

Toxoplasmosis, la mayor zoonosis parasitaria en el mundo: vías de transmisión a los humanos en Ibagué, Colombia

Juan David Medina Hernández
Laura Alejandra Osorio Delgado
Angie Natalia Varón Saavedra
Julio César Carranza Martínez
Gustavo Adolfo Vallejo



2023

Toxoplasmosis, la mayor zoonosis parasitaria en el mundo :
vías de transmisión a los humanos en Ibagué, Colombia /
Juan David Medina Hernández.-- 1ª. ed.-- Sello Editorial
Universidad del Tolima, 2023.

116 p. : il., tablas, anexos

Contenido: Marco teórico y antecedentes-- Detección de
ADN de toxoplasma gondii (metodología modificada y
patronizada en el LIPT)-- Estudio piloto toxoplasma gondii
en heces de gatos de la ciudad de Ibagué-- Detección de
toxoplasma gondii en frutas y hortalizas comercializadas en
la ciudad de Ibagué-- Detección de toxoplasma gondii en
carnes destinadas al consumo humano en Ibagué, Tolima--
Consideraciones finales.

ISBN: 978-628-7537-94-1 (Impreso)

978-628-7537-40-8 (PDF)

1. Toxoplasmosis- Enfermedades transmisibles 2.
Zoonosis 3. Parásitos I. Título II. Medina Hernández, Juan
David III. Osorio Delgado, Laura Alejandra IV. Varón
Saavedra, Angie Natalia V. Carranza Martínez, Julio César
VI. Vallejo, Gustavo Adolfo

616.959

T755

© Universidad del Tolima

© Juan David Medina Hernández, Laura Alejandra Osorio Delgado, Angie Natalia Varón Saavedra, Julio César Carranza Martínez, Gustavo Adolfo Vallejo

Toxoplasmosis, la mayor zoonosis parasitaria en el mundo: vías de transmisión a los humanos en Ibagué, Colombia
Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical - LIPT
Universidad del Tolima

Sello Editorial Universidad del Tolima

Cra. 5 con ClI. 10 Esquina

Edificio los Ocobos, piso 4

Teléfono: (57 608) 2 77 20 40

publicaciones@ut.edu.co

Ibagué-Tolima, Colombia

Primera edición: Ibagué - Tolima, 2023

ISBN 978-628-7537-94-1 (Impreso)

ISBN 978-628-7537-40-8 (PDF)

Coordinación Editorial: Sello Editorial Universidad del Tolima

Corrección de estilo, diseño y diagramación: Colors Editores S.A.S.

Impresión: Xpress Estudio Gráfico y Digital S. A. S./Kimpres

Cra. 69h # 77 - 40 Engativá, Bogotá D. C., Colombia

Impreso y hecho en Colombia

Todos los derechos reservados. Prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio, sin autorización expresa del titular del derecho de autor

Agradecimientos

Al Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima, por la financiación del proyecto “Análisis comparativo entre métodos parasitológicos y moleculares para la detección y genotipificación de parásitos intestinales en frutas y hortalizas comercializadas en la ciudad de Ibagué”, código 480130516, el cual permitió al Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT) estudiar la detección molecular de *Toxoplasma gondii* en diferentes fuentes de contaminación para la población de la ciudad de Ibagué.

A Ricardo Wagner de Almeida Vitor del Departamento de Parasitología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (Brasil) y a Martha Stela Ayala Sotelo y Liliana Jazmín Cortés del Grupo de Parasitología del Instituto Nacional de Salud de Bogotá por la donación de ADN de la cepa RH de *T. gondii* que fue utilizado como control positivo para la detección molecular del parásito en heces de gatos, hortalizas, frutas y carnes de consumo humano en la ciudad de Ibagué. Al Grupo de Investigación en Parasitología Molecular (GEPAMOL) y el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío y al doctor Jorge Enrique Gómez Marín, por las capacitaciones y asesorías brindadas. Finalmente, a el ingeniero geólogo Jorge Andrés Medina Hernández por el apoyo en el diseño de los mapas a través del software ArcGIS.

Contenido

Prólogo	11
Introducción	15
1. Marco teórico y antecedentes	18
1.1. Área de estudio	18
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> (<i>T. gondii</i>)	19
1.2.1. Formas de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
1.2.1.1. Ooquiste	21
1.2.1.2. Esporozoíto	21
1.2.1.3. Taquizoíto	22
1.2.1.4. Bradizoíto	22
1.2.2. Ciclo de vida	22
1.2.2.1. Fase sexual	23
1.2.2.2. Fase asexual	24
1.3. La toxoplasmosis	25
1.3.1. Formas de transmisión	25
1.3.1.1. Toxoplasmosis por transmisión horizontal	26
1.3.1.2. Toxoplasmosis por transmisión vertical	26
1.3.2. Fuentes de transmisión	26
1.3.2.1. Consumo de carnes mal cocidas	26
1.3.2.2. Frutas y hortalizas	27
1.3.2.3. Heces de felinos	28
1.3.2.4. Contaminación del agua	28
1.3.2.5. Contaminación del suelo	29
1.3.2.6. Trasplante de órganos	30
1.3.3. Sintomatología de la toxoplasmosis	30
1.3.3.1. En el feto (toxoplasmosis congénita)	31
1.3.3.2. En personas inmunocompetentes	31
1.3.3.3. En pacientes inmunodeficientes	31
1.4. Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
1.5. Metodologías de detección de <i>T. gondii</i>	33
1.5.1. Métodos tradicionales de detección (no basados en ADN)	33
1.5.1.1. Microscopía	33
1.5.1.2. Bioensayo	34
1.5.1.3. Pruebas serológicas	34
1.5.2. Métodos basados en detección del ADN del parásito	35
1.6. Prevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i>	37

1.7.	Tratamiento de la toxoplasmosis	43
1.7.1.	En adultos	43
1.7.2.	En mujeres embarazadas	43
1.7.2.1.	Placentario	43
1.7.2.2.	Fetal	44
1.7.3.	En toxoplasmosis congénita	44
1.8.	Prevención de la toxoplasmosis	45
2.	Detección de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> (metodología modificada y patronizada en el LIPT)	47
2.1.	PCR anidada	47
2.2.	Visualización de los productos	49
2.3.	Sensibilidad de la PCR anidada (n-PCR)	49
2.4.	Discusión	50
3.	Estudio piloto <i>Toxoplasma gondii</i> en heces de gatos de la ciudad de Ibagué	51
3.1.	Metodología	51
3.1.1.	La muestra	51
3.1.2.	Obtención de ADN a partir de muestras de heces de gato	52
3.1.2.1.	Procesamiento de la muestra	52
3.1.2.2.	Extracción y purificación de ADN a partir de la muestra	52
3.1.3.	Cuantificación de ADN	53
3.1.4.	Detección molecular de <i>T. gondii</i> en heces de gato doméstico	53
3.1.5.	Análisis estadístico	53
3.2.	Resultados	53
3.2.1.	Obtención de muestras de estudio	53
3.2.2.	Muestras de heces de gatos domésticos	54
3.2.3.	Detección molecular de <i>T. gondii</i> en heces de gato doméstico	55
3.2.4.	Visualización producto de amplificación del gen <i>B1</i> para la detección de <i>T. gondii</i> en heces de gato doméstico	56
3.3.	Discusión	57
3.3.1.	Obtención de ADN	57
3.3.2.	Detección molecular	57
3.3.3.	Prevalencia de <i>T. gondii</i> en heces de gatos domésticos	58
3.4.	Conclusiones	59
4.	Detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en frutas y hortalizas comercializadas en la ciudad de Ibagué	61

4.1.	Metodología	61
4.1.1.	Selección de puntos de muestreo	61
4.1.2.	Obtención de la muestra	62
4.1.3.	Concentración y ruptura de ooquistes	63
4.1.4.	Digestión enzimática y extracción de ADN	64
4.1.5.	Detección molecular	64
4.2.	Resultados	64
4.3.	Discusión	66
4.4.	Conclusiones	67
5.	Detección de <i>Toxoplasma gondii</i> en carnes destinadas al consumo humano en Ibagué, Tolima.	69
5.1.	Metodología	69
5.1.1.	Tamaño muestral	69
5.1.2.	Obtención de ADN a partir de muestras de carnes	70
5.1.2.1.	Digestión de la muestra	70
5.1.2.2.	Extracción y purificación de ADN a partir de la muestra digerida	70
5.1.3.	Cuantificación de ADN	71
5.1.4.	Detección de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	71
5.1.5.	Análisis estadístico	71
5.2.	Resultados	71
5.2.1.	Obtención de ADN	71
5.2.2.	Muestras de carnes y prevalencia de <i>T. gondii</i>	72
5.3.	Discusión	78
5.3.1.	Obtención de ADN	78
5.3.2.	Prevalencia en carnes	79
5.3.2.1.	Prevalencia en carnes de res	80
5.3.2.2.	Prevalencia en carnes de pollo	80
5.3.2.3.	Prevalencia en carnes de cerdo	81
5.4.	Conclusiones	82
	Consideraciones finales	83
	Referencias Bibliográficas	84
	Anexos	109

Lista de figuras

Figura 1. Área urbana de Ibagué	19
Figura 2. Organelos de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Figura 3. Formas de <i>T. gondii</i>	21
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	23
Figura 5. Fuentes de transmisión de <i>T. gondii</i> para el humano	30
Figura 6. Visualización del producto de la segunda ronda de PCR en gel de poliacrilamida al 6%. Diluciones de ADN de referencia	50
Figura 7. Ubicación puntos de muestro para heces felinas en el casco urbano de la ciudad de Ibagué - Tolima	53
Figura 8. Diagrama representativo de la presencia de <i>T. gondii</i> en heces de gato doméstico en la ciudad de Ibagué - Tolima	56
Figura 9. Visualización del producto de amplificación de la segunda ronda de PCR-nested para la detección <i>T. gondii</i> en muestras de heces felinas en gel de poliacrilamida al 6%	56
Figura 10. Ubicación de los 13 puntos de muestreo para frutas y hortalizas – casco urbano ciudad de Ibagué	63
Figura 11. Visualización del producto de la segunda ronda de PCR (anidada) para detección general de <i>Toxoplasma gondii</i> en gel de poliacrilamida al 6% de las muestras de verduras y frutas en Ibagué	66
Figura 12. Ubicación de muestras de carnes positivas en la ciudad de Ibagué	75

Lista de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Tabla 2. Número de genotipos detectados por Shwab et al. (2014)	33
Tabla 3. Estudios de detección de <i>Toxoplasma gondii</i> por métodos tradicionales	37
Tabla 4. Estudios basados en detección del ADN del parásito	40
Tabla 5. Cebadores para detección del gen B1 de <i>T. gondii</i>	47
Tabla 6. Mezcla de reacción para la n-PCR del gen B1	48
Tabla 7. Ruptura de ooquistes por choque térmico	52
Tabla 8. Puntos de muestreo coprológico – casco urbano, ciudad de Ibagué	54
Tabla 9. Resultados PCR anidada y características del felino donador	57
Tabla 10. Detección ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en frutas y hortalizas	65
Tabla 11. Cantidad de ADN obtenido evaluando dos temperaturas de digestión de las muestras de carnes con PK	72
Tabla 12. Resultados de detección de muestras de carnes tomadas en otros municipios	72
Tabla 13. Características de las comunas y coordenadas de las muestras de carnes tomadas	73
Tabla 14. Resultados de la detección de muestras de carne	75
Tabla 15. Estimaciones e intervalos de confianza de las muestras evaluadas	78
Tabla 16. Componentes de TBE 5X	113
Tabla 17. Preparación de TBE diluido	113
Tabla 18. Componentes para preparar gel de acrilamida al 6%	114
Tabla 19. Componentes de la acrilamida al 30%	115
Tabla 20. Componentes de las soluciones usadas para la coloración de geles de poliacrilamida al 6%	115

Lista de anexos

Anexo A. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos por Fenol-Cloro formo-Alcohol-Isoamílico (FCAI)	109
Anexo B. Cuantificación por espectrofotometría: NanoDrop	111
Anexo C. Electroforesis en gel de agarosa 1%	112
Anexo D. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%	114

Lista de abreviaciones

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

SAG: (Surface Antigen) Antígeno de superficie
SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
WB: (Western Blotting) Western Blot

Prólogo

La pandemia del covid-19, le recordó a la humanidad que alrededor del 75% de las enfermedades infecciosas y parasitarias son de origen zoonótico, es decir, son transmitidas de los animales al hombre. Una revisión de los agentes infecciosos y parasitarios muestra que aproximadamente 120 especies de virus, 200 especies bacterianas, 120 especies de hongos y 200 especies de parásitos pueden infectar al hombre en diferentes regiones geográficas del planeta, por lo tanto, se podría estimar que de los 640 agentes infecciosos y parasitarios reconocidos que infectan al hombre, 480 proceden de los animales domésticos y silvestres.

Toxoplasma gondii es un parásito que realiza su ciclo biológico sexual y asexual en los felinos domésticos y silvestres, considerados por esta razón, los hospederos definitivos, y el resto de los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre, son los hospederos intermediarios, se pueden infectar y en ellos se realiza el ciclo de reproducción asexual.

T. gondii, probablemente, es el parásito más difundido en la naturaleza y con mayor prevalencia en los humanos, pues cerca de un tercio de la población, es decir, unos 2.700 millones de personas están infectadas en el mundo, con mayores prevalencias entre 60% y 80% en las regiones tropicales. Por lo anterior, la toxoplasmosis es considerada la mayor zoonosis que afecta a los humanos.

Los orígenes de la toxoplasmosis se remontan a los propios orígenes de los homínidos primitivos, la presencia de *T. gondii* hasta ahora se ha verificado en restos humanos de 2000 años de antigüedad en Suráfrica (Rifkin et al., 2020), lo que sugiere que esta zoonosis ya estaba probablemente presente en el Holoceno, hace 12.000 años, cuando los humanos desarrollaron la agricultura y la domesticación de animales. Sin embargo, otros autores mediante estudios genómicos han mostrado que

el *Homo sapiens* en el Pleistoceno tardío, hace menos de 200.000 años, ya era afectado por 25 agentes infecciosos y parasitarios, y que además de bacterias y virus, estaba infectado por nemátodos y cestodos intestinales (Houldcroft & Underdown, 2016). Por lo anterior, no se puede descartar que en el Pleistoceno el *H. sapiens* ya estuviera infectado con *T. gondii* a partir de ooquistes de felinos selváticos o bradizoítos en la carne de hospederos intermediarios. Se espera la confirmación de *T. gondii* y otros agentes infecciosos y parasitarios en el Pleistoceno mediante las metodologías que utilizan la paleogenómica, la paleomicrobiología y paleoparasitología.

La relación parásito-hospedero del *H. sapiens* con *T. gondii* llegó a un equilibrio, de manera que, en la actualidad, la mayoría de los humanos infectados son asintomáticos y solo aparece la enfermedad cuando la persona presenta algún grado de inmunosupresión (bajo algunas excepciones), originando la toxoplasmosis adquirida o cuando el parásito es transmitido por vía placentaria, dando origen a la toxoplasmosis congénita.

La toxoplasmosis en humanos puede transcurrir con síndrome febril, inflamación de los ganglios, compromiso ocular, con lesiones de la retina, que pueden comprometer la visión o producir ceguera. En casos severos, la toxoplasmosis puede producir pericarditis, insuficiencia ventilatoria e insuficiencia ventricular. En Colombia, *Toxoplasma gondii* es la segunda causa más común de ceguera congénita y es el principal agente causal de discapacidad visual en pacientes inmunocompetentes (de la Torre et al., 2013; de la Torre et al., 2018).

La toxoplasmosis, por ser una enfermedad de origen zoonótico, no se puede erradicar, porque el origen primario de la infección siempre estará latente en los felinos y animales silvestres. A partir del surgimiento de vacunas, en el futuro será posible tener un mayor control de la infección en los animales domésticos y en los humanos. Sin embargo, las actividades de control son necesarias para disminuir la prevalencia de la infección humana, entre las cuales se destaca: el debido cuidado de los gatos domésticos para evitar que se infecten y dispersen el parásito a través de sus heces, el apropiado tratamiento de las aguas para consumo

humano y animal, el adecuado manejo de los alimentos, en especial las legumbres, las frutas y las carnes destinadas al consumo humano, para eliminar las formas del parásito presente en estas fuentes de infección.

Actualmente, nuevas enfermedades zoonóticas están emergiendo como consecuencia de la pérdida de biodiversidad a nivel mundial, efecto del cambio climático y la deforestación, de manera que enfermedades virales, bacterianas, micóticas y parasitarias están pasando desde los animales silvestres a los animales domésticos y al hombre. Por lo anterior, se ha planteado un nuevo enfoque denominado “Una sola salud” para estudiar el control y la vigilancia epidemiológica de las enfermedades comunes a los animales y al hombre, en otras palabras, las zoonosis han adquirido una especial importancia en la actualidad.

Por consiguiente, este libro recoge los resultados de varios proyectos de investigación, desarrollados en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT), en la ciudad de Ibagué, sobre la detección molecular de *Toxoplasma gondii* en heces de gatos, como fuente primaria de infección, en legumbres, frutas y carnes para consumo humano, demostrando que las fuentes de infección son ubicuas, siendo necesaria la toma de medidas de control, prevención y educación de las comunidades para evitar la transmisión del parásito en beneficio de la salud pública.

Introducción

La toxoplasmosis es considerada una de las infecciones parasitarias olvidadas dentro de un grupo de cinco enfermedades parasitarias que han sido blanco de la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) para la acción en salud pública. En este grupo, además de la toxoplasmosis, se encuentran la enfermedad de Chagas, la cisticercosis, la toxocariasis y la trichomoniasis (CDC. Parasites - Neglected Parasitic Infections (NPIs), 2016). La toxoplasmosis es causada por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), un parásito protozoario del filo Apicomplexa que infecta a la mayoría de especies de sangre caliente, incluyendo humanos (Almeria & Dubey, 2021; Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2020) y, además, causa grandes pérdidas económicas en el sector pecuario (Ferra et al., 2015).

Los felinos juegan un papel importante en el ciclo de vida y la epidemiología de la toxoplasmosis, ya que son los huéspedes definitivos que expulsan en las heces ooquistes altamente resistentes a factores medioambientales, lo que hace que este parásito presente una amplia distribución geográfica (Dubey et al., 2004; Pérez-Grisales et al., 2021; Simon et al., 2017; Yang et al., 2015). La ingesta de alimentos o agua contaminados con ooquistes esporulados, liberados en las heces de gatos infectados, es la principal fuente de infección para los animales de producción (Almeria & Dubey, 2021; Cruz-Quevedo et al., 2019; Guo et al., 2017; Maharana et al., 2010; Ramos-Valencia & Vásquez-Arteaga, 2017). El humano puede ser infectado por los mismos medios que los animales de producción, sumándose a estos el consumo de carne cruda o mal cocida de animales que contienen quistes tisulares. Es por esto que el manejo de las cajas de arena para gatos sin la adecuada precaución y las cajas de arena en parques para niños que podrían contener heces de gatos y, por tanto, ooquistes de *T. gondii* los cuales pueden ser ingeridos de manera accidental (Cruz-Quevedo et al., 2019; Dubey et al., 2011; Simon et al., 2017; Yekkour et al., 2017; Zulpo et al., 2012).

Se ha demostrado que la infección con *Toxoplasma gondii* es a menudo más alta en las zonas del mundo con altitudes más bajas, que tienen climas cálidos y húmedos, logrando llegar hasta un 95% de algunas poblaciones humanas (CDC, 2018; de Wit et al., 2020; Giraldo-Ospina et al., 2019). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud en 1983 reportó que el 47,71% de la población general había tenido contacto con el parásito, hecho evidenciado mediante la detección de anticuerpos IgG *anti-Toxoplasma*, y fue la región Caribe donde se reportaron los títulos más altos del país. En este mismo estudio, la proporción de individuos positivos presentó aumento con la edad, pasando de 32% en los menores de 10 años a un 65,3% en adultos de 60 años, esto se debe a que la producción de este anticuerpo continúa durante toda la vida, una vez adquirida la infección, y a mayor edad mayor posibilidad de infección por la naturaleza tan diversa de las fuentes de contagio de este parásito (Juliao-Ruiz et al., 1983).

La toxoplasmosis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en individuos inmunodeprimidos y puede causar graves problemas de salud en los adultos sanos (Barrios et al., 2012; Cortés & Aguirre, 2018; Enriquez-Marulanda et al., 2017; Luft et al., 1993; Montoya & Liesenfeld, 2004). Pese que en el humano la infección crónica sintomática solo se desarrolla en un pequeño grupo de personas, la mayoría presentan un estado latente asintomático que aparenta no tener riesgo directo a la salud física de su hospedero; sin embargo, se ha asociado *T. gondii* a tasas de aumento de trastornos de comportamiento, incluyendo el homicidio, suicidio y otras violencias autodirigidas (Lester, 2012; Pedersen et al., 2012), además, ha sido sindicado del aumento en la incidencia de la esquizofrenia y otras enfermedades neuropsiquiátricas (Fabiani et al., 2013).

También se ha determinado que existe divergencia geográfica en la distribución de las cepas de *Toxoplasma* (Morisset et al., 2008) y que la toxoplasmosis no es transmitida de persona a persona, excepto en casos de trasmisión de la madre al niño (congénita o transmisión vertical) y transfusión de sangre o trasplante de órgano. Los humanos se pueden infectar principalmente por tres rutas de transmisión: **I.** Agua o comida contaminada, **II.** Animal – humano (zoonótica) y **III.** Madre a niño (congénitos), aparte de estas se pueden presentar casos raros como accidentes en pruebas experimentales (Almeria & Dubey, 2021; CDC, 2018).

En Colombia se han desarrollado algunos trabajos como veremos más adelante, que permiten el entendimiento de este parásito en convivencia con el ser humano y su importancia en la salud pública. En Ibagué (Tolima), se han desarrollado tres estudios en el Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima (LIPT), estos fueron la base fundamental para la construcción del presente documento, en el que se busca no solo concientizar a la comunidad, sino ofrecer nueva información sobre *T. gondii* y sus diversas vías de transmisión.

Capítulo 1

Marco teórico y antecedentes

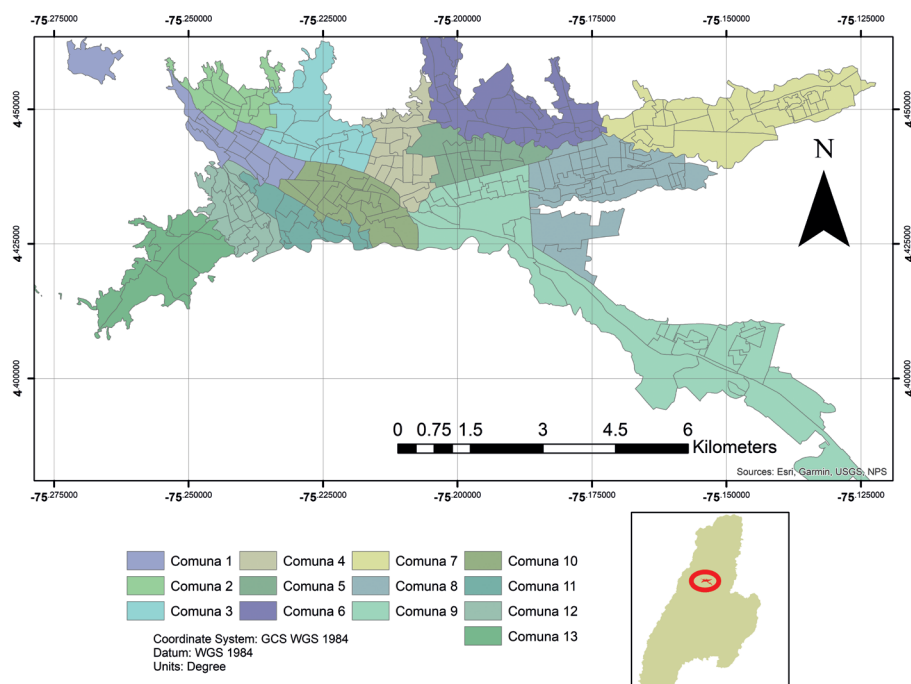
1.1. Área de estudio

El departamento del Tolima se encuentra en el corazón de Colombia y es paso obligado para múltiples viajeros, cuya capital es la ciudad de Ibagué, lugar donde se desarrolló el presente estudio, más precisamente en su casco urbano. Dicha ciudad se encuentra a 1.285 metros sobre el nivel del mar con una temperatura media de 21°C.

El área municipal de Ibagué cubre 1.498 Km², los cuales se distribuyen en una zona montañosa que se extiende por la cordillera Central y una amplia zona plana conocida como la meseta de Ibagué, limitada al norte con Anzoátegui y Alvarado, al oriente con Piedras y Coello, al sur con San Luis y Rovira, al occidente con Cajamarca y los departamentos de Quindío y Risaralda.

El área urbana está dividida en 13 comunas (**Figura 1**) y 445 barrios (Alcaldía Municipal de Ibagué, 2020). El 2,41% pertenece al área urbana y 97,59% al área rural, el área rural está integrada por 19 centros poblados en 17 corregimientos y 140 veredas (Alcaldía Municipal de Ibagué, 2014, 2016, 2018).

Figura 1. Área urbana de Ibagué.

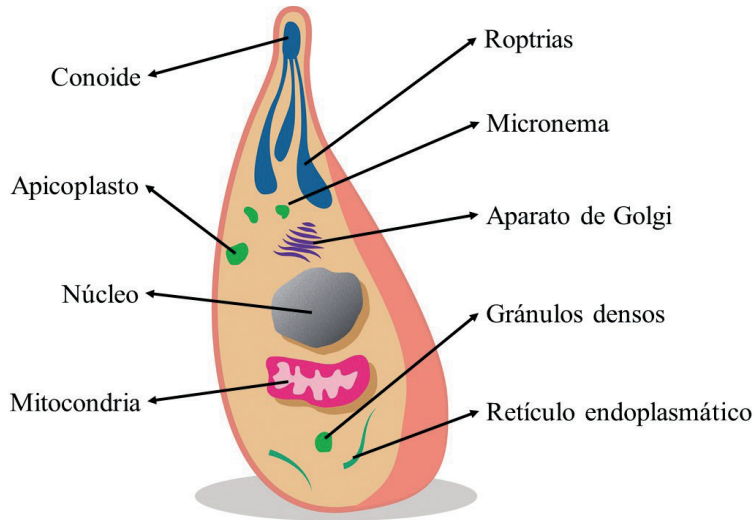


Fuente: Los autores, basados en Alcaldía Municipal de Ibagué (2020).

1.2. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)

Han pasado poco más de 100 años desde el descubrimiento del parásito *T. gondii* en 1908 por Nicolle y Manceaux, que lo encontraron cuando trabajaban en el norte de África, y por Splendore en Brasil (Tenter et al., 2000; Weiss & Dubey, 2009). *T. gondii* es un protozooario intracelular obligado de distribución mundial, que pertenece al filo Apicomplexa (Ajzenberg et al., 2005). El nombre del género deriva del griego “toxón”, que significa “arco”, refiriéndose a la forma de medialuna del organismo (**Figura 2**) y la denominación de especie se originó del nombre del roedor del norte de África, *Ctenodactylus gundi*, a partir del cual se aisló este parásito (**Tabla 1**) (Black & Boothroyd, 2000). Su identificación fue seguida rápidamente por su reconocimiento como patógeno humano (Weiss & Dubey, 2009).

Figura 2. *Organelos de Toxoplasma gondii.*



** Organelos más relevantes del estado de taquizoíto.*

Fuente: Los autores, basados en Blader, Coleman, Chen, Gubbels & Hill (2016).

Tabla 1. *Taxonomía de Toxoplasma gondii.*

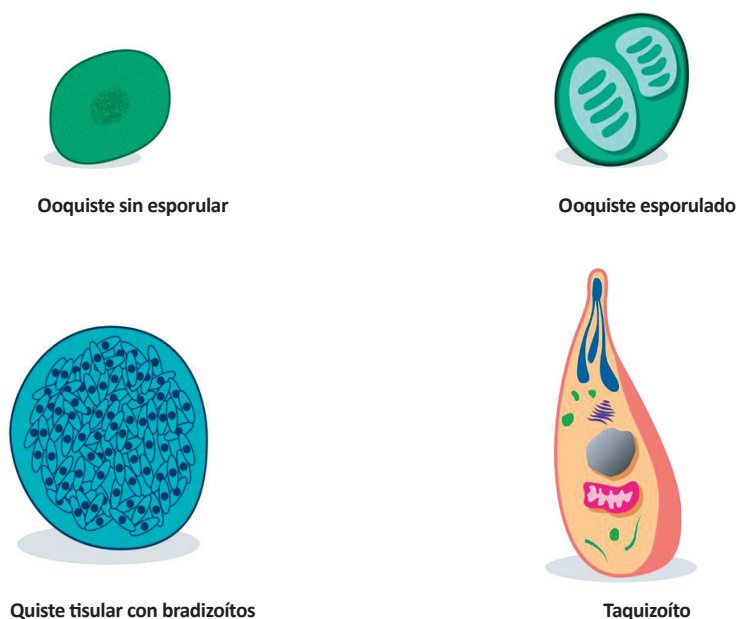
Dominio	Eucariota
Reino	Protista
Super grupo	SAR o Harosa
Super filo	Alveolata
Filo	Apicomplexa
Clase	Sporozoasida
Subclase	Coccidiasina
Orden	Eimeriorina
Familia	Toxoplasmatidae
Género	Toxoplasma
Especie	<i>Toxoplasma gondii</i> (Nicolle & Manceaux, 1908)

Fuente: Los autores, basados en Adl & Needs Authors (2013) y Bahia-Olivera, Gómez-Marín & Shapiro (2017).

1.2.1. Formas de *Toxoplasma gondii*

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

Figura 3. Formas de *T. gondii*.



Fuente: Los autores, basados en Robert-Gangneux & Dardé (2012).

1.2.1.1. Ooquiste. Se encuentran en las heces de los gatos, tiene forma esferoide, midiendo de 11-15 μm por 9-11 μm (Díaz et al., 2010). Durante la infección aguda, varios millones de ooquistes se eliminan en las heces de los gatos durante 7-21 días después de una infección primaria de los animales. La gran resistencia de la pared del ooquiste permite al parásito sobrevivir más de un año en el suelo cuando las condiciones de humedad y temperatura (4-37°C) son favorables (Maleki et al., 2021; Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003).

1.2.1.2. Esporozoíto. La esporulación de los ooquistes se produce en el medioambiente durante los próximos 1 y 5 días o hasta 21, dependiendo de la aireación y la temperatura, momento en el cual se vuelve

infeccioso; cada ooquiste lleva en su interior dos esporoquistes y estos, a su vez, cuentan con cuatro esporozoítos (Dubey & Lappin, 1998; Grandía et al., 2013). Los esporozoítos miden 2 por 6-8 μm con un núcleo subterminal y presentan abundantes micronemas, roptrias, gránulos de amilopectina y lípidos (Grandía et al., 2013; Jones & Dubey, 2010).

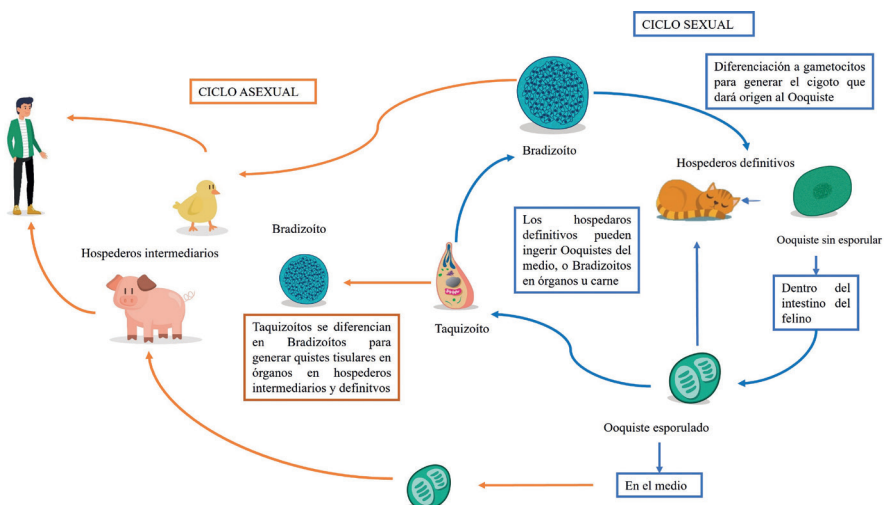
1.2.1.3. Taquizoíto. Presentan entre 2-4 μm de ancho y 4-8 μm de largo, se trata de la forma diseminativa del parásito capaz de invadir cualquier tipo de célula de vertebrados, se multiplican por repetidas endodigenias dentro de la célula, que es un tipo de división especializada en la cual se da lugar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

1.2.1.4. Bradizoíto. Son morfológicamente muy similares a los taquizoítos, pero de replicación más lenta, formas que aparecen de 7 a 10 días después de la infección, se caracterizan por tener forma de coma y están rodeados de una verdadera membrana formando un quiste, que parasitan diferentes tejidos del organismo, siendo el estado letárgico o inactivo en huéspedes inmunocompetentes, estas formas de bradizoítos latentes están rodeadas por una pared de quistes rica en carbohidratos dentro de la vacuola parasitófora (Díaz et al., 2010; Weiss & Dubey, 2009). Los quistes pequeños (jóvenes) miden 5 μm de diámetro y contienen solo dos bradizoítos, y los quistes grandes (viejos) contienen cientos de bradizoítos en su interior (Díaz et al., 2010).

1.2.2. Ciclo de vida

T. gondii posee un ciclo de vida típico de parásitos coccidios que viven en los tejidos, con fase sexual y asexual (**Figura 4**).

Figura 4. Ciclo de vida de *T. gondii*.



* Se muestran la biología, la infección y la replicación de las tres etapas infecciosas de los parásitos en sus respectivos huéspedes.

Fuente: Los autores, basados en Robert-Gangneux & Dardé (2012).

T. gondii se caracteriza por ser un organismo heteroxeno, es decir, que su ciclo biológico se puede desarrollar en dos o más huéspedes, ampliando su oportunidad de infección, lo que confiere su capacidad de estar en diversos lugares del mundo, *T. gondii* presenta dos tipos de reproducción; sexual en su huésped definitivo y asexual en sus huéspedes secundarios (Botero & Restrepo, 2012). Se debe agregar que su ciclo biológico comprende tres fases: la enteroepitelial (en huéspedes definitivos), la extraintestinal (en huéspedes intermediarios y definitivos) y la esporogónica, que ocurre en el medioambiente (Webster, 2010).

1.2.2.1. Fase sexual. Se produce exclusivamente en el huésped definitivo, en este caso los miembros de la familia Felidae, se han reportado cerca de 19 especies entre los géneros *Felis*, *Oncifelis*, *Lynx*, *Acinonyx* y *Panthera* (Dubey, 2009a; Igreja et al., 2021; Su et al., 2003); sin embargo, *T. gondii* se encuentra ampliamente distribuido en *Felis catus Linnaeus*, 1758 (gato común). La fase sexual ocurre en el intestino de este, dando como resultado la producción de oocistos que posteriormente serán excretados al medio (Awobode et al., 2020; Grandía et al., 2013).

Los felinos pueden llegar a ingerir de cualquier forma del parásito y, así, dentro de su intestino, se diferencian en microgametos masculinos y macrogametos femeninos, cuya fecundación da origen a la formación de un ooquiste diploide y no esporulado, que se elimina con las deyecciones después de la formación de una capa protectora (Dubey et al., 2004; Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003).

Cuando un animal susceptible a la infección ingiere ooquistes esporulados, los esporozoítos penetran en el revestimiento intestinal, se vuelven taquizoítos y se establece una infección. Se ha demostrado que *F. catus* puede actuar como hospedero intermediario, es decir, *T. gondii* puede desarrollar tanto su ciclo sexual como el asexual en el gato común (Maharana et al., 2010; Montoya & Liesenfeld, 2004; Zamora-Vélez et al., 2020).

1.2.2.2. Fase asexual. Se lleva a cabo en hospederos intermediarios donde se producen invasiones extraintestinales; consiste en dos etapas distintas de crecimiento, dependiendo de si la infección es en la fase aguda o crónica. La etapa taquizoíto implica el rápido crecimiento de forma del parásito que se encuentra en la fase aguda de la toxoplasmosis, en esta fase se desarrolla un ciclo lítico que se diferencia en cinco pasos: unión, invasión, formación de vacuolas, replicación y salida (Blader et al., 2016); entran en todas las células nucleadas por penetración activa y forman una vacuola citoplásmica, después de la replicación repetida con un tiempo de generación de 6 a 8 h (in vitro) salen de la célula a infectar las células vecinas; generalmente, después de 64 a 128 parásitos acumulados, las células del huésped se rompen y los taquizoítos se diseminan a través del torrente sanguíneo e infectan muchos tejidos, incluidos el SNC, los ojos, el músculo esquelético y cardíaco, y la placenta (Montoya & Liesenfeld, 2004; Radke & White, 1998; Smith, 1995).

En el animal infectado, los taquizoítos se transforman en bradizoítos bajo la presión de la respuesta inmune, formando quistes tisulares; los quistes tisulares contienen cientos y miles de bradizoítos y se forman dentro de las células del huésped, se encuentran predominantemente en el sistema nervioso central y el tejido muscular, donde pueden residir durante toda la vida del anfitrión. Los bradizoítos

pueden liberarse a partir de quistes, transformarse nuevamente en taquizoítos y provocar el recrudecimiento de la infección en pacientes inmunocomprometidos (Black & Boothroyd, 2000; Kim, 2015; Weiss & Dubey, 2009).

La reproducción asexual se produce en una variedad de huéspedes intermediarios y, por esto, es considerado el patógeno zoonótico más extendido en el mundo, ya que puede infectar prácticamente a todas las especies de animales de sangre caliente, incluyendo animales salvajes, animales de la industria agropecuaria, mamíferos marinos y el humano (Almeria & Dubey, 2021; Black & Boothroyd, 2000; Camossi et al., 2011; Dubey, 2009b; Ferra et al., 2015; Maharana et al., 2010; Weiss & Dubey, 2009; Zrelli et al., 2021). Es considerado como uno de los patógenos eucariotas más exitosos en cuanto al número de especies que sirven de huésped y el porcentaje de animales que infecta alrededor del mundo (Su et al., 2010).

1.3. La toxoplasmosis

Es una zoonosis ampliamente distribuida que transcurre con síntomas clínicos leves, no específicos, en la mayoría de los pacientes humanos y animales (Restrepo-Isaza, 2007). Se ha dicho que es responsable de la pérdida de la visión en al menos un 1% en el mundo y en Suramérica hasta un 10% de las personas infectadas (Gómez-Marín et al., 2018), con alta morbilidad de fetos y pacientes inmunosuprimidos; además de lo anterior, ha ocasionado graves pérdidas económicas y productivas en el sector agropecuario, debido a que puede ocasionar aborto espontáneo, la reanudación o la retención de la placenta, el nacimiento inanimado y el nacimiento de jóvenes débiles y demacrados en ovejas, cabras y cerdos (Camossi et al., 2011; Ferra et al., 2015; Maharana et al., 2010; Meireles et al., 2004; Zrelli et al., 2021).

1.3.1. Formas de transmisión

Dependiendo de la forma en que se transmite esta puede ser horizontal o vertical.

1.3.1.1. Toxoplasmosis por transmisión horizontal. Clásicamente, el consumo de carne poco cocida se ha atribuido como el principal factor de riesgo para la adquisición de toxoplasmosis de manera horizontal, debido a que en las carnes *T. gondii* se presenta en quistes tisulares que contienen bradizoítos resistentes en cierto grado a enzimas digestivas como tripsinas y pepsinas (Almeria & Dubey, 2021; López et al., 2005; Tenter et al., 2000), además de lo anterior, se ha detectado la presencia de *T. gondii* en leche de animales como ovejas, cabras y vacas (Camossi et al., 2011; Jones & Dubey, 2012; Tenter et al., 2000). Por otra parte, los ooquistes eliminados en las heces de gatos contaminan el medioambiente y estos tienen una gran probabilidad de ser ingeridos junto con el agua o los alimentos crudos, lo que representa una fuente de infección para los animales de sangre caliente (Awobode et al., 2020; Maleki et al., 2021; Silva et al., 2014; Slifko et al., 2000; Weiss & Dubey, 2009; Wit et al., 2020).

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

1.3.2. Fuentes de transmisión

La toxoplasmosis transmitida por alimentos (Almeria & Dubey, 2021; Luna et al., 2019), se considera una enfermedad parasitaria grave, esta puede causar hasta el 20% de la carga de morbilidad de transmisión alimentaria y afecta a más de 1 millón de personas cada año (OMS, 2012). Veamos las diversas fuentes de transmisión de *T. gondii* (**Figura 5**).

1.3.2.1. Consumo de carnes mal cocidas. Cualquier carne de animales de sangre caliente se ha considerado una fuente importante de infección por *T. gondii*, puesto que tradicionalmente el consumo de carne ha acompañado la formación de las civilizaciones en el mundo, un ejemplo de ello, es que, en países occidentales, el riesgo asociado con el tipo de carne (cordero, cerdo y res, etc.) varía entre los países según los hábitos alimenticios (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). En

un estudio multicéntrico en Europa, se estimó que el consumo de carne era responsable del 30 al 63% de los casos de infección, mientras que el contacto con el suelo representaba del 6 al 17% de los casos (Cook, 2000). Es importante resaltar que los quistes de tejido permanecen infecciosos en canales refrigeradas (1 °C a 6 °C) o carne picada por hasta tres semanas (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

El consumo de carne cruda o mal cocida ha sido un factor de riesgo relevante (Almeria & Dubey, 2021; López et al., 2005). En Colombia un estudio realizado en la región del Eje cafetero demostró que el 53 % de las muestras obtenidas fueron positivas para *T. gondii*, con predominio de la carne de cerdo en Manizales (70 %), de la carne de bovinos (80 %) en Armenia y de la carne de pollo (80 %) en Pereira (Lora-Suárez et al., 2007). El factor de riesgo se ha asociado a la forma en que se críen los animales para consumo y el contacto con felinos y redores (Ortega-Pacheco et al., 2011). En consecuencia, la ausencia de adecuadas condiciones de higiene en el sitio de sacrificio, de mantenimiento y crianza de los animales de consumo humano genera la presencia del parásito en las carnes (Lora-Suárez et al., 2007). Otros alimentos, incluyendo la leche, pueden ser una posible fuente de transmisión al humano, debido a que se han vinculado brotes de toxoplasmosis al consumo de leche cruda, como se ha evidenciado en California (Sacks, 1982).

1.3.2.2. Frutas y hortalizas. También se consideran una fuente de infección para contraer toxoplasmosis, considerando que estas pueden contaminarse con *T. gondii* en diferentes puntos de su producción y ser fuente de transmisión al ser consumidas, más aún no se conoce la eficacia de la eliminación de ooquistes mediante el lavado (Kniel et al., 2002). Un ejemplo de ello es que personas con dieta vegetariana llegan a contraer toxoplasmosis, infiriendo que la contaminación de aguas u hortalizas por ooquistes, o la manipulación de tierra o plantas que estén en contacto con excrementos de gato, pueden acarrear la contaminación de los alimentos crudos (Marques et al., 2020; Petersen et al., 2010; Rivera & García, 2017). También experimentalmente, la textura de las frutas o verduras se involucra en la fijación de los ooquistes de *T. gondii*, pueden adherirse a las bayas, especialmente a las frambuesas (Kniel et al., 2002).

1.3.2.3. Heces de felinos. Sin lugar a duda los felinos juegan un papel importante dentro de todo el ciclo de transmisión de la *T. gondii*; puesto que los gatos infectados constituyen una de las fuentes de infección más cercana a los seres humanos, debido a que los gatos domésticos coexisten en una estrecha asociación con la mayoría de los asentamientos humanos en todo el mundo a través del tiempo (Liberg et al., 2000), y tanto los gatos domésticos como silvestres contribuyen a la carga ambiental de estos organismos, depositando sus ooquistes en diversos lugares (de Wit et al., 2020; Dubey, 2009a). Los felinos pueden llegar a eliminar millones de ooquistes en sus heces, provocando que sea el principal eslabón de la cadena epidemiológica (Maleki et al., 2021; Pappas et al., 2009). Se ha demostrado también, que hay un riesgo de seroconversión elevado en los gatos, cuando hay predominio de gatos jóvenes; de igual forma, se han visto tasas serológicas más altas en los gatos salvajes y en aquellos que vagan libremente, que aquellos que conviven como mascotas (Jones & Dubey, 2012; Pérez et al., 2011; Silva et al., 2014; Weiss & Dubey, 2009). Acorde con lo anterior, varias investigaciones concluyen que evitar que los gatos deambulen libremente podría prevenir las infecciones por *T. gondii* al reducir la contaminación ambiental con este patógeno zoonótico (de Wit et al., 2020).

Existen diversos métodos para detectar la presencia de *T. gondii* en heces de felinos, pero cada una tiene diversos niveles de sensibilidad, como lo demuestra un estudio realizado en 2020, donde, la microscopía detectó 7/200 (3,5%) ooquistes que se consideraron similares a *T. gondii*, mientras por técnicas moleculares para detectar los genes B1 y REP se encontró 17/200 (8,5%) muestras positivas para *T. gondii*, además, todas las muestras que fueron microscópicamente positivas para ooquistes similares a *T. gondii* también mostraron ser positivas por los genes B1 y REP (Nasiru-Wana et al., 2020). Lo anterior confirma la importancia de utilizar técnicas moleculares en el diagnóstico del parásito (Igreja et al., 2021).

1.3.2.4. Contaminación del agua. La principal fuente de infección para los animales de producción es a través de la ingesta de alimentos o agua contaminados con ooquistes esporulados, liberados en las heces de gatos infectados (Pérez et al., 2011). Los ooquistes pueden permanecer viables durante largos períodos de tiempo en el agua y

pueden resistir la congelación y las temperaturas moderadamente altas del agua; por otro lado, los quistes no son eliminados por los tratamientos químicos y físicos que se aplican actualmente en las plantas de potabilización (Bahia-Oliveira et al., 2003; Bahia-Oliveira et al., 2017).

En un estudio realizado en Polonia, utilizando métodos moleculares, Adamska en 2018 encontró que de 36 cuerpos de agua superficiales naturales, 7 de estos presentaron *T. gondii* (19,4%). A su vez, Sroka et al. (2006) por medio de exámenes microscópicos y de PCR de 114 muestras de agua rurales, encontraron *T. gondii* en 15 (13,2%) y 31 (27,2%) de las muestras respectivamente.

En Colombia (Sincelejo, Sucre), un estudio de aguas reporta una prevalencia del 58,6% de *T. gondii*, en las muestras evaluadas (Campo-Portacio et al., 2021). Lo cual soporta lo reportado previamente por López et al. (2005), donde se asoció un mayor riesgo de adquirir *T. gondii* al consumir agua de grifo.

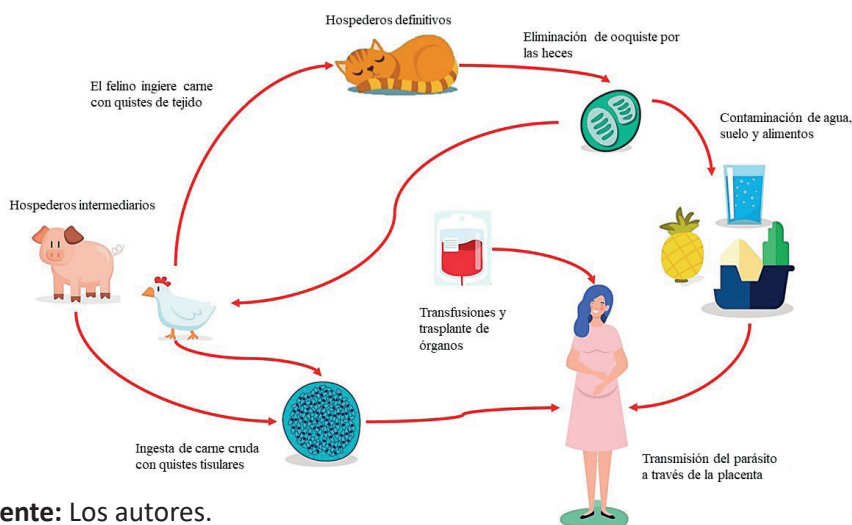
Además de lo anterior, se han encontrado reportes de animales Marínos infectados por *T. gondii*, mostrando la persistencia de este parásito en múltiples espacios y a largo plazo, incluso en diversos alimentos como mariscos (Shapiro et al., 2019).

1.3.2.5. Contaminación del suelo. Entre otros factores que se han postulado como riesgo de infección de *T. gondii* está el suelo, pues en bajos niveles socioeconómicos, las malas condiciones sanitarias, contacto con suelos y ocupaciones como la jardinería se han relacionado con la infección con *T. gondii*; hay estudios como los realizados en Europa de carácter multicéntrico, donde se halló que del 6 al 17% de las infecciones primarias en humanos se atribuyen a este factor de riesgo (Cook, 2000). Un estudio de EE. UU. mostró que la detección de anticuerpos contra *T. gondii* fue dos veces mayor en una población con una exposición común al suelo contaminado (Patitucci et al., 2006); otro realizado en Polonia arrojó que de 101 muestras de suelo de diferentes sitios se halló ADN de *T. gondii* en 18 muestras (17,8%) (Lass et al., 2009).

Se debe agregar también que, el riesgo de adquirir la infección después del contacto o ingestión de suelo es particularmente alto para infantes, como es el caso de un estudio realizado en Brasil, donde se aislaron ooquistes en hasta el 32% de los patios escolares (Santos et al., 2010).

1.3.2.6. Trasplante de órganos. Los taquizoítos pueden invadir gran parte de células nucleadas y generar quistes que se pueden encontrar en prácticamente cualquier órgano, por lo tanto, el trasplante de órganos sólidos (SOT) llega a causar la transmisión de toxoplasmosis a través de órganos que contienen quistes desde un donante que adquirió la infección en el pasado y ciertos órganos tienen más probabilidades de albergar quistes que otros (Gómez, 2004). También se han reportado casos de toxoplasmosis transmitida por transfusiones de sangre o leucocitos y por accidentes del personal que labora en los laboratorios (Montoya & Liesenfeld, 2004). También se ha demostrado la presencia de *T. gondii* hasta en un 19,66% de donantes positivos para el anticuerpo IgG de este protozoo (Stephen et al., 2017).

Figura 5. Fuentes de transmisión de *T. gondii* para el humano.



Fuente: Los autores.

1.3.3. Sintomatología de la toxoplasmosis

La infección transcurre en la mayoría de los casos en forma asintomática, solo entre 10 y 20 % de los casos son sintomáticos durante

una infección, sus principales síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, mialgia, cuello rígido, dolor en los ojos, dolor de garganta, linfadenitis, coriorretinitis y raramente miocarditis o miositis (Dubey, 2009a; Hill & Dubey, 2002; Montoya & Liesenfeld, 2004; Restrepo-Isaza, 2007). Sin embargo, diferentes pacientes presentan diferentes síntomas y afectaciones, como mostraremos a continuación:

1.3.3.1. En el feto (toxoplasmosis congénita). Las lesiones ocasionadas por la enfermedad al feto varían dependiendo del momento en el cual se da la infección, pudiendo ir desde bajo coeficiente intelectual, retinoroiditis, hidrocefalia, calcificación intracerebral, aspecto de niño prematuro, hepatoesplenomegalia, ictericia, neumonitis, miocarditis y otros; hasta aborto espontáneo y muerte del neonato. Una infección temprana durante el embarazo implica el desarrollo de daños más severos al feto (Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016b; Tenter et al., 2000; Wang et al., 2011).

1.3.3.2. En personas inmunocompetentes. La inmunidad controla la infección inicial y el parásito permanece en las células formando los quistes tisulares y allí permanecen indefinidamente, sin embargo, hay reportes de toxoplasmosis en pacientes inmunocompetentes como el caso de una mujer de 59 años, la cual presentaba neumonía no especificada y, bajo un estudio de mayor profundidad, se encontró que presentaba quistes de *T. gondii* en sus pulmones (Shen et al., 2015) o el caso de un joven de 15 años con síndrome nefrótico (Barrios et al., 2012). Para Colombia se ha reportado el caso de una mujer en el departamento del Chocó, de 72 años e inmunocompetente, que presentó una toxoplasmosis aguda diseminada fatal (Cortés & Aguirre, 2018). Además de esto, *T. gondii* se ha asociado a el aumento en tasas de trastornos de comportamiento humano como: aumento en la incidencia del alzhéimer, la esquizofrenia y otras enfermedades neuropsiquiátricas (Fabiani et al., 2013; Torres et al., 2018), el homicidio, suicidio y otras violencias autodirigidas (Lester, 2012; Pedersen et al., 2012).

1.3.3.3. En pacientes inmunodeficientes. En esta categoría se incluyen personas con SIDA, pacientes con trasplante de órganos, inmunodeficiencias primarias, enfermedades malignas de tipo hematológico, especialmente enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, pacientes que reciben terapia inmunosupresora, corticosteroides o drogas

citotóxicas. Se ha encontrado que *T. gondii* afecta principalmente los ojos, el corazón, el hígado, los ganglios linfáticos, los pulmones y otros órganos, pero la complicación más frecuente y severa es la encefalitis (Restrepo-Isaza, 2007; Shen et al., 2015). Una situación epidemiológica importante es que cerca del 20% de los pacientes que presentan toxoplasmosis ocular pueden quedar ciegos (Kijlstra & Jongert, 2009). Así mismo, se debe agregar que es la segunda causa más común de ceguera congénita (de la Torre et al., 2013) y es el principal agente causal de uveítis posterior y retinocoroiditis, afecta de igual forma a hombres y mujeres, además, en el mundo es la mayor causa de coriorretinitis (de la Torre et al., 2018).

1.4. Genotipos de *Toxoplasma gondii*

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

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

Shwab et al. (2014) reportan 189 genotipos diferentes alrededor del mundo, de los cuales solo unos pocos genotipos dominan en el hemisferio norte, mientras que cientos de genotipos coexisten y unos pocos tienen una frecuencia relativamente más alta en el hemisferio sur (**Tabla 2**).

Tabla 2. Número de genotipos detectados por Shwab et al. (2014).

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

Fuente: Adaptado de Shwab et al. (2014).

Shwab et al. (2014) mencionan que África comparte 5 genotipos con Asia, 5 con Europa, 4 con Norteamérica y 5 con centro/sur de América; Asia comparte 5 genotipos con Europa, 6 con Norteamérica y 8 con centro/sur de América; Europa comparte 6 genotipos con Norteamérica y 6 con centro/sur de América; y Norteamérica comparte 17 genotipos con centro/sur de América.

1.5. Metodologías de detección de *T. gondii*

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

1.5.1. Métodos tradicionales de detección (no basados en ADN)

Tres metodologías principales sobresalen en la literatura que no usan el ADN del parásito para determinar su presencia, como son: la detección microscópica, el bioensayo y las diferentes pruebas serológicas.

1.5.1.1. Microscopía. Esta técnica se trata de la visualización de muestra coprológica o de tejido al microscopio. Si la muestra es de excretas de gato pueden encontrarse ooquistes; si se trata de tejido infectado puede presentar bradizoítos o taquizoítos, esta se vale de tinciones con Hematoxilina y Eosina (HE), ácido peryódico de Schiff (PAS) y azul de Alcán (AB) que permiten un mejor contraste y, por tanto, mejor detección (Black & Boothroyd, 2000; da Silva et al., 2010); en muestras

de Líquidos Cefalorraquídeo (LCR) o amniótico se pueden observar taquizoítos (Martín-Hernández & García-Izquierdo, 2003); las muestras de agua y/o ambientales (materas, cajas de arena o suelos) también pueden ser examinadas por este medio y presentar ooquistes (Lilly & Wortham, 2013).

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

1.5.1.2. Bioensayo. Esta metodología es más sensible que la microscopía y determina la viabilidad de los ooquistes o quistes tisulares presentes en las muestras (Dubey et al., 2013; Hill & Dubey, 2002); requiere animales de prueba, usualmente gatos o ratones vivos, los cuales son alimentados con quistes aislados o tejido sospechoso y se espera a que *T. gondii* se multiplique en su interior (Morisset et al., 2008); sin embargo, esto representa un riesgo biológico, debido a la multiplicación de las fuentes de infección y posible fuga de las mismas (Salant et al., 2010).

Los ensayos en ratones han establecido que los diferentes genotipos de *T. gondii* presentan variación en su virulencia y letalidad (Sibley et al., 2002). Así, ratones que mueren después de unos días de ser alimentados con la muestra problema puede que fallezcan por toxoplasmosis, pero debido a la variación en la virulencia es necesario examinar los cuerpos y/o sacrificar y examinar tejidos del cerebro de los ratones por medio de microscopía u otra técnica como la determinación de anticuerpos específicos contra *T. gondii*. A los gatos que se ha dado tejido infectado se examinan las heces por microscopía.

1.5.1.3. Pruebas serológicas. La medición de anticuerpos en suero, mediante el uso de varias pruebas serológicas o inmunológicas, han sido comúnmente usadas para la determinación de exposición a *T. gondii* (Salant et al., 2010). Se conoce que dependiendo del tipo de anticuerpo detectado, se puede establecer o estimar la fase de infección en la cual se encuentra el individuo; debido a que los títulos de IgM surgen

tempranamente después de la infección y decrecen rápidamente, se utiliza para la detección de la enfermedad en su estado agudo, mientras que los títulos de IgG permanecen bajos durante las primeras semanas y, posteriormente, se incrementan significativamente, así: el detectar –IgM e +IgG es señal de haber estado en contacto con *T. gondii* o presentarse una reinfección, +IgM e –IgG o +IgM e +IgG es señal de que *T. gondii* se encuentra en la fase aguda, los resultados de –IgM e –IgG se presumen como si no existiera factor de riesgo, sin embargo –IgM e –IgG también puede presentarse en una fase activa de la parasitosis, arrojando falsos negativos (Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016b).

Existen otros dos tipos de anticuerpos que han sido usados para detectar la toxoplasmosis en su fase aguda, o fase inicial: los anticuerpos IgA se pueden detectar en el suero de adultos con infección aguda y niños infectados congénitamente utilizando métodos de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o ensayo de inmunoabsorción por aglutinación (ISAGA). Los anticuerpos IgE son detectables por ELISA en sueros de adultos con infección aguda, los lactantes con infección congénita, y los niños con toxoplasmosis ocular congénita. El periodo de seropositividad de IgE es menor que con los anticuerpos IgM o IgA y, por lo tanto, parece ser útil como un método complementario para la identificación de infecciones adquiridas recientemente.

En la actualidad existen una gran variedad de pruebas serológicas como: test de Sabin-Fledman (DT), reacción de aglutinación directa (AG), prueba diferencial de aglutinación (AC/HS), test de aglutinación modificada (MAT), test de aglutinación de látex (LAT), prueba de hematoaglutinación indirecta (IHA), test de inmunofluorescencia indirecta (IFA o IFAT), ELISA, ensayo fluorescente ligado a enzimas (ELFA), ISAGA, prueba inmunocromatográfica (IC), ensayo de inmunoaglutinación piezoeléctrica (PIA) y Western Blot (WB) (Blanco et al., 2011; Boughattas et al., 2014; Cárdenas-Pérez et al., 2006; Ferra et al., 2015; Hashemi-Fesharki, 1996; Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016b; Meireles et al., 2004).

1.5.2. Métodos basados en detección del ADN del parásito

Los métodos convencionales no son engañosos usualmente, sin embargo, son limitados en casos de pacientes inmunocomprometidos o

prenatales. La amplificación por PCR utiliza para detectar *T. gondii* su propio ADN, y dicha detección puede hacerse a partir de fluidos y tejidos corporales del individuo a examinar o muestras ambientales. Se ha utilizado con éxito para diagnosticar toxoplasmosis congénita, ocular, cerebral y diseminada.

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

Burg, Grover, Pouletty & Boothroyd (1989) propusieron el gen B1 para la detección directa y sensible de *T. gondii* por medio de una PCR anidada (n-PCR), con fines de diagnóstico en humanos; en su artículo mencionan que esta secuencia se encuentra repetida en el genoma del parásito entre 25 y 50 veces, siendo 35 veces el número más probable y aceptado por diferentes autores. Burg et al. (1989) también evaluaron la especificidad de los cebadores usados y encontraron que *Sarcocystis*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Absidia spp.* no amplificaban con estos cebadores.

Los cebadores propuestos por Burg et al. (1989) eran de más de 20pb, y a través del tiempo se han modificado, Jones et al. (2000) en su estudio emplea como base los cebadores de Burg et al. (1989). Ponce & Gómez-Marín (2003) realizaron la estandarización y validación para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por VIH, usando los cebadores empleados en el estudio de Jones et al. (2000), en esta ocasión el cebador Toxo N2 fue rectificado y las condiciones de amplificación; esta prueba ha sido usada para evaluar la presencia de *T. gondii* en agua, carnes para consumo y en humanos con excelentes resultados (Álvarez et al., 2015; Campo-Portacio et al., 2014; Franco-Hernandez et al., 2015; Triviño-Valencia et al., 2016).

Estudios realizados por Cortés-Cortés, Hernández-Castro, Mantilla, Medina & Duque (2014), mediante la técnica de PCR para la detección del gen B1 de *T. gondii*, determinaron la especificidad de los oligonucleótidos propuestos por Ponce & Gómez-Marín (2003), esto a través del ensayo con ADN de otros microorganismos como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania braziliensis*. Al revelar el producto de PCR de estos organismos con los oligonucleótidos para el gen B1, bajo las mismas condiciones de PCR, no se observó producto de amplificación.

1.6. Prevalencia de *Toxoplasma gondii*

Cerca del 30% de la población humana está infectada de forma crónica por este parásito (Schlüter et al., 2014). Dado que se trata de un parásito de relevancia a nivel de salud pública, por ser cosmopolita se pueden encontrar diversos estudios llevados a cabo con diferentes técnicas parasitológicas, tanto tradicionales como moleculares en diferentes objetos de estudio como: deyecciones de gato, sangre de diferentes animales, muestras de suelo, tejidos animales, muestras de sangre periférica de humanos y más recientemente muestras de agua, frutas y verduras; a continuación, en las **Tablas 3 y 4** se muestran algunos estudios que se han desarrollado en estos ámbitos.

Tabla 3. Estudios de detección de *Toxoplasma gondii* por métodos tradicionales.

Método	Sujeto de estudio	Porcentaje (Positivos/Muestras)	Localización	Referencia
Microscopía	Heces de gato	0,6 (1/158)	Egipto	(Al-Kappany et al., 2010)
	Heces de gato	14,2 (1/7*)	Adís Abeba, Etiopía	(Dubey et al., 2013)
	Heces de gato	0 (0/140*)	Armenia, Colombia	(Zamora-Vélez et al., 2020)
Bioensayo	<i>Sus scrofa</i>	25 (7/28)	Sao Paulo, Brasil	(Dos-Santos et al., 2005)
	Gato Directamente	Corazón	Egipto	(Al-Kappany et al., 2010)
		Lengua		
		Cerebro		

Ensayo Serológico		Gato: tejido ensayado de ratón KO	Corazón	26,7 (357/1337)		
		Lengua	12,8 (171/1336)			
		Cerebro	7,2 (97/1347)			
		Cabra	Tejido de miocardio dado a ratón	57,6 (83/144*)	Beltsville, Maryland, USA	(Dubey et al., 2011)
		Gato	Heces y corazón	19,4 (7/36)	Adís Abeba, Etiopía	(Dubey et al., 2013)
	DT	Suero dilución 1:16	Humanos	66,53	Montevideo, Uruguay	(Freyre & Falcón, 1990)
			6-10 años	30		
			41-45 años	77		
			71-75 años	88		
			Novillos	1,71 (4/233)		
			Cerdos	70 (422/600)		
	MAT	<i>Sus scrofa</i>		18,7 (49/261)	Sao Paulo, Brasil	(Dos-Santos et al., 2005)
		Gatos		97,4 (154/158)	Egipto	(Al-Kappany et al., 2010)
		Cabra		53,4 (125/234)	Beltsville, Maryland, USA	(Dubey et al., 2011)
		Gato	Corazón	91,6 (33/36)	Adís Abeba, Etiopía	(Dubey et al., 2013)
		Ovejas	Corazón	38,2 (83/217)	Tunez	(Boughattas et al., 2014)
		Corderos	Corazón	73,6 (92/125)		
	LAT	Oveja	24,3 (537/2209)		Irán	(Hashemi-Feshar-ki, 1996)
		Cabra	20 (106/530)			
	IFI o IFAT	Humanos	General	47,1	Colombia	(Juliao Ruiz et al., 1983)
			0 - 9 años	32		
			≥60 años	65,3		
		Carne de consumo humano (Anti IgG)	Equinos	21	Caldas, Colombia	(Jorge Enrique Cárdenas Pérez et al., 2006)
			Porcinos	15		
			Aves	16		
	Bovinos		35			

IHA	Oveja		24,6 (271/1102)	Irán	(Hashemi-Feshar- ki, 1996)
	Cabra		18,5 (20/108)		
	Gatos callejeros Perros callejeros		17 (17/100) 38 (76/200)	Sao Paulo, Brasil	(Meireles et al., 2004)
ELISA	Gatos callejeros	IgG	40 (40/100)		
	Perros callejeros		50,5 (101/200)	Sao Paulo, Brasil	(Meireles et al., 2004)
	Antígenos quiméricos		90 – 100	Gdansk, Polonia	(Ferra et al., 2015)
	Oveja, caballo y cerdos	TLA (T. lysate antigen)	100		
	Cerdos	Tejido del miocardio	95,2 (20/21 ²)	Emilia-Romagna, Italia	Bacci et al., 2015)
	Cerdos	IG	96,6 (58/60)	Mérida, Yucatán, México	(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016a)
	Mujeres con abortos en su vida (Muestra de sangre periférica)	IgG	98,94 (94/95*)	Mérida, Yucatán, México	(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016b)
ELFA	Mujeres gestantes	IgG anti Toxoplasma	0 (0/100 ²)	Sincelejo, Colombia	(Blanco et al., 2011)
Avidity Test	Mujeres con abortos en su vida (Muestra de sangre periférica)	IgG	98,94 (94/95*)	Mérida, Yucatán, México	(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016b)
Imágenes diagnósticas	Mujer de 59 años, VIH negativo, a través de tomografía computarizada		100 (1/1*)	Hospital pulmonar de Shanghai	(Shen et al., 2015)

* Algunas de las muestras o todas fueron positivas por otras metodologías.

Fuente: Los autores.

Tabla 4. Estudios basados en detección del ADN del parásito.

Método	Sujeto de estudio	Blanco	Porcentaje (Positivos/Muestras)	Localización	Referencia
PCR	Corazón de ovejas	B1	50 (17/34*)	Túnez	Boughattas et al., 2014)
	Cordero Res	B1	14% (7/50) 4% (2/59)	Ahvaz, Irán	(Rahdar et al., 2012)
	Heces de gatos	529bp	6,12 (3/49)	Condado de Rockbirdge, Virginia	(Lilly & Wortham, 2013)
qPCR	Líquido amniótico de mujeres embarazadas	RE	4,6 (82/1792)	Francia y el extranjero	(Costa et al., 2013)
		B1	86,3 (63/73*)		
		P30	67,1 (49/73*)		
	Frutas y vegetales	B1	9,72 (21/216)	Norte de Polonia	(Lass et al., 2012)
		SAG2	38% (8/21*) 6 Tipo I 2 Tipo II		
	Muestras de agua Corazón	529bp	8,79 (124/1411)	Escocia	(Wells et al., 2015)
	Mujeres con abortos en su vida (Muestra de sangre periférica) Tejido de miocardio dado a ratón	B1	3,84 (5/130)	Mérida, Yucatán, México	(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016b)
	Una muestra de heces de gato	AF	49,82 (278/558)	Ardenas, Francia	(Simon et al., 2017)
	Lugar de muestreo		88,14 (119/135)		
nPCR	Carnes de consumo humano	B1	52,7 (95/180)	Eje cafetero, Colombia	(Lora-Suárez et al., 2007)
	Res	B1	43 (29/60)		
	Pollo		40 (24/60)		
	Cerdo		70 (42/60)		
	Mujeres gestantes seronegativas	B1	12 (12/100)	Sincelejo, Colombia	(Blanco et al., 2011)
	Res Pollo Cerdo	B1	12 (12/100)	Sincelejo, Colombia	(Campo-Portacio et al., 2014)
	Res Pollo Cerdo	B1	27,5 (11/40) 35 (13/40) 32,5 (14/40)	Bogotá, Colombia	(Franco-Hernandez et al., 2015)

Pacientes con toxoplasmosis ocular		77,5 (69/89)		
Niños (congénita)	B1	46,6 (7/15)	Quindío, Colombia	
Infectados asintomáticos		19,6 (123/625*)		
Muestras de carne		32,4 (38/117)		
Res		35 (14/40)		
Pollo	B1	29,7 (12/37)		
Cerdo		30 (12/40)		(Álvarez et al., 2015)
Pacientes con toxoplasmosis ocular		17,3 (12/69*)		
Niños (Toxoplasmosis congénita)	B1	14,2 (1/7*)		
Infectados asintomáticos		19,5 (24/123*)		
Res		21,4 (3/13)		
Pollo	Rop16	18 (2/11)		
Cerdo		16,2 (2/12)		
Heces de gato	B1	17.8 (25/140)		
	Rop16	24 (6/25*)	Armenia, Quindío	(Zamora-Vélez et al., 2020)
Muestras de agua	ITS1	35,2 (6/17*)	Escocia	(Wells et al., 2015)
Cerdo, muestra de:				
Lengua		23,2 (13/56)	Mérida, Yucatán, México	
Lomo	SAG1	7 (4/57)		
Sangre		0		(Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016a, 2016b)
Mujeres con abortos en su vida (sangre)	SAG1	6,92 (9/130)		
Salchichas de cerdo		27,14 (19/77)		
	SAG2	14 Tipo I 5 Tipo II	Botucatu, Sao Paulo, Brasil	(da Silva et al., 2005)

* Algunas de las muestras o todas fueron positivas por otras metodologías.

Fuente: Los autores.

Para Colombia, se han llevado a cabo diversos estudios, algunos de los más relevantes son: el Instituto Nacional de Salud realizó un estudio y reportó que el 47,71% de la población general había estado en contacto con el parásito, evidenciado por la detección de anticuerpos IgG

anti-*Toxoplasma* (Juliao Ruiz et al., 1983). Un estudio de aguas de Armenia llevado a cabo por Triviño-Valencia, Lora-Suárez, Zuluaga & Gómez-Marín (2016) con el uso de PCR para el análisis de muestras reporta una prevalencia del 58,6% de *T. gondii*.

La prevalencia de este organismo se ha visto reflejada también en casos como, en Valledupar, pues para el año 2013 se encontró que, de un total de 300 mujeres embarazadas estudiadas, 174 fueron positivas, lo que arrojó una prevalencia del 58% de mujeres positivas con anticuerpos específicos IgG para *T. gondii* (Torres, 2013), otro estudio agrega que hubo una alta tasa de letalidad en los niños no tratados antes de nacer (25%) en hospitales y centros de diferentes niveles (Gómez-Marín et al., 2011). Además, en la ciudad de Cúcuta (Norte de Santander), de 348 donantes participantes, 134 (38,5 %) presentaron anticuerpos IgG contra *T. gondii* (Ramírez et al., 2019).

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

En la actualidad no hay pruebas disponibles que puedan determinar la fuente de infección, por lo tanto, la proporción de la población humana que adquiere la infección por ingesta de ooquistes en el medioambiente o por el consumo de carne contaminada no se conoce (Almeria & Dubey, 2021; Dubey et al., 2011).

Es claro que la mejor forma de prevención de la adquisición de la enfermedad es la concientización y educación de la población con mayor riesgo de infección como las mujeres embarazadas y los pacientes inmunocomprometidos (Díaz et al., 2010; Opsteegh et al., 2015).

1.7. Tratamiento de la toxoplasmosis

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

1.7.1. En adultos

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

El tratamiento clásico se hace con pirimetamina y sulfonamidas, se administra por vía oral la pirimetamina con una carga inicial de 100 a 200 mg/día durante los dos primeros días y se continúa con 50 a 75 mg diarios por un periodo de entre cuatro y seis semanas; simultáneamente con la pirimetamina se administra sulfadiazina u otras sulfas como la sulfadoxina; inicialmente, una carga de 75 mg/kg en los adultos, para continuar luego con 1 a 1,5 gramos diarios cada seis horas, durante cuatro a seis semanas (Restrepo-Isaza, 2007). Sin embargo, datos más actualizados mencionan que los fármacos de tratamiento recomendados para la toxoplasmosis se dirigen a la etapa de taquizoíto del parásito y no erradican los parásitos enquistados en los tejidos; la pirimetamina es considerada el fármaco más eficaz contra la toxoplasmosis (CDC, 2020).

1.7.2. En mujeres embarazadas

El tratamiento a seguir en mujeres embarazadas se establece a continuación, según la “Guía de atención integral para la prevención, detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto y puerperio: sección toxoplasmosis en el embarazo” compilada por Cortez et al. (2012) y se refuerza con otras referencias.

1.7.2.1. Placentario. Según Díaz et al. (2010) al ocurrir seroconversión materna sin evidencia de infección fetal y antes de las 20 semanas de gestación, se indica espiramicina por su menor potencial

de teratogenicidad a dosis de 9000000 U o 3-4 g/día dividida en tres dosis cada 24 horas. La guía de Cortez et al. (2012) recomienda el tratamiento con espiramicina (3 g/día) por el resto del embarazo para la infección confirmada por toxoplasma en la gestante.

1.7.2.2. Fetal. En la segunda mitad del embarazo, en caso de confirmación de la transmisión fetal de toxoplasmosis por ecografías que sugieren compromiso neurológico del feto, aislamiento del *T. gondii* en líquido por PCR amniótico (sugerido entre semana 20 y 26), y/o cultivo celular o inoculación en ratones. La OMS y el CDC de Atlanta recomiendan como principal esquema de tratamiento la combinación de pirimetamina a dosis de 25-100 mg/día, sulfadiazina 1-1,5 g cada seis horas y ácido fólico 10-25 mg, simultáneamente a cada dosis de pirimetamina. En ciertas situaciones la clindamicina 300 mg cada ocho horas puede ser una opción. Estos esquemas se sugieren administrar ininterrumpidamente o durante 3-4 semanas con descanso de una semana entre ciclo y ciclo hasta por lo menos dos semanas antes de la culminación del embarazo. Según la guía de Cortez et al. (2012) el tratamiento con espiramicina (3 g/día) se debe seguir hasta culminar el embarazo.

1.7.3. En toxoplasmosis congénita

Si se realizó la detección y tratamiento placentario se deben presentar con controles hematológicos cada 1-2 semanas, se debe tratar con 2 mg/Kg/día los dos primeros días y se continúa con 1 mg/kg/día de pirimetamina durante dos meses a un año. El medicamento puede presentar reacciones secundarias, especialmente por problemas en el metabolismo del ácido fólico, por lo que es necesario administrar suplemento adicional de ácido fólico 1 mg diario, o levadura de pan fresca 50 mg/kg/día dos veces al día durante dos a seis meses (Díaz et al., 2010; Restrepo-Isaza, 2007). Los medicamentos alternativos en caso de efectos adversos y/o limitaciones al tratamiento de primera elección, y a juicio del médico, se pueden usar como alternativa clindamicina, sulfadoxina o azitromicina en conjunto con pirimetamina más ácido fólico (Cortez et al., 2012; Restrepo-Isaza, 2007).

1.8. Prevención de la toxoplasmosis

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

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

Capacitar en manipulación de alimentos, normas higiénicas y de salud culinaria es la mejor forma de llevar a cabo la prevención primaria. Se aconseja según Díaz et al. (2010) y Opsteegh, Prickaerts, Frankena & Evers (2011):

- Higiene personal estricta (lavado de manos).
- Congelar las carnes a -12°C , por los menos un par de días.
- Limpiar y desinfectar regularmente la nevera.
- Consumo de carnes bien cocidas (por lo menos a 56° por 10 min).
- Consumo de frutas y verduras lavadas.
- Lavar utensilios y superficies antes de preparar alimentos o antes de ingerirlos, así parezcan estar limpios; además de tener especial cuidado con aquellos que hayan servido para preparación de otros alimentos, evitando la contaminación cruzada.
- No tener gatos; en caso de tener gatos, educarlos y no dejarlos salir, no alimentarlos con comida cruda. Hacer la limpieza todos los días de la caja de arena, empleando elementos de protección personal (mínimo uso de guantes y tapabocas) y desinfectantes (hipoclorito de sodio).
- Hervir el agua para consumo y la que se usa para el preparado de alimentos, otra opción es tratarla con filtros adecuados o con tintura

de yodo al 2% durante por lo menos tres horas, pues el tratamiento que se realiza al agua para potabilizarla va dirigido contra bacterias como salmonelas, coliformes y pseudomonas, tratamiento que no inactiva los ooquistes de *Toxoplasma* que pueda contener la misma (Campo-Portacio et al., 2021).

- Evitar actividades de jardinería o áreas donde hay tierra, en caso de realizar trabajos de este tipo se debe usar guantes y lavarse las manos al culminar.
- A personas que practiquen excursiones o realicen actividades al aire libre recomendar no ingerir agua de lagos, ríos, arroyos, charcos naturales o tanques (recomendar llevar su propio suministro de agua).
- Evitar comer en sitios donde no se tenga la certeza de las normas de salubridad y de preparación de alimentos.
- Durante la manipulación de carnes crudas, frutas y vegetales utilizar guantes, evitar el contacto de las manos enguantadas o no, con los ojos y la boca.
- Procurar eliminar roedores e insectos coprofágicos como cucarachas y moscas.
- Promocionar la consulta preconcepcional donde se podrán identificar pacientes de riesgo y aquellas que no lo presenten, aportando información veraz y minimizar el miedo a esta patología antes que logren embarazarse. Existen estudios que demuestran que el riesgo de seroconversión es nueve veces menor en pacientes bien informadas.

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

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

Capítulo 2

Detección de ADN de *Toxoplasma gondii* (metodología modificada y patronizada en el LIPT)

El LIPT cuenta con investigadores de amplia experiencia en biología molecular y día a día crece su red de colaboradores. Para la detección de *T. gondii* se ha optado por detectar su ADN, dadas las limitantes mencionadas con las técnicas “tradicionales” como se mencionó en el capítulo anterior.

2.1. PCR anidada

Una PCR anidada o PCR-*nested* (n-PCR) se desarrolla con dos pares de cebadores. Para la detección de *Toxoplasma gondii* en el LIPT, se empleó esta técnica con los cebadores que se muestran en la **Tabla 5**, dichos cebadores se basan en el estudio original de Burg et al (1989), los cuales fueron base para los cebadores usados por Jones, Okhravi, Adamson & Tasker (2000) que son un poco más cortos que los originales (**Tabla 5**).

Tabla 5. Cebadores para detección del gen B1 de *T. gondii*.

Cebadores Primera Reacción		Secuencia
Cebador F	Toxo N1	GGAAGTCATCCGTTTCATGAG
Cebador R	Toxo C1	TCTTTAAAGCGTTTCGTGGTC
Cebadores Segunda Reacción		Secuencia
Cebador F	Toxo N2	TGCATAGGTTGCAGTCACTG
Cebador R	Toxo C2	GGCGACCAATCTGCGAATACA

Fuente: Los autores, basados en Burg et al. (1989) y Jones et al. (2000).

Los cebadores anteriormente mencionados también fueron analizados con las herramientas bioinformáticas Nucleotide BLAST, PCR Products y Primer-BLAST. La mezcla de reactivos para la n-PCR se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la n-PCR del gen B1.

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)
Buffer 10X	1X	2
MgCl ₂	1,5mM	1,2
dNTPs	2,5mM	1,6
Cebador F	1μM	0,8
Cebador R	1μM	0,8
Taq Polimerasa	1U	0,1
H ₂ O	-	11,5
ADN		2

Fuente: Los autores.

Después de hacer la mezcla, las muestras se llevaron al termociclador, con el perfil térmico estandarizado por Ponce & Gómez-Marín (2003) para la realización de la prueba que consta de dos fases, bajo las siguientes condiciones:

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

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

Cabe aclarar que la segunda ronda del protocolo empleado por Ponce & Gómez-Marín (2003) consta de 14 ciclos, con el fin de mejorar la sensibilidad de la prueba, en el LIPT se aumentó el número de ciclos de la segunda ronda de PCR a 30.

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

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

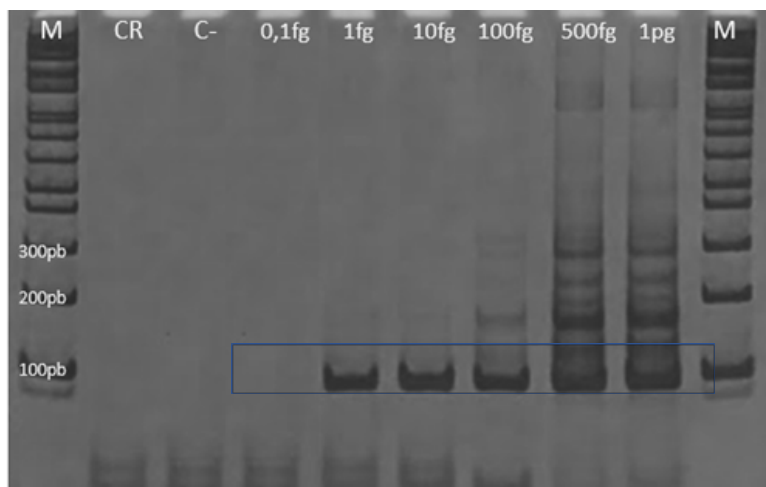
2.2. Visualización de los productos

Para la visualización de los productos de amplificación se empleó la electroforesis en gel de acrilamida al 6% (**Anexo D**), se eligió este tipo de gel por su alta sensibilidad para detectar los productos de PCR de las muestras problema, para este, 5 μ L de los productos de la segunda reacción de PCR que se mezclaron con 1 μ L de 6x de buffer de carga se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en una solución tampón al 1X de tris-ácido bórico-EDTA (TBE) a 80 voltios durante aproximadamente 40 minutos y se realizó la tinción con nitrato de plata, posteriormente, se tomó la imagen de gel para el análisis. El tamaño de los fragmentos fue determinado utilizando marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

2.3. Sensibilidad de la PCR anidada (n-PCR)

Con el fin de determinar la cantidad mínima de ADN detectable al haber modificado el número de ciclos de 14 a 30, se desarrolló la dilución del ADN de referencia, logrando detectar hasta 1fg (**Figura 6**).

Figura 6. Visualización del producto de la segunda ronda de PCR en gel de poliacrilamida al 6%. Diluciones de ADN de referencia.



* En recuadro azul, banda de 97pb obtenida usando los cebadores Toxo N2 - Toxo C2 (Jones et al., 2000). M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; C-) Control negativo (Agua destilada); canaletas de la 4 a las 9 diluciones de ADN de la cepa RH de *T. gondii*.

Fuente: Los autores.

2.4. Discusión

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

Como se observa en la **Figura 6**, hemos logrado detectar hasta 1 fg de ADN de referencia de *T. gondii* al aumentar el número de ciclos en la segunda reacción y usar los primeros Toxo N2 – Toxo C2 (Jones et al., 2000), mientras que Ponce & Gómez-Marín (2003) habían establecido 10fg con 14 ciclos como su límite de detección de ADN del parásito puro.

Capítulo 3

Estudio piloto *Toxoplasma gondii* en heces de gatos de la ciudad de Ibagué

Los gatos son los huéspedes más importantes en el ciclo epidemiológico de *T. gondii*, puesto que, al ser su hospedador definitivo, este parásito necesita de los felinos para completar su ciclo biológico (Dubey, 2009a). Sin lugar a duda, los felinos son trascendentales como fuente de infección para los seres humanos, debido a que los gatos domésticos coexisten en una estrecha asociación con la mayoría de los asentamientos humanos en todo el mundo a través del tiempo (Liberg et al., 2000).

Por lo anterior, en el presente capítulo, se pretendió, mediante un estudio piloto, detectar la presencia del parásito en las heces de los gatos, con el fin de concientizar sobre *T. gondii* en factores de salud pública, ambiental y animal.

3.1. Metodología

Como vimos en el capítulo anterior, los métodos de detección *T. gondii* son variados y todos llegan a ser indispensables para hacer diagnósticos clínicos, descriptivos, poblacionales, compresiones biológicas, entre otros. Así, mediante metodologías estandarizadas en las instalaciones del LIPT, se diseñó un método que permitió hacer la detección molecular de este protozooario en heces de felinos domésticos por técnicas de PCR-anidado del gen *B1*, como veremos a continuación:

3.1.1. La muestra

El muestreo coprológico se realizó de forma aleatoria entre el año 2019 y 2020, sin discriminar la característica del donador, las muestras fueron donadas bajo el consentimiento informado del dueño, teniendo

en cuenta la emergencia sanitaria global del covid-19, se recolectó en total 40 muestras de heces que fueron tomadas directamente del lugar de deposición, o llevadas por el responsable del gato; en ambos casos se utilizaron recipientes estériles, además se tomó nota de los datos que nos proporcionó información que caracteriza al donador.

3.1.2. Obtención de ADN a partir de muestras de heces de gato

3.1.2.1. Procesamiento de la muestra. Se depositaron 2 g de cada muestra en un frasco estéril, para su posterior transporte en neveras refrigeradas al LIPT, donde se colocaron en bolsas estériles de cierre hermético (Vignau et al., 2005), las cuales fueron rotuladas con datos, tales como fecha y lugar de procedimiento. Continuamente se realizó agitación manual en recipientes de un solo uso, después se agregó 150 ml de agua desionizada, estas fueron agitadas manualmente por 10 min, asegurándose de impregnar toda la muestra con el agua estéril. Posteriormente, se rescatan los 150 ml de agua producto del lavado, pasándola a tubos falcón de 50 ml, a través de una gasa sencilla estéril para filtrar la muestra de suciedad y partículas grandes, para proceder a la concentración de los ooquistes por el método de flotación de Faust y ruptura de estos por choque térmico (**Tabla 7**).

Tabla 7. Ruptura de ooquistes por choque térmico.

	Procedimiento	Temperatura C°
1	Resuspender en 100 μ de buffer de lisis (H ₂ O milli Q, EDTA 50mM, NaCl 5M y SDS 1%)	
2	Congelamiento en nitrógeno líquido	-195,8
3	Descongelamiento en baño de María	65
	Repetir por 3 veces	

Fuente: Los autores.

3.1.2.2. Extracción y purificación de ADN a partir de la muestra. La metodología empleada para la extracción y purificación de ácidos nucleicos en muestras coprológicas de gatos domésticos se realizó de la forma mencionada anteriormente, mediante pruebas de extracción a partir de 300 μ L de muestra con el método de Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamilico (**Anexo A**) y digestión con RNasa A (Concentración de trabajo de 50 μ g/mL) (Sambrook et al., 1989).

3.1.3. Cuantificación de ADN

Posterior a la extracción y purificación de ADN, la muestra fue cuantificada por espectrofotometría con NanoDrop 2000 para determinar cuál es la mejor opción para el tratamiento de las muestras, siendo la que permita mayor concentración de ADN (ng/ μ L) y pureza (Relación 260/280), además de realizar pruebas de sensibilidad con el fin de identificar la cantidad mínima de ADN detectable con el método.

3.1.4. Detección molecular de *T. gondii* en heces de gato doméstico

La detección se realizó mediante el procedimiento de PCR-*nested* (anidado) estandarizado en el LIPT; y visualización a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%, estipulado en el capítulo anterior (**Ver capítulo 2**); que demuestra eficacia en la detección.

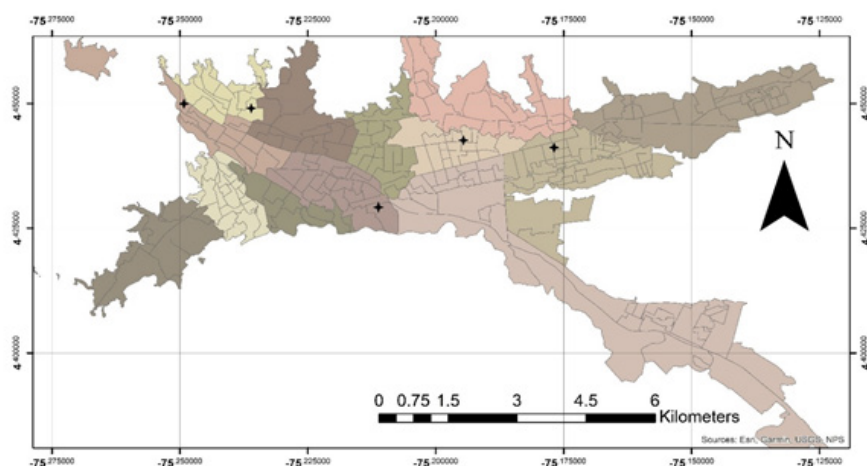
3.1.5. Análisis estadístico

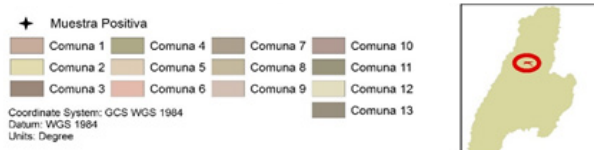
Los resultados obtenidos se ubicaron en una base de datos de Microsoft Excel y se categorización como negativos o positivos según el caso.

3.2. Resultados

3.2.1. Obtención de muestras de estudio

Figura 7. Ubicación puntos de muestro para heces felinas en el casco urbano de la ciudad de Ibagué – Tolima.





Fuente: Los autores.

En este estudio piloto, se establecieron puntos de muestreo de forma aleatoria en la ciudad de Ibagué (**Figura 7**), haciendo colecta en todas las comunas a excepción de la comuna número 3, las muestras recibidas bajo consentimiento informado proporcionaron información del donador, tal como: sexo, edad y ubicación.

3.2.2. Muestras de heces de gatos domésticos

En este estudio piloto, se lograron recolectar 40 muestras coprológicas de felinos; teniendo en cuenta el número anterior no se establecieron parámetros para determinar la prevalencia del organismo; sin embargo, el estudio reveló la presencia del parásito y la eficacia de la metodología para su detección (**Tabla 8**).

Tabla 8. Puntos de muestreo coprológico – casco urbano, ciudad de Ibagué.

Nº	Fecha	Barrio	Comuna
1	13/08/2019	Ambala	Comuna 6
2	14/08/2019	Las palmas	Comuna 10
3	14/08/2019	Boyacá	Comuna 10
4	15/08/2019	Picaleña	Comuna 9
5	15/08/2019	Villa Café	Comuna 10
6	15/08/2019	Jardín	Comuna 8
7	17/08/2019	Belén	Comuna 2
8	18/08/2019	Departamental	Comuna 10
9	18/08/2019	Jardín Palermo	Comuna 8
10	18/08/2019	Las palmas	Comuna 10
11	18/08/2019	Santa Helena/U. del Tolima	Comuna 10
12	5/08/2020	Plaza la 21	Comuna 5
13	6/08/2020	Santa Ana	Comuna 7
14	7/08/2020	Boquerón	Comuna 13

N°	Fecha	Barrio	Comuna
15	7/08/2020	Estación	Comuna 1
16	7/08/2020	Jordán	Comuna 5
17	7/08/2020	Salado	Comuna 7
18	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
19	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
20	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
21	18/08/2020	Villa Marlén	Comuna 4
22	19/08/2020	La Pola	Comuna 1
23	19/08/2020	Galán	Comuna 12
24	25/08/2020	Pirámides	Comuna 7
25	25/08/2020	Pirámides	Comuna 7
26	31/08/2020	Rosa Badillo	Comuna 12
27	1/09/2020	Ricaurte	Comuna 12
28	1/09/2020	Galarza	Comuna 12
29	12/09/2020	Los Mártires	Comuna 11
30	12/09/2020	Jordán I	Comuna 9
31	26/09/2020	Juan Pablo II	Comuna 6
32	28/09/2020	Varsovia	Comuna 9
33	28/09/2020	La Pola	Comuna 1
34	29/09/2020	Ambala	Comuna 12
35	30/09/2020	Ricaurte	Comuna 6
36	2/10/2020	Centro	Comuna 1
37	3/10/2020	Salado	Comuna 7
38	3/10/2020	El Carmen	Comuna 3
39	5/10/2020	Plazas del Bosque	Comuna 6
40	5/10/2020	Clarita Botero	Comuna 2

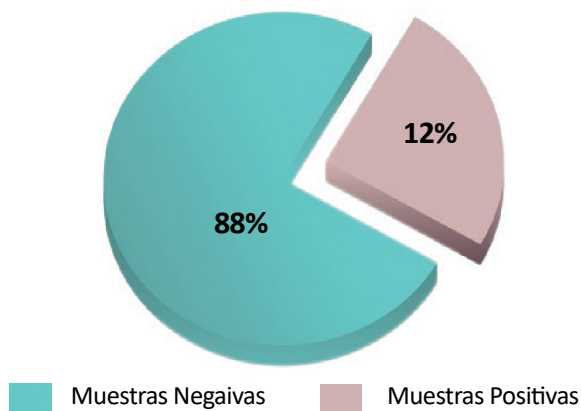
Fuente: Los autores.

3.2.3. Detección molecular de *T. gondii* en heces de gato doméstico

De 40 muestras coprológicas analizadas en el LIPT, 5 (12,5%) presentaron positividad del gen *B1* para *T. gondii* mediante técnicas de PCR-*nested* (anidado) después de ser sometidas a extracción y purificación de ácidos nucleicos, y 35 fueron negativas por el método ya mencionado (**Figura 8**). Representando así, la presencia del organismo en un 12 % de las muestras de ADN extraído en el estudio piloto.

Figura 8. Diagrama representativo de la presencia de *T. gondii* en heces de gato doméstico en la ciudad de Ibagué - Tolima.

Presencia de *T. gondii* en heces de gato doméstico

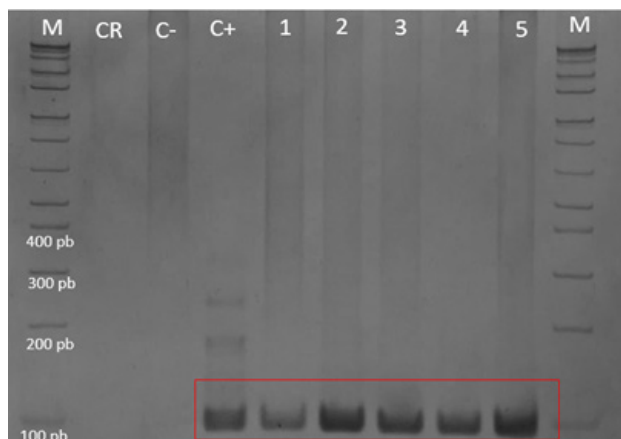


Fuente: Los autores.

3.2.4. Visualización producto de amplificación del gen B1 para la detección de *T. gondii* en heces de gato doméstico

Se logró detectar el producto de amplificación de la segunda ronda de PCR-nested (anidado) para la detección *T. gondii* en cinco muestras coprológicas de gato doméstico de un total de 40 colectadas en gel de poliacrilamida al 6%, mediante la detección del gen B1 (**Figura 9, Tabla 9**).

Figura 9. Visualización del producto de amplificación de la segunda ronda de PCR-nested para la detección *T. gondii* en muestras de heces felinas en gel de poliacrilamida al 6%.



**En rojo, banda de 97pb obtenida usando los cebadores Toxo N2 - Toxo C2. M) Marcador de peso molecular 1kb plus; CR) Control de reacción; C-) Control negativo (Agua estéril) C+) Control positivo; canaletas 5-9: muestras positivas para T. gondii en heces de gato*

Fuente: Los autores.

Tabla 9. Resultados PCR anidada y características del felino donador.

N° de muestra	Fecha de colecta	Barrio	N° Comuna	Sexo	Edad meses	Resultado n-PCR
6	15/08/2019	Jardín	8	Hembra	18	positivo
11	18/08/2019	Santa Helena	10	Hembra	24	positivo
30	12/09/2020	Jordán I	9	Hembra	6	positivo
33	28/09/2020	La Pola	1	Hembra	48	positivo
38	3/10/2020	El Carmen	3	Macho	10	positivo

Fuente: Los autores.

3.3. Discusión

3.3.1. Obtención de ADN

Estudios previos permitieron escoger la metodología más adecuada para hacer la concentración de los ooquistes en muestras biológicas, como se describe en **anexos** y en el **capítulo 4**; demostrando que el método de flotación por sulfato de zinc (Faust) generó resultados factibles para hacer la detección de *T. gondii* en heces de gato doméstico, además de ser una metodología de bajo costo y fácil realización, permitiendo detectar cantidades pequeñas de ADN.

3.3.2. Detección molecular

Mediante este estudio se pudo hacer la identificación de *T. gondii* en heces de gato por medio de técnicas moleculares, demostrando que los gatos domésticos son un foco de infección para los seres humanos; a pesar de no obtener un muestreo significativo, con el número de muestras procesadas analizadas, se logró medir la eficacia del método

para hacer identificación de este parásito en diferentes muestras biológicas como veremos más adelante en los dos capítulos siguientes.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que detecta directamente el ADN del parásito y ha sido evaluada por diferentes autores, empleando diferentes metodologías y muestras (Ponce & Gómez-Marín, 2003). Además, la detección del gen *B1* por PCR-*nested* (anidada) parece ser el protocolo más sensible en comparación a otros siendo capaz de detectar 50 fg, aproximadamente un solo taquizoíto y es una técnica que ha tenido éxito en la identificación del ADN de *T. gondii* en tejidos y fluidos (Jones et al., 2000) y se confirma con las investigaciones realizadas en el LITP.

3.3.3. Prevalencia de *T. gondii* en heces de gatos domésticos

En el mundo existen 36 especies de felinos silvestres; el continente americano es hogar de una tercera parte de ellos; y solo el puma se encuentra en todo tipo de ambientes (Ceballos et al., 2010). Estos felinos salvajes y los domésticos se consideran fuente de excreción de ooquistes contaminantes al medio (Halonen & Weiss, 2013). Varios autores concluyen que la transmisión de *T. gondii* a los seres humanos, es dependiente de la contaminación del ambiente, asociada también a la edad del felino, los hábitos, pero no el sexo del mismo (Afonso et al., 2007; Dubey, 2009a). Por ejemplo, en Beijing (China) se ha evidenciado que el 57,8% (37/64) de los gatos callejeros fueron seropositivos con anticuerpos de *T. gondii*, datos significativamente más altos que en gatos domésticos (14,9%) (Qian et al., 2012). Cabe resaltar que características como raza y el sexo que no muestran mayor significancia (Grandía et al., 2013; López et al., 2008). Sin embargo, en nuestro estudio observamos mayor presencia del parásito en hembras que en machos, posiblemente debido al número de muestras procesadas.

En Colombia, en la ciudad de Armenia, Quindío, aunque por microscopía óptica, no se logró detectar *T. gondii*; a través de PCR se encontró un 17,8% (25/140) de muestras positivas para el gen B1, llegando a la conclusión de que la presencia de este parásito en las heces de felinos de compañía es un factor importante que contribuye a la alta prevalencia de *T. gondii* en la población humana (Zamora-Vélez et al., 2020).

3.4. Conclusiones

La metodología de PCR anidada para el gen *B1* empleada en el presente estudio demuestra ser muy eficaz en la detección de *T. gondii* en heces de gato doméstico; además de ser una metodología de fácil realización.

Se estandarizó una metodología para la concentración de ooquistes a partir de muestras coprológicas de felinos domésticos, obteniendo ADN viable que garantizó la amplificación de la PCR-*nested* (anidada).

La presencia de *T. gondii* en muestras coprológicas de gato fue del 12 %, demostrando ser una fuente de transmisión del organismo al ser humano, haciendo necesario diseñar planes de mitigación de esta zoonosis silenciosa. Según lo reportado, se puede establecer que las heces de gato son un material biológico que necesita de medidas rigurosas de manejo a causa de ser fuente de contaminación al ser humano de parásitos como *T. gondii*.

Se recomienda en futuros estudios hacer un muestreo más amplio que permita dar una predicción del comportamiento del organismo en relación con este animal de compañía y el ser humano, además de evaluar factores como los hábitos del felino, mostrando los datos epidemiológicos relativos a la población de felinos de la ciudad de Ibagué.

Capítulo 4

Detección de *Toxoplasma gondii* en frutas y hortalizas comercializadas en la ciudad de Ibagué

En frutas y vegetales de consumo fresco, se ha reportado la presencia de parásitos, entre ellos *T. gondii*, aún en países desarrollados, una tendencia que se mantiene debido a varios factores, entre ellos la expansión del comercio internacional de productos alimenticios y materias primas, los cambios en los hábitos alimenticios, el consumo fuera del hogar de comidas rápidas y preparadas con anterioridad, y el crecimiento desordenado de la población en centros urbanos, donde no siempre hay disponibilidad de agua potable, tratamiento de aguas residuales y desechos sólidos como consecuencia del crecimiento poblacional acelerado (Capuano et al., 2002; Käferstein & Abdussalam, 1999; Morais-Falavigna et al., 2005).

Lo anterior, sumado a la variabilidad de los agentes patógenos, el porcentaje de contaminación en los vegetales y la diversidad de regiones afectadas, indican que se trata de un problema con amplia distribución geográfica que afecta tanto a las zonas rurales como las metropolitanas, poniendo en riesgo todos los días la salud de cientos de personas (Paula et al., 2003).

Por lo anterior, en el presente capítulo se lleva a cabo la detección de *Toxoplasma gondii* en frutas y hortalizas comercializadas en el casco urbano de la ciudad de Ibagué.

4.1. Metodología

4.1.1. Selección de puntos de muestreo

Para el muestreo de material vegetal, se escogieron trece de los puntos de venta más populares distribuidos en plazas de mercado, supermercados de cadena y tiendas de verduras de la ciudad de Ibagué.

Posteriormente, se realizó la compra de un total de 100 muestras entre frutas y hortalizas frescas vendidas en cada localidad, a partir del 18 de

enero del 2017 hasta el 3 de junio del 2018, con el fin de obtener muestras cultivadas en periodos climáticos diferentes.

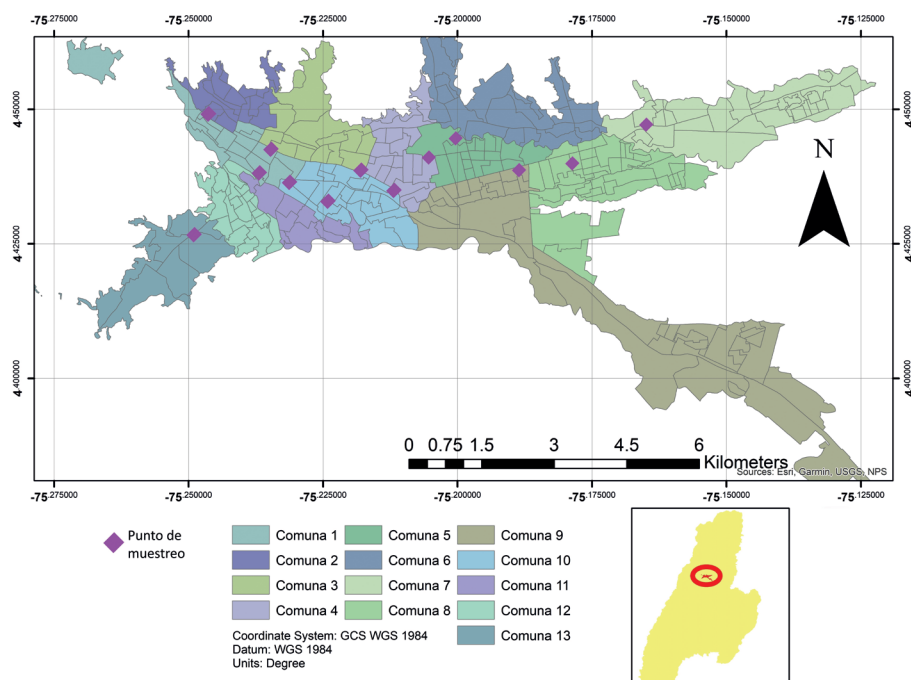
4.1.2. Obtención de la muestra

Se colectaron un total de 100 muestras, distribuidas en siete vegetales que se caracterizan por su mayor consumo y comercialización en la ciudad: lechuga (variedad lisa y crespita), apio, cebolla larga, zanahoria, cilantro y fresas.

La toma de las muestras se realizó en 15 visitas a los lugares establecidos para el muestreo del material vegetal. En los 13 puntos de muestreo (**Figura 10**), se tomaron 500 g de cada una de las siete hortalizas; estos productos se encontraban en perfecto estado macroscópico al momento del muestreo.

Cada producto se empacó en las bolsas entregadas por el vendedor o supermercado para evitar el contacto entre las mismas y fueron llevadas al laboratorio de parasitología tropical de la Universidad del Tolima (LIPT). Posteriormente, cada muestra se pasó a una bolsa de cierre hermético estéril, las cuales se marcaron con el número consecutivo de estudio y se diligenció el formato de recolección, en el cual se tiene información pertinente al sitio de muestreo, fecha, hora y resultados obtenidos.

Figura 10. Ubicación de los 13 puntos de muestreo para frutas y hortalizas – casco urbano ciudad de Ibagué.



Fuente: Los autores.

4.1.3. Concentración y ruptura de ooquistes

Inicialmente, se tomaron las bolsas estériles que contenían el material vegetal y se les agregó 200 ml de agua desionizada, fueron agitadas manualmente por 10 min y en un agitador por 15 min en agitación constante. Posteriormente, se rescataron los 200 ml de agua producto del lavado, pasándola a tubos falcon de 50 ml, a través de una gasa sencilla. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 3 min, con el fin de reunir el sedimento, el cual fue empleado para la concentración de quistes utilizando el método de flotación con sulfato de zinc, modificado (Tobie et al., 1938).

Fue necesario realizar un lavado a las muestras, debido al sulfato de zinc, el cual puede interferir en el protocolo de extracción por exceso de sales. Así mismo, debido a la gruesa pared quística, fue necesario realizar una ruptura previa de los ooquistes por choque térmico en dos pasos: **1.** Resuspender el pellet en 100 μ l de buffer de lisis (EDTA, NaCl, H_2O_d , SDS).

2. Someter la muestra a tres ciclos, de congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento en baño de María a 65 °C.

4.1.4. Digestión enzimática y extracción de ADN

Posterior a la lisis de ooquistes, se adicionó a la muestra 200 µl de H₂Odd (Volumen final 300 µl), y se realizó la digestión con proteinasa K a una concentración de trabajo de 200 µg/ml a 37 °C durante toda la noche.

La extracción se realizó con solventes orgánicos, aplicando el método Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico (FCAI). La purificación, realizando una digestión con ribonucleasa A (50 µg/ml) durante 1 hora a 37°C y repitiendo el procedimiento de extracción una vez (FCAI) (Sambrook et al., 1989).

4.1.5. Detección molecular

Se realizó la detección del ADN de los ooquistes por medio de una PCR anidada (n-PCR), con las especificaciones descritas en el **capítulo 2** del presente libro. Se eligió esta metodología por su alta sensibilidad, debido a la baja cantidad de ADN obtenido del material vegetal.

4.2. Resultados

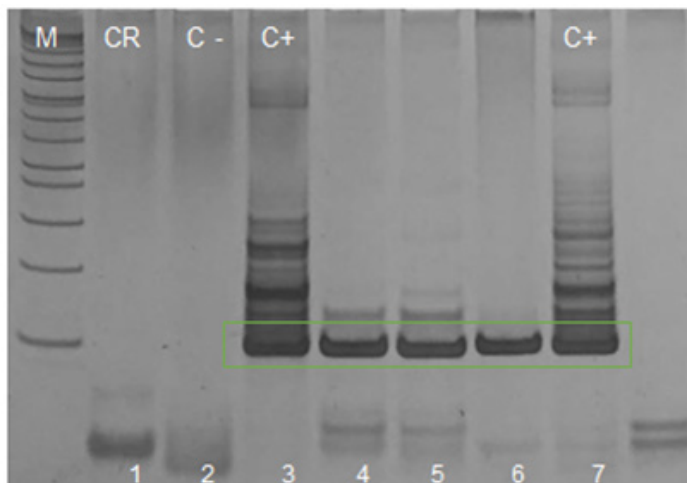
Las cien muestras obtenidas de material vegetal (fresas, apio, cebolla larga, cilantro, zanahoria, lechuga crespa y lisa), fueron sometidas a la extracción de ácidos nucleicos y, posteriormente, a la PCR anidada, logrando la amplificación del material genético de *T. gondii* en 22 de las muestras (**Tabla 10 y Figura 11**). En un estudio donde se evaluaron otros parásitos intestinales como *Giardia* y *Blastocystis* por metodologías moleculares, llevado a cabo por Osorio-Delgado (2019) en las mismas muestras, se evidenció que *T. gondii* presentó la mayor prevalencia.

Tabla 10. Detección ADN de *Toxoplasma gondii* en frutas y hortalizas.

No.	Código muestra	Tipo hortaliza	Sitio de recolección	Resultado n-PCR Gen B1	Total
1	8 C	Cilantro	2	+	6
2	15 C		3	+	
3	36 C		6	+	
4	49 C		8	+	
5	56 C		9	+	
6	63 C		10	+	
7	2 LL	Lechuga lisa	15	+	4
8	57 LL		9	+	
9	78 LL		12	+	
10	85 LL		13	+	
11	6 A	Apio	15	+	3
12	27 A		14	+	
13	60 A		9	+	
14	19 F	Fresas	3	+	4
15	66 F		10	+	
16	94 F		1	+	
17	59 F		9	+	
18	35 LC	Lechuga crespas	5	+	2
19	90 LC		13	+	
20	41 CL	Cebolla larga	6	+	3
21	61 CL		9	+	
22	68 CL		10	+	
				Total	22

Fuente: Los autores.

Figura 11. Visualización del producto de la segunda ronda de PCR (anidada) para detección general de *Toxoplasma gondii* en gel de poliacrilamida al 6% de las muestras de verduras y frutas en Ibagué.



* En recuadro verde, banda de 97pb obtenida usando los cebadores Toxo N2-Toxo C2. M) Marcador de peso molecular.

Fuente: Los autores.

Además de lo anterior, en el trabajo realizado por Osorio-Delgado (2019) de las 49 muestras positivas, se encontraron seis muestras que presentaban infección con más de un parásito; cinco muestras fueron detectadas con coinfección *Blastocystis* - *Toxoplasma* y 1 muestra con *Toxoplasma* – *Giardia*.

4.3. Discusión

La prevalencia encontrada de *Toxoplasma gondii* fue de 22% en las 100 muestras de las hortalizas trabajadas. Estos resultados se obtuvieron por medio de PCR anidada del gen B1.

Para Colombia, se han realizado diversos estudios que evalúan la presencia de *T. gondii* principalmente en carnes, sin embargo, no se habían llevado a cabo trabajos de detección en vegetales frescos. Un estudio de aguas de Armenia por Triviño-Valencia, Lora-Suárez, Zuluaga & Gómez-Marín

(2016), con el uso de la misma n-PCR para el análisis de muestras, reporta una prevalencia del 58,6% de *T. gondii*, lo cual es una muestra clara de la presencia de quistes de este parásito en fuentes hídricas de la región.

En estos últimos años se ha reportado la detección de ADN de *T. gondii* en frutas y vegetales de consumo fresco en varias regiones del mundo: Lass et al. (2012) en Polonia, de Souza et al. (2016) en Paraná (Brasil), Caradonna et al. (2017) en Italia, Ferreira et al. (2018) en Brasil, Slany et al. (2019) en la República Checa y Marques et al. (2020) en España y Portugal. En Colombia, recientemente, se han iniciado los estudios para detectar molecularmente a *T. gondii* en frutas y verduras de consumo fresco, por tal razón en este estudio reportamos por primera vez la detección molecular de *T. gondii* en frutas y verduras para consumo humano en la ciudad de Ibagué (Tolima-Colombia).

No son muchos los estudios relacionados con la detección de ooquistes de *T. gondii* en muestras ambientales. Durante años no estaban disponibles métodos eficientes para la detección de ooquistes de *T. gondii*. Finalmente, la situación fue cambiando con el desarrollo de métodos específicos y sensibles para recuperar e identificar los ooquistes de *T. gondii* utilizando métodos inmunomagnéticos (Dumètre & Dardé, 2003, 2005, 2007) y el desarrollo de métodos moleculares a través de la detección de ADN del parásito por medio de la PCR. Sin embargo, se ha recopilado poca información sobre la detección de *T. gondii* en agua y suelo (Afonso et al., 2008; Aramini et al., 1999; Aubert & Villena, 2009; de Moura et al., 2006; Dumètre & Dardé, 2003; Kourenti & Karanis, 2006; Kourenti et al., 2003; Lass et al., 2009; Sroka et al., 2006; Villena et al., 2004).

4.4. Conclusiones

Se estandarizó una metodología para concentración de quistes a partir de muestras vegetales, obteniendo ADN viable, en buena cantidad y calidad, que garantizó la amplificación por PCR del gen *B1* del parásito.

Los métodos moleculares aportaron una alta sensibilidad que permitió encontrar *Toxoplasma gondii* en hortalizas, observándose una mayor prevalencia en muestras provenientes de las plazas de mercado de la ciudad.

Capítulo 5

Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes destinadas al consumo humano en Ibagué, Tolima

Como lo mencionamos anteriormente, *T. gondii* es capaz de infectar cualquier animal de sangre caliente, incluyendo aquellos del sector pecuario. Debido a que una de las principales formas reportadas para el humano adquirir *T. gondii* es por la ingesta de carnes mal cocidas, en el presente capítulo se abordó esta fuente de infección con el objetivo de determinar la prevalencia de *T. gondii* en carnes de res, pollo y cerdo destinadas al consumo humano en la ciudad de Ibagué.

5.1. Metodología

Cada tipo de muestra tiene un método de extracción específico, a continuación se muestra el protocolo empleado para el procesamiento de muestras de carnes obtenidas de la ciudad de Ibagué de acuerdo con la metodología descrita por Medina-Hernández et al. (2022).

5.1.1. Tamaño muestral

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

Las muestras se obtuvieron de comercializadoras de carne (tiendas de barrio, plazas o almacenes de cadena) de la ciudad de Ibagué,

dado que de cada tipo de carne debía tomarse 62 muestras se decidió tomar cuatro muestras por cada comuna en los diferentes barrios al azar, para las comunas más grandes se colectaron más de cuatro muestras; además, se tomaron algunos puntos al azar del departamento del Tolima, utilizando carne de chivo y conejo, además de la carne de res, pollo y cerdo para realizar pruebas iniciales de digestión, con la finalidad de ajustar la metodología de obtención de ADN (**Tablas 11 y 12**). Se colectaron aproximadamente 100 g de cada tejido que se almacenaron refrigerados a 4°C hasta su posterior análisis en el laboratorio (Boughattas et al., 2014; Campo-Portacio et al., 2014).

5.1.2. Obtención de ADN a partir de muestras de carnes

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

5.1.2.1. Digestión de la muestra. A partir de 100g de carne se realizaron cortes con una hoja de bisturí estéril al azar hasta obtener 5g de muestra en una caja de Petri estéril. Se efectuaron pruebas de digestión con buffer de lisis (H_2O milli Q, EDTA 50mM, NaCl 5M y SDS 1%) y proteinasa K (solución de trabajo 200µg/mL) a dos temperaturas y tiempos diferentes para evaluar la calidad y cantidad de ADN obtenido, estas son:

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

5.1.2.2. Extracción y purificación de ADN a partir de la muestra digerida. Se efectuó la extracción de ADN a partir de 500µL de muestra digerida con el método de Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamilico (**Anexo A**) y la digestión con RNasa A (concentración de trabajo de 50µg/mL) (Sambrook et al., 1989).

5.1.3. Cuantificación de ADN

Se realizó la cuantificación con NanoDrop 2000 (**Anexo B**), posterior a la extracción y purificación de ADN, con el fin de determinar cuál era la mejor opción para el tratamiento de las muestras de carnes, siendo la que permitiera mayor concentración de ADN (ng/ μ L) y pureza (Relación 260/280) la que se usaría en las muestras del estudio.

5.1.4. Detección de ADN de *Toxoplasma gondii*

La detección se realizó empleando la PCR anidada que se especifica en el *capítulo 2* del presente libro.

5.1.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por muestra se almacenaron en una base de datos de Microsoft Excel y se determinó la frecuencia de infección de cada uno de los tipos de carne, estableciendo la prevalencia y los intervalos de confianza con el programa estadístico InfoStat versión 2016e, se empleó una prueba de estimación paramétrica basada en una proporción debido a que los datos evaluados eran de tipo categórico (positivo o negativo).

5.2. Resultados

5.2.1. Obtención de ADN

Como resultado de los ensayos de digestión de la muestra se observó que al realizar la digestión de la muestra por 1h con proteinasa K se obtuvo mayor cantidad de ADN según la cuantificación en Nanodrop 2000 (**Tabla 11**).

Tabla 11. Cantidad de ADN obtenido evaluando dos temperaturas de digestión de las muestras de carnes con PK.

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

Fuente: Los autores.

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

Se realizó la prueba de detección por n-PCR estandarizada para *Toxoplasma gondii* (**Capítulo 2**) a algunas de las muestras que presentaron mayor cantidad de ADN en la **Tabla 11**, estas procedían de municipios diferentes a Ibagué y los organismos presentaban hábitos de cría orgánica, los resultados se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados de detección de muestras de carnes tomadas en otros municipios.

Carne de	Coordenadas del lugar de compra	Municipio	Resultado de n-PCR
Conejo	4.927733, -75.061778	Líbano	Positivo
Chivo	4.277671, -75.019129	Gualanday	Positivo
Chivo 2	4.277671, -75.019129	Gualanday	Negativo
Cerdo	4.253319, -74.985837	Potrerillo	Positivo

Fuente: Los autores.

5.2.2. Muestras de carnes y prevalencia de *T. gondii*

A continuación, en la **Tabla 13** se observan las coordenadas donde se tomaron las muestras para cada comuna y el barrio correspondiente.

Con ayuda del software ArcGIS (versión 10.5) se elaboró y ubicó en un mapa de la ciudad de Ibagué las muestras que dieron positivas para *Toxoplasma gondii* según el tipo de muestra (**Figura 12**), el reporte consenso se muestra en la **Tabla 14**.

Tabla 13. Características de las comunas y coordenadas de las muestras de carnes tomadas.

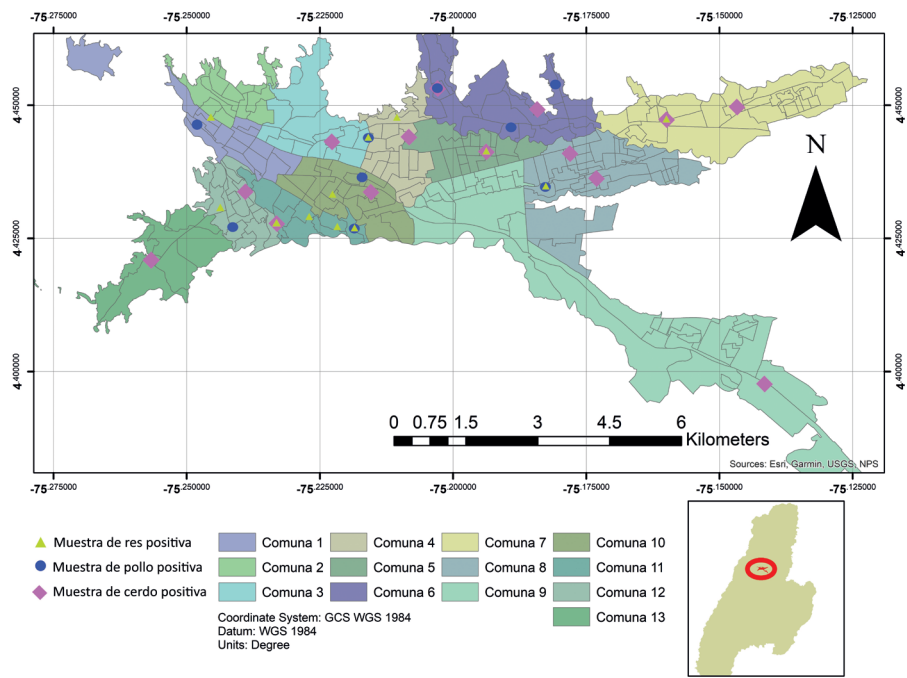
Comuna	Barrio donde se tomó la muestra	Coordenadas
1	La Pola	4.447373, -75.245411
	San Pedro Alejandrino	4.434714, -75.230658
	Libertador	4.446410, -75.247684
	Centro	4.441307, -75.240402
2	Belencito	4.4493334, -75.239221
	Ancón	4.449743, -75.234765
	Santa Bárbara	4.453609, -75.245356
	Belén	4.451084, -75.244811
	La Aurora	4.454901, -75.234970
3	Gaitán Parte Alta	4.443678, -75.215683
	Antonio Nariño	4.443840, -75.222876
	San Simón PB	4.442549, -75.219246
	El Carmen	4.443718, -75.230616
4	Calarcá	4.439641, -75.210106
	Gaitán Parte Baja	4.443640, -75.211440
	Onzaga	4.444200, -75.208005
	Restrepo	4.438040, -75.214959
	Sorrento	4.447586, -75.210789
5	Jordán 8va Etapa	4.440534, -75.193978
	La Campiña	4.442511, -75.189608
	Jordán 9na Etapa	4.441789, -75.202082
	Arrayanes	4.438694, -75.192310
	Jordán 7ma Etapa	4.442365, -75.195641

Comuna	Barrio donde se tomó la muestra	Coordenadas
6	La Gaviota	4.454375, -75.180932
	Entre Ríos	4.446146, -75.188868
	Cañaveral	4.449237, -75.184412
	Plazas del Bosque	4.448963, -75.201540
	Los Mandarinos	4.453173, -75.203239
7	Salado	4.449820, -75.146532
	San Pablo	4.447365, -75.159341
	Santa Ana	4.443637, -75.164304
	Urb. Portales del Norte	4.447369, -75.150075
	Modelia II	4.450373, -75.133391
8	Topacio	4.440942, -75.162977
	Caminos del Norte	4.443090, -75.173774
	Ciudadela Simón Bolívar	4.434414, -75.182698
	El Bunde	4.441160, -75.178343
	Ciudadela Simón Bolívar III	4.436170, -75.173660
9	Valparaíso	4.439268, -75.187921
	Jordán 3ra Etapa	4.436080, -75.194837
	Picaleña	4.398124, -75.141801
	Hacienda Piedra Pintada	4.432674, -75.204332
	Santa Rita	4.409308, -75.164390
10	Villa Café	4.427452, -75.189630
	Las Palmas	4.433871, -75.215875
	Montealegre	4.436033, -75.216881
	La Francia	4.433538, -75.221728
	Santa Helena	4.431488, -75.214161
11	Hipódromo	4.438397, -75.224590
	12 de octubre	4.431223, -75.230947
	Los Mártires	4.427266, -75.218032
	Refugio	4.427819, -75.233129
	Las Brisas	4.428634, -75.226832
12	Bosque	4.427137, -75.221676
	Ricaute	4.430935, -75.243748
	Galán	4.430415, -75.242418
	Kennedy	4.427426, -75.241778
	Yuldaima	4.433504, -75.238963

Comuna	Barrio donde se tomó la muestra	Coordenadas
13	Granada	4.421427, -75.257337
	Miramar	4.425848, -75.252700
	Boquerón	4.414616, -75.263979
	San Isidro	4.427462, -75.256117

Fuente: Los autores.

Figura 12. Ubicación de muestras de carnes positivas en la ciudad de Ibagué.



Fuente: Los autores.

Tabla 14. Resultados de la detección de muestras de carne.

Barrio	Fecha de Compra	Resultados n-PCR		
		Res	Pollo	Cerdo
Gaitán Parte Alta	24/04/2017	Positivo	Positivo	Negativo
Las Palmas	26/04/2017	Negativo	Negativo	Positivo
La Pola	5/05/2017	Positivo	Negativo	Negativo

Barrio	Fecha de Compra	Resultados n-PCR		
		Res	Pollo	Cerdo
Belencito	6/06/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Jordán 8va Etapa	7/06/2017	Positivo	Negativo	Positivo
Salado	7/06/2017	Positivo	Negativo	Positivo
Calarcá	5/07/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Valparaíso	6/07/2017	Negativo	Negativo	Negativo
San Pedro Alejandrino	7/07/2017	Negativo	Negativo	Negativo
12 de octubre	16/07/2017	Negativo	Negativo	Negativo
La Gaviota	19/07/2017	Negativo	Positivo	Negativo
Ricaurte	21/07/2017	Positivo	Negativo	Negativo
Granada	21/07/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Miramar	21/07/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Los Mártires	1/08/2017	Positivo	Positivo	Negativo
Topacio	2/08/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Galán	9/08/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Caminos del Norte	9/08/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Ancón	13/08/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Antonio Nariño	13/08/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Gaitán Parte Baja	22/08/2017	Negativo	Negativo	Negativo
La Campiña	28/08/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Jordán 3ra Etapa	28/08/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Entre Ríos	9/09/2017	Negativo	Positivo	Negativo
Montealegre	9/09/2017	Negativo	Positivo	Negativo
Santa Bárbara	11/09/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Libertador	11/09/2017	Negativo	Positivo	Negativo
La Francia	15/09/2017	Positivo	Negativo	Negativo
San Pablo	15/09/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Santa Helena	13/10/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Kennedy	6/10/2017	Negativo	Positivo	Negativo
San Simón PB	20/10/2017	Negativo	Negativo	Negativo

Onzaga	20/10/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Picaleña	27/10/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Jordán 9na Etapa	29/10/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Santa Ana	2/11/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Cañaveral	2/11/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Refugio	17/11/2017	Positivo	Negativo	Positivo
Ciudadela Simón Bolívar	17/11/2017	Positivo	Positivo	Negativo
Yuldaima	26/11/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Boquerón	26/11/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Belén	3/12/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Hacienda Piedra Pintada	3/12/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Centro	10/12/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Restrepo	12/12/2017	Negativo	Negativo	Negativo
Plazas del Bosque	16/12/2017	Negativo	Negativo	Negativo
El Carmen	16/12/2017	Negativo	Negativo	Negativo
El Bunde	21/12/2017	Negativo	Negativo	Positivo
Arrayanes	21/12/2017	Negativo	Negativo	Negativo
San Isidro	14/01/2018	Negativo	Negativo	Negativo
Las Brisas	14/01/2018	Positivo	Negativo	Negativo
Hipódromo	16/01/2018	Negativo	Negativo	Negativo
Urb. Portales del Norte	16/01/2018	Negativo	Negativo	Negativo
La Aurora	22/01/2018	Negativo	Negativo	Negativo
Santa Rita	23/01/2018	Negativo	Negativo	Negativo
Sorrento	31/01/2018	Positivo	Negativo	Negativo
Jordán 7ma Etapa	31/01/2018	Negativo	Negativo	Negativo
Ciudadela Simón Bolívar III	4/02/2018	Negativo	Negativo	Positivo
Villa Café	4/02/2018	Negativo	Negativo	Negativo
Modelia II	4/02/2018	Negativo	Negativo	Negativo
Bosque	4/02/2018	Positivo	Negativo	Negativo
Los Mandarininos	11/02/2018	Negativo	Positivo	Positivo

Fuente: Los autores.

Los cálculos de estimación de proporción (prevalencia) para cada tipo de carne y los intervalos de confianza se pueden observar en la **Tabla 15**. Los resultados estadísticos mostraron una prevalencia de *T. gondii* del 18,82% para las muestras de carne (35 de 186), siendo la prevalencia más baja en las muestras de carne de pollo (14,52%), seguidas por la carne de res (19,35%) y la más alta correspondió a las muestras de carne de cerdo (22,58%).

Tabla 15. *Estimaciones e intervalos de confianza de las muestras evaluadas.*

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

Fuente: Los autores.

Pese a lo anterior, los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las prevalencias de los tres tipos de muestras evaluadas (**Tabla 15**), es decir, que los tres tipos de carne (res, pollo y cerdo) presentan un riesgo para la salud, pero ninguno significativamente más que otro.

5.3. Discusión

5.3.1. Obtención de ADN

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

5.3.2. Prevalencia en carnes

En los países occidentales se ha considerado tradicionalmente cualquier tipo de carne de animal de sangre caliente como una fuente importante de infección por *Toxoplasma*, el riesgo asociado con el tipo de carne (pollo, cordero, cerdo y ternera, etc.) varía en los países, según los hábitos alimentarios locales (tradiciones) y la prevalencia en los animales destinados al consumo humano (Guo et al., 2017; Papatsiros et al., 2021; Robert-Gangneux & Dardé, 2012; Zrelli et al., 2021).

En reses, pollos y cerdos los quistes pueden sobrevivir entre tres y cuatro meses en corazón y músculo esquelético, estas características de resistencia hacen pensar que la infección y, por tanto, la infectividad persiste en estos animales de abasto (Hill & Dubey, 2002; Lora-Suárez et al., 2007). Lo anterior hace aún más evidente que la carne infectada con *T. gondii* es un foco de infección importante para los seres humanos. En Colombia se ha encontrado que puede ser la fuente de infección para el 25% de los casos de toxoplasmosis durante el embarazo (Díaz et al., 2010).

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

Las diferentes metodologías de producción de los animales, el tamaño de las granjas, las condiciones sanitarias y de bioseguridad, además de la presencia de insectos (como cucarachas o insectos coprófagos), animales silvestres y foráneos, especialmente felinos seropositivos y roedores infectados; asimismo, el sistema de control empleado, las fuentes de agua, la cercanía a las poblaciones urbanas y el uso de productos concentrados fabricados con materias primas de origen

animal o vegetal que pueda estar contaminado podrían tener relación con la prevalencia del parásito en las distintas especies estudiadas.

A continuación, se analiza cada tipo de carne evaluada y se comparan los resultados con los reportes de diferentes estudios.

5.3.2.1. Prevalencia en carnes de res. Los animales herbívoros, como los bovinos, tienden a infectarse por *T. gondii* consumiendo heno, pasturas, forraje o agua contaminada por ooquistes provenientes de heces de gatos (Alves et al., 2021; Kijlstra & Jongert, 2008).

Para las carnes de res comercializadas en Ibagué se determinó una prevalencia del 19,35%; el nivel encontrado se aproxima al reportado por Lora-Suárez et al. (2007) para la ciudad de Manizales utilizando n-PCR sobre el gen B1 (20% en res); sin embargo, prevalencias con amplias diferencias entre ellas han sido obtenidas incluso para una misma ciudad pero para plantas de sacrificio diferentes como lo muestra el estudio realizado por Franco-Hernandez et al. (2015), usando esta misma metodología de detección en la que dos tipos de plantas de sacrificio presentaron 63% de prevalencia del parásito para la planta tipo 1 (procesamiento de más de 480 bovinos y más de 400 cerdos cada 8 h) y un 10% para la planta tipo 2 (procesamiento de más de 320 bovinos y más de 240 cerdos cada 8 h).

5.3.2.2. Prevalencia en carnes de pollo. Debido a las prácticas de manejo y condiciones de producción intensiva en que son criados los pollos existe una baja prevalencia de la infección por *T. gondii*, pues este tipo de animales, al ser criados en galpones, no están en contacto con heces de gatos como lo pueden estar aquellos animales que deambulan abiertamente; además, debido a que toman el alimento directamente de comederos y no del suelo, que podría estar infectado con ooquistes, se reduce la posibilidad de contraer la infección, sin embargo, queda abierta la posibilidad a su infección por medio de agua contaminada que no es tratada de manera adecuada para su consumo (Campo-Portacio et al., 2014; Liu et al., 2017; Triviño-Valencia et al., 2016; Zrelli et al., 2021).

Reportamos la presencia de *T. gondii* en el 14,52% de las carnes de pollo evaluadas, un porcentaje cercano al reportado por Cárdenas

Pérez et al. (2006) usando la metodología de IFI en muestras de pollo del departamento de Caldas (16%).

Además de lo anterior, se ha visto que a medida que aumenta la edad de los individuos en una población las seroprevalencias aumentan, debido a que ha sido mayor el tiempo de exposición al parásito, ejemplo de esto es el estudio realizado por Juliao-Ruiz et al. (1983), el cual reporta que el 32% de colombianos de entre 0-9 años han estado en contacto y podrían presentar quistes tisulares de *T. gondii* y este porcentaje aumenta al 65% en la población mayor de 60 años; si trasponemos la situación a las aves, específicamente a pollos que se comercializan actualmente, estos al momento de su sacrificio tienen aproximadamente 60 días de vida, por lo que su tiempo de exposición es poco y, por tanto, podría pensarse que este sea un factor determinante para los niveles bajos de prevalencia en las carnes de este tipo.

5.3.2.3. Prevalencia en carnes de cerdo. El cerdo, por ser un animal de hábitos omnívoros y de hurgar en el suelo, puede adquirir *T. gondii* de la misma manera que los herbívoros, además de infectarse por el consumo de ratones que llevan quistes tisulares o la ingesta de insectos con hábitos coprófagos (Kijlstra & Jongert, 2008; Papatsiros et al., 2021). En la actualidad la carne de cerdo es una de las más consumidas por el humano (Lora-Suárez et al., 2007), asimismo, es una de las especies en la que más se ha logrado detectar el parásito con altos niveles de prevalencia, por lo que su carne se ha considerado como la fuente más importante para el hombre de transmisión de *T. gondii* (Dubey, 2009b).

Para la ciudad de Ibagué encontramos una prevalencia del 22,58% de las muestras evaluadas, porcentaje cercano al reportado en lenguas de cerdo por Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al. (2016a) en México (23,2%) usando n-PCR sobre la secuencia SAG1. Ahora bien, a nivel mundial las prevalencias han alcanzado hasta el 96,6% (Bacci et al., 2015; Hernández-Cortazar, Acosta-Viana, Guzmán-Marín et al., 2016a).

5.4. Conclusiones

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

Las carnes analizadas se pueden considerar como alimentos de riesgo potencial para la transmisión de la infección por *Toxoplasma gondii*, según se evidencia en la prevalencia encontrada en el presente estudio y reportada en otros. Por lo anterior, se hace necesario educar sobre este y otros parásitos en la región.

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

Consideraciones finales

Toxoplasma gondii es un parásito que pasa desapercibido y, en ocasiones, solo se conoce la infección y la enfermedad cuando es demasiado tarde. Como ya lo mencionamos no hay pruebas disponibles que puedan determinar la fuente de infección, por lo tanto, no es posible estimar de manera exacta en qué proporción se adquiere la infección de una u otra fuente de las expuestas anteriormente (Dubey et al., 2011; Guo et al., 2015).

La prevalencia del parásito en distintas especies de producción pecuaria está ligada al tamaño de las granjas, las condiciones sanitarias y de bioseguridad que estas presentan, por lo que se hace evidente un mayor control de las condiciones de cría de los distintos tipos de carne animal que consume el hombre.

Sin embargo, para enfrentar la toxoplasmosis, en primer lugar, se debe concientizar y educar a toda la población colombiana, en especial la población con mayor riesgo de infección como las mujeres embarazadas y los pacientes inmunocomprometidos (Díaz et al., 2010; Opsteegh et al., 2015). Pero dicha formación no solo debería ser sobre *Toxoplasma gondii*, sino el amplio número de parasitosis de origen zoonótico que puede afectar al humano.

Además de lo anterior, con el fin de minimizar las infecciones por consumo de alimentos contaminados por malos manejos, los colombianos deberían recibir capacitaciones en manipulación de alimentos. Para *T. gondii*, incluso en la preparación, se puede presentar contaminación cruzada, pues se ha detectado este parásito en superficies empleadas para la preparación de alimentos (Luna et al., 2019).

Referencias Bibliográficas

- Adamska, M. (2018). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in natural surface water bodies in Poland. *Journal of Water and Health*, 16(4), 657–660. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.236>
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., ... & Spiegel, F. W. (2013). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryote Microbiology*, 59(5), 1–45. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Afonso, E., Thulliez, P., Pontier, D. & Gilot-Fromont, E. (2007). Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: Not all prey species are equal. *Parasitology*, 134(14), 1963–1971. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003320>
- Afonso, E., Lemoine, M., Poulle, M. L., Ravat, M. C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Rabilloud, M., Riche, B. & Gilot-Fromont, E. (2008). Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 1017–1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.01.004>
- Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P. & Dardé, M.L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(5), 684–689. <https://doi.org/10.1086/342663>
- Ajzenberg, D., Dumètre, A. & Dardé, M.L. (2005). Multiplex PCR for Typing Strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1940–1943. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1940-1943.2005>

- Ajzenberg, D., Yera, H., Marty, P., Paris, L., Dalle, F., Menotti, J., Aubert, D., Franck, J., Bessi res, M., Quinio, D., Pelloux, H., Delhaes, L., Desbois, N., Thulliez, P., Robert-Gangneux, F., Kauffmann-Lacroix, C., Pujol, S., Rabodonirina, M., Bougnoux, M., ... Villena, I. (2009). Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Toxoplasmosis in Immunocompromised Patients and Correlation with Clinical Findings. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(8), 1155–1167. <https://doi.org/10.1086/597477>
- Al-Kappany, Y. M., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Kwok, O. C. H., Abu-Elwafa, S., Hilali, M. & Dubey, J. P. (2010). High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: isolation of viable *Toxoplasma gondii*, tissue distribution, and isolate designation. *The Journal of Parasitology*, 96(6), 1115–1118. <https://doi.org/10.1645/GE-2554.1>
- Alcaldía Municipal de Ibagué. (2014). Decreto 0823 del 23 de diciembre de 2014.
- Alcaldía Municipal de Ibagué. (2016). *Plan de Desarrollo 2016-2019*.
- Alcaldía Municipal de Ibagué. (2018). *Alcaldía Municipal de Ibagué/Localización*. Sitio web. Secretaria Administrativa. <http://www.ibague.gov.co/portal/seccion/contenido/index.php?type=3 &cnt=53>
- Alcaldía Municipal de Ibagué. (2020). *Ibagué Vibra - Localización*. <https://ibague.gov.co/portal/seccion/contenido/index.php?type=3 &cnt=53>
- Almeria, S. & Dubey, J. P. (2021). Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. *Research in Veterinary Science*, 135, 371–385. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.019>
-  lvarez, C., de la Torre, A., Vargas, M., Herrera, C., Uribe-Huertas, L. D., Lora-Suárez, F. M. & Gómez-Marín, J. E. (2015). Striking Divergence in *Toxoplasma* ROP16 Nucleotide Sequences From Human and Meat Samples. *The Journal of Infectious Diseases*, 211(12), 2006–2013. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu833>

- Alves, L., Lima, J., Melo, J., de Castro, A. M., Soares, V., Rossi, G., Teixeira, W., Ferreira, L., Cruz, B., Felippelli, G., Oliveira, V., Brom, P., Krawczak, F., da Costa, A. J. & López, W. (2021). Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* in cows and associated risk factors. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1), 76. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02495-0>
- Aramini, J. J., Stephen, C., Dubey, J. P., Engelstoft, C., Schwantje, H. & Ribble, C. S. (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and Infection*, 122(2), 305–315. <https://doi.org/10.1017/s0950268899002113>
- Aubert, D. & Villena, I. (2009). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 290–295. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200023>
- Awobode, H. O., Ohiolei, J. A., Adekeye, T. A., Adeyi, A. O. & Anumudu, C. I. (2020). Shedding proportion of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in feral cats and soil contamination in Oyo State, Nigeria. *Parasite Epidemiology and Control*, 11, e00181. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00181>
- Bacci, C., Vismarra, A., Mangia, C., Bonardi, S., Bruini, I., Genchi, M., Kramer, L. & Brindani, F. (2015). Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 202, 54–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.002>
- Bahia-Oliveira, L. M. G., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C. F., Oré-fice, F. & Addiss, D. G. (2003). Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 55–62. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>
- Bahia-Oliveira, L., Gómez-Marín, J. E. & Shapiro, K. (2017). Global Water Pathogen Project. In R. Fayer & W. Jakubowski (Eds.), *Global Water Pathogen Project*. UNESCO.

- Barrios, J. E., Duran-Botello, C. & González-Velásquez, T. (2012). Nephrotic syndrome with a nephritic component associated with toxoplasmosis in an immunocompetent young man. *Colombia Médica (Cali, Colombia)*, 43(3), 226–229.
- Black, M. W. & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(3), 607–623. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>
- Blader, I., Coleman, B., Chen, C., Gubbels, M. & Hill, C. (2016). *The lytic cycle of Toxoplasma gondii: 15 years later*. 463–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>
- Blanco, P. J., Assia-Mercado, Y. M., Montero-Perez, Y. M. & Orozco-Mendez, K. E. (2011). ELFA IgG anti-Toxoplasma y PCR anidada para el diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres gestantes de Sincelejo, Colombia. *Infectio*, 15(4), 253–258. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70739-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70739-1)
- Botero, D. & Restrepo, M. (2012). *Parasitosis Humanas* (5ta ed.). Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Boughattas, S., Ayari, K., Sa, T., Aoun, K. & Bouratbine, A. (2014). Survey of the parasite *Toxoplasma gondii* in human consumed ovine meat in Tunis City. *PLoS ONE*, 9(1), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085044>
- Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P. & Boothroyd, J. C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(8), 1787–1792. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.8.1787-1792.1989>
- Camossi, L. G., Greca-Júnior, H., Correa, A. P. F. L., Richini-Pereira, V. B., Silva, R. C., Da Silva, A. V. & Langoni, H. (2011). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.007>

- Campo-Portacio, D. M., Discuviche-Rebolledo, M. A., Blanco-Tuiran, P. J., Montero-Pérez, Y. M., Orozco-Méndez, K. E. & Assia-Mercado, Y. M. (2014). Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen *B1* en carnes de consumo humano. *Infectio*, 18(3), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.05.001>
- Campo-Portacio, D. M., Guerrero-Velásquez, L. F., Castillo-García, A. P., Orozco-Méndez, K. & Blanco-Tuirán, P. J. (2021). Detección de *Toxoplasma gondii* en agua para el consumo humano proveniente de jagüeyes del área rural del municipio de Sincelejo. *Biomédica*, 41(Supl. 1), 82–99. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5858>
- Cañón-Franco, W. A., López-Orozco, N., Gómez-Marín, J. E. & Dubey, J. P. (2014). An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. *Parasites & Vectors*, 7, 427. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-427>
- Capuano, D. M., Okino, M. H., Bettini, M. J. do C., Takayanagui, O. M., Lazzarini, M. P., Castro, A. A. M., Ferreira, F. L. & Takayanagui, A. M. (2002). Busca ativa de teniase e de outras enteroparasitoses em manipuladores de alimentos no município de Ribeirao Preto, SP, Brasil. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 61(1), 33–38. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-do-instituto-adolfo-lutz/articulo/busca-ativa-de-teniase-e-de-outras-enteroparasitoses-em-manipuladores-de-alimentos-no-municipio-de-ribeirao-preto-sp-brasil>
- Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S., Braccaglia, G., Normanno, G., Putignani, L. & Giangaspero, A. (2017). Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiology*, 67, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.006>
- Cárdenas-Pérez, J. E., Aricapa-Giraldo, H. J., Ríos-Candelo, S. M., Guevara-Garay, L. A., Meza-Osorio, J. A. & Correa-Salgado, R. A. (2006). Prevalencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en cuatro especies de consumo humano en Caldas-Colombia antibody prevalence in species of human consumption in Caldas, Colombia. *Biosalud*, 5, 33–42.

- Ceballos, G., List, R., Medellín, R. & Pacheco, J. (2010). *Los felinos en América cazadores elegantes*.
- Centers for Disease Control and Prevention (2016), Parasites-Neglected Parasitic Infections (NPIs). Fecha de consulta: 17 de enero de 2017
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018). *Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors*. <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Parasites - Toxoplasmosis (Toxoplasma infection)*. https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/health_professionals/index.html
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Toxoplasmosis - Biology*. <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>
- Chabbert, E., Lachaud, L., Crobu, L. & Bastien, P. (2004). Comparison of Two Widely Used PCR Primer Systems for Detection of Toxoplasma in Amniotic Fluid, Blood, and Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1719–1722. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1719>
- Cook, A. J. C. (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. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>
- Cortés, A. D. & Aguirre, N. (2018). Toxoplasmosis aguda diseminada fatal en una paciente adulta inmunocompetente proveniente del Pacífico colombiano. *Biomédica*, 38, 19–23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.4087>
- Cortés-Cortés, L. J., Hernández-Castro, D. C., Mantilla, M., Medina, M. I. & Duque, S. (2014). Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección del gen *B1* de *T. gondii*. *NOVA*, 12, 137–141.
- Cortéz, J. A., Gómez-Marín, J. E., Silva, P. I., Arévalo, L., Arévalo-Rodríguez, I., Álvarez, M. I., Beltrán, S., Corrales, I. F., Muller, E. A., Ruiz, G. & Gómez, P. I. (2012). Guía de atención integral para la prevención,

detección temprana y tratamiento de las complicaciones del embarazo, parto y puerperio: sección toxoplasmosis en el embarazo. *Infectio*, 16(4), 230–246.

Costa, J. M., Alanio, A., Moukoury, S., Clairet, V., Debruyne, M., Poveda, J.D. & Bretagne, S. (2013). Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluids based on *B1* gene polymorphism using minisequencing analysis. *BMC Infectious Diseases*, 13, 552. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-552>

Cruz-Quevedo, M., Hernández-Cruz, A. & Dorta-Contreras, A. J. (2019). El nexo entre biología, respuesta inmune y clínica en la infección por *Toxoplasma gondii*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 38(4), e256. <http://www.revibiomedica.sld.cu/index.php/ibi/article/view/256>

da Silva, A. V., de Oliveira, M. A., Pezerico, S. B., Domingues, P. F. & Langoni, H. (2005). Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. *Parasitología Latinoamericana*, 60, 65–68. <https://doi.org/10.4067/S0717-77122005000100011>

da Silva, P. D. C., Shiraishi, C. S., da Silva, A. V., Gonçalves, G. F., Sant'Ana, D. D. M. G. & Araújo, E. J.D. A. (2010). *Toxoplasma gondii*: A morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine. *Experimental Parasitology*, 125(4), 380–383. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.004>

de la Torre, A., Sauer, A., Pfaff, A. W., Bourcier, T., Brunet, J., Speeg-Schatz, C., Ballonzoli, L., Villard, O., Ajzenberg, D., Sundar, N., Grigg, M. E., Gómez-Marín, J. E. & Candolfi, E. (2013). Severe South American Ocular Toxoplasmosis Is Associated with Decreased Ifn- γ /Il-17a and Increased Il-6/Il-13 Intraocular Levels. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(11), e2541. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002541>

de la Torre, A., Facio-Lince, L. & López de Mesa, C. (2018). Toxoplasmosis ocular en Colombia: 10 años de aportes investigativos. *Revista Sociedad Colombiana De Oftalmología*, 51(1), 11–22.

- de Moura, L., Bahia-Oliveira, L. M. G., Wada, M. Y., Jones, J. L., Tuboi, S. H., Carmo, E. H., Ramalho, W. M., Camargo, N. J., Trevisan, R., Graça, R. M. T., da Silva, A. J., Moura, I., Dubey, J. P. & Garrett, D. O. (2006). Water-borne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 326–329. <https://doi.org/10.3201/eid1202.041115>
- de Souza, C. Z., Rafael, K., Sanders, A. P., Tiyo, B. T., Marchioro, A. A., Colli, C. M., Gomes, M. L. & Falavigna-Guilherme, A. L. (2016). An alternative method to recover *Toxoplasma gondii* from greenery and fruits. *International Journal of Environmental Health Research*, 26(5–6), 600–605. <https://doi.org/10.1080/09603123.2016.1227960>
- de Wit, L. A., Kilpatrick, A. M., Van-Wormer, E., Croll, D. A., Tershy, B. R., Kim, M. & Shapiro, K. (2020). Seasonal and spatial variation in *Toxoplasma gondii* contamination in soil in urban public spaces in California, United States. *Zoonoses and Public Health*, 67(1), 70–78. <https://doi.org/10.1111/zph.12656>
- Derouin, F., Howe, D. K. & Honore, S. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with Determination of Genotypes of *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1411–1414. [https://doi.org/0095-1137/97/\\$04.0010](https://doi.org/0095-1137/97/$04.0010)
- Díaz, L., Zambrano, B., Chacón, G., Rocha, A. & Díaz, S. (2010). Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 70(3), 190–205. [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(14\)69287-0](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(14)69287-0)
- Dos-Santos, C. B., de Carvalho, A. C. F. B., Ragozo, A. M., Soares, R. M., Amaku, M., Yai, L. E. O., Dubey, J. P. & Gennari, S. M. (2005). First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 131, 207–211. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.039>
- Dubey, J. P. (2009a). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>

- Dubey, J. P. (2009b). Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018>
- Dubey, J. P., Darrington, C., Tiao, N., Ferreira, L. R., Choudhary, S., Molla, B., Saville, W. J. a, Tilahun, G., Kwok, O. C. H. & Gebreyes, W. (2013). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from Addis Ababa, Ethiopia. *The Journal of Parasitology*, 99(1), 56–58. <https://doi.org/10.1645/GE-3229.1>
- Dubey, J. P. & Lappin, M. (1998). *Infectious diseases of dog and cat* (C. E. Greene (Ed.); 2nd ed.). Philadelphia: WB Saunders.
- Dubey, J. P., Navarro, I. T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R. L., Kawabata, H. H., Vianna, M. C. B., Kwok, O. C. H., Shen, S. K., Thulliez, P. & Lehmann, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *Journal of Parasitology*, 90(4), 721–726. <https://doi.org/10.1645/GE-382R>
- Dubey, J. P., Rajendran, C., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., Villena, I., Zhou, H., Su, C. & Jones, J. L. (2011). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology*, 41(8), 827–833. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.006>
- Dumètre, A. & Dardé, M. L. (2003). How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), 651–661. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00071-8)
- Dumètre, A. & Dardé, M. L. (2005). Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *Journal of Microbiological Methods*, 61(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.11.024>
- Dumètre, A. & Dardé, M. L. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the

- sporocysts. *Parasitology Research*, 101(4), 989–996. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0573-0>
- Enriquez-Marulanda, A., Valderrama-Chaparro, J., Parrado, L., Vélez, J. D., Granados, A. M., Orozco, J. L. & Quiñones, J. (2017). Cerebral toxoplasmosis in an MS patient receiving Fingolimod. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 18, 106–108. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.05.004>
- Fabiani, S., Pinto, B. & Bruschi, F. (2013). Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: Can serological studies establish a clear relationship? *Neurological Sciences*, 34(4), 417–425. <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1197-4>
- Ferra, B., Holec-Gąsior, L. & Kur, J. (2015). Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. *Parasitology International*, 64(5), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.03.004>
- Ferreira, F. P., Caldart, E. T., Freire, R. L., Mitsuka-Breganó, R., Freitas, F. M. de Miura, A. C., Mareze, M., Martins, F. D. C., Urbano, M. R., Seifert, A. L. & Navarro, I. T. (2018). The effect of water source and soil supplementation on parasite contamination in organic vegetable gardens. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180050>
- Franco-Hernandez, E. N., Acosta, A., Cortés-Vecino, J. & Gómez-Marín, J. E. (2015). Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. *Parasitology Research*, November. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4790-7>
- Freyre, A. & Falcón, J. (1990). Perfil de la transmisión de toxoplasmosis en algunos países de latinoamérica. *Veterinaria*, 25, 5–13.
- Giraldo-Ospina, B., Garzón-Castaño, S. C., López-Muñoz, D. F., Cardozo-Rios, L. & Millán-Benavidez, N. (2019). Seroprevalencia de

anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en mujeres de 18 años de una localidad de Colombia. *Ginecol Obstet Mex*, 87(6), 356–361. <https://doi.org/10.24245/gom.v87i6.2627>

Gómez-Marín, J. E., de la Torre, A., Angel-Muller, E., Rubio, J., Arenas, J., Osorio, E., Nuñez, L., Pinzon, L., Méndez-Córdoba, L. C., Bustos, A., de la Hoz, I., Silva, P., Beltran, M., Chacon, L., Marrugo, M., Manjarrés, C., Baquero, H., Lora, F., Torres, E., ... Castaño, G. (2011). First Colombian Multicentric Newborn Screening for Congenital Toxoplasmosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), e1195. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001195>

Gómez, F. (2004). *Estudio sobre la toxoplasmosis en Andorra y el Alto Urgel*. Universidad de Barcelona.

Gómez-Marín, J. E., Zuluaga, J. D., Pechené-Campo, E. J., Triviño, J. & de la Torre, A. (2018). Polymerase chain reaction (PCR) in ocular and ganglionic toxoplasmosis and the effect of therapeutics for prevention of ocular involvement in South American setting. *Acta Tropica*, November 2017, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.013>

Grandía G., R., Entrena G., Á. & Cruz H., J. (2013). Toxoplasmosis en *Felis catus*: Etiología, epidemiología y enfermedad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i2.2469>

Guo, M., Dubey, J. P., Hill, D., Buchanan, R. L., Gamble, H. R., Jones, J. L. & Pradhan, A. K. (2015). Prevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Meat Animals and Meat Products Destined for Human Consumption. *Journal of Food Protection*, 78(2). <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-328>

Guo, M., Lambertini, E., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Gamble, H. R., Jones, J. L. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.038>

- Halonen, S. K. & Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. In *Handbook of clinical neurology* (pp. 125–145). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>
- Hashemi-Fesharki, R. (1996). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle , sheep and goats in Iran. *Veterinary Parasitology*, 61, 1–3. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00818-7](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00818-7)
- Hernández-Cortazar, I. B., Acosta-Viana, K. Y., Guzmán-Marín, E., Ortega-Pacheco, A., Torres-Acosta, J. F. & Jimenez-Coello, M. (2016a). Presence of *Toxoplasma gondii* in Pork Intended for Human Consumption in Tropical Southern Mexico. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(12), 695–699. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2165>
- Hernández-Cortazar, I. B., Acosta-Viana, K. Y., Guzmán-Marín, E., Segura-Correa, J. C., Ortega-Pacheco, A., Carrillo-Martínez, J. R., González-Losa, M., Conde-Ferraz, L. & Jimenez-Coello, M. (2016b). *Toxoplasma gondii* in women with recent abortion from Southern Mexico. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(3), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)61012-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)61012-X)
- Hill, D. & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(10), 634–640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- Houldcroft, C. J. & Underdown, S. J. (2016). Neanderthal genomics suggests a pleistocene time frame for the first epidemiologic transition. *American Journal of Physical Anthropology*, 160(3), 379–388. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22985>
- Howe, D. K. & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages : Correlation of Parasite Genotype with Human Disease Function p30 Surface Antigen p22 Surface Antigen Rhoptry protein Unknown cDNA Unknown Unknown cDNA. *The Journal of Infectious Diseases*, 1561–1566.
- Igreja, J. A. S. L., Rezende, H. H. A., Melo, J., Garcia, J. L., Martins, F. D. C.

- & Castro, A. M. (2021). Copro-PCR in the detection and confirmation of *Toxoplasma gondii* oocysts in feces of stray and domiciled cats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 30(2). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612021022>
- Jones, C. D., Okhravi, N., Adamson, P., Tasker, S. & Lightman, S. (2000). Comparison of PCR Detection Methods for *B1*, *P30* and *18S rDNA* Genes of *T. gondii* in Aqueous Humor. *Investigative Ophthalmology*, 41(3), 634–644. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8)
- Jones, J. L. & Dubey, J. P. (2010). Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. *Experimental Parasitology*, 124(1), 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>
- Jones, J. L. & Dubey, J. P. (2012). Foodborne Toxoplasmosis. *Journal of Food Safety*, 55(1), 845–851. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00063.x>
- Juliao-Ruiz, O., Corredor-Arjona, A. & Moreno-Moreno, G. S. (1983). *Estudio Nacional de Salud, Toxoplasmosis en Colombia*.
- Käferstein, F. & Abdussalam, M. (1999). Food safety in the 21st century. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(4), 347–351. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10327714>
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2008). Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *International Journal for Parasitology*, 38(12), 1359–1370. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.002>
- Kijlstra, A. & Jongert, E. (2009). Toxoplasma-safe meat: close to reality? *Trends in Parasitology*, 25(1), 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.008>
- Kim, K. (2015). A Bradyzoite is a Bradyzoite is a Bradyzoite? *Trends in Parasitology*, 31(12), 610–612. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.005>
- Kniel, K. E., Lindsay, D. S., Sumner, S. S., Hackney, C. R., Pierson, M. D. & Dubey, J. P. (2002). Examination of attachment and survival of

- Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *The Journal of Parasitology*, 88(4), 790–793. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0790:EOAASO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0790:EOAASO]2.0.CO;2)
- Kourenti, C. & Karanis, P. (2006). Evaluation and applicability of a purification method coupled with nested PCR for the detection of *Toxoplasma* oocysts in water. *Letters in Applied Microbiology*, 43(5), 475–481. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02008.x>
- Kourenti, C., Heckerroth, A., Tenter, A. & Karanis, P. (2003). Development and Application of Different Methods for the Detection of *Toxoplasma gondii* in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 102–106. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.102-106.2003>
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B. & Myjak, P. (2012). The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1414-8>
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Modzelewska, E., Dumètre, A., Szostakowska, B. & Myjak, P. (2009). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil samples using molecular methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 28(6), 599–605. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0681-5>
- Lester, D. (2012). *Toxoplasma gondii* and Homicide. *Psychological Reports*, 111(1), 196–197. <https://doi.org/10.2466/12.15.16.PR0.111.4.196-197>
- Liberg, O., Sandell, M., Pontier, D. & Natoli, E. (2000). Density, spatial organization and reproductive tactics in the domestic cat and other felids. In D. C. Turner & P. Bateson (Eds.), *The Domestic Cat: The Biology of its Behavior* (pp. 119–147). Cambridge: Cambridge University Press
- Lilly, E. L. & Wortham, C. D. (2013). High prevalence of *Toxoplasma gondii*

- oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. *Parasites & Vectors*, 6(1), 266. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-266>
- Liu, X. C., He, Y., Han, D. G., Zhang, Z. C., Li, K., Wang, S., Xu, L. X., Yan, R. F. & Li, X. R. (2017). Detection of *Toxoplasma gondii* in chicken and soil of chicken farms in Nanjing region, China. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0277-3>
- López, A. P., Cardoso, L. & Rodrigues, M. (2008). Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Veterinary Parasitology*, 155(3–4), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.007>
- López, C., Díaz, J. & Gómez, J. (2005). Factores de riesgo en mujeres embarazadas, infectadas por *Toxoplasma gondii* en Armenia Colombia. *Rev. Salud Pública*, 7(2), 180–190.
- Lora-Suárez, F. M., Aricapa, H., Perez J. E., Arias, L., Idarraga, S., Mier, D. & Gómez-Marín, J. E. (2007). Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. *Infectio*, 11(3), 117–123.
- Luft, B. J., Hafner, R., Korzun, A. H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E. M., Bourland, D. D., Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J., Morlat, P., Vilde, J. L. & Remington, J. S. (1993). Toxoplasmic Encephalitis in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 329(14), 995–1000. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291403>
- Luna, J. C., Zamora, A., Hernández-Arango, N., Muñoz-Sánchez, D., Pinzón, M. I., Cortés-Vecino, J. A., Lora-suarez, F. & Gómez-Marín, J. E. (2019). Food safety assessment and risk for toxoplasmosis in school restaurants in Armenia, Colombia. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06473-w>

- Maharana, B., Panigrahi, M., Baithalu, R. K., Parida, S. & Allaie, I. M. (2010). Toxoplasmosis: Beware of cats !!! *Veterinary World*, 3(5), 247–249. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.3/May/Toxoplasmosis.pdf>
- Maleki, B., Ahmadi, N., Olfatifar, M., Gorgipour, M., Taghipour, A., Abdoli, A., Khorshidi, A., Foroutan, M. & Mirzapour, A. (2021). Toxoplasma oocysts in the soil of public places worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 115(5), 471–481. <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa133>
- Marques, C. S., Sousa, S., Castro, A. & da Costa, J. M. C. (2020). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in fresh vegetables and berry fruits. *Parasites & Vectors*, 13(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04040-2>
- Martín-Hernández, I. & García-Izquierdo, S. M. (2003). Toxoplasmosis en el hombre. *Bioquímica*, 28(3), 19–27.
- Medina-Hernández, J. D., Osorio-Delgado, L. A., Zabala-Gonzalez, D., de Almeida-Vitor, R., Gómez, J. E., Carranza-Martínez, J. C. & Vallejo, G. A. (2022). Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carnes para consumo humano en la ciudad de Ibagué, Colombia. *Biomedica*, 42(1 SE-Artículos originales). <https://doi.org/10.7705/biomedica.6251>
- Meireles, L. R., Galisteo, J., Pompeu, E. & Andrade, H. F. (2004). *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Tropical Medicine and International Health*, 9(8), 876–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01280.x>
- Montoya, J. & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363(9425), 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Morais-Falavigna, L., Rodrigues de Freitas, C. B., Cardoso de Melo, G., Nishi, L., Marques de Araújo, S. & Falavigna-Guilherme, A. L. (2005). Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. *Parasitología Latinoamericana*, 60, 144–149. <https://doi.org/10.4067/S0717-77122005000200007>

- Morisset, S., Peyron, F., Lobry, J. R., Garweg, J., Ferrandiz, J., Musset, K., Gómez-Marín, J. E., de la Torre, A., Demar, M., Carme, B., Mercier, C., Garin, J. F. & Cesbron-Delauw, M. F. (2008). Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes and Infection*, 10(7), 742–747. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.001>
- Nasiru-Wana, M., Mohd-Moklas, M. A., Watanabe, M., Zasmy-Unyah, N., Alhassan-Abdullahi, S., Ahmad-Issa Alapid, A., Nordin, N., Basir, R. & Abd-Majid, R. (2020). Molecular Detection and Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Cat Faeces from Klang Valley, Malaysia, Using B1 and REP Genes in 2018. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/pathogens9070576>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2012). *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria*. <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- Opsteegh, M., Kortbeek, T. M., Havelaar, A. H. & van der Giessen, J. W. B. (2015). Intervention Strategies to Reduce Human *Toxoplasma gondii* Disease Burden. *Clinical Infectious Diseases*, 60(1), 101–107. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu721>
- Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K. & Evers, E. G. (2011). A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International journal of food microbiology*, 150(2-3), 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.022>
- Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K. Y., Guzmán-Marín, E., Uitzil-Álvarez, B., Rodríguez-Buenfil, J. C. & Jimenez-Coello, M. (2011). Infection dynamic of *Toxoplasma gondii* in two fattening pig farms exposed to high and low cat density in an endemic region. *Veterinary Parasitology*, 175(3–4), 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.018>
- Osorio-Delgado, L. A. (2019). *Detección molecular de Giardia duodenalis, Blastocystis spp, Toxoplasma gondii y Cryptosporidium spp. en frutas*

y hortalizas comercializadas en la ciudad de Ibagué. Universidad del Tolima.

- Papatsiros, V. G., Athanasiou, L. V, Kostoulas, P., Giannakopoulos, A., Tzika, E. & Billinis, C. (2021). *Toxoplasma gondii* Infection in Swine: Implications for Public Health. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0039>
- Pappas, G., Roussos, N. & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1385–1394. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>
- Patitucci, A. N., Pérez, M. J., Barril, G., Cárcamo, C. M. & Muñoz, A. (2006). Detección de anticuerpos séricos contra *Toxoplasma gondii* (Nicolle y Mancaux, 1909) en llamas (*Lama glama* Linneaus, 1758) y alpacas (*Lama pacos* Linneaus, 1758) de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2). <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200013>
- Paula, P., Rodrigues, P. S., Tórtora, J. C., Uchôa, C. M. A. & Farage, S. (2003). Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(4), 535–537. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000400019>
- Pedersen, M. G., Mortensen, P. B., Norgaard-Pedersen, B. & Postolache, T. T. (2012). *Toxoplasma gondii* Infection and Self-directed Violence in Mothers. *Archives of General Psychiatry*, 69(11), 1. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.668>
- Pérez-Grisales, L. J., Cruz-Moncada, M., Peláez-Sánchez, R. & Díaz-Nieto, J. F. (2021). *Toxoplasma gondii* infection in Colombia with a review of hosts and their ecogeographic distribution. *Zoonoses and Public Health*, 68(1), 38–53. <https://doi.org/10.1111/zph.12787>
- Pérez, J. E., Villada-Gómez, J. S., Naranjo-Pérez, O. D. & Castaño, S. V. (2011). Formas alternas de transmisión de *Toxoplasma gondii*. *Biosalud*, 10(2), 123–137.

- Petersen, E., Vesco, G., Villari, S. & Buffolano, W. (2010). What do we know about risk factors for infection in humans with *Toxoplasma gondii* and how can we prevent infections? *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 8–17. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01278.x>
- Pfaff, A. W., Rochet, E., Brunet, J., Sabou, M., Sauer, A., Bourcier, T., Gómez-Marín, J. E. & Candolfi, E. (2014). New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 44(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.007>
- Ponce, N. C. & Gómez-Marín, J. E. (2003). Estandarización y validación clínica de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por el VIH. *Infectio*, 7, 8–14.
- Qian, W., Wang, H., Su, C., Shan, D., Cui, X., Yang, N., Lv, C. & Liu, Q. (2012). Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* strains from stray cats revealed a single genotype in Beijing, China. *Veterinary Parasitology*, 187(3–4), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.026>
- Radke, J. R. & White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 94(2), 237–247. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00074-7)
- Rahdar, M., Samarbaf-Zadeh, A. R. & Arab, L. (2012). Evaluating the prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat and meat products in Ahvaz by PCR method. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(4), 570–573. <https://doi.org/10.5812/jjm.4280>
- Ramírez, A. M., Ríos, Y. K., Galvis, N. F., Entrena, E., Mario, N. V., Rangel, D. M., Araque, M. A., Cabarique, D. M., Murillo, M. & Gómez-Marín, J. E. (2019). Seroprevalencia y detección molecular de *Toxoplasma gondii* en donantes de un banco de sangre de Cúcuta , Colombia. *Biomédica*, 39(Supl.2), 144–156. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4288>

- Ramos-Valencia, O. A. & Vásquez-Arteaga, L. R. (2017). Toxoplasmosis humana, variables y determinantes sociales en un municipio rural en Colombia. In *Salud(i)Ciencia* (Vol. 22). <https://doi.org/10.21840/siic/156178>
- Restrepo-Isaza, M. (2007). Toxoplasmosis: parasitic zoonosis. *CES Med*, 21(Supl 1), 41–48. <http://www.ces.edu.co/descargas/Toxoplasmosis.pdf>
- Rifkin, R. F., Vikram, S., Ramond, J. B. J., Cowan, D. A., Jakobsson, M., Schlebusch, C. M. & Lombard, M. (2020). Ancient DNA of *Rickettsia felis* and *Toxoplasma gondii* implicated in the death of a hunter-gatherer boy from South Africa, 2,000 years ago. *BioRxiv*, 2020.07.23.217141. <https://doi.org/10.1101/2020.07.23.217141>
- Rivera, N. & García, D. (2017). El papel de los gatos en la toxoplasmosis. Realidades y responsabilidades. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(6), 7–18.
- Robert-Gangneux, F. & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264–296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Sacks, J. J. (1982). Toxoplasmosis Infection Associated With Raw Goat's Milk. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 248(14), 1728. <https://doi.org/10.1001/jama.1982.03330140038029>
- Salant, H., Spira, D. T. & Hamburger, J. (2010). A comparative analysis of coprologic diagnostic methods for detection of toxoplasma gondii in cats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 865–870. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0635>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (N. Ford, C. Nolan & M. Ferguson (Eds.); 2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, T. R., Nunes, C. M., Luvizotto, M. C. R., Moura, A. B., López, W. D. Z., Costa, A. J. & Bresciani, K. D. S. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. *Veterinary Parasitology*, 171(1–2), 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.vet-par.2010.02.045>

- Schlüter, D., Däubener, W., Schares, G., Groß, U., Pleyer, U. & Lüder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 917–929. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L. A., VanWormer, E. & Villena, I. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00049. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>
- Shen, C., Zhang, G., Song, X., Xie, S. & Wang, C. (2015). *Toxoplasma gondii* Pneumonia in an Immunocompetent Individual. *The American Journal of the Medical Sciences*, 350(1), 70–71. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000496>
- Shwab, E. K., Zhu, X.-Q., Majumdar, D., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P. & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
- Sibley, L. D., Mordue, D. G., Su, C., Robben, P. M. & Howe, D. K. (2002). Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 357(1417), 81–88. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1017>
- Silva, L. A., Andrade, R. O., Carneiro, A. C. & Vitor, R. (2014). Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS ONE*, 9(2), 3–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090237>
- Simon, J. A., Kurdzielewicz, S., Jeannot, E., Dupuis, E., Marnef, F., Aubert, D., Villena, I. & Pouille, M.-L. (2017). Spatial distribution of soil contaminated with *Toxoplasma gondii* oocysts in relation to the distribution and use of domestic cat defecation sites on dairy farms. *International Journal for Parasitology*, 47(6), 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.01.004>

- Slany, M., Dziedzinska, R., Babak, V., Kralik, P., Moravkova, M. & Slana, I. (2019). *Toxoplasma gondii* in vegetables from fields and farm storage facilities in the Czech Republic. *FEMS Microbiology Letters*, 366(14). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz170>
- Slifko, T. R., Smith, H. V. & Rose, J. B. (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1379–1393. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00128-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00128-4)
- Smith, J. E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: The cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 25(11), 1301–1309. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00067-C](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00067-C)
- Sroka, J., Wójcik-Fatla, A. & Dutkiewicz, J. (2006). Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*, 13(1), 169–175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16841888>
- Stephen S, Pradeep J, Anitharaj V, Janarthanam V. Seroprevalence of toxoplasmosis in voluntary blood donors of Puducherry and surrounding districts of Tamil Nadu. (2017) J Parasit Dis. 2017 Dec;41(4):1158-1161. doi: 10.1007/s12639-017-0949-8. Epub 2017 Jul 25. PMID: 29114158; PMCID: PMC5660049.
- Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W. & Sibley, L. D. (2003). Recent Expansion of *Toxoplasma* Through Enhanced Oral Transmission. *Science*, 299(5605), 414–416. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>
- Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q. & Dubey, J. P. (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 137(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>
- Su, C., Zhang, X. & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, 36(7), 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>

- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Tobie, J., Thomen, L. F., Sawitz, W., D'Antoni, J. S., Peres, C., Faust, E. C., Miller, M. J., Odom, V. & Walker, J. H. (1938). A Critical Study of Clinical Laboratory Technics for the Diagnosis of Protozoan Cysts and Helminth Eggs in Feces 1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, s1-18(2), 169–183. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1938.s1-18.169>
- Torres, J. J. (2013). Prevalencia de infección por *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas, en Valledupar, Cesar. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 3, 31–44.
- Torres, L., Robinson, S., Kim, D., Yan, A., Cleland, T. A. & Bynoe, M. S. (2018). *Toxoplasma gondii* alters NMDAR signaling and induces signs of Alzheimer's disease in wild-type, C57BL/6 mice. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1086-8>
- Triviño-Valencia, J., Lora-Suárez, F. M., Zuluaga, J. D. & Gómez-Marín, J. E. (2016). Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitology Research*, 115(5), 1789–1797. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5>
- Vignau, M., Venturini, L., Romero, J. & Eirás, D. (2005). *En Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos*.
- Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferté, H., Ingland, J. C., Denis-Bisiaux, H., Dondon, J. M., Pisano, E., Ortis, N. & Pinon, J. M. (2004). Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4035–4039. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4035-4039.2004>
- Wang, T., Liu, M., Gao, X. J., Zhao, Z. J., Chen, X. G. & Lun, Z. R. (2011). *Toxoplasma gondii*: The effects of infection at different stages of

- pregnancy on the offspring of mice. *Experimental Parasitology*, 127(1), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.003>
- Webster, J. P. (2010). Dubey, J.P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. *Parasites & Vectors*, 3(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-112>
- Weiss, L. M. & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>
- Wells, B., Shaw, H., Innocent, G., Guido, S., Hotchkiss, E., Parigi, M., Opsteegh, M., Green, J., Gillespie, S., Innes, E. & Katzer, F. (2015). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Research*, 87, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.015>
- Wit, L. A., Kilpatrick, A. M., VanWormer, E., Croll, D. A., Tershy, B. R., Kim, M. & Shapiro, K. (2020). Seasonal and spatial variation in *Toxoplasma gondii* contamination in soil in urban public spaces in California, United States. *Zoonoses and Public Health*, 67(1), 70–78. <https://doi.org/10.1111/zph.12656>
- Yang, Y., Ying, Y., Verma, S. K., Cassinelli, A. B. M., Kwok, O. C. H., Liang, H., Pradhan, A. K., Zhu, X. Q., Su, C. & Dubey, J. P. (2015). Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China. *Veterinary Parasitology*, 211(3–4), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.006>
- Yekkour, F., Aubert, D., Mercier, A., Murat, J.B., Khames, M., Nguewa, P., Ait-Oudhia, K., Villena, I. & Bouchene, Z. (2017). First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria. *Veterinary Parasitology*, 239, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.013>
- Zamora-Vélez, A., Triviño, J., Cuadrado-Ríos, S., Lora-Suarez, F. & Gómez-Marín, J. E. (2020). Detection and genotypes of *Toxoplasma gondii*

DNA in feces of domestic cats in Colombia. *Parasite*, 27, 25. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020023>

Zrelli, S., Amairia, S., Mhadhbi, M., Briki, O., Bouallegue, S., Souissi, F. & Gharbi, M. (2021). High Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Industrial Tunisian Poultry Meat. *Acta Parasitologica*. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00467-4>

Zulpo, D. L., Headley, S. A., Biazzone, L., da Cunha, I. A. L., Igarashi, M., de Barros, L. D., Taroda, A., Cardim, S. T., Bogado, A. L. G., Navarro, I. T. & García, J. L. (2012). Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology*, 131(2), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.006>

Anexos

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

Extracción de ácidos nucleicos por FCAI:

- A 500 μ L de muestra digerida, adicionar el mismo volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) en un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
- Mezclar por inversión suavemente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 3 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo y agregar un volumen igual de Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1).
- Mezclar por inversión durante 5 minutos.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 3 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo, agregar 10% de volumen de acetato de sodio 3 M y el doble de volumen de etanol absoluto frío.
- Mezclar por inversión.
- Colocar el tubo en cama de hielo durante 15 minutos.
- Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 500 μ L de etanol al 70%.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante, dejar secar el pellet y agregar 50 μ L de TE (Tris-EDTA, pH 8,0).
- Almacenar a 4 °C. Hasta la purificación.

Purificación de ADN por Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico:

- Adicionar a la muestra 450 μL de H_2Odd y 2,5 μL de ribonucleasa A (solución de trabajo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Dejar en digestión en baño María durante 1 hora a 37°C.
- Repetir el procedimiento de extracción por el método Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico.
- Resuspender en 50 μL de TE (Tris-EDTA pH 8.0).
- Almacenar a 4°C.

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

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

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

Pesar 40,81 g de acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y llevar a 100 mL de H_2Odd . Medir y ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial, y autoclavar a 15 Lb durante 10 minutos.

Preparación de TE (50 mL):

Mezclar 0,5 mL de Tris-HCl 1M pH 8 y 0,1mL EDTA 0,5M pH 8. Adicionar 49,4 mL de H_2Odd .

Anexo B. Cuantificación por espectrofotometría: NanoDrop.

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

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

Procedimiento:

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

NOTA: Realice la medición del blanco cada 8 muestras.

Anexo C. Electroforesis en gel de agarosa 1%

- Ensamblar la cámara molde del gel y colocar el peine.
- En un frasco de vidrio agregar 1 g de agarosa y llevar a 100 mL con TBE 0,5X nuevo, tapar con vinipel y perforar con una punta.
- Fundir la agarosa en horno microondas durante 3 minutos.
- Completar el volumen perdido con agua destilada.
- Enfriar la agarosa, teniendo cuidado que esta no se gelifique en el frasco, adicionar 1,5 μ L de GelRed (10,000X).
- Servir la agarosa en la cámara desde una esquina para evitar la formación de burbujas y esperar aproximadamente 30 minutos para que gelifique. Cuando el gel está listo, se puede ver translúcido.
- Adicionar en la cuba de electroforesis el buffer de corrido TBE 0,5X.
- Retirar los peines de la cámara molde del gel y colocar el gel en cámara de electroforesis.
- Agregar buffer de carga a las muestras dependiendo del volumen de la muestra.
- Sembrar 10 μ L la muestra en las canaletas (Evite tocar el gel con la puntera).
- Coloque la tapa de la cámara y conecte los cables a la fuente de poder en su respectivo polo.
- Dejar correr la electroforesis a 100 V por ~ 60 minutos (depende del tamaño de la muestra).
- Luego de finalizar el corrido, visualizar en transiluminador con luz UV, tome la fotografía y discuta los resultados sobre esta.

Preparación de TBE:

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

Tabla 16. Componentes de TBE 5X.

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

Fuente: LIPT.

Tabla 17. Preparación de TBE diluido.

Concentración	Volumen			
	500 mL		1000 mL	
	TBE 5X (mL)	H ₂ Odd (mL)	TBE 5X (mL)	H ₂ Odd (mL)
0,5X	50	450	100	900
1X	100	400	200	800

Fuente: LIPT.

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

1. Pesar 9,30 g de EDTA. 2H₂O.
2. Adicionar 30 mL de H₂O y homogenizar.
3. Medir y ajustar el pH con lentejas de NaOH al comienzo y luego con solución de NaOH 1N.
4. Completar los 50 mL con H₂O.
5. Autoclavar a 15psi por 15 minutos.

Buffer de carga:

Para preparar 10 mL de buffer de cargar se pesa 0,025 g de azul de bromofenol (0,25%) y 4 g de sacarosa (40%) y se afora a 10 mL con H₂Odd. La relación es 1 µL de buffer de carga por cada 5 µL de muestra.

Marcador de peso molecular:

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

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

Tabla 18. Componentes para preparar gel de acrilamida al 6%.

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

Fuente: LIPT.

Procedimiento:

- Limpiar vidrios, separadores y cauchos con agua desionizada y etanol 70%, secar con un paño limpio.
- Ensamblar la cámara molde del gel de poliacrilamida.
- Adicionar agua a la cámara, esperar de 1 a 3 minutos, para verificar que no haya filtración. Seguidamente retirar el agua y secarla.
- Mezclar en un recipiente de vidrio limpio los componentes del gel de poliacrilamida.
- Servir la solución de poliacrilamida en la cámara de electroforesis, colocar el peine adecuado, teniendo en cuenta que no se formen burbujas.
- Esperar a que el gel se polimerice.
- Adicionar buffer de carga a las muestras (1 μL de buffer de carga 6X por cada 5 μL de muestra).
- Retirar el peine, lavar las canaletas con agua desionizada y TBE 1X nuevo utilizando jeringa para retirar el exceso de acrilamida.
- Realizar el montaje de la cámara molde en la cámara de electroforesis, agregar TBE 1X en los contenedores de la cámara.
- Sembrar aproximadamente 4 μL de muestra en cada canaleta.
- Conectar los cables a la fuente de poder y dejar a 80 voltios (el tiempo del corrido varía dependiendo del tamaño del gel fragmento y el área del gel).

Preparación de acrilamida al 30%:

Tabla 19. Componentes de la acrilamida al 30%.

Componente	Para preparar 100 mL
Acrilamida	29(g)
NN-metilen-bisacrilamida	1(g)
H ₂ Odd	Aforar a 100 (mL)

Fuente: LIPT.

- Medir los componentes según la **Tabla 19** y se adicionan en un frasco previamente rotulado con la cantidad de H₂Odd a utilizar. Es necesario usar doble guante, tapaboca, careta y bata manga larga como medidas de protección para pesar los componentes, ya que la acrilamida es neurotóxica.
- Adicionar H₂Odd y llevar a baño de María a 37 °C hasta que se disuelva.
- Cubrir con papel aluminio el frasco, rotularlo y almacenarlo a 4 °C.

Preparación de persulfato de amonio 10%:

Pesar 1g de persulfato de amonio y llevar a 10mL con H₂Odd.

Protocolo coloración con nitrato de plata para geles de poliacrilamida al 6%:

Tabla 20. Componentes de las soluciones usadas para la coloración de geles de poliacrilamida al 6%.

Solución Fijadora	
Etanol absoluto	40mL
Ácido acético	1mL
H ₂ Odd	Llevar a 400 mL
Solución con Nitrato de Plata	
Nitrato de plata	0,15 g

Solución fijadora	50 mL
H ₂ Odd	100 mL
Solución Reveladora	
Formaldehido	1 mL
H ₂ Odd	140 mL
NaOH	2 g

Fente: LIPT.

Procedimiento:

- Preparar cada una de las soluciones (fijadora, nitrato de plata y reveladora).
- Cuando el corrido haya finalizado, adicionar la solución fijadora en una bandeja limpia y en ella colocar el gel de poliacrilamida. Desmontar el gel de poliacrilamida retirando los vidrios, verificar la orientación del gel.
- Agitar suavemente durante 5 minutos.
- Retirar la solución fijadora y adicionar la solución de nitrato de plata. Agitar suavemente durante 10 minutos.
- Retirar la solución de nitrato de plata, lavar rápidamente con agua desionizada. Seguidamente, retire el agua.
- Adicionar la solución reveladora y agitar constantemente hasta que sean visibles las bandas y el gel tome la tonalidad deseada.
- Retirar la solución de revelado y adicionar solución fijadora.
- Para fijar el gel, se humedece una hoja de papel celofán con solución fijadora y se cubre un vidrio de montaje. Sobre este se coloca el gel y encima otra hoja de papel celofán humedecido. Evitar la formación de burbujas; una vez deshidratado el gel despegar y recortar.

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