

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/μL) 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.

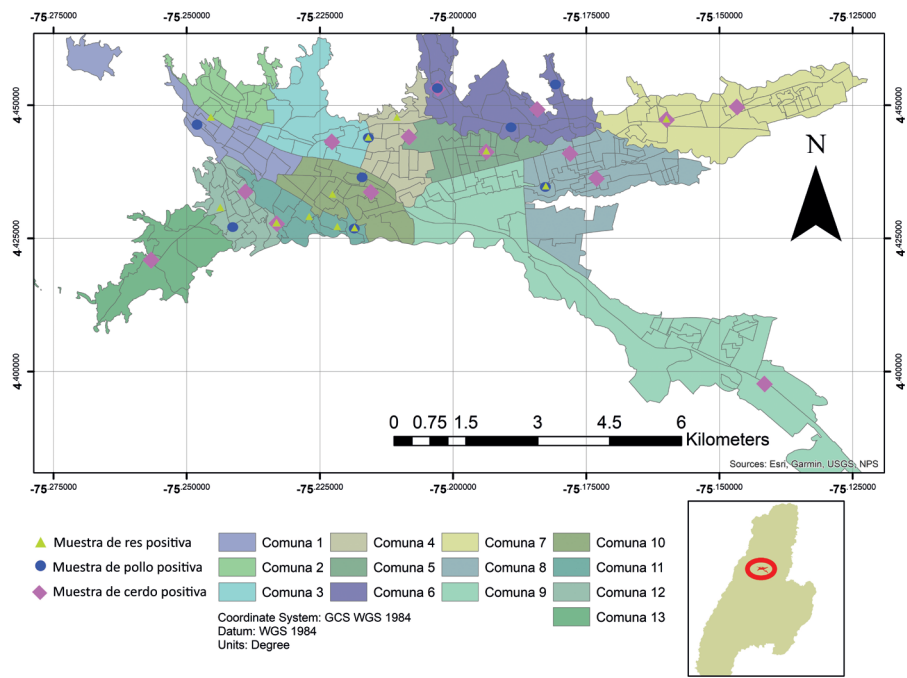
Comuna	Barrio donde se tomó la muestra	Coordenadas
1	La Pola	4.447373, -75.245411
	San Pedro Alejandrino	4.434714, -75.230658
	Libertador	4.446410, -75.247684
	Centro	4.441307, -75.240402
2	Belencito	4.4493334, -75.239221
	Ancón	4.449743, -75.234765
	Santa Bárbara	4.453609, -75.245356
	Belén	4.451084, -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%).