

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD**

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

TESIS:

***Toxoplasma gondii* DETECTADO EN CARNES DE CONSUMO
HUMANO EXPENDIDAS EN LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE
CAJAMARCA.**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: SALUD PÚBLICA

Presentada por:

CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA

Asesor:

PhD. PEDRO LUIS ORTIZ OBLITAS

Cajamarca, Perú

2022



Universidad Nacional de Cajamarca

"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"
Fundada por Ley 140515 del 13 de febrero de 1962

Escuela de Posgrado

La Directora de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias de La Salud, de la Universidad Nacional de Cajamarca, expide la presente:

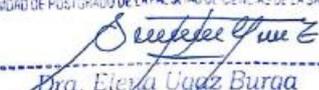
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD:

Que, el Bachiller en Medicina Veterinaria **CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA**, ha sustentado y aprobado su tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias, Mención Salud Pública, titulada: **"Toxoplasma gondii DETECTADO EN CARNES DE CONSUMO HUMANO EXPENDIDAS EN LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE CAJAMARCA"**.

Ha cumplido con los requisitos de originalidad establecidos por la Escuela de Posgrado, para lo cual ha presentado el Reporte de Aplicativo **TURNITIN** con el **15%** de similitud, reporte presentado por su asesor **Ph. D. Pedro Luis Ortiz Oblitas**.

Se otorga la presente constancia, a solicitud del interesado para los fines pertinentes.

Cajamarca, 19 de diciembre de 2023.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Dra. Eleya Ugaz Burga
DIRECTORA

COPYRIGHT @ 2022 by
CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA
Todos los derechos reservados



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD

Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las *10:00* horas, del día 29 de diciembre de dos mil veintidós, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por la **Dra. SARA ELIZABETH PALACIOS SÁNCHEZ**, **Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES**, **Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO**, y en calidad de Asesor el **Dr. PEDRO LUIS ORTIZ OBLITAS**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada **“Toxoplasma gondii DETECTADO EN CARNES DE CONSUMO HUMANO EXPENDIDAS EN LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE CAJAMARCA”**, presentada por el **Bachiller en Medicina Veterinaria CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó **APROBAR**... con la calificación de **Dieciocho (18)... EXCELENTE**... la mencionada Tesis; en tal virtud, el **Bachiller en Medicina Veterinaria CRISTIAN ANGEL HOBÁN VERGARA**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, con Mención en **SALUD PÚBLICA**.

Siendo las *11:20* horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....
Dr. Pedro Luis Ortiz Oblitas
Asesor

.....
Dra. Sara Elizabeth Palacios Sánchez
Jurado Evaluador

.....
Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares
Jurado Evaluador

.....
Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

A mi hijo, Victor Amaru, mi inspiración día a día, perdón por mis ausencias.

Cristian Angel Hobán Vergara

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, a pesar de su ausencia sigue fortaleciéndome para cumplir mis objetivos.

A mi padre, mis hermanos y hermanas, por su confianza, cariño y apoyo en cada momento de mi vida.

A mi asesor, el Dr. Pedro Ortiz Oblitas, por seguir incentivando en mí el camino de la investigación, la responsabilidad y el rigor académico, por su paciencia, conocimiento y amistad.

A Silvia Chilón y Cesar Murga por su apoyo en el trabajo de laboratorio y su amistad sincera.

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca y a todos los docentes que compartieron su conocimiento para culminar mi formación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
INTRODUCCIÓN	x
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3. Justificación de la investigación	2
Objetivos de la investigación	3
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Antecedentes del estudio	4
2.2 Bases teóricas.....	6
2.3 Hipótesis	10
2.4 Variables.....	11
CAPITULO III.....	12
MARCO METODOLÓGICO.....	12
3.1 Diseño y Tipo de estudio.....	12
3.2 Criterio de inclusión y exclusión	12
3.3. Población	12
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	13
3.4.2 Preparación previa a la extracción de ADN	14
3.4.2 Digestión de muestras de carne.....	14
3.4.3 Extracción de ADN de muestras de carne utilizando Fenol – Cloroformo – Alcohol Isoamílico.....	16
CAPÍTULO IV.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
CAPÍTULO V	29
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
5.1 Conclusiones	29
5.2. Recomendaciones.....	29
CAPÍTULO V.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en carne de consumo humano proveniente de bovinos, ovinos y porcinos expendidos en los diferentes mercados del distrito de Cajamarca mediante la amplificación del Gen B1 de *T. gondii*. Para ello se colectó muestras de carne de mercados de abasto del distrito de Cajamarca; seguidamente se realizó la extracción de ADN genómico total de las muestras, mediante el uso de Fenol, Cloroformo, Alcohol isoamílico, el cual fue analizado con respecto a su calidad y cantidad para luego servir de molde para la PCR Anidada con dos pares de cebadores de inicio y reversa los cuales permitieron la amplificación de la secuencia del Gen B1 de *T. gondii*. Se logró detectar la presencia del gen B1 de *T. gondii* en un 25% (13/52) del total de muestras de carnes analizadas. Un 19.05% (4/21) de las muestras positivas fueron de bovino, 37.5% (6/16) fueron de ovino y 20% (3/15) de porcino. Además, se encontró que la mayor frecuencia de carnes positivas (27.2%) procedieron del Mercado San Sebastián (3/11), seguido del Mercado Modelo con 25.81% (8/31), luego el Mercado Central con 16.67% (1/6) y el Mercado San Martín con 25% (1/4). Esta investigación ha demostrado la presencia de *T. gondii* en diferentes tipos de carne de consumo humano comercializados en el distrito de Cajamarca, lo cual significa que la población está en un alto riesgo de infección por este parásito.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, carne, ADN, bovino, ovino, porcino

ABSTRACT

The objective of this research was to detect the presence of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption from cattle, sheep and pigs that is sold in the different markets of the district of Cajamarca through the amplification of Gen B1 of *T. gondii*. For this, the extraction of DNA from meat samples was carried out using Phenol, Chloroform, Isoamyl Alcohol, which was analyzed with respect to its quality and quantity to later serve as a template for the Nested PCR with two pairs of start primers. and reverse which allowed the amplification of the sequence of Gene B1 of *T. gondii*. The presence of the *T. gondii* B1 gene was detected in 25% (13/52) of the total meat samples analyzed. Of the total samples analyzed, 19.05% (4/21) were from cattle, 37.5% (6/16) were from sheep and 20% (3/15) from pigs, it was also found that the highest frequency of positive meats, 27.2 % came from Mercado San Sebastián, which had the highest frequency with 27.27% (3/11) positive meat samples, followed by Mercado Modelo with 25.81% (8/31) of positive samples, then Mercado Central with 16.67% (1/6) of positivity and the Mercado San Martín with 25% (1/4). This research has shown the presence of *T. gondii* in different types of meat for human consumption marketed in the district of Cajamarca, which means that the population is at high risk of infection by this parasite.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, meat, DNA, cattle, sheep, pigs

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias han influido en forma determinante en la evolución de la historia del hombre, siendo en algunos casos causa de alta mortalidad (1). *Toxoplasma gondii* es el agente causal de la Toxoplasmosis, enfermedad considerada como la cuarta entre las veinticuatro más peligrosas para los seres humano (2) y afecta a diferentes especies animales (3), teniendo como hospedador definitivo a los felinos domésticos y salvajes (4), además son también portadores de la forma infectante los bovinos, ovinos, porcinos y las aves (5), animales de abasto que permiten la obtención de proteína necesaria para el desarrollo y supervivencia de los seres humanos, siendo la carne de estos de venta común y un medio de infección de este parásito (6). Se han llevado a cabo varios trabajos relacionados a la seroprevalencia en animales y humanos (7,8) y se ha demostrado que está presente entre el 35% y 50% de la población a nivel mundial (9). Además diferentes trabajos demuestran la presencia del parásito en carne (10–14) y agua (12,15,16). En nuestro país se ha reportado prevalencias sobre el 77.2% (17), sin embargo, no se han realizado estudios que demuestren la presencia del parásito en carnes de consumo humano ni la diversidad genética de este, siendo le Tipo I de *T. gondii* el causante de enfermedad clínica (18). Es en este contexto que el objetivo de este trabajo de investigación fue detectar molecularmente la presencia de *T. gondii* mediante la aplicación de técnicas moleculares que permitan obtener datos reales del nivel de infección que se presenta en las carnes que son expandidas en los mercados de la ciudad de Cajamarca y de esta forma ser un antecedente para futuras investigaciones.

Estructuralmente, esta investigación está constituida por cinco capítulos: en el capítulo I se plantea el problema de la investigación científica, la formulación, justificación y objetivos; en el capítulo II se realiza la descripción del marco teórico empleado para dar sustento a la investigación, en el capítulo III se presenta las hipótesis

y la operacionalización de las variables; el capítulo IV describe la metodología utilizada; y en el capítulo V se hace la presentación de los resultados de la investigación a través de fotografías de los geles obtenido y gráficos con su respectiva discusión de resultados. Finalmente se señalan las conclusiones y las recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema.

Las zoonosis son infecciones transmisibles de los animales al hombre (1). *Toxoplasma gondii* es un protozoo que infecta animales de sangre caliente incluyendo el hombre (19,20), este se infecta por ingestión de alimentos y agua con ooquistes esporulados de *T. gondii* o por transmisión congénita (6,12,20). En humanos es responsable de la pérdida de la visión en al menos un 1% de las personas infectadas (21) y presenta alta morbilidad de fetos y pacientes inmunosuprimidos (22,23). *T. gondii* como hospedadores definitivos a felinos salvajes y domésticos, los que liberan en las heces la forma resistente del parásito (3,24–26). *T. gondii* es prevalente a nivel mundial (9) varía de acuerdo con factores culturales, geográficos, climáticos y de exposición (27). En los seres humanos se encuentra sobre el 35% de la población (9,21) y puede producir esquizofrenia (28) y específicamente en mujeres embarazadas producir muerte fetal y lesiones neurológicas y oculares con consecuencias incapacitantes (22,29). La OMS ha clasificado a *T. gondii* como el cuarto parásito más peligroso de las parasitosis a nivel mundial ocasionadas por el consumo de alimentos (2).

En ese sentido, y siendo Cajamarca un distrito con consumo diario de carne de diferentes especies y contando con varios mercados públicos para su venta, es que se propone determinar la presencia de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano.

1.2 Formulación del problema

Frente a este problema es que se planteó la siguiente pregunta:

¿Existe presencia de *T. gondii* en las carnes de consumo humano expandidas en los mercados del distrito de Cajamarca en el año 2021?

1.3. Justificación de la investigación

Se conoce que *T. gondii* infecta animales de sangre caliente, como bovinos, aves, porcinos y otros, de los cuales su carne se usa para el consumo humano, razón por la cual se han identificado como fuentes de infección. En Cajamarca no existen estudios que indiquen la presencia o ausencia de este protozoo en las carnes que diariamente consume la comunidad. Esta falta de información permite que se expendan carnes que constituyan riesgo de infección por *T. gondii* en consumidores, especialmente de gestantes y pacientes inmunocomprometidos. Por lo tanto, se hace necesario realizar estudios que ayuden a determinar la presencia de *T. gondii* en las carnes de consumo humano que se expenden en los diferentes mercados de Cajamarca mediante la detección del gen B1 de *T. gondii* en muestras de carne de bovino, ovino y porcino, además de determinar la diversidad genética de los linajes de *T. gondii* mediante la Restricción de Fragmentos Polimórficos (RFLP).

Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Determinar la presencia de *T. gondii* en carnes de consumo humano expandidas en los mercados del distrito de Cajamarca, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia del gen B1 de *T. gondii* en carne de bovino, ovino y porcino.
2. Determinar la diversidad genética del gen B1 de *T. gondii* mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción - RFLP

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

Antecedentes Nacionales

En nuestro país se reportan varios estudios relacionados a *T. gondii*, dentro de ellos los realizados en animales en el 2009, Chang (30) en 249 muestras de sangre de llamas, en la sierra central hallando una seroprevalencia moderada de 13.7% (34/249), Cerro et al. (31) sobre la frecuencia de *T. gondii* en Lima en 178 muestras, aplicando dos técnicas, reportando seroreactores en hemaglutinación 11.2% y en inmunofluorescencia indirecta 17.9%, así también el realizado por Chávez et al. (32) en 1119 caprinos hallando una seroprevalencia de 28.15%.

Para el caso de humanos solo existe un trabajo publicado por Silva – Diaz y Díaz - Ginez. (17) en 92 muestras de donantes de sangre en el Hospital II de Tarapoto, hallando una seroprevalencia de 77.2% sugiriendo la posible transmisión del parásito por transfusión sanguínea.

Antecedentes Internacionales

Se han llevado a cabo muchos estudios en el mundo acerca de esta enfermedad, utilizando diferentes técnicas para su detección, siendo la identificación de anticuerpos las principales tanto en humanos como en animales (5,7,33,34). El uso de nuevas técnicas como las de biología molecular son ahora utilizadas para la detección de *T. gondii* (10,11,35–42). Tal es así, el trabajo realizado por Mahami-Oskouei (42) en el que se detecta la presencia del gen B1 de *T. gondii* y la identificación de genotipos por RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism) en 150 muestras de carne de pollo, bovino y ovino en diferentes regiones al noreste de Irán hallando un 26 (17.33%) muestras positivas a *T. gondii*, siendo 4 (8%) de pollo, 8 (16%) de bovino y 14 (28%) de ovino, además de identificar el genotipo I en todos los amplificadas.

Del mismo modo en China realizó un estudio en 2215 mejillones colectados al azar, en los que se realizó la amplificación del gen B1 de *Toxoplasma gondii* en 55 muestras (2.48%) de las muestras analizadas, siendo el primer estudio en confirmar la presencia del parásito en productos acuáticos (43). También se han realizado estudios en vegetales, como el de Slany (44) en 292 muestras de vegetales que incluyen zanahorias, pepinos y lechugas hallando positividad a *T. gondii* en 9.2% (28/292) de muestras analizadas.

En Colombia se realizó un primer estudio en 180 muestras de carne de porcino, bovino y pollo, 20 muestra de cada especie, en las ciudades de Manizales, Pereira y Armenia, para lo cual utilizaron una PCR anidada y luego la amplificación del Gen B1 de *T. gondii*, en las que 95 muestras, es decir el 52.7% amplificaron una región de 160 pares de bases, considerándose positivas, con respecto a la carne de cerdo se detectaron un total de 42 de 60 muestras, lo que representa el 70% de muestras positivas, seguida por las de bovino con 29 de 60, es decir 80% de positividad y 24 de 60 en pollo lo que representa un 70% de positividad por especie (11).

Del mismo modo en Sincelejo – Sucre, Colombia, en el año 2014 se analizaron 120 muestras de carne, 40 de bovino, 40 de porcino y 40 de pollo, hallando positividad en 38 de 120, 32% a la presencia del gen B1 de *T. gondii*, para pollo 13 de 40 muestras positivas, representando el 35%, en cerdo 14 de 40 positivas, que equivale al 35.5% y en bovino 11 de 40, lo que equivale a un el 27.5% (10) de positividad.

En ese mismo año en Irán, Azizi et al., (45) realizó un estudio en muestras de carne y vísceras de 50 bovinos y 70 ovinos, reportando 8.57% de positividad para el primero y 38% para el segundo al análisis molecular, pero antes en el 2010, Asgari et al. (14) detectó una prevalencia similar del 37.5%.

Finalmente, el trabajo realizado por Medina et al. (41) en Ibagué, Colombia menciona presencia del gen B1 de *T. gondii* en 22.5% (14/62) de muestras de carne de porcino y en 19.3% (12/62) muestras de carne de res.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Toxoplasmosis

Es una zoonosis, causada por el parásito intracelular obligado *T. gondii*, el cual fue aislado en un inicio por Charles Nicolle y Manceaux en 1908, de roedores del África identificados como *Ctenodactylus gundii* (4,26). La infección en humanos se ha extendido en todo el mundo y la frecuencia varía mucho según las zonas geográficas y los hábitos alimentarios (12,27,46) .

2.2.2 Etiología

T. gondii ha pasado por múltiples clasificaciones hasta la actual, teniendo como nomenclatura taxonómica más aceptada de este protozoo (esporozoo) la siguiente:

Reino	: Protista
Subreino	: Protozoo
Phylum	: Apicomplexa
Clase	: Coccidia
Familia	: Sarcocystidae
Género	: Toxoplasma
Especie	: <i>Toxoplasma gondii</i>

Fuente: Soulsby 1987 (47)

T. gondii lleva este nombre porque morfológicamente tiene una forma arqueada, además proviene del griego toxon que significa arco y plasma que significa forma (48). El parásito existe en tres formas infectantes por Ooquiste u oocisto: es la forma de resistencia en el medio ambiente y mide de 10 a 12 μm de diámetro. Los taquizoitos o trofozoitos que son de forma semilunar con longitud de 5 a 8 μm y ancho de 3 μm , por último, los bradizoitos, contenidos en los quistes intratisulares, los cuales tienen 5-100 μm de diámetro, constituyendo los que constituyen la forma de resistencia al medio interior (49,50).

2.2.3 Ciclo biológico

Este se divide en dos: Ciclo sexual, el cual se da por gametogonia en las células epiteliales del intestino delgado de los gatos, el que es su hospedero definitivo y de algunos otros félidos; y un ciclo asexual que ocurre en los tejidos extraintestinales de los félidos y de otros hospedadores, incluido el hombre, todos estos como hospederos intermediarios (6,26).

2.2.4 Ciclo sexual

El gato es infectado al ingerir animales (roedores y aves) portadores de quistes o bien vegetales contaminados con ooquistes, estos al ubicarse en el intestino como enteroquistes, se diferencian en microgametos femeninos y masculinos (51). Su fecundación da origen a un ooquiste diploide y no esporulado que es eliminado con las heces (6,40). Es así que millones de ooquistes formados por dos esporoquistes y cada uno con cuatro esporozoitos, se excretan así en el transcurso de las tres semanas siguientes a la primera infección del gato, luego en el medioambiente se da la esporulación, esto entre uno a cinco días, volviéndose infectantes (4,6,51). La gran resistencia que tiene 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, convirtiéndose en una fuente de contaminación para el hombre y los animales (6,19,48,51,52).

2.2.5 Ciclo asexual.

Los humanos y animales se infectan por la ingestión de ooquistes maduros procedentes de las heces de los gatos o de las formas quísticas presentes en los tejidos de otros animales, cuyas carnes son ingeridas crudas o mal cocidas en los que se dan invasiones extraintestinales, dándose un ciclo incompleto de reproducción (6,24,51). En estos casos la infección es aguda dándose la reproducción intracelular de los taquizoitos, es en ese momento que el hospedero desarrolla inmunidad, la infección se hace crónica y se forman los verdaderos quistes con los bradizoitos, este mismo proceso también se da en los gatos que a la vez son hospedadores definitivos (6,26,48,53).

2.2.6 Patogenia

Los parásitos son liberados de los quistes intratisulares (bradizoitos) o de los oocistos (esporozoitos) por el proceso digestivo en el tracto gastrointestinal del hospedero, estos se multiplican en los enterocitos, y a continuación, los trofozoítos formados se diseminan por el torrente sanguíneo o linfático parasitando las células de una variedad de órganos particularmente tejidos linfáticos, músculo esquelético, miocardio, retina, placenta, y más frecuentemente, el sistema nervioso central (SNC) (48,53–55). Los trofozoitos penetran en las células de forma activa gracias a sus movimientos y a la producción de hialuronidasas y lisozimas (56). En estas células se multiplican por endogénesis, forman acúmulos citoplasmáticos y provocan lesiones tisulares como consecuencia de la destrucción celular y una reacción inflamatoria (57,58).

2.2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es un método de biología molecular, que se realiza “in vitro”, el cual permite obtener y amplificar un fragmento de la secuencia de ADN, obteniéndose múltiples copias a través de repetidos ciclos, con diferentes periodos de tiempo y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable (59). Esta es una técnica que ha sido estandarizada para la detección de *T. gondii* en muestras de diferente origen (60,61).

La PCR consta de tres fases, una primera fase es la desnaturalización de la molécula de ADN, donde la doble cadena que se amplificará es separada mediante la aplicación de altas temperaturas, 95°C durante 20-30 segundos, una segunda fase llamada de hibridación, en donde los “Primers” o “Cebadores” que son pequeños fragmentos de ADN diseñados una computadora, se acoplan a una región complementaria del ADN molde, señalando una pequeña región que dará inicio a la clonación en doble cadena al ser reconocida por la polimerasa. Esta fase se realiza a una temperatura entre 50- 60°C, durante 10 a 60 segundos y una tercera fase que es la extensión en la cual la enzima incorpora los nucleótidos complementarios (dNTP’s) a la cadena molde, en el sentido 5’-3’ a partir de los oligonucleótidos ordenados (Primers) previamente pegados; esto se da a una temperatura de 72°C, y el tiempo dependerá del tamaño de la región a amplificar, utilizando 1 minuto por cada 1000 nucleótidos de extensión como regla general (59).

2.2.7 Gen B1 de *Toxoplasma gondii*

Este gen es uno de los más utilizados por su alto nivel de conservación, repetibilidad y la frecuencia con que es usado para el diagnóstico pues es altamente específico y sensible

(62,63). Este gen es el más usado en diferentes estudios clínicos con PCR y PCR Anidada (64–67) y la detección de *T. gondii* en muestras de tejidos (10,38,41,68) y agua (69).

2.2.8 Diversidad genética de *Toxoplasma gondii*

La diversidad genética de *T. gondii* está relacionada con tres linajes clonales conocidos como Tipo I, II y III, pertenecientes a los locus polimórficos del antígeno de superficie SAG2 (37). Los linajes tipo I y II son prevalentes tanto en aislamientos de animales como en humanos (70) estando la cepa tipo I relacionada con virulencia aguda en el ratón (33,71,72), es así que estos linajes clonales se han estudiado correlacionándolos con las diferentes formas clínicas de toxoplasmosis congénita, hallando el tipo II en 65% de aislamientos de casos de pacientes con VIH y el tipo III comúnmente en animales y ocasionalmente en humanos, esto sugiere que el genotipo de la forma parasitaria determina el progreso y la severidad de la enfermedad (18).

2.3 Hipótesis

T. gondii está presente en carne de diferentes especies expandida en los mercados del distrito de Cajamarca.

2.4 Variables

Variable independiente: Carne de diferentes especies (bovino, ovino y porcino).

Variable dependiente: Presencia de *Toxoplasma gondii*.

Variable	Dimensiones	Definición conceptual	Indicadores	Técnica	Fuentes
Carne de diferentes especies (bovino, ovino y porcino).	Carne de bovino Carne de ovino Carne de porcino	Parte del cuerpo de los animales preparada para el consumo humano; especialmente la de los animales no marinos y en particular la de las reses		Colección de muestras de carne	Puestos de expendio en los mercados
Presencia de <i>Toxoplasma gondii</i>	Presencia del parásito <i>Toxoplasma gondii</i>	Protozoo intracelular obligado que infecta animales de sangre caliente.	Confirmación molecular del gen B1 de <i>Toxoplasma gondii</i> .	PCR Electroforesis RFLP	ADN genómico de <i>Toxoplasma gondii</i>

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Diseño y Tipo de estudio

Investigación básica, no experimental, observacional descriptivo de corte transversal.

3.2 Criterio de inclusión y exclusión

Criterio de inclusión: Carne del brazuelo de bovino, ovino y porcino.

Criterio de exclusión: Carne de otras partes de bovino, ovino y porcino.

3.3. Población

Población: Está constituida por 52 muestras de carne de consumo humano de bovino, ovino y porcino que se expende en los mercados del distrito de Cajamarca.

Muestreo: Muestreo aleatorio simple.

Muestra: La muestra de estudio estuvo conformada por 52 muestras de carne proveniente de cuatro mercados ubicados en el distrito de Cajamarca.

Tabla N°1: Distribución de las muestras analizadas según el mercado de procedencia

Mercado	Bovino	Ovino	Porcino	Total
San Sebastián (9 puestos)	4	4	3	11
Modelo (27 puestos)	14	8	9	31
Central (6 Puestos)	2	2	2	6
San Martín (5 puestos)	1	2	1	4
TOTAL	21	16	15	52

Tabla 1. Distribución de las muestras analizadas según el mercado de procedencia

Mercado	Bovino	Ovino	Porcino	Total
San Sebastián (9 puestos)	4	4	3	11
Modelo (27 puestos)	14	8	9	31
Central (6 Puestos)	2	2	2	6
San Martín (5 puestos)	1	2	1	4
TOTAL	21	16	15	52

Unidad de Análisis

Carne de diferentes especies: Bovino, ovino y porcino.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Colección y mantenimiento de muestras de carnes

Las muestras fueron obtenidas en los diferentes puestos de los cuatro mercados del distrito de Cajamarca, se obtuvo 100g de muestra de carne de la paleta para las tres especies, bovino, ovino y porcino, cada una fue colocada dentro de una bolsa con cierre hermético e identificada, luego fueron transportadas al Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Una vez en el laboratorio, las muestras se congelaron a -30 °C en un Congelador de Laboratorio de Alto rendimiento marca Thermo Scientific™ ULT1230-USA, hasta su procesamiento.

3.4.2 Preparación previa a la extracción de ADN

Previamente, los materiales empleados como pinzas, morteros y pilones fueron lavados con detergente líquido, luego desinfectados con alcohol 70%, se colocaron en bolsas de polipropileno y se llevaron a congelar a -70 °C por 24 horas. Antes de iniciar el proceso de extracción de ADN, toda el área de trabajo fue desinfectada con lejía y a continuación con alcohol al 70%. Los guantes, pipetas, puntas de diferente calibre y microtubos de 1.5ml se colocaron en cabina de flujo laminar y fueron sometidos a luz UV por 30 minutos para su esterilización. Las muestras de carne conservadas a -30 °C fueron previamente digeridas antes de la extracción del ADN genómico por el método de Fenol, Cloroformo y Alcohol Isoamílico 25:24:1, de acuerdo al siguiente protocolo (73,74).

3.4.2 Digestión de muestras de carne

1. Se colocó aproximadamente 10 mg de muestra de carne en un microtubo de 1.5 ml, luego se lavó con agua destilada tres veces.
2. La muestra fue retirada y se colocó en un microtubo nuevo de 1.5 ml para congelarse en nitrógeno líquido por 20 segundos, luego descongeló a temperatura ambiente. Este proceso se repitió 3 veces para facilitar la posterior homogenización.



Figura 1. Muestra de carne congelada en nitrógeno líquido lista para ser homogenizada en un mortero.

3. La muestra se colocó en el mortero y con ayuda de un pilón se homogenizó hasta que el tejido tomó consistencia de un polvo.
4. Se agregó 500 μl de agua ultra pura Milli Q®, luego se aspiró y dejó el contenido varias veces. A continuación, con un tip de 1000ul se trasvasó el material en un nuevo microtubo de 1.5 ml.



Figura 2. Obtención de polvo de tejido (carne) listo para el proceso de digestión.

5. Se agregó a cada microtubo 1000 μl de buffer de lisis y se homogenizó en Vortex por 20 segundos, luego se llevó los microtubos a centrifugar a 14 000 rpm por 5

minutos a temperatura ambiente (18 a 20°C) y se descartó el sobrenadante dejando solo 50µl del líquido por encima del pellet.

6. Se agregó 500 µl de buffer de lisis y se homogenizó por inversión, después se agregó 20µl de β-mercapto etanol y luego 10 µl de Proteinasa K a cada microtubo.
7. Finalmente se incubó toda la noche en Baño María a 56° C y se agitó en Vortex a las 2 horas de iniciado el proceso y 2 horas antes de finalizar.



Figura 3. Microtubos con muestras de carne colocados en Baño María a 56°C.

3.4.3 Extracción de ADN de muestras de carne utilizando Fenol – Cloroformo – Alcohol Isoamílico

Se utilizó el método descrito por Sambrook et al. (75).

1. Se agregó a cada microtubo (que contiene la muestra previamente digerida del paso anterior) 500 µl de la mezcla: Fenol/Cloroformo/Isoamílico 25:24:1, luego se agitó en Vortex por 15 segundos y a continuación se centrifugó a temperatura ambiente a 14 000 rpm por 5 min para separar las fases, una fase acuosa en la parte superior donde se encuentra el ADN y una fase orgánica en la parte inferior con residuos proteicos.

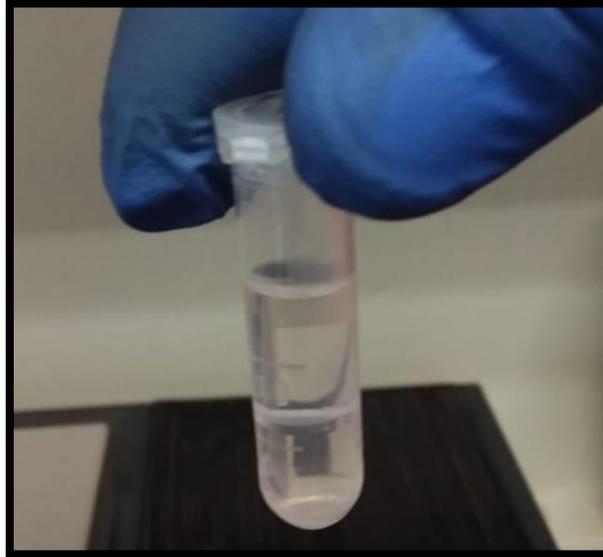


Figura 4. Microtubo luego de centrifugación a 14000 rpm donde se observa la fase acuosa y la fase orgánica.

2. Se transfirió la fase acuosa (superior) a otro microtubo, evitando pipetear la interfase, luego se agregó 600 μ l de isopropanol al 100% a temperatura ambiente y se mezcló por inversión (se repitió aproximadamente 50 veces).
3. Se llevó los tubos a centrifugar a 14 000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, de esta manera se obtuvo el pellet de ADN.
4. Se descartó el sobrenadante y a continuación se agregó 1000 μ l de etanol al 70% a temperatura ambiente para lavar el pellet., nuevamente se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos y se volvió a descartar el sobrenadante, el lavado con etanol 70% se repitió por 2 veces más.
5. Finalmente se llevó a la estufa a secar el pellet por 2 horas a 37°C, dejando el tubo destapado e inclinado sobre papel filtro verificando que no queden restos de etanol en el tubo, seguidamente se le agregó 50 μ l de agua ultrapura con la finalidad de resuspender el ADN. Se incubó a 37°C por 30 minutos en Baño María y se congeló a -30°C hasta su evaluación en Nanodrop.

3.4.4 Evaluación de la calidad y pureza del ADN por espectrofotometría

La evaluación de calidad y concentración de las muestras de ADN se llevó a cabo mediante espectrofotometría en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher), a 260 nm y 280 nm. Para determinar la concentración de ADN se midió a 260 nm y su pureza se calculó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm. Además, se evaluó el parámetro a 230 nm para ver el grado de contaminación por fenol mediante la relación de absorbancia 260/230. A continuación, se describe el protocolo empleado:

1. Se levantó el brazo del Nanodrop y se colocó en el pedestal 1 μ l de agua grado molecular, con la finalidad de blanquear el equipo, después se limpió con papel secante la parte del brazo del equipo que tiene contacto con el agua y el pedestal. Antes de iniciar la medición de las muestras se tomó la medida de agua ultrapura para verificar que esta no esté contaminada con nucleótidos o proteínas.
2. Cada muestra es colocada en el pedestal para hacer la medición respectiva. Las mediciones de concentración y pureza del ADN se evidencian en la pantalla del computador a través de un software instalado en el mismo. Los valores leídos se almacenan en una hoja de datos que se muestra en la parte inferior de la pantalla con el nombre de la muestra, los valores de las lecturas y la fecha. Con estos datos se obtuvo un archivo Excel con toda la información.
3. Después de leer todas las muestras, se colocó 1 μ L de agua ultrapura para de esta manera limpiar el cabezal del Nanodrop. Las muestras de ADN obtenidas fueron conservadas a -30 °C.

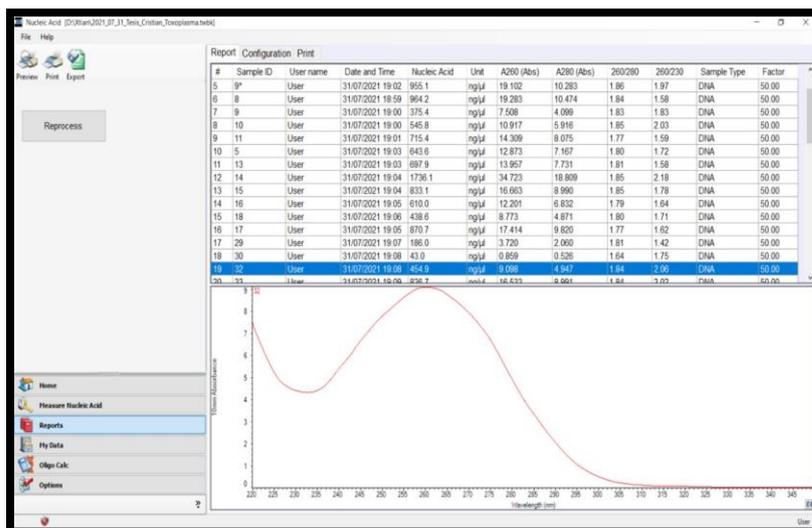


Figura 5. Evaluación de la calidad de ADN genómico a partir de muestras de tejido (carne).

3.4.5 Primers

Los primers para la amplificación correspondientes del Gen B1 de *T. gondii* se diseñaron a partir de las secuencias completas de nucleótidos disponibles en las bases de datos del Gen Bank y a partir de estudios realizados por otros investigadores, obteniéndose las secuencias: **ToxoN1** GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG y **ToxoC1** TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC para la primera amplificación y **ToxoN2**: TGCATAGGTTGCCAGTCACTG y **ToxoC2**: GGCGACCAATCTGCGAATACA (10,41,63,76)

3.4.6 Amplificación del ADN por PCR Anidada

La amplificación de los fragmentos de ADN del Gen B1 de *T. gondii* se realizó a partir de 1µl del ADN extraído. Para este proceso se empleó el kit comercial KOD Hot Start DNA Polymerase, con el siguiente protocolo:

1. En un microtubo de 1,5 ml estéril, libre de ADNasas se combinó por muestra: 32 μ l de agua grado molecular, 5 μ l de Buffer DNA, 3 μ l de MgSO₄, 5 μ L dNTP, 1,5 μ l de primer forward **ToxoN1** GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG, 1,5 μ l de primer reverse **ToxoC1** TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC, dando un volumen final de 48 μ l, que fueron servidos en microtubos de 200 μ l. A cada microtubo se agregó 1 μ l del ADN obtenido de cada muestra y finalmente 1 μ l de la enzima Kod Hot Star Polymerase.
2. Las condiciones de reacción se dieron en un termociclador Bio-Rad modelo T100 y fueron:

Tabla 2. Programa de PCR para primera amplificación de gen B1 de *T. gondii*.

94 °C por 5 minutos	35 ciclos
94 °C por 1 minutos	
53 °C por 1 minutos	
72 °C por 1 minutos	
72 °C por 3 minutos	
4 °C por 3 indefinidamente	

3. El primer producto amplificado obtenido fue utilizado como molde para realizar la segunda reacción, la cual tuvo la misma concentración de la primera reacción de PCR y los primer usados fueron **ToxoN2:** TGCATAGGTTGCCAGTCACTG y **ToxoC2:** GGCGACCAATCTGCGAATACA, las condiciones de reacción fueron:

4. **Tabla 3.** Programa de PCR para la segunda amplificación de gen B1 de *T. gondii*.

94 °C por 5 minutos	30 ciclos
94 °C por 1 minutos	
53 °C por 30 segundos	
72 °C por 30 segundos	
72 °C por 10 minutos	
4 °C por 3 indefinidamente	

5. Finalmente, las amplicones se conservaron a -20 °C hasta su detección por electroforesis.

3.4.7 Detección de fragmentos amplificados (bandas) por electroforesis en gel.

El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2 % preparado con Tris Borato EDTA 0.5X (TBE), y teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) (10 µl), según el protocolo siguiente:

El gel solidificado se colocó en el sistema de electroforesis y también fue cubierto con TBE. En el primer pocillo se colocó el marcador de peso molecular de 100 pb (pares de bases) + buffer de siembra, a razón de 5 µl + 1 µl respectivamente, luego el control negativo (master mix sin ADN), y luego los amplificados, todos a razón de 4 µl + 1 µl de buffer de corrida.

Se conectó a la fuente de poder, se hizo una corrida inicial por 10 minutos a 80 voltios y luego a 100 voltios por 45-50 minutos más. Finalizada la corrida electroforética, las bandas se observaron con transiluminación de luz UV en un Visi-Blue Transilluminator™ (UVP). Las bandas fueron fotografiadas para su posterior análisis.

3.4.8 Restricción de Fragmentos Polimórficos con enzima PmII (Eco72I)

Para este procedimiento se usó los fragmentos amplificados del gen B1 de *T. gondii* de origen bovino, ovino y porcino y se siguió el siguiente protocolo proporcionado por el fabricante de la enzima de restricción *PmII* (*Eco72I*).

En un microtubo de 200 μ l de volumen agregar 16 μ l de agua libre de nucleasas, a continuación 2 μ l del Buffer Tango 10X, 1 μ l del ADN amplificado y finalmente 1 μ l de la enzima de restricción *PmII* (*Eco72I*).

1. Se llevó a Baño María por 1 hora a 37°C,
2. Finalmente se llevó a electroforesis en gel de Agarosa al 2% a 100 voltios por 35 minutos y luego al transiluminador para su observación y documentación.

3.4.9 Análisis de los fragmentos amplificados

Las bandas de los fragmentos amplificados fueron fotografiadas con un equipo fotodocumentador MicroDOC Basic System (Cleaver Scientific Ltd.); luego medidas por aproximación al marcador de peso molecular (MPM) mediante la utilización del software Gel Analyzer 2019®, disponible en forma gratuita en www.gelalyzer.com. obteniéndose los pesos moleculares individuales.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos. El número total de muestras analizadas fue 52, de las que se obtuvo ADN total en óptimas concentraciones y calidad.

Tabla 4. Frecuencia del gen B1 de *Toxoplasma gondii* con respecto al lugar de obtención de la muestra y el tipo de carne.

Variable	N° de muestras analizadas	N° muestras positivas	Porcentaje de positividad
Mercado			
San Sebastián	11	3	27.27
Modelo	31	8	25.81
Central	6	1	16.67
San Martín	4	1	25.00
Total	52	13	25
Tipo de carne			
Bovino	21	4	19.05
Ovino	16	6	37.50
Porcino	15	3	20.00
Total	52	13	25.00

Mediante el uso de primers a los que denominamos ToxoC1, ToxoN1 para la primera amplificación y ToxoC2, ToxoN2 para la segunda amplificación de la PCR anidada se obtuvo como productos fragmentos de ADN de aproximadamente 100 pb, los que pertenecen al gen B1 de *T. gondii*, estas bandas, producto de la amplificación de este gen fueron analizadas con el programa GelAnalyzer 10.0, lo que nos permitió confirmar que se amplificaron las moléculas correspondientes al gen B1 en estudio.

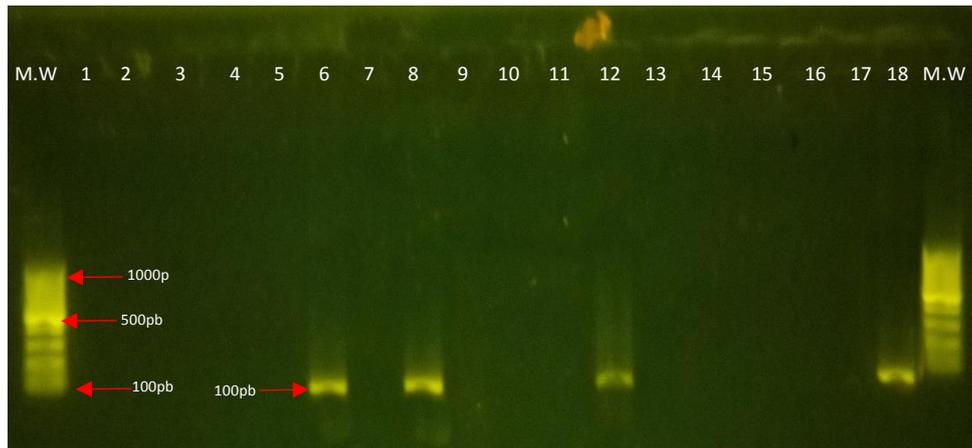


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% mostrando bandas de aproximadamente 100pb correspondientes al gen B1 de *T. gondii* a partir de muestras de carne de Bovino. MW: Marcador de peso molecular.

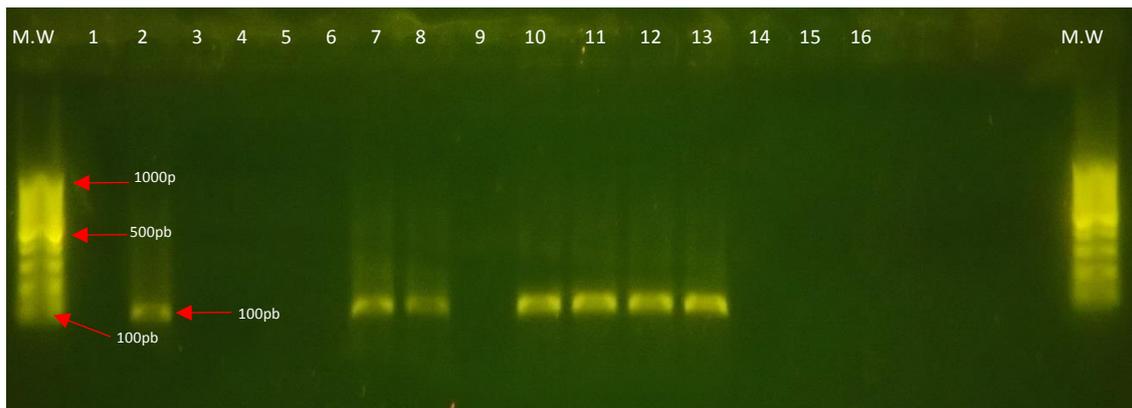


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% mostrando bandas de aproximadamente 100pb correspondientes al gen B1 de *T. gondii* a partir de muestras de carne de Ovino. MW: Marcador de peso molecular.

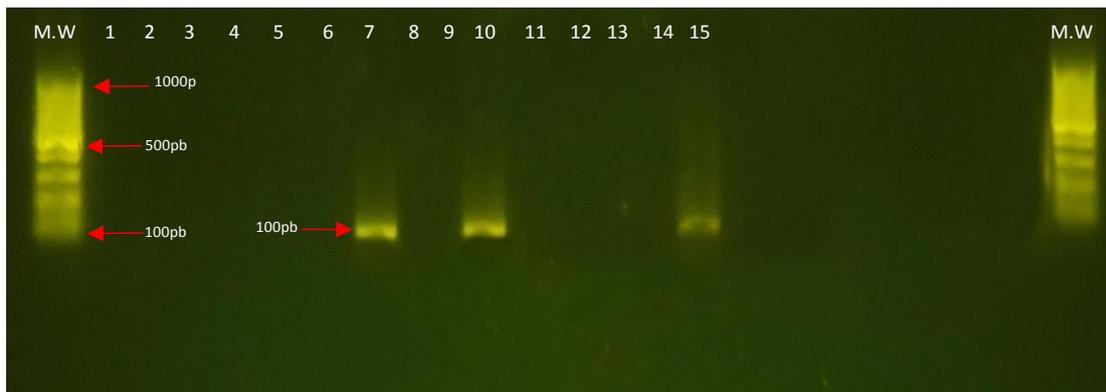


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando bandas de aproximadamente 100pb correspondientes al gen B1 de *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de carne de Porcino. MW: Marcador de peso molecular.

La presencia de *T. gondii* en carne consumo humano constituye desde ya una fuente de infección para seres humanos y por ende un problema de salud pública (11,40,42,77), ya que este parásito trae como consecuencia problemas reproductivos relacionados con aborto y toxoplasmosis congénita en seres humanos (29,40,78) y animales (34), también problemas oculares como uveítis, retinitis, neuroretinitis, las que terminan en ceguera (22,53,79) y mentales como la esquizofrenia (28,77).

De las 52 muestras de carne analizadas, el 25% (13/52) fueron positivas a la presencia del gen B1 de *T. gondii*. Con respecto a la carne de bovino en este estudio se reporta 19% (13/52) de muestras positivas muy similar al 19.3% reportado por Medina et al. (41) y relativamente mayor a lo mencionado por Azizi et al. (45) con 8.57%, Mahami-Oskouei et al. (35) quienes hallaron 17.33% por debajo del 27.5% reportado por Campos-Portacio et al.(10) y el 52.7% de Lora et al.(11), en todos los casos se detecta a *T. gondii*, esto probablemente se deba a las condiciones de crianza que reciben los animales, los que pueden infectarse por el consumo de ooquistes en los pastizales y el agua de bebida (19,51).

En el caso de las muestras provenientes de ovino, hallamos presencia del gen B1 en el 37.5% (6 de 16), siendo esta especie en la que se detectó mayor cantidad de positivos, este valor es muy consistente al 38% que reporta Azizi et al., (45) y el 37.5% mencionado por Asgari(14). Es válido mencionar que en los ovinos *T. gondii* es uno de los principales agentes abortivos (80,81), y ha sido detectado en diferentes partes comestibles de la carne de ovino (82,83). Si bien en este estudio no se han detectado los linajes Tipo II y III como en los reportados por Melo et al. (84), Chen et al. (85) y Sánchez-Sánchez et al. (86) ya existe un trabajo en México realizado por Martínez-Flores et al. (87) que relaciona la presencia del gen B1 con genotipos potencialmente virulentos a partir de ovinos naturalmente infectados.

Con respecto a la carne de porcino, se halló un 20% (3 de 15), si bien es cierto este valor es menor a lo que reportan Medina et al.(41) con 22.5% y Campo y Portacio (10) con presencia del gen B1 en el 32.5% (14 de 40), para ambos casos se presentan como el segundo tipo de carne con presencia del gen B1 de *T. gondii*, a su vez, el estudio realizado por Lora et al. (11) detectó al gen B1 en el 70% (42 de 60) de las muestras analizadas, esto probablemente también se relacione con la forma en que crían los cerdos en Cajamarca, los cuales son mantenidos en el traspatio o a estaca sin condiciones higiénicas adecuadas, lo que predispone a estos animales a la infección por *T. gondii* (19).

Los resultados obtenidos y comparados con la literatura denotan las implicaciones hacia la salud pública (6,18,37,70,71,77), poniendo en riesgo a la población, hasta el momento no se cuenta con pruebas que permitan determinar la fuente de infección (41) por lo que no se sabe si se adquiere la infección por ingestión de quiste en el medio ambiente o por el consumo de carne (6,40).

Por consiguiente, la mejor forma de evitar la infección por *Toxoplasma gondii* es concientizar y educar a la población que tiene mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, como son las personas inmunocomprometidas y las mujeres embarazadas (28,51,79,88)

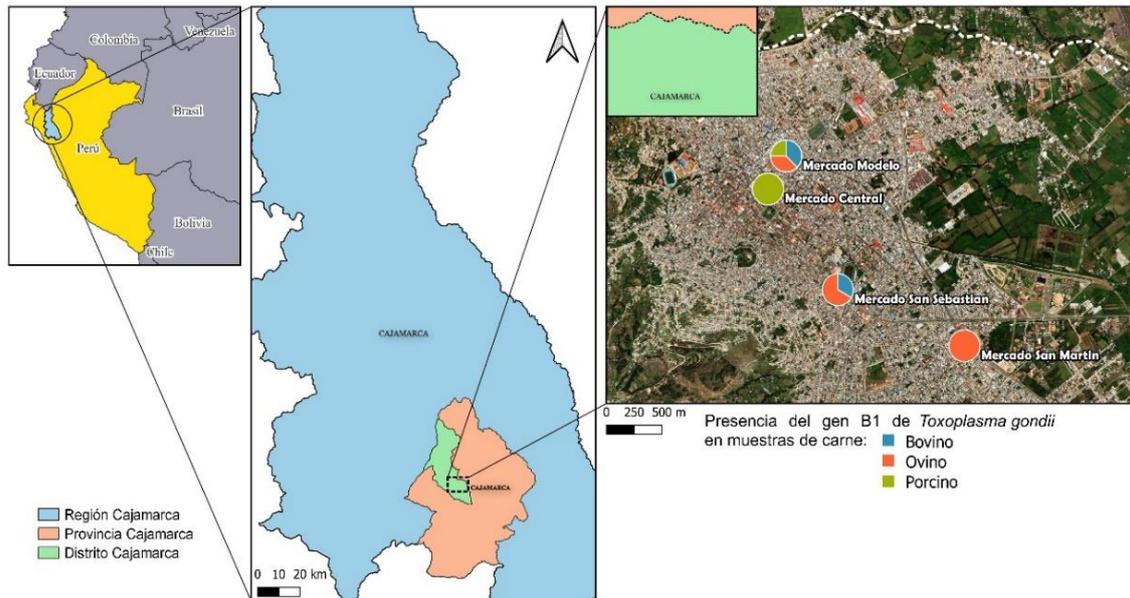


Figura 10. Mapa de distribución de los sitios muestreados en relación a su positividad.

En relación a la diversidad genética hay algunos estudios en los que se muestra que en varias regiones del mundo se presentan linajes en ciertas especies que son hospedadoras, tanto en humanos como en animales (18,37), en este estudio se realizó la técnica de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción RFLP, con la cual se pretendió evidenciar la presencia de los linajes de *T. gondii* usando la enzima *PmII* (*Eco72I*), la cual es capaz de restringir la posición 5'...CAC[^]GTG...3' y permite diferenciar el linaje Tipo I ya que corta los linajes Tipo II y III.

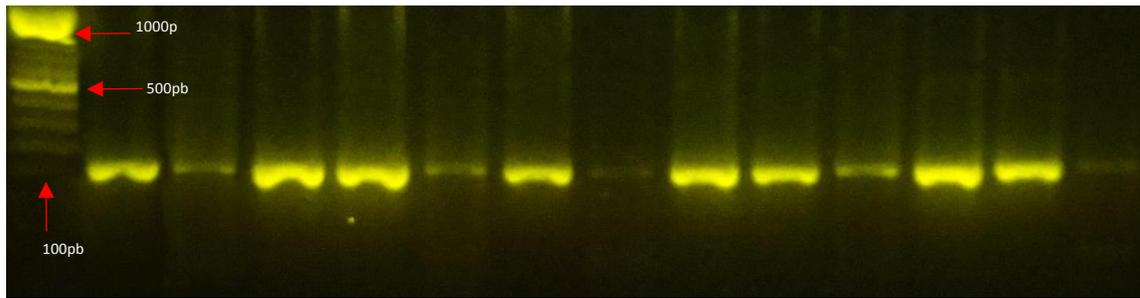


Figura 11. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.2% mostrando el patrón de restricción de RFLP para la endonucleasa de restricción *PmII* (*Eco72I*) a partir de muestras de carne de vacuno, ovino y porcino en las que no muestran restricción. MW: Marcador de peso molecular.

El total de muestras no restringieron a la enzima mencionada, esto permite identificar a los amplificadas como linaje Tipo I, siendo este el identificado en humanos como lo menciona Howe et al. (18,37,70) y el más virulento para ratones como lo menciona Melo et al. (84,86).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Este estudio concluye que el 25% (13/52) del total de carnes analizadas expandidas en los mercados del distrito de Cajamarca fueron positivas a *T. gondii* mediante la detección del gen B.
2. La mayor frecuencia *T. gondii* se halló en las carnes de ovino 37.5% (6/16).
3. La frecuencia de *T. gondii* hallada en carne de porcino fue 20% (3/15).
4. La frecuencia de *T. gondii* hallada en carne de bovino fue 19.05%.
5. La diversidad genética de *T. gondii* mediante el Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), corresponde al linaje Tipo I.

5.2. Recomendaciones

1. Realizar estudios con mayor cantidad de muestras de carne y en diferentes especies a las ya estudiadas.
2. Continuar con el genotipaje de aislamientos de *T. gondii* y llevar esta técnica de diagnóstico al análisis en humanos lo cual nos permitirá relacionar el consumo de carnes con el tipo de *T. gondii* presente en la población de Cajamarca.

CAPÍTULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dabanch J. Zoonosis. Vol. 20, Revista chilena de infectología. 2003. p. 47–51.
2. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization). Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. 2012. 1–324 p.
3. Tenter A, Heckeroth A, Weiss L. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30(12–13):1217–58.
4. Dubey JP. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods. 2020. p. 1–19.
5. Stelzer S, Basso W, Benavides Silván J, Ortega-Mora LM, Maksimov P, Gethmann J, et al. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. Food Waterborne Parasitol. 2019 Jun 1;15
6. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. Clinical Microbiology and Infection. 2002;8(10):634–40.
7. El-Shahawy IS, Khalil MI, Bahnass MM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in women in Najran City, Saudi Arabia. Saudi Medical Journal. 2014;35(9):1143–6.
8. Meireles LR, Galisteo AJ, Pompeu E, Andrade HF. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. Tropical Medicine and International Health. 2004;9(8):876–81.
9. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis - A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. PLoS One. 2014;9(3).
10. Campo-Portacio DM, Discuviche-Rebolledo MA, Blanco-Tuiran PJ, Montero-Perez YM, Orozco-Mendez KE, Assia-Mercado YM. Detección de *Toxoplasma gondii* por amplificación del gen B1 en carnes de consumo humano. Infectio. 2014;18(3):93–9.
11. Lora F, Aricapa H, Pérez J, Arias L, Idarraga SE, Mier D, et al. *Toxoplasma gondii* infection of meat for human consumption detected by PCR assay in three cities from the coffee region of Colombia. Infectio. 2016;11(3):117–23.
12. Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. Veterinary Parasitology. 2009 8;163(3):196–206.

13. Williams M, Hernandez-Jover M, Shamsi S. Parasites of zoonotic interest in selected edible freshwater fish imported to Australia. *Food Waterborne Parasitol.* 2022;26(9):1-15.
14. Asgari Q, Sarnevesht J, Kalantari M, Sadat SJA, Motazedian MH, Sarkari B. Molecular survey of *Toxoplasma* infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran. *Tropical Animal Health and Production.* 2011;43(2):389–92.
15. Slifko TR, Smith H V, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal of Parasitology.* 2000;30(12–13):1379–93.
16. Gajadhar AA, Allen JR. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Veterinary Parasitology.* 2004;126(12):3–14.
17. Silva-Díaz H, Díaz-Giné A. *Toxoplasma gondii* Infection And Associated Factors In Blood Donors From Hospital II-2 Tarapoto, Peru, July To December 2019. *Revista de la Facultad de Medicina Humana.* 2021;21(3):510–6.
18. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases.* 1995;172(6):1561–6.
19. Rawal BD. The epidemiology of toxoplasmosis. *Indian Journal of Medical Science.* 1960;14 (1):685–8.
20. Alvarado-Esquivel C, Torres-Berumen JL, Estrada-Martínez S, Liesenfeld O, Mercado-Suarez MF. *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: A case-control study in a Northern Mexican population. *Parasities and Vectors.* 2011;4(1):75.
21. Galat M, Starodub N, Galat V. Toxoplasmosis: Prevalence and New Detection Methods. *Foodborne Diseases.* 2018;(1):79–118.
22. Havelaar AH, Kemmeren JM, Kortbeek LM. Disease burden of congenital toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases.* 2007;44(11):1467–74.
23. Nazaré Carneiro Bichara C, Acácia De Cristo Canto G, de Lima Tostes C, Jacob Da J, Freitas S, Lima Do Carmo E, et al. Incidence of congenital toxoplasmosis in the city of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2012;45(1):122-124
24. Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *International Journal of Medical Microbiology.* 2014;304(7):917–29.
25. Vasileiou NGC, Fthenakis GC, Papadopoulos E. Dissemination of parasites by animal movements in small ruminant farms. *Vet Parasitol.* 2015;213(11):56–60..
26. Al-Tubaikh J. Toxoplasmosis. In: *Infectious Diseases and Tropical Medicine.* Springer, Berlin, Heidelberg; p. 398–400.

27. Blader I, Saeij J. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 1175-6. 2014;117. (5-6):458-476.
28. Fuglewicz AJ, Piotrowski P, Stodolak A. Relationship between toxoplasmosis and schizophrenia: A review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2017;26(6):1033-8.
29. Fallahi S, Rostami A, Nourollahpour Shiadeh M, Behniafar H, Paktinat S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 2018;47(3):133-40.
30. Chang H. K, Chávez V. A, Li E. O, Falcón P. N, Casas A. E, Casas V. G. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en llamas hembras de la Sierra Central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2009;20(2):306-11
31. Cerro T. L, Chávez V. A, Casas A. E, Suárez A. F, Rubio V. A. Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en gatos de Lima Metropolitana y concordancia entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2009;20(2):285-90.
32. Chávez V. A, Pinedo V. R, Suárez A. F, Villacaqui A. E, Pérez C. I, Chávez V. A, et al. Estudio seroepidemiológico de *Toxoplasma gondii* en caprinos del Perú y su asociación a factores de riesgo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 202;32(6).
33. Cabezón O, García-Bocanegra I, Molina-López R, Marco I, Blanco JM, Höfle U, et al. Seropositivity and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild birds from Spain. *PLoS One*. 2011;6(12):1-7.
34. Elfahal AM, Elhassan AM, Hussien MO, Enan KA, Musa AB, el Hussein AM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dairy Cattle with Reproductive Problems in Sudan. *ISRN Veterinary Science*. 2013; 2013:1-4.
35. Tavalla M, Asgarian F, Kazemi F. Prevalence and genetic diversity of *Toxoplasma gondii* oocysts in cats of southwest of Iran. *Infection, Disease and Health*. 2017;22(4):203-9.
36. Veronesi F, Santoro A, Milardi GL, Diaferia M, Branciarri R, Miraglia D, et al. Comparison of PCR assays targeting the multi-copy targets B1 gene and 529 bp repetitive element for detection of *Toxoplasma gondii* in swine muscle. *Food Microbiololy*. 2017; 63:213-6.
37. Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal Clinical Microbiology*. 1997;35(6):1411-4.
38. Cong W, Zhang NZ, Hou JL, Wang XC, Ma JG, Zhu XQ, et al. First detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in market-sold oysters in China. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 54:276-8

39. Wang H, Zhang L, Ren Q, Yu F, Yang Y. Diagnosis of Swine Toxoplasmosis by PCR and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Henan, Central China. *BMC Veterinary Research*. 2017;13(1):1–8.
40. Amany M, Merwad A. Epidemiology and Molecular Detection of Zoonotic *Toxoplasma gondii* in Cat Feces and Seroprevalence of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Pregnant Women and Sheep. *Life Science Journal*. 2012; 9:133–46.
41. Medina JD, Osorio LA, Zabala D, de Almeida Vitor RW, Gómez JE, Carranza JC, et al. Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carnes para consumo humano en Ibagué, Colombia. *Biomédica*. 2022;42(1):136.
42. Mahami-Oskouei M, Moradi M, Fallah E, Hamidi F, Asl Rahnamaye Akbari N. Molecular detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in chicken, beef, and lamb meat consumed in northwestern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2017;12(1):38–45.
43. Cong W, Zhang NZ, Yuan DQ, Zou Y, Li S, Liang ZL. Detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in market-sold mussels (*Mytilus edulis*) in certain provinces of China. *Microbial Pathogenesis*. 2019 Nov 1; 136:103687.
44. Slany M, Dzedzinska R, Babak V, Kralik P, Moravkova M, Slana I. *Toxoplasma gondii* in vegetables from fields and farm storage facilities in the Czech Republic. *FEMS Microbiology Letters*. 2019;366(14).
45. Azizi H, Shiran B, Boroujeni AB, Jafari M. Molecular Survey of *Toxoplasma gondii* in Sheep, Cattle and Meat Products in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Southwest of Iran. *Iranian Journal Parasitology*. 2014;9(3):429.
46. Cakir-Koc R, Özdemir B. A Global Problem of Toxoplasmosis. *The Microbiology of Central Nervous System Infections*. 2018;305–17.
47. Soulsby E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Interamericana; 1987.
48. Dunn Ian J. Toxoplasmosis. *Seminars in Roentgenology*. 1998; 1(1):81-85
49. Compans RW, Cooper GM, Koprowski AH. *Current Topics In Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. 1996. Pp. 268
50. Weiss L, Kim K. *Toxoplasma gondii*. *The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. 2007. Elsevier Ltd. pp801.
51. Dubey J. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Taylor & Francis Group. 2010 pp338.
52. Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *International Journal of Parasitol*. 2013;43(2):107–13.
53. Davidson MG. Toxoplasmosis. Vol. 30, *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. W.B. Saunders; 2000. p. 1051–62.

54. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. 1998;11(2):267–99..
55. Guerina NG. Congenital Infection With *Toxoplasma gondii*. *Pediatric Annals*. 1994; 23(3):138–51.
56. Lycke E, Lund E. Enhancement by lysozyme and hyaluronidase of the penetration by *Toxoplasma gondii* into cultured host cells. *The British Journal of Experimental Pathology*. 1965; 46(2):189-99.
57. Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki A. Association of CD4 + T Cell-dependent, Interferon- γ -mediated Necrosis of the Small Intestine with Genetic Susceptibility of Mice to Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996.
58. Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe C v, Watanabe H, et al. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Experimental Medicine*. 1996; 1;184(2):597-607.
59. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986;51 (1):263-73.
60. Riaz F, Rashid I, Akbar H, Shehzad W, Islam S, Bajwa AA, et al. DNA Amplification Techniques for the Detection of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Meat Producing Animals: A Narrative Review Article. *Iranian Journal of Parasitology*; 11(4):431–40.
61. Moiana A, Gramegna M, Genco F, Meroni V. Development of a PCR test for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections. *Microbiología Médica*. 2010;25(2):92–4.
62. Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, et al. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. *Journal Medical Microbiology*;53(7):629–32.
63. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, et al. Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta biomedica: Atenei Parmensis*. 2006;77(2):75–80.
64. Burg J, Perelman D, Kasper L, Ware J, Boothroyd. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. 1988;141(10):84–91.
65. Colombo FA, Vidal JE, Penalva De Oliveira AC, Hernandez A v., Bonasser-Filho F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *Journal Clinical Microbiology*. 2005;43(10):5044–7.

66. Mesquita RT, Ziegler Ángela P., Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal Medical Microbiology*;59(6):641–7.
67. Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(4):346–50.
68. de Melo Ferreira A, Vitor RWA, Carneiro ACAV, Brandão GP, Melo MN. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infection, Genetics and Evolution*. 2004;4(2):131–42.
69. Garcia Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréface F, Addiss DG. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infection Disease*. 2003;9(1):55.
70. Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *Journal Clinical Microbiology*. 2001;39(4):1566–70.
71. Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992;359(6390):82–5.
72. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med*]. 2001;(1):1–19.
73. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2003.
74. Killeen AA. *Molecular Pathology Protocols*. 2001.
75. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2003.
76. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*. 1989;27(8):1787.
77. Chen X, Chen B, Hou X, Zheng C, Yang X, Ke J, et al. Association between *Toxoplasma gondii* infection and psychiatric disorders in Zhejiang, Southeastern China. *Acta Tropica*. 2019; 192:82–6.
78. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal Parasitology*. 2009;39(12):1385–94.
79. Dodds EM. Toxoplasmosis ocular. *Archives Society Especially Ophthalmology*. 2003;78(10):531–41.

80. Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. *Veterinary Parasitology*. 2009 Jul 7;163(1–2):1–14.
81. Edwards JF, Dubey JP. Toxoplasma gondii abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype T. gondii from an aborted lamb from a chronically infected ewe. *Veterinary Parasitology*. 2013;192(1–3):129–36.
82. Lundén A, Ugglå A. Infectivity of Toxoplasma gondii in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *International Journal of Food Microbiology*. 1992;15(3–4):357–63.
83. Dubey J, Kirkbride C. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1989;(195):6–1715.
84. Melo RPB, Almeida JC, de Lima DCV, Carvalho JCS, Porto WJN, Magalhães FJR, et al. Atypical Toxoplasma gondii genotype from a sheep and a pig on Fernando de Noronha Island, Brazil, showed different mouse virulence profiles. *Parasitology Research*. 2020;119(1):351–6.
85. Chen J, Li ZY, Zhou DH, Liu GH, Zhu XQ. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* strains from different hosts and geographical regions revealed by sequence analysis of GRA5 gene. *Parasites and Vectors*. 2012;5(1).
86. Sánchez-Sánchez R, Ferre I, Regidor-Cerrillo J, Gutiérrez-Expósito D, Ferrer LM, Arteché-Villasol N, et al. Virulence in Mice of a Toxoplasma gondii Type II Isolate Does Not Correlate With the Outcome of Experimental Infection in Pregnant Sheep. *Front Cell Infection Microbiology*. 2019;8
87. Martínez-Flores WA, Palma-García JM, Caballero-Ortega H, del Viento-Camacho A, López-Escamilla E, Martínez-Hernández F, et al. Genotyping Toxoplasma gondii with the B1 Gene in Naturally Infected Sheep from an Endemic Region in the Pacific Coast of Mexico. *Vector Borne Zoonotic Disease*. 2017;17(7):495–502.
88. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in Pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*. 1994;18(6):853–62.

ANEXO

1.- Electroforesis de ADN genómico obtenido de muestras de carne.

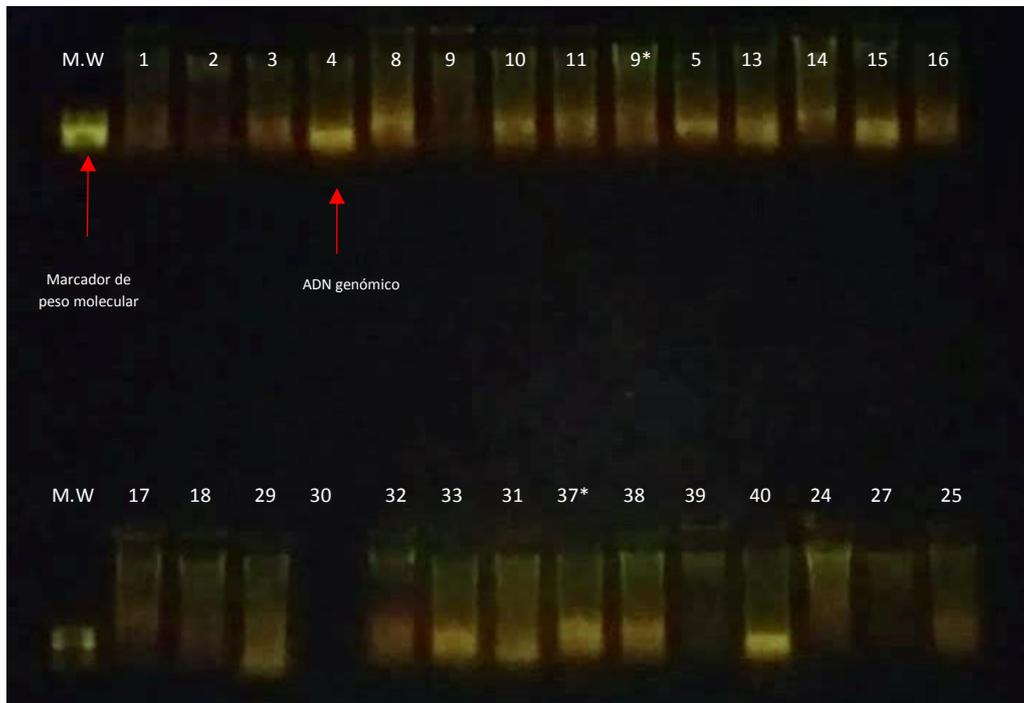


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% mostrando bandas de ADN genómico obtenidas de muestras de carne de vacuno, ovino y porcino.