

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.

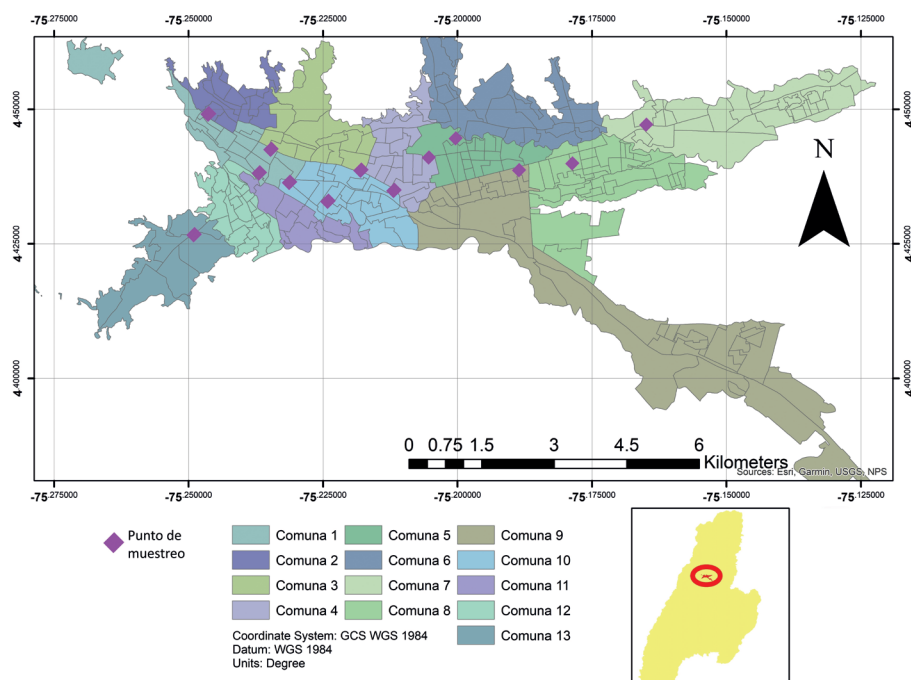
4.1.2. Obtención de la muestra

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, H₂O_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

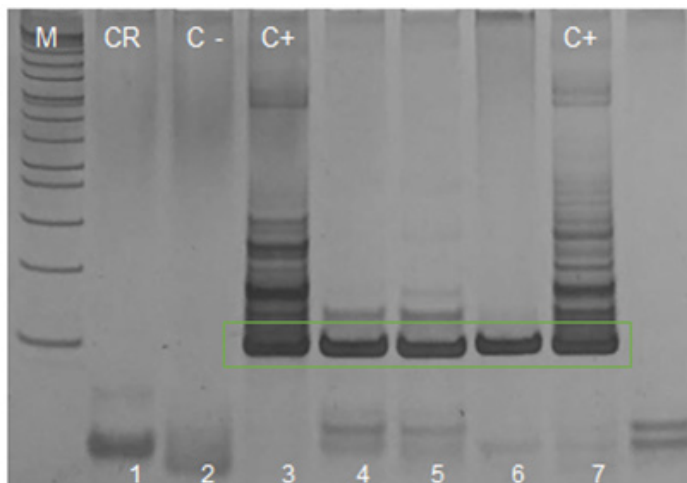
Las cien muestras obtenidas de material vegetal (fresas, apio, cebolla larga, cilantro, zanahoria, lechuga crespa y lisa), fueron sometidas a la extracción de ácidos nucleicos y, posteriormente, a la PCR anidada, logrando la amplificación del material genético de *T. gondii* en 22 de las muestras (**Tabla 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 crespita	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.

