L. B. P., Rodrigues, J. D. S. & Pereira, R. (2010). Occurrence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in pigs in a system of commercial breeding in the state of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(4), 198-200.
177. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). 2014. “*Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites*”. Microbiological Risk Assessment Series No.23. Rome.
178. Forbes, L. B., Parker, S. E., & Gajadhar, A. A. (2012). Performance of commercial ELISA and agglutination test kits for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in serum and muscle fluid of swine infected with 100, 300, 500 or 1000 oocysts. *Veterinary parasitology*, 190(3-4), 362-367.
179. Foroutan, M., Fakhri, Y., Riahi, S. M., Ebrahimpour, S., Namroodi, S., Taghipour, A. & Rostami, A. (2019). The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: a systematic review and meta-analysis. *Veterinary parasitology*, 269, 42-52.
180. Franco-Hernandez, E. N., Acosta, A., Cortés-Vecino, J., & Gómez-Marín, J. E. (2016). Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. *Parasitology research*, 115(2), 691-695.
181. Franssen, F., Gerard, C., Cozma-Petruț, A., Vieira-Pinto, M., Jambrak, A. R., Rowan, N. & Robertson, L. (2019). Inactivation of parasite transmission stages: Efficacy of treatments on food of animal origin. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 114-128.
182. Frazão-Teixeira, E., & de Oliveira, F. C. (2011). Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in a highly endemic area for human toxoplasmosis in Brazil. *The Journal of parasitology*, 97(1), 44-47.
183. Frazão-Teixeira, E., De oliveira, F., Pelissari-sant’ana, V. & lopes, C. (2006). *Toxoplasma gondii* em encéfalos de suínos comercializados no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 15(1), 33-36.

184. Fredericks, J., Hawkins-Cooper, D. S., Hill, D. E., Luchansky, J., Porto-Fett, A., Gamble, H. R. & Dubey, J. P. (2019). Low salt exposure results in inactivation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites during formulation of dry cured ready-to-eat pork sausage. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00047.
185. Freitas, J. A., Oliveira, J. P., Ramos, O. S. & Ishizuka, M. M. (2009). Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos sem inspeção em Belém. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(5), 1230-1232.
186. Frenkel, J. (1973). *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience*, 23(6), 343–352.
187. Frenkel, J. (1948). Dermal hypersensitivity to *Toxoplasma* antigens (toxoplasmins). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 68(3), 634–639.
188. Fritz, H. M., Bowyer, P. W., Bogyo, M., Conrad, P. A., & Boothroyd, J. C. (2012). Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. *PloS one*, 7(1), e29955.
189. Fulton, J. & Turk, J. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, 1068–1069.
190. Funk, J. & Gebreyes, W. A. (2004). Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health and Production*, 12(5), 246-251.
191. Galal, L., Hamidović, A., Dardé, M. L., & Mercier, M. (2019). Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00052.
192. Gale, S. D., Brown, B. L., Berrett, A., Erickson, L. D., & Hedges, D. W. (2014). Association between latent toxoplasmosis and major depression, generalised anxiety disorder and panic disorder in human adults. *Folia parasitologica*, 61(4), 285.
193. Gallino, A., Maggiorini, M., Kiowski, W., Martin, X., Wunderli, W., Schneider, J. & Follath, F. (1996). Toxoplasmosis in heart transplant recipients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(5), 389-393.
194. Galván-Ramírez, M. L., Madriz Elisondo, A. L., Rico Torres, C. P., Luna-Pastén, H., Rodríguez Pérez, L. R., Rincón-Sánchez, A. R. & Correa, D. (2010). Frequency of *Toxoplasma gondii* in pork meat in Ocotlán, Jalisco, Mexico. *Journal of food protection*, 73(6), 1121-1123.
195. Gamble, H. R., Brady, R. C. & Dubey, J. P. (1999). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. *Veterinary parasitology*, 82(2), 129-136.
196. Gamble, H. R., Dubey, J. P. & Lambillotte, D. N. (2005). Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

- domestic pig. *Veterinary parasitology*, 128(3-4), 177-181.
197. Garcia-Bocanegra, I., Cabezon, O., Hernandez, E., Martinez-Cruz, M. S., Martinez-Moreno, A. & Martinez-Moreno, J. (2013). *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. *The Journal of parasitology*, 99(3), 438-440.
198. García-Bocanegra, I., Dubey, J. P., Simon-Grifé, M., Cabezón, O., Casal, J., Allepuz, A. & Almería, S. (2010a). Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. *Research in Veterinary Science*, 89(1), 85-87.
199. García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J. P., Casal, J., Martín, G. E., Cabezón, O. & Almería, S. (2010b). Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitology International*, 59(3), 421-426.
200. Garcia, J. L., Burrells, A., Bartley, P. M., Bartley, K., Innes, E. A., & Katzer, F. (2017). The use of ELISA, nPCR and qPCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis in experimentally infected pigs. *Research in veterinary science*, 115, 490-495.
201. Garcia, J. L., Gennari, S. M., Machado, R. Z., & Navarro, I. T. (2006). *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Experimental parasitology*, 113(4), 267-271.
202. Garcia, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., Headley, S. A., Vidotto, O. & Igarashi, M. (2008). Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs. *Research in veterinary science*, 84(2), 237-242.
203. Garcia, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., Sinhorini, I. L., Freire, R. L. & Begale, L. P. (2005). Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 129(3-4), 209-217.
204. Gazzonis, A. L., Marangi, M., Villa, L., Ragona, M. E., Olivieri, E., Zanzani, S. A. & Manfredi, M. T. (2018). *Toxoplasma gondii* infection and biosecurity levels in fattening pigs and sows: serological and molecular epidemiology in the intensive pig industry (Lombardy, Northern Italy). *Parasitology research*, 117(2), 539-546.
205. Gebreyes, W. A., Bahnson, P. B., Funk, J. A., McKean, J., & Patchanee, P. (2008). Seroprevalence of *Trichinella*, *Toxoplasma*, and *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional swine production systems. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(2), 199-

- 203.
206. Genchi, M., Vismarra, A., Mangia, C., Faccini, S., Vicari, N., Rigamonti, S. & Fabbi, M. (2017). Lack of viable parasites in cured 'Parma Ham'(PDO), following experimental *Toxoplasma gondii* infection of pigs. *Food microbiology*, *66*, 157-164.
207. Giraldo, M. (2008). Toxoplasmosis. *Medicina & Laboratorio*, *14*, 359-375.
208. Goldman, M. (1957). Staining *Toxoplasma Gondii* with Fluorescein-Labelled Antibody: II. A New Serologic Test for Antibodies to *Toxoplasma* Based upon Inhibition of Specific Staining. *Journal of Experimental Medicine*, *105*(6), 557–573.
209. Gómez-Lus, R. (1967). Estudio epidemiológico de la toxoplasmosis. *Rev. Diagn. Biol.*, *16*(16), 293–297.
210. Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Ortega-Velázquez, R., Fuentes, M. V., & Osuna, A. (2020). Absence of *Toxoplasma gondii* in 100% Iberian products from experimentally infected pigs cured following a specific traditional process. *Food Microbiology*, 103665.
211. Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J. C., Fuentes, M. V., & Osuna, A. (2016). *Toxoplasma gondii* detection and viability assays in ham legs and shoulders from experimentally infected pigs. *Food microbiology*, *58*, 112-120.
212. Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J. C., Fuentes, M. V., & Osuna, A. (2015). Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial "Serrano" ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food microbiology*, *46*, 107-113.
213. Gómez, I. & Grau, F. (2004). Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alt Urgell. Universitat de Barcelona. *Universitat de Barcelona*.
214. Gracia, M. J., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Pagán, R., Ramos, S., Garcia, J. L., & Bayarri, S. (2020). High-pressure processing (HPP) of raw and dry-cured ham from experimentally infected pigs as a potential tool for the risk control of *Toxoplasma gondii*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *61*, 102315.
215. Gras, L., Gilbert, R. E., Wallon, M., Peyron, F., & Cortina-Borja, M. (2004). Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiology & Infection*, *132*(3), 541-548.
216. Greiner, M., & Gardner, I. A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive veterinary medicine*, *45*(1-2), 3-22.
217. Grigg, M. E., & Suzuki, Y. (2003). Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes and Infection*, *5*(7), 685-690.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

218. Grønbech, K., Vorlund-Kiær, M., Nielsen, H. V., Alban, L., y Johansen, M. V. (2017). Sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in Danish pigs. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, 136-138.
219. Groër, M. W., Yolken, R. H., Xiao, J. C., Beckstead, J. W., Fuchs, D., Mohapatra, S. S., ... & Postolache, T. T. (2011). Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii*-positive women. *American journal of obstetrics and gynecology*, 204(5), 433-e1.
220. Grossklaus, D. & Baumgarten, H. (1968). Die überlebensdauer von *Toxoplasma*-cysten in schweinefleisch I. Mitteilung: Ergebnisse von lagerungsversuchen bei verschiedenen temperaturen. *Fleischwirtschaft*, 48, 930-932.
221. Guesdon, J. L., Ternynck, T., & Avrameas, S. (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27(8), 1131-1139.
222. Guo, M., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Lambertini, E., Ying, Y. & Pradhan, A. K. (2015a). Qualitative assessment for *Toxoplasma gondii* exposure risk associated with meat products in the United States. *Journal of food protection*, 78(12), 2207-2219.
223. Guo, M., Lambertini, E., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Gamble, H. R., ... & Pradhan, A. K. (2017). Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption of fresh pork in the United States. *Food Control*, 73, 1210-1222.
224. Guo, M., Dubey, J. P., Hill, D., Buchanan, R. L., Gamble, H., Jones, J. L., & Pradhan, A. K. (2015b). Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *Journal of food protection*, 78(2), 457-476.
225. Halová, D., Mulcahy, G., Rafter, P., Turčeková, L., Grant, T. & De Waal, T. (2013). *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. *Zoonoses and public health*, 60(2), 168-173.
226. Hamilton, C. M., Kelly, P. J., Bartley, P. M., Burrells, A., Porco, A., Metzler, D. & Katzer, F. (2015). *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasites & vectors*, 8(1), 166.
227. Handke, M., Engels, M., Prohaska, S., Keller, C., Brugnera, E., Sydler, T., & Sydler, X. (2012). Infektionsbedingte Fruchtbarkeitsstörungen in schweizerischen Schweinezuchtbetrieben am Ende der "Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS)-Epizootie (Infection related fertility disorders in Swiss pig breeding farms at the end of the postweaning). *Schweiz Arch Tierh*, 154(10), 437-444.
228. Haritani, M., Shimura, K., Iwabuchi, I., Kobayashi, M. & Narita, M. (1988).

- Demonstration of *Toxoplasma gondii* antigen in stillborn piglets using immunoperoxidase technique. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 50(4), 954–956.
- 229.Harker, K. S., Ueno, N., & Lodoen, M. B. (2015). *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite immunology*, 37(3), 141-149.
- 230.Hartley, W. J., & Marshall, S. C. (1957). Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *New Zealand Veterinary Journal*, 5(4), 119-124.
- 231.Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Tarradas, C., Luque, I., García-Valverde, R., Reguillo, & Astorga, R. J. (2014). A serological Survey of *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in Iberian Fattening Pigs Reared in Free-Range Systems. *Transboundary and emerging diseases*, 61(5), 477-481.
- 232.Herrero, L. (2019). *Evaluación y control del riesgo de toxoplasma gondii en el proceso integral de elaboración del jamón curado* (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).
- 233.Herrero, L., Gracia, M. J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, M., Herrera, A., & Bayarri, S. (2016). *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Veterinary parasitology*, 224, 52-59.
- 234.Herrero, L., Gracia, M. J., Perez-Arquillue, C., Lazaro, R., Herrera, A., & Bayarri, S. (2017). *Toxoplasma gondii* in raw and dry-cured ham: the influence of the curing process. *Food microbiology*, 65, 213-220.
- 235.Hill, D. E., Benedetto, S. M. C., Coss, C., McCrary, J. L., Fournet, V. M. & Dubey, J. P. (2006). Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *Journal of food protection*, 69(8), 1961-1965.
- 236.Hill, D. E., Chirukandoth, S., & Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal health research reviews*, 6(1), 41.
- 237.Hill, D. E., Chirukandoth, S., Dubey, J. P., Lunney, J. K., & Gamble, H. R. (2006). Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Veterinary parasitology*, 141(1-2), 9-17.
- 238.Hill, D. & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(10), 634–640.
- 239.Hill, D. E., & Dubey, J. P. (2013). *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *International journal for parasitology*, 43(2), 107-113.
- 240.Hill, D. E., & Dubey, J. P. (2015). Update on *Toxoplasma gondii* as a parasite in food: analysis and control. In *Advances in Microbial Food Safety* (pp. 59-80). Woodhead Publishing.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

241. Hill, D. E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H. R., & Dubey, J. P. (2010). Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 53-59.
242. Hill, D. E., Luchansky, J., Porto-Fett, A., Gamble, H. R., Fournet, V. M., Hawkins-Cooper, D. S. & Dubey, J. P. (2018). Rapid inactivation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites during formulation of dry cured ready-to-eat pork sausage. *Food and Waterborne Parasitology*, 12, e00029.
243. Hill, D. E., Sreekumar, C., Gamble, H. R., & Dubey, J. P. (2004). Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *Journal of food protection*, 67(10), 2230-2233.
244. Hill, R. D. & Su, C. (2012). High tissue burden of *Toxoplasma gondii* is the hallmark of acute virulence in mice. *Veterinary parasitology*, 187(1-2), 36-43.
245. Hirvelä-Koski, V. (1990). Evaluation of ELISA for the detection of *Toxoplasma* antibodies in swine sera. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 31(4), 413-422.
246. Holec-Gąsior, L. (2013). *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. *Clin. Vaccine Immunol.*, 20(9), 1343-1351.
247. Holliman, R. E. (1995). Congenital toxoplasmosis: prevention, screening and treatment. *Journal of Hospital Infection*, 30, 179-190.
248. Holpert, M., Lüder, C., Gross, U. & Bohne, W. (2001). Bradyzoite-specific expression of a P-type ATPase in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 112(2), 293.
249. Homan, W. L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., & Verschueren, H. (2000). Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International journal for parasitology*, 30(1), 69-75.
250. Hope, J. C., Kwong, L. S., Thom, M., Sopp, P., Mwangi, W., Brown, W. C. & Howard, C. J. (2005). Development of detection methods for ruminant interleukin (IL)-4. *Journal of immunological methods*, 301(1-2), 114-123.
251. Howe, D. K. & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises of parasite three clonal lineages: Correlation with human disease genotype. *The Journal of Infectious Diseases*, 172(6), 1561-1566.
252. Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. X. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled

- antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(4), 577-580.
253. Hugh-Jones, M. E., Broussard, J. J., Stewart, T. B., Raby, C., & Morrison, J. E. (1986). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in southern Louisiana swine in 1980 and 1981. *American journal of veterinary research*, 47(5), 1050.
254. Huong, L. T. T., & Dubey, J. P. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from Vietnam. *Journal of Parasitology*, 93(4), 951-952.
255. Hutchison, W. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206(4987), 961.
256. Ibrahim, H. M., Osman, G. Y., Mohamed, A. H., Al-Selwi, A. G., Nishikawa, Y., & Abdel-Ghaffar, F. (2018). *Toxoplasma gondii*: Prevalence of natural infection in pigeons and ducks from middle and upper Egypt using serological, histopathological, and immunohistochemical diagnostic methods. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 13, 45-49.
257. Ikadai, H., Xuan, X., Igarashi, I., Tanaka, S., Kanemaru, T., Nagasawa, H. & Mikami, T. (1999). Cloning and Expression of a 48-Kilodalton *Babesia caballi* Merozoite Rhoptyr Protein and Potential Use of the Recombinant Antigen in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3475-3480.
258. Ishaku, B. S., Abdullahi, M., Nalong, D., Jonah, R., & Mayowa, O. (2018). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in pigs, sheep and goats at slaughter in Jos Municipal Abattoir, Nigeria. *Vet Sci Res Rev*, 4(2), 55-61.
259. Iqbal, A., Janecko, N., Pollari, F. & Dixon, B. (2018). Prevalence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* DNA in retail fresh meats in Canada. *Food and Waterborne Parasitology*, 13, e00031.
260. ISO I. 16140-2: Microbiology of the Food Chain-Method Validation-Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. International Standards Organization. Geneva: 2016.
261. Israelski, D. M., Chmiel, J. S., Poggensee, L., Phair, J. P., & Remington, J. S. (1993). Prevalence of *Toxoplasma* infection in a cohort of homosexual men at risk of AIDS and toxoplasmic encephalitis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*.
262. Jacobs, L., & Lundé, M. (1957). A hemagglutination test for toxoplasmosis. *The Journal of Parasitology*, 43(3), 308-314.
263. Jacobs, L., Remington, J. S. & Melton, M. L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology*, 46(1), 11-21.
264. Jakubek, E. B., Lundén, A., & Ugglå, A. (2006). Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp. infections in Swedish horses. *Veterinary Parasitology*, 138(3-4), 194-

- 199.
265. Jamra, L. M. F., Martins, M. C. & Vieira, M. D. P. L. (1991). Action of table salt on *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(5), 359-363.
266. Janků, J., 1923. Pathogenesa a patologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolombu žluté skvrny voku normálně velikem a microphthalmickém s nálezem parazitu v sítnici. Časopis lékařů českých [Pathogenesis and pathologic anatomy of the “congenital coloboma” of the macula lutea in an eye of normal size, with microscopic detection of parasites in the retina] 62, 1021–1027, 1052–1059, 1081–1085, 1111-111, 1138–1143 (For English translation, see Janků, J., 1959. *Cesk. Parasitol.* 6, 9–58).
267. Jauregui, L. H. Higgins, J., Zarlenga, D., Dubey, J. P., & Lunney, J. K. (2001). Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2065-2071.
268. Jensen, K., Melo, M., Cordeiro, C., Julien, L., Grotenbreg, G. & Saeij, J. (2015). *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *MBio*, 6(2).
269. Jenum, P. A. & Stray-Pedersen, B. (1998). Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*.
270. Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. 2010. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 238–247.
271. Jones-Brando, L., Torrey, E. F. & Yolken, R. (2003). Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. *Schizophrenia research*, 62(3), 237-244.
272. Jones, J. L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C., Remington, J. S., y Montoya, J. G. (2009). “Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States”. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), pp. 878-884.
273. Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M., McQuillan, G., Navin, T., & McAuley, J. B. (2001). *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *American journal of epidemiology*, 154(4), 357-365.
274. Jungersen, G., Jensen, L., Riber, U., Heegaard, P. M., Petersen, E., Poulsen, J. D. & Lind, P. (1999). Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *International journal for parasitology*, 29(8), 1307-1319.
275. Juránková, J., Opsteegh, M., Neumayerová, H., Kovařík, K., Frencová, A., Baláž, V. &

- Koudela, B. (2013). Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic capture and real-time PCR. *Veterinary parasitology*, 193(1-3), 95-99.
276. Juránková, J., Basso, W., Neumayerová, H., Baláž, V., Jánová, E., Sidler, X. & Koudela, B. (2014). Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food microbiology*, 38, 167-170.
277. Kamerkar, S., & Davis, P. H. (2012). *Toxoplasma* on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. *Journal of Parasitology Research*, 2012.
278. Kapperud, G., Jenum, P. A., Stray-Pedersen, B., Melby, K. K., Eskild, A., & Eng, J. (1996). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. *American journal of epidemiology*, 144(4), 405-412.
279. Karim, K. A. & Ludlam, G. B. (1975). Serological diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology*, 28(5), 383-387.
280. Khan, A., Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., & Sibley, L. D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International journal for parasitology*, 41(6), 645-655.
281. Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J. P., Dardé, M. L., Ajioka, J. W. & Sibley, L. D. (2007). Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14872-14877.
282. Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A. L., Rizzo, L. V., Belfort Jr, R., ... & Sibley, L. D. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 12(6), 942.
283. Kijlstra, A., Eissen, O. A., Cornelissen, J., Munniksmá, K., Eijck, I., & Kortbeek, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(9), 3165-3169.
284. Kijlstra, A., & Jongert, E. (2009). *Toxoplasma*-safe meat: close to reality? *Trends in Parasitology*, 25(1), 18-22.
285. Kijlstra, A., Meerburg, B., Cornelissen, J., De Craeye, S., Vereijken, P., & Jongert, E. (2008). The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Veterinary parasitology*, 156(3-4), 183-190.
286. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. Macmillan.
287. Kittas, C. & Henry, L. (1979). Effect of gonadectomy and oestrogen administration on

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

- the response of lymph-node post-capillary venules to infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Pathology*, 127(3), 129-136.
288. Klein, S., Wendt, M., Baumgärtner, W., & Wohlsein, P. (2010). Systemic toxoplasmosis and concurrent porcine circovirus-2 infection in a pig. *Journal of comparative pathology*, 142(2-3), 228-234.
289. Klun, I., Djurković-Djaković, O., Katić-Radivojević, S., & Nikolić, A. (2006). Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology*, 135(2), 121-131.
290. Klun, I., Vujanić, M., Yera, H., Nikolić, A., Ivović, V., Bobić, B., ... & Djurković-Djaković, O. (2011). *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Veterinary research*, 42(1), 17.
291. Knutson, K., Marth, E., & Wagner, M. (1987). Microwave heating of food. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie*, 20(3), 101–110.
292. Koethe, M., Schade, C., Fehlhaber, K., & Ludewig, M. (2017). Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simulated gastric fluid and cow's milk. *Veterinary parasitology*, 233, 111-114.
293. Kotresha, D., & Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *Apmis*, 118(8), 529-542
294. Kotula, A. W., Dubey, J. P., Sharar, A. K., Andrews, C. D., Shen, S. K. & Lindsay, D. S. (1991). Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *Journal of food protection*, 54(9), 687-690.
295. Kul, O., Yildiz, K., Ocal, N., Freyre, A., Deniz, A., Karahan, S. & Terzi, O. S. (2013). In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: a novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. *Research in veterinary science*, 94(2), 269-276.
296. Kumagai, S., Saga, H., Takahashi, Y., Shimura, O., & Hatakeyama, N. (1988). Toxoplasmosis of suckling piglets supposed congenital infection. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association (Japan)*.
297. Kuticic, V., & Wikerhauser, T. (1996). Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. In *Toxoplasma gondii* (pp. 261-265). Springer, Berlin, Heidelberg.
298. Langoni, H., Júnior, H. G., Guimarães, F. F., Ullmann, L. S., Gaio, F. C., Uehara, R. S. & Da Silva, R. C. (2011). Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 177(1-2), 50-54.

299. Lourenço, E. V., Bernardes, E. S., Silva, N. M., Mineo, J. R., Panunto-Castelo, A., & Roque-Barreira, M. C. (2006). Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes and infection*, *8*(5), 1244-1251.
300. Lee, S. H., Kang, H. J., Lee, D. H., Kang, S. M. & Quan, F. S. (2018). Virus-like particle vaccines expressing *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 18 and microneme protein 8 provide enhanced protection. *Vaccine*, *36*(38), 5692-5700.
301. Lekutis, C., Ferguson, D. J., & Boothroyd, J. C. (2000). *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Experimental parasitology*, *96*(2), 89-96.
302. Lemmon, G. H., & Gardner, S. N. (2008). Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *7*(1), 18.
303. Li, Y. N., Nie, X., Peng, Q. Y., Mu, X. Q., Zhang, M., Tian, M. Y., & Min, S. J. (2015). Seroprevalence and genotype of *Toxoplasma gondii* in pigs, dogs and cats from Guizhou province, Southwest China. *Parasites & vectors*, *8*(1), 214.
304. Liao, S., Weng, Y., Song, H., Yang, A., Cui, J., Zhang, H. & Zhu, X. (2006). Diagnosis of swine toxoplasmosis by specific PCR assay and the isolation of *Toxoplasma gondii* strains. *J Trop Med*, *6*, 969–971.
305. Limon, G., Beauvais, W., Dadios, N., Villena, I., Cockle, C., Blaga, R., & Guitian, J. (2017). Cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* infection in pig farms in England. *Foodborne Pathogens and Disease*, *14*(5), 269-281.
306. Lin, Z., Zhang, Y., Zhang, H., Zhou, Y., Cao, J., & Zhou, J. (2012). Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary parasitology*, *185*(2-4), 296-300.
307. Lind, P., Haugegaard, J., Wingstrand, A., & Henriksen, S. A. (1997). The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, *71*(1), 1-15.
308. Lindsay, D. S., Collins, M. V., Holliman, D., Flick, G. J., & Dubey, J. P. (2006). Effects of high-pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. *Journal of Parasitology*, *92*(1), 195-196.
309. Liu, X., Liu, C., Liu, Y., Jin, H., Zhao, Y., Chen, J. & Liu, Q. (2012). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered pigs and cattle in Liaoning Province, northeastern China. *Journal of Parasitology*, *98*(2), 440-441.
310. Liu, L., Wang, P., Xu, J., & Xia, C. M. (2019). Increased risk of *Toxoplasma gondii*

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

- infection in cancer patients: A meta-analysis of current evidence based on case-control study. *Acta tropica*, 192, 30-40.
311. Lopes, A. P., Dubey, J. P., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Rodrigues, M., & Cardoso, L. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Veterinary parasitology*, 193(1-3), 266-269.
312. López, M. D. G. & Fernández, F. U. (2000). La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, 3, 12-16.
313. Luciano, D. M., Menezes, R. C., Ferreira, L. C., Nicolau, J. L., Neves, L. B. D., Luciano, R. M. & Amendoeira, M. R. R. (2011). Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(4), 351-353.
314. Luft, B. J., & Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical infectious diseases*, 15(2), 211-222.
315. Lundén, A. (1995). Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. *Veterinary parasitology*, 56(1-3), 23-35.
316. Lundén, A., Lind, P., Gustavsson, K., Ugglå, A., Vågsholm, I., & Engvall, E. O. (2002). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 34(5), 362-365.
317. Lundén, A. & Ugglå, A. (1992). Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *International journal of food microbiology*, 15(3-4), 357-363.
318. Lyons, R. E., McLeod, R., & Roberts, C. W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. *Trends in parasitology*, 18(5), 198-201.
319. Macrì, G., Sala, M., Linder, A. M., Pettirossi, N., & Scarpulla, M. (2009). Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. *Parasitology research*, 105(1), 35.
320. Maenz, M., Schlüter, D., Liesenfeld, O., Schares, G., Gross, U., & Pleyer, U. (2014). Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in retinal and eye research*, 39, 77-106.
321. Magalhães, F. J., Ribeiro-Andrade, M., Souza, F. M., Lima Filho, C. D., Biondo, A. W., Vidotto, O., Navarro, I. T., & Mota, R. A. (2017). Seroprevalence and spatial distribution

- of *Toxoplasma gondii* infection in cats, dogs, pigs and equines of the Fernando de Noronha Island, Brazil. *Parasitology International*, 66(2), 43-46.
- 322.Mai, K., Sharman, P. A., Walker, R. A., Katrib, M., Souza, D. D., McConville, M. J. & Smith, N. C. (2009). Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 281-289.
- 323.Mainar-Jaime, R. C., & Barberán, M. (2007). Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 122-129..
- 324.Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., y Roitt, I.M. (2014). *Inmunología*. (Octava Edición) Barcelona: Elsevier S.L.
- 325.Manger, I. D., Hehl, A. B., & Boothroyd, J. C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infection and Immunity*.
- 326.Martin, V., Arcavi, M., Santillan, G., Amendoeira, M. R. R., Neves, E. D. S., Griemberg, G. & Angel, S. O. (1998). Detection of human *Toxoplasma*-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant *Toxoplasma gondii* rop2 protein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5(5), 627-631.
- 327.Martín-Hernández, I., & García-Izquierdo, S. (2003). Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*, 28(3), 19–27.
- 328.Martina, M. N., Cervera, C., Esforzado, N., Linares, L., Torregrosa, V., Sanclemente, G. & Campistol, J. M. (2011). *Toxoplasma gondii* primary infection in renal transplant recipients. Two case reports and literature review. *Transplant International*, 24(1), e6-e12.
- 329.De Mattos, C. C. B., Siqueira, R. C., Frederico, F. B., Ferreira, I. M. R., Ferreira, A. I. C., Previato, M. & de Mattos, L. C. (2018). Toxoplasmic retinochoroiditis caused by *Toxoplasma gondii* strain ToxoDB# 65. *Acta tropica*, 185, 419-421.
- 330.Matsuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., & Nagamune, K. (2014). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan. *Parasitology international*, 63(4), 638-639.
- 331.McLeod, R. & Boyer, K. (2000). Management of and outcome for the newborn infant with congenital toxoplasmosis. In *Congenital toxoplasmosis* (pp. 189-213). Springer, Paris.
- 332.McLeod, R., Boyer, K., Karrison, T., Kasza, K., Swisher, C., Roizen, N. & Mets, M. (2006). Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981–2004: the national

- collaborative Chicago-based, congenital toxoplasmosis study. *Clinical Infectious Diseases*, 42(10), 1383-1394.
333. Meerburg, B. G., Riel, J. V., Cornelissen, J. B., Kijlstra, A. & Mul, M. F. (2006). Cats and goat whey associated with *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, 6(3), 266-274.
334. Mejia, A. S., DeBrunner, M., Cox, E. & Caldwell, R. (2011). Acquired toxoplasmosis after orthotopic heart transplantation in a sulfonamide-allergic patient. *Pediatric cardiology*, 32(1), 91-93.
335. Meira, C. S., Costa-Silva, T. A., Vidal, J. E., Ferreira, I. M., Hiramoto, R. M., & Pereira-Chiocola, V. L. (2008). Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted–secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of medical microbiology*, 57(7), 845-850.
336. Mercier, A., Devillard, S., Ngoubangoye, B., Bonnabau, H., Bañuls, A. L., Durand, P. & Dardé, M. L. (2010). Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(11), e876.
337. Mie, T., Pointon, A. M., Hamilton, D. R. & Kiermeier, A. (2008). A qualitative assessment of *Toxoplasma gondii* risk in ready-to-eat smallgoods processing. *Journal of food protection*, 71(7), 1442-1452.
338. Milne, G., Webster, J. P. & Walker, M. (2020). *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat?. *Trends in parasitology*.
339. Miman, O., Mutlu, E. A., Ozcan, O., Atambay, M., Karlidag, R., & Unal, S. (2010). Is there any role of *Toxoplasma gondii* in the etiology of obsessive–compulsive disorder?. *Psychiatry research*, 177(1-2), 263-265.
340. Minho, A., Freire, R., Vidotto, O., Gennari, S., Marana, E., Garcia, J., & Navarro, I. (2004). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in experimentally infected pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 24(4), 199–202.
341. Miranda, F. J. B., Souza, D. B. D., Frazão-Teixeira, E., Oliveira, F. C. D., Melo, J. C. D., Mariano, C. M. A. & DaMatta, R. A. (2015). Experimental infection with the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain in the Brazilian BR-1 mini pig is a suitable animal model for human toxoplasmosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(1), 95-100.
342. Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. Toxoplasmosis Lancet. 2004; 363: 1965–1976.
343. Morrissette, N. S., Bedian, V., Webster, P. & Roos, D. S. (1994). Characterization of

- extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. *Experimental parasitology*, 79(3), 445-459.
344. De Moura, A. B., Osaki, S. C., Zulpo, D. L. & Marana, E. R. (2007). Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16(1), 54-56.
345. Murillo, J. M. S., Carretero, R. C., Sánchez, J. F., García, S. R., Manso, G. P. & Gómez-Nieves, J. M. (2004). Seroprevalencia de la toxoplasmosis porcina en animales sacrificados para consumo en la ciudad de Badajoz. *Avances en tecnología porcina*, 1(2), 12-16.
346. Nau, J., Eller, S. K., Wenning, J., Spekker-Bosker, K. H., Schroten, H., Schwerk, C., ... & Däubener, W. (2017). Experimental porcine *Toxoplasma gondii* infection as a representative model for human toxoplasmosis. *Mediators of inflammation*, 2017.
347. Navarro, I. T., Vidotto, O., Giraldo, N. & Mitsuka, R. (1992). [Resistance of *Toxoplasma gondii* to sodium chloride and condiments in pork sausage]. *Bol Oficina Sanit Panam*.
348. Nichols, B. A., & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* 1. *The Journal of protozoology*, 34(2), 217-226.
349. Nicolle C. y Manceaux, L.H. (1908). On a Leishman body infection (or related organisms) of the gondi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*, 147, 763-766.
350. NordVal International (2017). NordVal International Protocol for the validation of microbiological alternative (proprietary) methods against a reference method.
351. Nowakowska, D., Colón, I., Remington, J. S., Grigg, M., Golab, E., Wilczynski, J., & Sibley, L. D. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1382-1389.
352. Obwaller, A., Hassl, A., Picher, O., & Aspöck, H. (1995). An enzyme-linked immunosorbent assay with whole trophozoites of *Toxoplasma gondii* from serum-free tissue culture for detection of specific antibodies. *Parasitol Res*.
353. Ödberg-Ferragut, C., Soète, M., Engels, A., Samyn, B., Loyens, A., Van Beeumen, J., & Dubremetz, J. (1996). Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 82(2), 237-244.
354. Okamoto, I., Suzuki, Y., Itoh, H., Fukuura, H., & Yokoyama, I. (1989). A collective outbreak of porcine toxoplasmosis due to supplied feed supplements contaminated with *Toxoplasma* oocysts [Japan]. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

(Japan).

355. Olinda, R. G., Pena, H. F., Frade, M. T., Ferreira, J. S., Maia, L. Â., Gennari, S. M. & Riet-Correa, F. (2016). Acute toxoplasmosis in pigs in Brazil caused by *Toxoplasma gondii* genotype Chinese 1. *Parasitology research*, 115(7), 2561-2566.
356. Omata, Y., Taka, A., Terada, K., Koyama, T., Kanda, M., Saito, A. & Dubey, J. P. (1997). Isolation of coccidian enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* from the intestinal mucosa of cats by Percoll density-gradient centrifugation. *Parasitology research*, 83(6), 574-577.
357. Onyiche, T. E., & Ademola, I. O. (2015). Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in Ibadan, Nigeria. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(2), 309-314.
358. Opel, U., Charleston, W. A. G., Pomroy, W. E., & Rommel, M. (1991). A survey of the prevalence of *Toxoplasma* infection in goats in New Zealand and a comparison of the latex agglutination and indirect fluorescence tests. *Veterinary parasitology*, 40(3-4), 181-186.
359. Opsteegh, M., Langelaar, M., Sprong, H., den Hartog, L., De Craeye, S., Bokken, G. der Giessen, J. van. (2010). Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.027>
360. Opsteegh, M., Maas, M., Schares, G., & Van der Giessen, J. (2016). on behalf of the consortium. Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01). An extensive literature review. Final report. *An extensive literature review. Final report*.
361. Ortega-Pacheco, A., Acosta Viana, K. Y., Guzmán-Marín, E., Segura-Correa, J. C., Alvarez-Fleites, M. & Jiménez-Coello, M. (2013). Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico. *BioMed research international*, 2013.
362. Ovalle, F., Garcia, A., Thibauth, J. & Lorca, M. (2000). Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cats from Valdivia city, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología*, 55(3-4), 94-99.
363. Owen, J. A., & Punt, J. (2009). Stranford. SA, Patricia P. Jones. *Kuby Immunology. 7th ed. Schultz L, Erica Champion., Pech I, Michael. A, Ebadat. Y, Christine Buese., et al., editors. WH Freeman and Company. New York.*
364. Palella Jr, F. J., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A. & HIV Outpatient Study Investigators. (1998). Declining morbidity and mortality among

- patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, 338(13), 853-860.
365. Papatsiros, V. G., Athanasiou, L. V., Stougiou, D., Papadopoulos, E., Maragkakis, G. G., Katsoulos, P. D. & Boutsini, S. (2016). Cross-sectional serosurvey and risk factors associated with the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Greece. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(1), 48-53.
366. Paquet, C., Yudin, M. H., Allen, V. M., Bouchard, C., Boucher, M., Caddy, S., ... & van Schalkwyk, J. (2013). Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada*, 35(1), 78-79.
367. Pardini, L., Maksimov, P., Herrmann, D. C., Bacigalupe, D., Rambeaud, M., Machuca, M., ... & Venturini, M. C. (2012). Evaluation of an in-house TgSAG1 (P30) IgG ELISA for diagnosis of naturally acquired *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Veterinary parasitology*, 189(2-4), 204-210.
368. Paredes-Santos, T. C., Tomita, T., Fen, M. Y., De Souza, W., Attias, M., Vommaro, R. C., & Weiss, L. M. (2016). Development of dual fluorescent stage specific reporter strain of *Toxoplasma gondii* to follow tachyzoite and bradyzoite development in vitro and in vivo. *Microbes and infection*, 18(1), 39-47.
369. Parmley, S. F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L. D., Sucharczuk, A., & Remington, J. S. (1994). Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Molecular and biochemical parasitology*, 66(2), 283-296.
370. Paștiu, A. I., Györke, A., Blaga, R., Mircean, V., Rosenthal, B. M., & Cozma, V. (2013). In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. *Parasitology Research*, 112(6), 2403-2407.
371. Patton, S., Johnson, S. S., & Puckett, K. (1990). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in nine populations of dairy goats: compared titers using modified direct agglutination and indirect hemagglutination. *The Journal of parasitology*, 74-77.
372. Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International journal for parasitology*, 38(5), 561-569.
373. Pena, H. F. J., Marvulo, M. F. V., Horta, M. C., Silva, M. A., Silva, J. C. R., Siqueira, D. B. & Gennari, S. M. (2011). Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Veterinary*

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

parasitology, 175(3-4), 377-381.

374. Perera, J. T., & García, A. J. L. (2002) Ingeniería genética. I, Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. *Síntesis*.
375. Pettersen, E. (1979). Destruction of *Toxoplasma gondii* by HC1 solution. *APMIS*, 87(1–6), 217–220.
376. Piassa, F., Araujo, J., Rosa, R., Mattei, R., Silva, R., Langoni, H., & Silva, A. Prevalence and risk factors for *T. gondii* infection in certified and non-certified pigs breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 152-156.
377. Pinkerton, H., & Weinman, D. (1940). *Toxoplasma* infection in human. *Arch Pathol*, 30, 374-392.
378. Plaza, J., Dámek, F., Villena, I., Innes, E. A., Katzer, F., & Hamilton, C. M. (2020). Detection of *Toxoplasma gondii* in retail meat samples in Scotland. *Food and Waterborne Parasitology*, e00086.
379. Pocock, C., Richards, D. & Richards, D. (2013). The physiology of the digestive system. *Oxford University Press Oxford*, 94.
380. Poljak, Z., Dewey, C. E., Friendship, R. M., Martin, S. W., Christensen, J., Ojkic, D. & Chow, E. (2008). Pig and herd level prevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario finisher pigs in 2001, 2003, and 2004. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(4), 303.
381. Possenti, A., Cherchi, S., Bertuccini, L., Pozio, E., Dubey, J. P., & Spano, F. (2010). Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. *International journal for parasitology*, 40(14), 1639-1649.
382. Poma, J. P. (1989). La fabrication du jambon sec: importance de la congélation de la matière première. *V P C*, 10, 179–182.
383. Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Haseine, L., Dardé, M. L. & Marty, P. (2011). Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging infectious diseases*, 17(7), 1327.
384. Pozio, E. (2004). Highly Active AntiRetroviral Therapy and opportunistic protozoan infections. *Parassitologia*.
385. Pozio, E. & Morales, M. A. G. (2005). The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends in parasitology*, 21(2), 58-63.
386. Pradhan, S., Yadav, R., & Mishra, V. N. (2007). *Toxoplasma* meningoencephalitis in HIV-seronegative patients: clinical patterns, imaging features and treatment outcome. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(1),

- 25-33.
387. Pumarola, A., Rodríguez Torres, A., García Rodríguez, J. & Ángulo Piedrola, G. (1982). Microbiología y parasitología médica. *Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas S.A.*
388. Qu, D., Zhou, H., Han, J., Tao, S., Zheng, B., Chi, N. & Du, A. (2013). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a diagnostic tool of *Toxoplasma gondii* in pork. *Veterinary parasitology*, 192(1-3), 98-103.
389. Rabjeau, A., Foussard, F., Mauras, G., & Dubremetz, J. F. (1997). Enrichment and biochemical characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite plasmalemma. *Parasitology*, 114(5), 421-426.
390. Rahman, W. A., Manimegalai, V., Chandrawathani, P., Nurulaini, R., Zaini, C. M., & Premaalatha, B. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Malaysian cattle. *Malaysian Journal of Veterinary Research*, 2, 51-56.
391. Rahumatullah, A., Khoo, B. Y., & Noordin, R. (2012). Triplex PCR using new primers for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Experimental parasitology*, 131(2), 231-238.
392. Ranucci, D., Veronesi, F., Branciari, R., Miraglia, D., Moretta, I., & Fioretti, D. P. (2012). Evaluation of an immunofluorescence antibody assay for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in meat juice samples from finishing pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 9(1), 75-78.
393. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, n. 34, de 8 de febrero de 2013.
394. Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico. *Boletín Oficial del Estado*, n. 10, de 11 de enero de 2014.
395. Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad derivados cárnicos. *Boletín Oficial del Estado*, n. 147, de 18 de junio de 2014.
396. Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº 608/2004 de la

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

- Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 304, de 22 de noviembre de 2011.
- Remington, J. & Merigan, T. (1968). Interferon: protection of cells infected with an intracellular protozoan (*Toxoplasma gondii*). *Science*, 161(3843), 804–806.
397. Remington, J. S. & Klein, J. O. (2001). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. WB Saunders.
398. Richomme, C., Aubert, D., Gilot-Fromont, E., Ajzenberg, D., Mercier, A., Ducrot, C. & Villena, I. (2009). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 296-300.
399. Roberts, C. W., Cruickshank, S. M., & Alexander, J. (1995). Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infection and immunity*, 63(7), 2549-2555.
400. Roberts, A., Hedman, K., Luyasu, V., Zufferey, J., Bessières, M. H., Blatz, R. M., & Guy, E. (2001). Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(7), 467-474.
401. Rogers, N. M., Peh, C.-A., Faull, R., Pannell, M., Cooper, J., & Russ, G. R. (2008). Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. *Transplant Infectious Disease*.
402. Roqueplo, C., Halos, L., Cabre, O., & Davoust, B. (2011). *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia. *Parasite*, 18(4), 345.
403. Saad, N. M., Hussein, A. A., & Ewida, R. M. (2018). Occurrence of *Toxoplasma gondii* in raw goat, sheep, and camel milk in Upper Egypt. *Veterinary world*, 11(9), 1262.
404. Saadatnia, G., Ghani, H., Khoo, H., Maimunah, B. Y., & Rahmah, N. (2010). Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Tropical Biomedicine*, 27(1), 125–130.
405. Saavedra, G. M., & Ortega, Y. R. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from slaughterhouses in Lima, Peru, and Georgia, USA. *Journal of Parasitology*, 90(4), 902-904.
406. Sabin, A., & Feldman, H. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108(2815), 660–663.
407. Saeij, J. P., Boyle, J. P., & Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in parasitology*, 21(10), 476-481.

408. Sandfoss, M., DePerno, C., Patton, S., Flowers, J., & Kennedy-Stoskopf, S. (2011). Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in feral pigs (*Sus scrofa*) of eastern North Carolina. *Journal of wildlife diseases*, 47(2), 338-343.
409. De Santana Rocha, D., de Sousa Moura, R. L., Maciel, B. M., Guimarães, L. A., O'dwyer, H. N., Munhoz, A. D., & Albuquerque, G. R. (2015). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in naturally infected sheep's milk. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 8658-8662.
410. Santoro, A., Tagel, M., Must, K., Laine, M., Lassen, B., & Jokelainen, P. (2017). *Toxoplasma gondii* seroprevalence in breeding pigs in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 1-8.
411. Dos Santos, C. B., Carvalho, Â. C., Ragozo, A. M., Soares, R. M., Amaku, M., Yai, L. E., Dubey, J.P., y Gennari, S. M. (2005). First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 131(3), 207-211.
412. Saraei, M., Shojaee, S., Esmaeli, A. R., Jahani-Hashemi, H., & Keshavarz, H. (2010). Evaluation of confounders in toxoplasmosis indirect fluorescent antibody assay. *Iranian Journal of Parasitology*, 5(4), 55–62.
413. Sarkari, B., Asgari, Q., Bagherian, N., Esfahani, S. A., Kalantari, M., Mohammadpour, I. & Sarvestani, F. S. (2014). Molecular and serological evaluation of *Toxoplasma gondii* infection in reared turkeys in Fars Province, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(7).
414. Savarino, V., Mela, G. S., Scalabrini, P., Sumberaz, A., Fera, G. & Celle, G. (1988). 24-hour study of intragastric acidity in duodenal ulcer patients and normal subjects using continuous intraluminal pH-metry. *Digestive diseases and sciences*, 33(9), 1077-1080.
415. Savva, D. (1992). *Toxoplasma*. In *Molecular and Cell Biology of Opportunistic Infections in AIDS*, 163–185.
416. Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L. & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7.
417. Sevilla, D. L. M. (1969). Investigación serológica de la toxoplasmosis en animales domesticos de Espana. Segunda parte. *Suppl. Cient. Cons. Gen. Col. Vet. Esp.*, 187, 3-37.
418. Sharma, R. N., Tiwari, K., Chikweto, A., DeAllie, C., & Bhaiyat, M. I. (2015). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in pigs in Grenada, West Indies. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5(06), 138.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

419. Sheffield, H. & Melton, M. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 209–226.
420. Shwab, E., Jiang, T., Pena, H., Gennari, S., Dubey, J., & Su, C. (2016). The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 46(2), 141–146.
421. Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453-461.
422. Sibley, L. D., & Ajioka, J. W. (2008). Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, 329-351.
423. Sibley, L. D., & Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359(6390), 82-85.
424. Silveira, C., Ferreira, R., Muccioli, C., Nussenblatt, R., & Belfort Jr, R. (2003). Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *American journal of ophthalmology*, 136(2), 370-371.
425. Sims, T. A., Hay, J., & Talbot, I. C. (1989). An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma* tissue cysts within the brains of mice with congenital toxoplasmosis. *British journal of experimental pathology*, 70(3), 317.
426. Sommer, R., Rommel, M., & Levetzow, R. (1965). Die Überlebensdauer von *Toxoplasma* zysten in fleisch und fleischzubereitungen. *Fleischwirtschaft*, 5, 454–457.
427. De Sousa, S., Ajzenberg, D., Canada, N., Freire, L., da Costa, J. C., Dardé, M. L., & Dubey, J. P. (2006). Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Veterinary parasitology*, 135(2), 133-136.
428. De Sousa, R. Á. D., Lemos, J. D. F., Farias, L. A., Lopes, C. D., & Santos, K. R. D. (2014). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pigs in southern Piauí. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), 98-100.
429. Speer, C. A., Clark, S., & Dubey, J. P. (1998). Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology*, 84(3), 505.
430. Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de'conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo*, 3, 109-112.

431. Sroka, J., Cencek, T., Ziomko, I., Karamon, J. & Zwolinski, J. (2008). Preliminary assessment of ELISA, MAT, and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 545-549.
432. Sroka, J., Karamon, J., Wójcik-Fatla, A., Piotrowska, W., Dutkiewicz, J., Bilska-Zajac, E. & Cencek, T. (2020). *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered pigs and cattle in Poland: seroprevalence, molecular detection and characterization of parasites in meat. *Parasites & Vectors*, 13, 1-11.
433. Steinparzer, R., Reisp, K., Grünberger, B., Köfer, J., Schmoll, F., & Sattler, T. (2015). Comparison of different commercial serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in serum of naturally exposed pigs. *Zoonoses and public health*, 62(2), 119-124.
434. Stelzer, S., Basso, W., Silván, J. B., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P., Gethmann, J. & Schares, G. (2019). *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00037.
435. Stroehle, A., Schmid, K., Heinzer, I., Naguleswaran, A., & Hemphill, A. (2005). Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *Journal of Parasitology*, 91(3), 561-563.
436. Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M. L. & Sibley, L. D. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15), 5844-5849.
437. Su, C., Zhang, X., & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International journal for parasitology*, 36(7), 841-848.
438. Suarez, C. E., Palmer, G. H., Hines, S. A., & McElwain, T. F. (1993). Immunogenic B-cell epitopes of Babesia bovis rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. *Infection and immunity*, 61(8), 3511-3517.
439. Suárez-Aranda, F., Galisteo Jr, A. J., Hiramoto, R. M., Cardoso, R. P. A., Meireles, L. R., Miguel, O., & Andrade Jr, H. F. (2000). The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Veterinary Parasitology*, 91(1-2), 23-32.
440. Sullivan Jr, W. J., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 717-733.
441. Sun, H., Zhuo, X., Zhao, X., Yang, Y., Chen, X., Yao, C., & Du, A. (2017). The heat shock protein 90 of *Toxoplasma gondii* is essential for invasion of host cells and tachyzoite

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

growth. *Parasite*, 24.

442. Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., & Remington, J. S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240(4851), 516-518.
443. Swierzy, I. J., Muhammad, M., Kroll, J., Abelmann, A., Tenter, A. M., & Lüder, C. G. (2014). *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission. *International Journal for Parasitology*, 44(2), 91-98.
444. Tao, Q., Wang, Z., Feng, H., Fang, R., Nie, H., Hu, M. & Zhao, J. (2011). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on pig farms in central China. *The Journal of parasitology*, 97(2), 262-264.
445. Tenter, A. M. (2009). *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200033>
446. Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., y Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1217-1258.
447. Thaller, R., Tamaro, F., & Pentimalli, H. (2011). Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in central Italy. *Le infezioni in medicina*, 19(4), 241.
448. Thiptara, A., Kongkaew, W., Bilmad, U., Bhumibhamon, T., & Anan, S. (2006). Toxoplasmosis in piglets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081(1), 336-338.
449. Tonouhewa, A. B. N., Akpo, Y., Sessou, P., Salanon, C., Aplogan, G. L., Assogba, M. N. & Farougou, S. (2020). *Toxoplasma gondii* infections in pigs from south benin and assessment of breeders' knowledge about toxoplasmosis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 23(2).
450. Torgerson, P. R., de Silva, N. R., Fèvre, E. M., Kasuga, F., Rokni, M. B., Zhou, X. N. & Stein, C. (2014). The global burden of foodborne parasitic diseases: an update. *Trends in Parasitology*, 30(1), 20-26.
451. Toro-Montoya, A. (1995). Toxoplasmosis. *Medicina & Laboratorio*, 129–141.
452. Travaille, E., La Carbona, S., Gargala, G., Aubert, D., Guyot, K., Dumètre, A. & Houssin, M. (2016). Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control*, 59, 359-365.
453. Tsai, Y. J., Chung, W. C., Fei, A. C., Kaphle, K., Peng, S., & Wu, Y. L. (2007). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from slaughterhouses in Taiwan. *Journal of Parasitology*, 93(6), 1540-1541.

454. Tsubota, N., Hiraoka, K., Sawada, Y., Ohshima, S. & Hoshino, M. (1977). Studies on latex agglutination test for toxoplasmosis. Evaluation of the microtitre test as a serological test for toxoplasmosis in some animals. *Japanese Journal of Parasitology*, 26(4), 291–298.
455. Tsutsui, V. S., Freire, R. L., Garcia, J. L., Gennari, S. M., Vieira, D. P., Marana, E. R. M., ... & Navarro, I. T. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(1), 30-34.
456. Tuda, J., Adiani, S., Ichikawa-Seki, M., Umeda, K., & Nishikawa, Y. (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in humans and pigs in North Sulawesi, Indonesia. *Parasitology international*, 66(5), 615-618.
457. Turčeková, L., Antolová, D., Reiterová, K., & Spišák, F. (2013). Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. *Acta parasitologica*, 58(3), 361-366.
458. UE (2003). Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. *DO L 325 de 12 de diciembre de 2003*, 31-40.
459. UE. (2008). Decisión de la Comisión de 28 de abril de 2008 que modifica la Decisión 2002/253/CE, por la que se establecen las definiciones de los casos para comunicar las enfermedades transmisibles a la red comunitaria, de conformidad con la Decisión N° 2119/98/CE de. *DO L 159 de 18 de Junio de 2008*, 46–90.
460. Ues, L. (1998). Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (elisa) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 7(2), 79–85.
461. Uggla, A., Sjöland, L., & Dubey, J. P. (1987). Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *American journal of veterinary research*, 48(3), 348-351.
462. Valdès, V., Legagneur, H., Watrin, V., Paris, L., & Hascoët, J. M. (2011). Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*, 18(7), 761-763.
463. Van der Giessen, J., Fonville, M., Bouwknegt, M., Langelaar, M., & Vollema, A. (2007). Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. *Veterinary parasitology*, 148(3-4), 371-374.

"*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo"

464. Velmurugan, G. V., Dubey, J. P., & Su, C. (2008). Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Veterinary parasitology*, 155(3-4), 314-318.
465. Velmurugan, G. V., Su, C., & Dubey, J. P. (2009). Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. *Journal of Parasitology*, 95(1), 95-99.
466. Ventanas, B. (2001). Tecnología del jamón Iberico. *Mundi-Prensa*.
467. Venturini, M. C., Bacigalupe, D., Venturini, L., Rambeaud, M., Basso, W., Unzaga, J. M., & Perfumo, C. J. (2004). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and an outdoor farm in Argentina. *Veterinary parasitology*, 124(3-4), 161-165.
468. Verhelst, D., De Craeye, S., Dorny, P., Melkebeek, V., Goddeeris, B., Cox, E., & Jongert, E. (2011). IFN- γ expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues are associated with an antibody response against GRA7 in experimentally infected pigs. *Veterinary parasitology*, 179(1-3), 14-21.
469. Verhelst, D., De Craeye, S., Entrican, G., Dorny, P., & Cox, E. (2014). Parasite distribution and associated immune response during the acute phase of *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *BMC veterinary research*, 10(1), 293.
470. Verhelst, D., De Craeye, S., Jennes, M., Dorny, P., Goddeeris, B., & Cox, E. (2015). Interferon-gamma expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues in experimentally infected sheep in comparison with pigs. *Veterinary parasitology*, 207(1-2), 7-16.
471. Verhofstede, C., Van Gelder, P., & Rabaey, M. (1988). The infection-stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by immunoblotting. *Parasitology research*, 74(6), 516-520.
472. Veronesi, F., Ranucci, D., Branciarri, R., Miraglia, D., Mammoli, R., & Fioretti, D. P. (2011). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria region, central Italy. *Zoonoses and public health*, 58(3), 178-184.
473. Veronesi, F., Santoro, A., Milardi, G. L., Diaferia, M., Branciarri, R., Miraglia, D., ... & Ranucci, D. (2017). Comparison of PCR assays targeting the multi-copy targets B1 gene and 529 bp repetitive element for detection of *Toxoplasma gondii* in swine muscle. *Food microbiology*, 63, 213-216.
474. Vidal, J. E. (2019). HIV-related cerebral toxoplasmosis revisited: current concepts and controversies of an old disease. *Journal of the International Association of Providers of*

- AIDS Care (JIAPAC)*, 18, 2325958219867315.
475. Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., & Buffolano, W. (2009). Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 161(1-2), 1-8.
476. Vitor, R. W. A., Ferreira, A. M., & Fux, B. (1999). Antibody response in goats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology*, 81(3), 259-263.
477. Vostalová, E., Literák, I., Pavlásek, K., & Sedlák. (2000). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in finishing pigs in large-scale farm in the Czech Republic. *Acta Vet*, 69, 209–212.
478. Wang, H., Wang, T., Luo, Q., Huo, X., Wang, L., Liu, T., ... & Yu, L. (2012). Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China. *International journal of food microbiology*, 157(3), 393-397.
479. Wang, Y., Wang, G., Zhang, D., Yin, H., & Wang, M. (2013). Detection of acute toxoplasmosis in pigs using loop-mediated isothermal amplification and quantitative PCR. *The Korean journal of parasitology*, 51(5), 573.
480. Warnekulasuriya, M. R., Johnson, J. D., & Holliman, R. E. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *International journal of food microbiology*, 45(3), 211-215.
481. Warren, J. & Russ, S. (1948). Cultivation of *Toxoplasma* in embryonated egg. An antigen derived from choriolallantoic membrane. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 67(1), 85–89.
482. Webster, J. P. (2010). Review of " toxoplasmosis of animals and humans " by JP Dubey. *Parasites & Vectors*, 3, 112.
483. Webster, J. P., Kaushik, M., Bristow, G. C., & McConkey, G. A. (2013). *Toxoplasma gondii* infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour?. *Journal of Experimental Biology*, 216(1), 99-112.
484. Weinman, D., & Chandler, A. H. (1954). Toxoplasmosis in Swine and Rodents. Reciprocal Oral Infection and Potential Human Hazard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87(1), 211-216.
485. Weiss, L. M., & Kim, K. (2007). Bradyzoite development. In *Toxoplasma gondii* (pp. 341-366). Academic Press.
486. Weissenböck, H., & Dubey, J. (1993). *Toxoplasma* epizootie in einem Mastschweinebestand. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 100, 370–374.
487. Welsch, U. (2009). *Histología de Sobotta 2/e* (Médica Pan).
488. Wendte, J. M., Miller, M. A., Lambourn, D. M., Magargal, S. L., Jessup, D. A., & Grigg,

- M. E. (2010). Self-mating in the definitive host potentiates clonal outbreaks of the apicomplexan parasites *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii*. *PLoS genetics*, 6(12), e1001261.
489. Williams, D. M., Grumet, F. C., & Remington, J. S. (1978). Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 19(2), 416-420.
490. Windeck, T. & Gross, U. (1996). *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. *Parasitology research*, 82(8), 715-719.
491. Wingstrand, A., Lind, P., Haugegaard, J., Henriksen, S. A., Bille-Hansen, V., & Sørensen, V. (1997). Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, 72(2), 129-140.
492. Wolf, A., Cowen, D., & Paige, B. (1939). Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *The American Journal of Pathology*, 15(6), 657.
493. Work, K. (1968). Resistance of *Toxoplasma gondii* encysted in pork. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 73(1), 85-92.
494. Wu, D., Lv, R., Sun, X., Shu, F., Zhou, Z., Nie, K. & Zou, F. (2012). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from slaughter pigs in Chongqing, China. *Tropical animal health and production*, 44(4), 685-687.
495. Wyman, C. P., Gale, S. D., Hedges-Muncy, A., Erickson, L. D., Wilson, E., & Hedges, D. W. (2017). Association between *Toxoplasma gondii* seropositivity and memory function in nondemented older adults. *Neurobiology of aging*, 53, 76-82..
496. Xu, P., Cai, Y. N., Leng, X., Wang, J., Ma, W., Mu, G. D. & Yang, G. L. (2015). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Jilin Province, Northeastern China. *Trop Biomed*, 32, 116-120.
497. Xue, M., He, S., Cui, Y., Yao, Y., & Wang, H. (2008). Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology international*, 57(4), 424-429.
498. Yai, L. E. O., Soares, R. M., Freire, R. L., & Richtzenhain, L. J. (2003). Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction Avaliação da infecção experimental por *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) em suínos pelas provas. *Brazilian Journal of Veterinary*, 227-234.

499. Yang, S., & Parmley, S. F. (1997). *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts. *Gene*, *184*(1), 1-12.
500. Yu, H., Huang, B., Zhuo, X., Chen, X., & Du, A. (2013). Evaluation of a real-time PCR assay based on the single-copy SAG1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology*, *197*(3-4), 670-673.
501. Yu, H. J., Zhang, Z., Liu, Z., Qu, D. F., Zhang, D. F., Zhang, H. L. & Du, A. F. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pigs, in Zhejiang Province, China. *Journal of Parasitology*, *97*(4), 748-749.
502. Zakimi, S., Hisako, K. Y. A. N., Oshiro, M., Sugimoto, C. & Fujisaki, K. (2006). PCR-based discrimination of *Toxoplasma gondii* from pigs at an abattoir in Okinawa, Japan. *Journal of veterinary medical science*, *68*(4), 401-404.
503. Zhang, Y., Mi, R., Huang, Y., Xia, L., Cai, Y., Jia, H. & Chen, Z. (2019). Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in pork in Shanghai, China. *Food Control*, *99*, 57-63.
504. Zhang, H., Thekisoe, O. M., Aboqe, G. O., Kyan, H., Yamagishi, J., Inoue, N., ... & Xuan, X. (2009). *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Experimental parasitology*, *122*(1), 47-50.
505. Zhang, Y., Träskman-Bendz, L., Janelidze, S., Langenberg, P., Saleh, A., Constantine, N. & Postolache, T. T. (2012). *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies and nonfatal suicidal self-directed violence. *The Journal of clinical psychiatry*, *73*(8), 1069-1076.
506. Zhuo, X., Huang, B., Luo, J., Yu, H., Yan, B., Yang, Y., & Du, A. (2015). Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays based on ITS-1 for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in pork. *Veterinary Parasitology*, *208*(3-4), 246-249.
507. Zhou, D. H., Liang, R., Yin, C. C., Zhao, F. R., Yuan, Z. G., Lin, R. Q., ... & Zhu, X. Q. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from southern China. *Journal of Parasitology*, *96*(3), 673-674.
508. Zhou, P., Zhang, H., Lin, R. Q., Zhang, D. L., Song, H. Q., Su, C., & Zhu, X. Q. (2009). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitology International*, *58*(2), 193-195.
509. Zia-Ali, N., Fazaeli, A., Khoramizadeh, M., Ajzenberg, D., Dardé, M., & Keshavarz-Valian, H. (2007). Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. *Parasitology research*, *101*(1), 111-115.

“*Toxoplasma gondii* en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo”

510. Zintl, A., Halova, D., Mulcahy, G., O'Donovan, J., Markey, B., & DeWaal, T. (2009). In vitro culture combined with quantitative TaqMan PCR for the assessment of *Toxoplasma gondii* tissue cyst viability. *Veterinary parasitology*, 164(2-4), 167-172.
511. Zou, F. C., Sun, X. T., Xie, Y. J., Li, B., Zhao, G. H., Duan, G., & Zhu, X. Q. (2009). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in southwestern China. *Parasitology international*, 58(3), 306-307.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Resultados serológicos obtenidos mediante IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies a partir de sueros procedentes de cerdos infectados experimentalmente.

Día de infección	Cerdo	IFI			MAT			ELISA monoespecie			ELISA multiespecies		
0	1	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	2,335	2,401	2,390	21,213	23,386	20,680
	2	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	2,000	2,001	1,988	10,860	10,960	10,186
	3	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	3,213	3,192	3,232	8,936	11,851	7,621
	4	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	4,523	4,601	4,783	20,363	20,238	18,622
	5	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	6,233	6,221	6,312	11,910	12,709	11,585
	6	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	1,458	1,489	1,532	17,242	15,281	15,352
	7	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	6,823	7,001	6,792	30,965	23,670	26,151
	8	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	5,210	5,012	5,511	7,371	5,880	7,262
	9	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	8,235	8,532	8,335	10,136	16,540	17,848
	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	0,253	0,322	0,302	9,028	10,727	10,127
8	1	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	12,912	12,687	11,287	15,050	15,149	21,229
	2	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	3,070	4,109	3,973	13,959	16,923	17,340
	3	1:40	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	1,355	0,903	2,619	15,999	21,404	25,277
	4	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	8,985	9,210	9,526	14,100	19,489	17,623
	5	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	2,754	3,070	2,845	10,102	14,067	13,467
	6	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	6,908	5,915	5,553	24,111	21,279	22,903
	7	1:80	1:80	1:160	<1:40	<1:40	<1:40	3,296	2,529	3,251	31,657	37,853	27,567
	8	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	2,980	2,980	2,754	12,576	12,035	13,359
	9	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	9,210	10,023	8,037	18,706	21,296	20,396
	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	0,768	1,400	1,400	8,528	9,328	10,144
15	1	1:80	1:80	1:160	1:540	1:540	1:540	18,824	19,914	20,375	26,008	37,084	30,266
	2	1:160	1:160	1:160	1:540	1:1620	1:1620	73,366	73,534	73,744	29,098	20,157	6,737
	3	1:160	1:160	1:160	1:1620	1:1620	1:1620	36,055	34,965	37,228	76,998	76,833	83,849
	4	1:160	1:160	1:160	1:1620	1:1620	1:1620	70,641	77,307	75,630	96,790	97,154	86,115
	5	1:80	1:80	1:80	1:540	1:540	1:540	26,538	25,448	22,807	108,241	87,765	104,653
	6	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	30,646	26,203	26,789	49,617	62,987	64,533
	7	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	52,782	53,537	48,338	77,329	95,014	74,462
	8	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	30,688	29,011	30,353	98,224	91,494	82,642
	9	1:160	1:160	1:160	1:1620	1:1620	1:1620	77,014	76,846	74,079	57,477	117,076	117,724
	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	2,893	2,851	2,809	19,387	22,872	16,318
22	1	1:160	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	50,385	39,008	54,629	80,595	88,382	81,186
	2	1:160	1:160	1:320	1:540	1:540	1:540	65,870	77,292	79,595	113,784	78,896	88,807
	3	1:640	1:640	1:640	1:540	1:540	1:540	71,333	73,365	66,863	No ¹	No ¹	No ¹
	4	1:1280	1:1280	1:1280	1:540	1:540	1:540	113,455	115,577	117,383	134,188	121,029	89,256
	5	1:320	1:320	1:320	1:180	1:540	1:540	36,073	36,434	34,267	No ¹	No ¹	No ¹
	6	1:640	1:640	1:640	1:540	1:540	1:540	49,572	39,594	43,071	94,811	82,077	101,383
	7	1:320	1:320	1:320	1:1620	1:1620	1:1620	47,902	41,987	46,096	95,619	98,526	90,314
	8	1:320	1:320	1:640	1:540	1:1620	1:1620	53,184	43,929	52,461	80,459	79,564	74,657
	9	1:1280	1:2560	1:2560	1:4860	1:4860	1:4860	86,367	93,997	89,979	127,834	129,358	123,595

"Toxoplasma gondii en la industria de elaboración de productos curados. Evaluación de métodos de detección y su aplicación al proceso de evaluación y control del riesgo"

ANEXO 1. Resultados serológicos obtenidos mediante IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies a partir de sueros procedentes de cerdos infectados experimentalmente (Continuación)

	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	1,355	1,264	1,851	No ¹	No ¹	No ¹
29	1	1:320	1:320	1:320	1:1620	1:1620	1:1620	55,759	54,333	54,040	82,460	108,112	82,918
	2	1:640	1:640	1:640	1:1620	1:1620	1:1620	49,931	52,614	53,830	112,434	129,408	118,731
	3	1:640	1:640	1:640	1:1620	1:1620	1:1620	65,569	64,353	57,855	120,500	129,278	126,149
	4	1:320	1:320	1:320	1:1620	1:1620	1:1620	88,207	88,375	88,207	136,560	150,019	135,545
	5	1:160	1:160	1:160	1:1620	1:1620	1:1620	52,237	50,895	48,254	No ¹	No ¹	No ¹
	6	1:160	1:160	1:160	1:180	1:180	1:540	34,797	29,682	30,521	101,258	91,185	83,264
	7	1:320	1:320	1:320	1:1620	1:1620	1:1620	34,545	35,887	37,983	101,180	94,793	109,267
	8	1:320	1:320	1:320	1:540	1:540	1:540	46,913	47,416	43,936	105,230	100,142	99,051
	9	1:1280	1:2560	1:2560	1:4860	1:4860	1:4860	83,093	81,583	84,099	149,104	142,484	158,525
	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	3,103	3,480	3,438	19,721	17,658	17,882
36	1	1:320	1:320	1:320	1:180	1:180	1:180	102,169	85,509	85,193	118,813	125,041	128,465
	2	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	62,304	53,635	42,664	106,032	99,570	115,237
	3	1:160	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	78,195	80,679	73,500	133,627	108,043	137,122
	4	1:160	1:160	1:320	1:180	1:540	1:540	98,918	91,694	100,995	129,075	127,358	131,778
	5	1:80	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	94,268	98,151	106,277	135,608	111,488	136,492
	6	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	57,202	59,008	53,410	87,449	88,262	86,291
	7	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	46,412	46,999	46,592	82,704	99,783	105,168
	8	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	56,299	60,949	65,193	64,974	92,824	96,969
	9	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	75,396	84,742	81,175	129,055	135,354	135,273
	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	8,578	8,985	10,745	18,766	27,981	26,102
50	1	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	64,982	57,268	56,807	158,856	158,646	145,187
	2	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	50,518	50,728	50,937	134,938	127,713	131,309
	3	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	65,736	59,909	63,810	143,841	152,987	160,246
	4	1:160	1:160	1:160	1:180	1:540	1:540	80,032	79,174	71,186	142,484	126,918	134,486
	5	1:80	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	69,803	56,304	75,546	133,438	142,330	140,741
	6	1:80	1:80	1:80	1:60	1:60	1:180	21,717	21,046	22,723	58,917	69,453	101,975
	7	1:160	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	29,305	26,706	24,903	115,015	106,719	106,332
	8	1:160	1:160	1:160	1:540	1:540	1:540	54,794	48,925	46,577	123,509	127,216	118,170
	9	1:320	1:640	1:640	1:540	1:540	1:540	80,158	83,763	74,331	153,858	166,656	170,418
	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	1,803	1,384	1,845	22,654	23,713	24,717
63	1	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	66,952	62,792	65,477	115,908	145,353	140,477
	2	1:80	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	51,604	47,443	47,353	121,899	122,241	127,823
	3	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	45,250	49,412	50,888	99,459	118,170	109,333
	4	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	85,257	90,000	89,776	103,166	102,637	96,757
	5	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	67,759	71,295	63,956	111,275	116,063	75,994
	6	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	38,090	39,477	37,463	80,242	82,448	85,835
	7	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	45,116	44,310	44,086	99,702	95,025	93,535
	8	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	54,424	54,379	50,128	127,492	117,342	125,374
	9	1:80	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	71,384	66,372	71,429	167,483	154,245	146,798
	10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	4,259	3,856	3,587	20,955	20,260	19,135

¹No hay datos de 4 sueros mediante la técnica ELISA multiespecies por no haber suficiente volumen de muestra para todas las pruebas analítica

ANEXO 2. Resultados serológicos obtenidos mediante IFI, MAT, ELISA monoespecie y ELISA multiespecies a partir de sueros procedentes de cerdos no infectados experimentalmente.

Cerdo	IFI			MAT			ELISA monoespecie			ELISA multiespecies		
1	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	13,939	14,337	7,726	8,543	6,177	6,357
2	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	7,885	7,487	6,691	3,199	4,390	4,986
3	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	6,770	6,611	13,779	7,311	5,875	4,986
4	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	13,461	13,620	8,045	13,668	11,220	12,150
5	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	7,965	8,124	10,514	3,370	5,157	4,423
6	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	10,593	10,912	8,204	8,796	6,863	8,315
7	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	8,284	8,523	6,691	7,067	5,173	5,263
8	<1:20	1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	6,611	6,770	12,266	6,528	9,131	6,340
9	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	11,947	12,346	5,974	5,168	4,774	5,247
10	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	6,611	5,814	6,133	15,754	12,203	20,047
11	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	6,372	6,292	16,010	12,192	11,723	14,082
12	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	15,691	15,691	14,735	4,496	4,064	6,414
13	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	14,496	14,656	14,257	2,823	3,093	6,765
14	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	13,222	14,098	7,646	6,817	4,851	6,839
15	<1:20	<1:20	1:20	<1:40	<1:40	<1:40	7,248	7,487	9,638	2,481	1,404	5,867
16	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	9,239	9,717	8,204	1,314	-0,759	0,065
17	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	8,523	8,284	4,859	8,311	10,404	12,568
18	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	5,735	5,337	8,284	4,651	7,842	5,663
19	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	8,443	12,266	9,000	4,007	4,978	4,512
20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:40	<1:40	<1:40	9,558	9,160	-1,274	4,937	5,973	4,953
Suma												
1	1:40	1:80	1:80	1:180	1:180	1:180	123,566	127,848	133,728	117,459	100,153	37,624
2	1:40	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	6,580	5,952	4,810	9,826	9,253	3,386
3	1:80	1:80	1:80	<1:40	<1:40	<1:40	3,840	3,497	3,040	8,216	6,839	9,887
4	1:80	1:80	1:80	1:180	1:180	1:540	217,603	221,426	205,655	1,779	18,964	23,941
5	1:160	1:160	1:160	1:180	1:180	1:180	50,418	45,798	50,498	130,218	126,232	120,459
6	1:80	1:80	1:160	1:180	1:180	1:540	160,505	167,985	168,441	10,226	9,119	4,773
7	1:160	1:160	1:320	1:180	1:540	1:540	271,844	252,170	253,524	193,674	198,561	192,160
8	1:160	1:160	1:160	1:180	1:540	1:540	178,096	186,937	252,728	123,619	169,208	178,596
9	1:320	1:320	1:320	1:540	1:540	1:540	198,987	177,976	191,051	219,212	208,773	195,507
10	1:640	1:640	1:1280	1:540	1:540	1:540	180,088	172,723	175,236	92,301	222,932	38,024
11	1:320	1:320	1:320	1:540	1:540	1:540	252,728	239,984	247,153	238,876	226,085	207,258
12	1:160	1:320	1:320	1:540	1:540	1:540	81,004	75,189	81,322	61,906	81,820	80,296
13	1:640	1:640	1:1280	1:1620	1:1620	1:1620	242,135	262,286	256,949	197,931	188,157	188,654
14	1:640	1:640	1:640	1:1620	1:1620	1:1620	240,860	246,515	228,992	247,450	213,159	242,291
15	1:320	1:640	1:640	1:1620	1:1620	1:1620	237,754	224,452	223,337	138,425	197,087	212,999
16	1:320	1:640	1:640	1:540	1:1620	1:1620	270,649	274,791	262,684	4,292	4,570	7,026
17	1:1280	1:1280	1:1280	1:1620	1:1620	1:1620	246,276	227,081	268,817	283,741	259,383	275,115
18	1:1280	1:1280	1:1280	1:1620	1:1620	1:1620	216,886	199,363	273,437	226,958	226,025	215,466
19	1:1280	1:1280	1:1280	1:1620	1:1620	1:1620	259,976	249,223	229,152	257,836	262,129	297,567
20	1:1280	1:1280	1:2560	1:1620	1:1620	1:1620	254,241	251,055	276,145	296,980	330,031	330,378