



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Determinación de los subtipos de *Toxoplasma gondii* en muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L.) del mercado América de Ambato.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Autor: Yesenia Camila Pacheco Jiménez

Tutor: Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

Ambato – Ecuador

Enero – 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de diciembre de 2025.

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

1309651998

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Yesenia Camila Pacheco Jiménez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink that reads "Camila Pacheco". The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

Yesenia Camila Pacheco Jiménez

1104695901

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink that reads "Camila Pacheco". The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

Yesenia Camila Pacheco Jiménez

1104695901

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Mg. Danae Fernández Rivero
1757181209

Mg. María Daniela Garcés Moncayo
1803571585

Ambato, 24 de diciembre de 2025.

DEDICATORIA

Dedico a Dios este trabajo, quien me permitió cumplir una meta más.

También dedico este trabajo a mi familia, a mi madre Yomarita, a mi papá Darío y a mi papá David, a mi hermanita Ariana y a mi hermanito Darío, a mi abuelita Marujita, quienes han sido un pilar en mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, por prepararme, por permitirme soñar y a intentarlo incluso con miedo, a ser valiente y a esforzarme en todo lo que haga. A mis hermanos por motivarme a ser mejor cada día y seguir adelante

Agradezco a mi tutora Dra. Helena de la Torre, por su paciencia, su apoyo y sus enseñanzas. Me permitió conocer y amar aún más el mundo de la ciencia.

Agradezco a mi familia, a mis abuelitas Nonita, Marcita y Marujita, por su cariño atento. A mis tías científicas y trabajadoras, Augustita, Vero, Eri, que me introdujeron en el mundo de la ciencia; y a mis primas, Emy, Meche, Sofy, Dama, por sus locuras persistentes que alegran mis días.

Agradezco a mis mejores amigas, Dome, Ashley y Belén, quienes me sacaron de mis momentos más oscuros, y por hacerme reír cuando a veces solo quería llorar. A mi mejor amiga a la distancia, Jossy, quien me acompañó y motivó a no rendirme frente a las circunstancias. A Alex, por acompañarme en cada aventura, por enseñarme a enfrentar mis miedos, por amarme en cada etapa. A mis amigos Salomé, Darwin, Melany, Roger, Enrique, por hacer de esta experiencia universitaria un momento que atesoraré toda mi vida.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Justificación.....	1
1.1.2 Aspectos generales de <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.1.2.1 Descubrimiento y taxonomía del parásito	2
1.1.2.2 Morfología y fases del parásito	2
1.1.2.3 Ciclo biológico	3
1.1.3 Epidemiología	4
1.1.3.1 Situación global.....	4
1.1.3.2 Situación en Latinoamérica y Ecuador.....	5
1.1.4 Variabilidad genética de <i>T. gondii</i>	5
1.1.4.1 Tipos clonales.....	5
1.1.4.2 Tipos no clonales.....	6
1.1.5 Manifestaciones clínicas	6
1.1.5.1 Afectaciones en mujeres embarazadas	6
1.1.5.2 Afectaciones dependiendo el sistema inmune del hospedador.....	7
1.1.6 Técnicas de detección.....	7

1.1.6.1	Microscopía	7
1.1.6.2	Técnicas moleculares.....	7
1.1.7	Vías de transmisión	8
1.1.7.1	Transmisión por suelo y agua.....	8
1.1.7.2	Transmisión por alimentos	8
1.1.7.3	La lechuga como vehículo de transmisión	9
1.1.8	Vacíos de conocimiento y aporte a futuras investigaciones	10
1.2	Objetivos.....	11
1.2.1	Objetivo general	11
1.2.2	Objetivos específicos	11
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA		12
2.1	Materiales	12
2.2	Métodos	13
1.2.3	Recolección y transporte de muestras	13
1.2.4	Lavado de lechugas	13
1.2.5	Microscopía de las muestras	14
1.2.5.1	Preparación de solución de Sheather	14
1.2.5.2	Flotación de ooquistes con solución de Sheather	14
1.2.6	Extracción de ADN	14
1.2.7	Diseño de las condiciones de la PCR y utilización de primers	15
1.2.8	Diseño de las condiciones de la PCR anidada.....	15
1.2.8.1	Primera ronda de PCR anidada.....	15
1.2.8.2	Segunda ronda de PCR anidada.....	16
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		17
1.3	Análisis y discusión de resultado.....	17
1.3.1	Resultados de observación microscópica	17
1.3.2	Análisis de microscopía	20
1.3.2.1	Comparación morfológica de las diferentes muestras	20
1.3.2.2	Prevalencia en los puestos de venta.....	21

1.3.2.3	Posibles fuentes de contaminación	21
1.3.2.4	Limitaciones de la técnica de microscopía	22
1.4	Resultados de análisis molecular	22
1.4.1	PCR del gen B1	22
1.4.2	Resultados de PCR anidada.....	23
1.4.3	Interpretación de los resultados.....	24
1.4.3.1	Análisis de la amplificación del gen B1	24
1.4.3.2	Análisis de la PCR anidada	24
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		26
1.5	Conclusiones.....	26
1.6	Recomendaciones	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		28
ANEXOS.....		34
Anexo 1. Electroforesis en gel al 2% de agarosa de productos de PCR de muestras de <i>T. gondii</i> ...		34
Anexo 2. Lista de primers para PCR anidada.		34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales, reactivos y equipos utilizados en la investigación.....	12
Tabla 2. Resultados de la observación microscópica de posibles ooquistes es muestras de lechuga ..	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	4
Figura 3. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 1.	18
Figura 4. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 2.	18
Figura 5. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 3.	19
Figura 6. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 4.	19
Figura 7. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 5.	19
Figura 8. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 6.	20
Figura 9. Amplificación del fragmento B1 de las muestras.....	23

RESUMEN EJECUTIVO

Toxoplasma gondii es un parásito que causa la toxoplasmosis ocular, una zoonosis que afecta a un tercio de la población mundial, el cual perjudica significativamente a mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas. Se ha demostrado que tiene varias vías de transmisión, siendo relacionada principalmente a las heces de los gatos y a carne mal cocinada. Sin embargo, existen vías de transmisión por vegetales crudos, especialmente los de hoja verde, como lo es la lechuga (*Lactuca sativa* L). En Ecuador no existe información sobre la presencia de este parásito en matrices vegetales y tampoco su caracterización molecular. El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *T. gondii* en lechuga comercializada en el mercado América de Ambato, e identificar si pertenece al subtipo II o III por medio de la amplificación del gen SAG2 y la utilización de técnica de PCR anidada. Se realizó un análisis descriptivo y exploratorio, donde se analizaron 21 muestras de 7 puestos de venta, de los cuales 11 fueron identificadas microscópicamente y de ellas, 7 muestras evidenciaron molecularmente la presencia de *T. gondii* (33,3 por ciento). No obstante, ninguna de las muestras presentó compatibilidad a subtipos II o III, sugiriendo que existe la posible circulación de cepas no arquetípicas de *T. gondii* en la ciudad. En conclusión, el estudio determinó la presencia de *T. gondii* en muestras de lechuga y aporta evidencia preliminar sobre la variabilidad genética del parásito, asentando las bases para futuras investigaciones.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, microscopía, lechugas, PCR, subtipos, escasa investigación, variabilidad genética

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a parasite that causes ocular toxoplasmosis, a zoonosis that affects one-third of the world's population and significantly harms pregnant women and immunocompromised individuals. It has been shown to have several routes of transmission, mainly related to cat feces and undercooked meat. However, there are also routes of transmission through raw vegetables, especially green leafy vegetables such as lettuce (*Lactuca sativa* L). In Ecuador, there is no information on the presence of this parasite in vegetable matrices, nor on its molecular characterization. The objective of this research was to determine the presence of *T. gondii* in lettuce sold in the América market in Ambato and to identify whether it belongs to subtype II or III by amplifying the SAG2 gene and using nested PCR. A descriptive and exploratory analysis was carried out, in which 21 samples from seven market stalls were analyzed. Eleven of these samples were identified microscopically, and seven of them showed molecular evidence of the presence of *T. gondii* (33, percent). However, none of the samples were compatible with subtypes II or III, suggesting that non-archetypal strains of *T. gondii* may be circulating in the city. In conclusion, the study determined the presence of *T. gondii* in lettuce samples and provides preliminary evidence on the genetic variability of the parasite, laying the groundwork for future research.

Key words: *Toxoplasma gondii*, microscopy, lettuce, PCR, subtypes, limited research, genetic variability

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

Toxoplasma gondii es un parásito de amplia distribución a nivel mundial, afectando hasta un tercio de la población, responsable de causar la toxoplasmosis ocular, enfermedad que puede terminar en la pérdida total de la visión del ojo. Además, *T. gondii* tiene la capacidad de provocar daños graves en personas con el sistema inmune comprometido, causando enfermedades graves como la encefalitis y neumonía (Yu et al., 2023). Las mujeres embarazadas también son un grupo vulnerable, ya que al contagiarse con *T. gondii* por primera vez, pueden tener un parto prematuro, aborto, muerte fetal o el feto puede nacer con anomalías oculares y neurológicas (Deganich et al., 2022).

Los hospedadores definitivos son los felinos, ya que el parásito puede sobrevivir en el tracto intestinal, lugar donde completan su ciclo de vida mediante reproducción sexual, liberando ooquistes infecciosos al ambiente, por medio de sus heces (Ubaid et al., 2025). Esto representa un riesgo para la seguridad alimentaria, ya que estos ooquistes son resistentes y estables en el ambiente, llegando a contaminar suelos, agua, vegetales e incluso otros animales, principalmente de sangre caliente (Sheng et al., 2023). *T. gondii* se ha asociado su transmisión al consumo de carne mal cocida, sin embargo, se ha documentado que los vegetales, especialmente de hoja verde y muchas veces, consumidos crudos, representan un vehículo significativo de propagación. Por ello, la identificación de *T. gondii* en matrices vegetales es crucial para la salud pública.

Adicionalmente, la determinación de subtipos de *T. gondii* aporta información fundamental para comprender la diversidad genética del parásito en un territorio específico. En América Latina predominan cepas no arquetípicas variables, no obstante, la identificación de los subtipos clásicos I, II y III es fundamental para instaurar una base sólida, la cual permita la comparación de perfiles epidemiológicos, estimación de niveles de virulencia y aportará datos que contribuyan al entendimiento global de la estructura poblacional del parásito.

Ambato es una ciudad de comercial, de gran cantidad de mercados y de alta rotación de productos agrícolas, donde miles de personas adquieren vegetales frescos diariamente. El objetivo de investigar si la lechuga (*Lactuca sativa* L.) comercializada contiene *T. gondii*, permite determinar a qué subtipo pertenece y con ello, orientar recomendaciones de inocuidad alimentaria, fortalecer estrategias de vigilancia y generar conciencia en los consumidores y productores. Finalmente, este estudio responde a un vacío de conocimiento en Ecuador, ya que existen escasos trabajos sobre la seroprevalencia en humanos y animales, más aún, no se han realizado investigaciones que evalúen la presencia del parásito

en vegetales ni su caracterización molecular. Por ello, la ausencia esta información dificulta comprender la dinámica local de transmisión, por lo que es imprescindible este trabajo de investigación de enfoque descriptivo, transversal y exploratorio, para aportar con evidencia científica y contextualizada que permita abrir campo a nuevas investigaciones.

1.1.2 Aspectos generales de *Toxoplasma gondii*

1.1.2.1 Descubrimiento y taxonomía del parásito

Toxoplasma gondii fue aislado por primera vez del tejido de un roedor (*Ctenodactylus gundi*) por Nicolle y Maceaux en 1908, en el Instituto de Pasteur. Es un parásito protozario intracelular obligado, perteneciente al filo Apicomplexa y un tipo de coccidio capaz de formar ooquistes e infectar a animales domésticos. También es caracterizado por la presencia de un complejo apical especializado, facilitando la invasión celular, lo que permite infectar a la mayoría de los animales de sangre caliente, incluyendo a los humanos. En 1970 se reveló su ciclo de vida, el cual tiene una fase asexual y una sexual la cual se desarrolla en el intestino de los felinos, por ello se consideran hospedadores definitivos (**Téllez-Isaías et al., 2023**)

1.1.2.2 Morfología y fases del parásito

Su morfología varía según la fase de su ciclo celular. Se divide en tres estructuras principales: los ooquistes, los taquizoítos y los quistes tisulares, como se pueden observar en la **Figura 1**. Los ooquistes tienen forma circular con un tamaño de 10 a 12 μm de diámetro. Estos se producen en la fase sexual, en el intestino de los felinos, donde se excretan al ambiente por medio de las heces. Estos se encuentran de forma no esporulada durante 21 días a una temperatura constante. Posteriormente, el ooquiste madura y esporula, conteniendo en su interior dos estructuras ovaladas llamadas esporoquistes que, a su vez, contienen en su interior hasta 4 esporozoitos. Los ooquistes maduros pueden permanecer en el ambiente hasta 18 meses de forma viable, siendo capaz de resistir cambios bruscos de temperatura (**Giraldo, 2008**).

Los taquizoítos miden aproximadamente de 2 a 4 μm de ancho y 4 a 8 μm de largo. Tienen una estructura ovalada o de luna creciente, y es la forma invasiva del parásito, ya que puede infectar todas las células del cuerpo. Estas células infectadas se lisan, dando paso a la diseminación de más taquizoítos por vía sanguínea, llegando a perjudicar tejidos como muscular, miocardio y placenta (**Attias et al., 2020**).

Los quistes tisulares tienen un tamaño de 10 a 200 μm de diámetro, y en su interior contiene una gran cantidad de bradizoítos. Estos quistes permanecen de forma latente durante la vida del hospedero, principalmente en el cerebro, músculo esquelético y corazón. La multiplicación de los bradizoítos es lenta y tienen la capacidad de convertirse nuevamente en taquizoítos frente a una alteración deficiente del sistema inmune. Son resistentes a los jugos digestivos y pueden transmitirse por la ingesta de carne mal cocida, sin embargo, son susceptibles a temperaturas mayores a 60 °C (**Giraldo, 2008**).

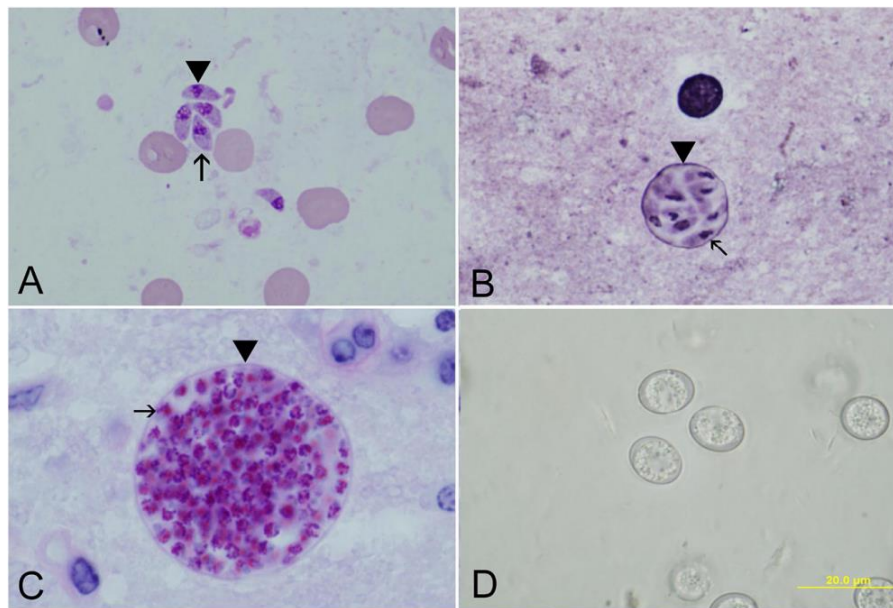


Figura 1. Etapas del ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Nota: (A) Taquizoítos. (B) Quiste tisular con bradizoítos en su interior (C) Quiste tisular en sección transversal (D) Ooquiste no esporulado. (Fuente: Adaptado de (**Dubey, 2020**))

1.1.2.3 Ciclo biológico

El ciclo de *T. gondii* funciona en dos fases, la sexual donde ocurre en huéspedes definitivos, y la fase asexual, que ocurre en los huéspedes intermedios, descritas en la **Figura 2**. La reproducción sexual ocurre después de la ingestión de un tejido infectado con quistes tisulares. Dentro del intestino, la pared es destruida por actividad enzimática y se liberan los bradizoítos, dando lugar a la gametogonia, proceso en el cual forman gametos masculinos y femeninos dentro de los enterocitos. Posteriormente a la fertilización, se forman los ooquistes no esporulados dentro de los enterocitos y son excretados por medio de las heces del hospedador, luego de 3 a 7 días desde la ingestión del quiste (**Hotea & Darabus, 2023**).

En los hospedadores intermediarios, el parásito solamente experimenta un desarrollo asexual. Al ingerir los ooquistes esporulados encontrados en el ambiente, se liberan los esporozoitos y se diferencian en

taquizoítos, los cuales se replican rápidamente dentro de cualquier tipo de célula nucleada y se diseminan por todo el organismo (Dubey et al., 1998). También ocurre lo mismo al ingerir quistes tisulares encontrados en carne mal cocida, en donde la pared de los quistes se rompe, dando lugar a los bradizoítos que infectarán el epitelio intestinal del huésped, diferenciándose nuevamente en taquizoítos y proliferándose por todo el cuerpo. Esta fase es muy peligrosa ya que, si ocurre durante el embarazo, se da la transmisión congénita, el cual el parásito atraviesa la pared de la placenta y puede llegar a infectar al feto (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

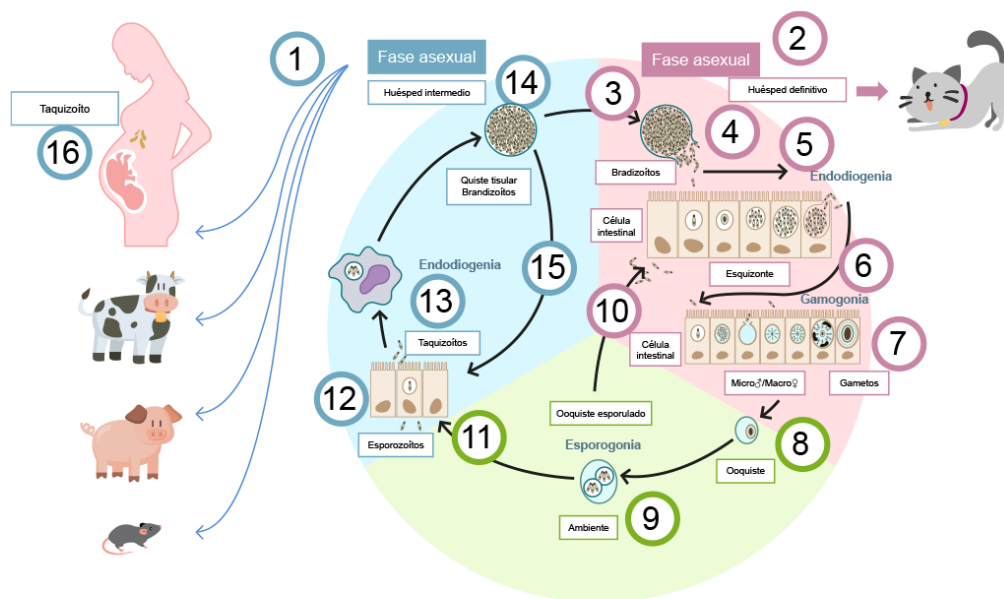


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Nota: Biología, infección y replicación (Fuente: Obtenido de García et al., 2023).

1.1.3 Epidemiología

1.1.3.1 Situación global

La toxoplasmosis es una de las infecciones parasitarias con alta prevalencia a nivel mundial, variando ampliamente entre regiones debido a diferencias climáticas, sanitarias y socioculturales. Las regiones que cuentan con áreas tropicales y subtropicales son las que favorecen a la supervivencia de los ooquistes, siendo mayor la seroprevalencia en esas zonas. Entre esas regiones, se encuentran África, Medio Oriente, Sur de Asia, Latinoamérica, Europa Central y Europa del Este, quienes tienen un alto índice de toxoplasmosis (Vidal, 2019). En algunos países de Europa y algunas regiones de Estados Unidos, la toxoplasmosis oscila entre el 15 y 22 %, y debido a sus factores climáticos, la toxoplasmosis alcanza una prevalencia del 16% en el suroeste y un 52,9% en Hawái (Khairullah et al., 2024; Shapiro

et al., 2019). También se evidenció la resistencia de ooquistes de *T. gondii* en zonas frías como en Canadá, donde se evidenció que el 31,3 % de muestras de carne de beluga, una ballena que se habita en las zonas árticas, contiene quistes de *T. gondii*, se detectó que el 30,8 % de las muestras tenían ADN del parásito en el tejido del cerebro, y el 12,5% se detectó en tejido de bazo del animal (Merks et al., 2025) .

1.1.3.2 Situación en Latinoamérica y Ecuador

La distribución de *T. gondii* en América Latina es distintiva, caracterizada por las altas tasas de transmisión, y una diversidad genética significativamente mayor que en otras regiones. La seroprevalencia en humanos llega a cubrir más del 50 % en varios países, atribuyendo a condiciones ambientales favorables para la propagación del parásito. Asimismo, los estudios genotípicos reportan la circulación de cepas atípicas altamente virulentas, lo cual incrementa el riesgo de cuadros clínicos severos, especialmente para mujeres embarazadas y personas con el sistema inmunodeficiente.

En Ecuador, la prevalencia varía entre 10 y 15% dependiendo de la región. Durante los últimos 5 años se determinó que en la región costa es donde existe una mayor prevalencia, con Guayas del 73%, El Oro con el 16% y en Manabí del 9% en mujeres gestantes, en donde la mayoría de los casos afirman manipular correctamente los alimentos y consumir carne bien cocida, sugiriendo que la transmisión de *T. gondii* fue ocasionada por otra vía de contaminación (Zavala-Hoppe et al., 2025).

No obstante, hay muy pocos estudios que evidencian la prevalencia de parásitos en muestras vegetales en el país, como el descrito por Caiza & Caiza, (2019), en donde se refleja la carga parasitaria de protozoarios como *Blastocytis* sp. y *Eimeria* sp., en frutas y vegetales, sin embargo, no incluye la detección de *T. gondii*. En la ciudad de Ambato solamente hay un estudio sobre la identificación de *T. gondii* en coles verdes, en donde se confirmó un 53,33% de contaminación por este parásito, representando un riesgo significativo ya que la toxoplasmosis en Tungurahua en mujeres embarazadas es del 42%, lo que podría indicar una posible fuente de transmisión (Ibarra, 2025). A pesar de ello, no se han realizado identificaciones genéticas para determinar la cepa correspondiente ni en matrices vegetales ni en muestras biológicas.

1.1.4 Variabilidad genética de *T. gondii*

1.1.4.1 Tipos clonales

T. gondii tiene una estructura poblacional clonal que consta de tres linajes clonales, o cepas arquetípicas, conocidos como I, II y III. Estos subtipos están muy extendidos por Norteamérica y Europa, en donde

se afirma que en cada locus existen solamente dos alelos, lo que sugiere que estos linajes tuvieron un mismo origen de la misma fuente, sin embargo, han experimentado un intercambio genético muy limitado (**Shwab et al., 2014**). Las cepas de subtipo I son altamente virulentas, mientras que los subtipos II y III son relativamente no virulentas, sin embargo, existen casos en donde las infecciones en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fueron causadas por el subtipo II (**Khan et al., 2005**).

Además de su relevancia epidemiológica, los tres subtipos clonales presentan perfiles genómicos distintivos que influyen en la patogénesis y respuesta inmunitaria del hospedador. El tipo II es el más prevalente en humanos y está relacionado con la toxoplasmosis congénita y ocular, mientras que el tipo III es menos virulento, sin embargo, es relevante por su amplia circulación en animales domésticos y fauna silvestre (**Uzelac & Djurković-Djaković, 2025**).

1.1.4.2 Tipos no clonales

En Sudamérica, existen diferentes linajes de *T. gondii* y mucho más virulentos que los linajes típicos del parásito. Las cepas exóticas de *T. gondii* tiene muchos polimorfismos únicos, derivándose de los subtipos I, II y III. Se determinaron 156 genotipos distintos en América del sur, de las cuales 106 se encontraron exclusivamente en Brasil, demostrando la diferencia genética y el gran número variable de polimorfismos específicos (**Brito et al., 2023**).

Se han reportado varios aislamientos atípicos definidos como genotipos #6, 65 y 71 en Brasil, aislados de muestras de laboratorio de pacientes infectados por VIH, mujeres embarazadas, recién nacidos y personas inmunocompetentes ingresados y tratados en diferentes instituciones clínicas. En este caso, el #65 es altamente virulento para los humanos y al activarse, produce una mayor cantidad de parásitos que otros genotipos (**Ferreira et al., 2011**). En Argentina se han identificado 6 genotipos atípicos aislados de sangre de cordón umbilical y placenta, de los cuales dos han provocado infecciones crónicas y agudas en ensayos con ratones (**Pardini et al., 2019**).

1.1.5 Manifestaciones clínicas

1.1.5.1 Afectaciones en mujeres embarazadas

Las mujeres embarazadas son uno de los grupos vulnerables y de mayor riesgo. Si la madre contrae *T. gondii* por primera vez durante el embarazo, se puede dar una infección congénita al feto, ya que *T. gondii* tiene la capacidad de atravesar la placenta y ocasionar en el feto convulsiones, toxoplasmosis ocular, hidrocefalia, coriorretinitis toxoplásmica, encefalitis e incluso aborto (**Deganich et al., 2022**).

1.1.5.2 Afectaciones dependiendo el sistema inmune del hospedador

Las enfermedades que *T. gondii* puede causar dependen del estado inmunológico del hospedador y el subtipo del parásito. En personas inmunocompetentes, la infección es asintomática o puede generar una sintomatología parecida a una gripe. Los síntomas más evidentes y comunes que presenta una persona con un sistema inmune sano son linfadenopatía, fiebre y fatiga (Yu et al., 2023). *T. gondii* está latente en este hospedador, no obstante, si el sistema inmune está deficiente, *T. gondii* puede reactivarse y producir la enfermedad.

Sin embargo, cuando el sistema inmune es deficiente o tiene complicaciones, puede verse afectado de manera significativa. En pacientes con SIDA, *T. gondii* puede causar la encefalitis toxoplásmica, una de las causas más comunes de infección al sistema nervioso central (Lee et al., 2024). *T. gondii* también puede causar toxoplasmosis ocular en este tipo de pacientes, causadas en su mayoría por el subtipo I.

1.1.6 Técnicas de detección

1.1.6.1 Microscopía

La detección en muestras biológicas (como fecales, tejidos y sangre) o en muestras ambientales, se ha utilizado tradicionalmente el examen microscópico, sin embargo, la técnica es poco sensible y fiable, por lo que se complementa con otras técnicas. La centrifugación y filtración ayuda a la acumulación de ooquistes en grandes volúmenes de muestra, y los quistes tisulares pueden teñirse con Giemsa y hematoxilina y eosina, la cual es sencilla, rentable y permite obtener mejores resultados (Liu et al., 2015).

1.1.6.2 Técnicas moleculares

Las herramientas moleculares han demostrado tener una mayor sensibilidad y especificidad, permitiendo confirmar la infección y además la caracterización de genotipos del parásito. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes como la transcripción inversa (RT-PCR), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP-PCR) y la cuantitativa en tiempo real (qPCR), permiten la amplificación específica de ADN a partir de pequeñas cantidades de muestra, mejorando significativamente el tratamiento de esta enfermedad (Brenier-Pinchart et al., 2022).

Para *T. gondii* se utiliza esta técnica con varios genes de direccionamiento multicopia y de regiones conservadas, como son el gen B, el P30, el SAG1 y SAG2 (Wang et al., 2023). En un estudio se utilizó

la qPCR y la RFLP-PCR dirigida al elemento repetido de 529 pb para la detección de *T. gondii* en productos cárnicos, donde demostraron una alta prevalencia y sensibilidad de detección del parásito (Plaza et al., 2020). A pesar de la alta sensibilidad de estas técnicas, se requieren de equipos costosos, lo que limita su uso en aplicaciones de campo y un restringido uso en el laboratorio.

1.1.7 Vías de transmisión

1.1.7.1 Transmisión por suelo y agua

Los ooquistes de *T. gondii* son la forma más resistente del parásito, y este puede sobrevivir tanto en el suelo como en fuentes de agua, siendo un riesgo para los cultivos. Además, existe una variabilidad en la seroprevalencia por sector socioeconómico, debido a las malas condiciones, el agua se convierte en un vehículo de transmisión, ya que esta no está filtrada o tratada adecuadamente. Las tasas de detección de *T. gondii* oscilaron entre 2,3 % y 17,9 % en agua utilizada en viviendas y de consumo público (Ureña et al., 2022). En Brasil, un grupo socioeconómico de estatus alto tiene una seroprevalencia de 23%, de estatus medio de 62% y de estatus bajo del 84%, un porcentaje similar en Estados Unidos, donde la infección por toxoplasmosis se ve ligada predominantemente con la pobreza (Khairullah et al., 2024). Además, en Estados Unidos, desde mediados hasta final de la década de los 2000, se estima que hubo más de 300 muertos y más de 4000 hospitalizaciones por toxoplasmosis, inducida por alimentos contaminados (Jones et al., 2014).

Los ooquistes pueden permanecer en su estado infeccioso en arena o suelo por más de un año, el porcentaje varía dependiendo de la ubicación del suelo: se ha determinado que en parques infantiles existe una tasa de detección de 1,1 % y un 94,1 % en huertos urbanos (Akins et al., 2024). El contacto directo con el suelo representa una amenaza a la salud pública.

1.1.7.2 Transmisión por alimentos

La superficie de los vegetales y frutas pueden contaminarse con ooquistes presentes en agua o en suelo que contenga heces de gato infectado con el parásito. Un estudio hecho por Pinto-Ferreira et al., (2019) han demostrado que las verduras serán la vía de transmisión de *T. gondii* más común posible en un futuro. Se demostró que las cadenas alimentarias y el incremento del consumo de vegetales crudos han ampliado las vías de exposición, donde se han llegado a reportar presencia de *T. gondii* en matrices vegetales, especialmente de hoja verde, ya que contienen una gran cantidad de patógenos, representando más del 22% de infecciones transmitidas por alimentos (Lilly & Webster, 2021). En España y Portugal se evaluó la presencia de *T. gondii* en vegetales conservados en fundas y frutos rojos recolectados de

productores locales, en donde el 40% de las muestras de estos alimentos fue confirmada la presencia del parásito **(Marques et al., 2020)**.

La evidencia disponible sobre la presencia de *T. gondii* en vegetales frescos todavía es limitada y desactualizada en Latinoamérica. En Brasil hay un estudio que describe dos brotes de toxoplasmosis aguda a causa de vegetales y acaí contaminados con *T. gondii* entre 2009 y 2013, resaltando la falta de estudios actualizados de identificación parasitaria en alimentos **(Shapiro et al., 2019)**. La mayoría de los estudios sobre presencia de *T. gondii* en matrices vegetales se concentra en estudios realizados fuera de la región. Un estudio realizado en China, **(Lass et al., 2019)** aplicaron PCR convencional y cuantitativa para evaluar distintos vegetales recolectados en mercados locales, confirmando la presencia de ADN de *T. gondii* en una proporción de las muestras analizadas.

Un aspecto crítico en la epidemiología alimentaria es que no se han desarrollado investigaciones que estén dirigidas a la identificación genética del parásito en estos alimentos. Esto evidencia que no se han investigado su variabilidad genética de los aislamientos positivos, por lo tanto, tampoco ha sido posible determinar a qué cepa pertenece el *T. gondii* presente en vegetales contaminados. Esto es de vital importancia considerando que los genotipos del parásito difieren en virulencia y comportamiento, limitando significativamente la comprensión y el riesgo real asociado al consumo de las hortalizas crudas.

1.1.7.3 La lechuga como vehículo de transmisión

La lechuga (*Lactuca sativa L.*) es uno de los vegetales de hoja verde más consumidos a nivel mundial gracias a su valor nutricional, su accesibilidad y su uso primordial para preparaciones crudas, convirtiéndose en un alimento altamente comercializado en mercados mayoristas y minoristas. Sin embargo, la detección de ooquistes es difícil por las complicaciones en la separación y concentración de ooquistes, demostrando que faltan métodos estandarizados de laboratorio para su detección **(Temesgen et al., 2019)**.

Se ha identificado la presencia de *T. gondii* en lechuga en varios países como Marruecos, Polonia, China y Brasil, donde el porcentaje de muestras positivas alcanzaron hasta un 18% **(Marín-García et al., 2022)**. En Ecuador, la investigación es baja o casi nula, ya que no existe registros de estudios publicados que evalúen la presencia de *T. gondii* en lechuga ni otros vegetales mediante métodos de investigación molecular, confirmando que no se dispone información sobre eventuales cepas circulantes en la producción agrícola.

1.1.8 Vacíos de conocimiento y aporte a futuras investigaciones

T. gondii es un patógeno relevante para la salud pública ecuatoriana, sin embargo, las brechas persisten e impiden la comprensión en sus vías de transmisión y variabilidad genética. Es por ello que se destacan los siguientes vacíos sobre la investigación parasitaria en matrices vegetales:

- a. **Ausencia de estudios genéticos aplicados a matrices vegetales:** En Ecuador no se han realizado investigaciones mediante técnicas de identificación molecular, para evaluar la presencia en vegetales de *Toxoplasma gondii*. Casi toda la literatura está centrada en sus muestras humanas, como líquido amniótico o tejidos, dejando a un lado el origen en los productos agrícolas. Dejando sin información sobre la cepa o genotipo del parásito que podría estar presente en vegetales contaminados.
- b. **Carencia de un mapa genético regional del parásito:** Algunos países Latinoamericanos han descrito genotipos atípicos y de alta virulencia. Por el contrario, Ecuador no cuenta con un sistema de vigilancia genética que permita identificar linajes circulantes. Esto genera impedimentos para la interpretación epidemiológica de los casos, dificultando establecer relaciones entre cepas detectadas.
- c. **Inexistencia de protocolos adaptados a la realidad local:** La complejidad de estas matrices requiere metodologías específicas para la detección molecular de *T. gondii* en vegetales. En Ecuador, no se ha desarrollado ni validado ningún procedimiento para empezar la recuperación y el análisis de ooquistes en lechugas u otros vegetales de consumo frecuente.
- d. **Falta de información del papel de los vegetales como vías de transmisión:** La evidencia internacional ha demostrado que los vegetales pueden actuar como un vehículo de contaminación, sin importar esto no existen investigaciones ecuatorianas que midan la contribución que fomenta al riesgo de toxoplasmosis.

Estos hallazgos resaltan la vulnerabilidad de la lechuga dentro de la cadena agroalimentaria. Además, la falta de protocolos para la manipulación de vegetales frescos y la escasa investigación de patógenos se ha vuelto una problemática y resalta la necesidad de estudios que evalúen su presencia y variabilidad genética de *T. gondii*.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Determinar los subtipos de *Toxoplasma gondii* en muestras de lechuga (*Lactuca Sativa* L.) del mercado América de Ambato.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar la presencia de ooquistes de *T. gondii* en muestras de lechuga por medio de microscopía.
- Analizar el ADN de las muestras de *T. gondii* con la utilización de técnica de PCR.
- Examinar el subtipo presente de *T. gondii* mediante la técnica de PCR anidada.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios tanto académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En la **Tabla 1** se enlistan los reactivos, material fungible y los equipos que se utilizaron durante el proceso de investigación.

Tabla 1.

Materiales, reactivos y equipos utilizados en la investigación

Categoría	Material	Cantidad
Reactivos	Agua destilada	10 L
	Agua ultrapura	200 mL
	Formaldehído 37%	10 mL
	Tampón Tris-EDTA	3 mL
	Master Mix (Dream Taq Green PCR)	2 mL
	Par de Primers TOXO 1	10 µL
	Par de Primers TOXO 1	10µL
	2 Pares de Primers SAG2 3' Externos	7 µL
	2 Pares de Primers SAG2 3' Internos	7 µL
	2 Pares de Primers SAG2 5' Externos	7 µL
	2 Pares de Primers SAG2 5' Internos	7 µL
	Tween 80	10 µL
	TBE 1X	1 L
	Alcohol isopropílico	200 mL
	Hielo seco	200 g
	Kit de extracción de ADN (GeneJet Genomic DNA Purification, Thermo Fisher, Lituania)	1
Material Fungible	Puntas de micropipetas 100 -1000 µl	100
	Puntas de micropipeta 20 – 200 µl	100
	Puntas de micropipeta 0,1 – 10 µl	100
	Tubos Falcon	50
	Tubos de PCR	30
	Tubos Eppendorf 1,5 mL	25
	Filtros jeringa	50

	Portaobjetos	50
	Cubreobjetos	50
Equipos	Refrigeradora	1
	Congeladora	1
	Plancha de calentamiento	1
	Incubadora	1
	Cabina de flujo laminar	1
	Cámara de electroforesis	1
	Balanza analítica	1
	Micropipeta (0,1 – 10 µL)	1
	Micropipeta (10 – 100 µL)	1
	Micropipeta (100 – 1000 µL)	1
	Microscopio óptico	1
	Potenciómetro	1
	Vórtex	1
	Fotodocumentador	1

2.2 Métodos

1.2.3 Recolección y transporte de muestras

La metodología de recolección de muestras se basó en los lineamientos del Instituto Ecuatoriano de Normalización 1750 para ensayos de laboratorio en hortalizas, con un enfoque específico en lechugas (**Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), 1996**). Se implementó un muestreo completamente aleatorio, donde se seleccionaron completamente al azar 3 lechugas (*Lactuca sativa L*) de cada uno de los 7 puestos del Mercado América que comercializan esta hortaliza (coordenadas 1°16'5"S 78°36'37"W).

Las lechugas fueron transportadas directamente a los Laboratorios de la UODIDE de la Universidad Técnica de Ambato en fundas plásticas Ziploc de doble sellado y se conservaron en una refrigeradora a 4°C.

1.2.4 Lavado de lechugas

Este método se basó en **Dardona et al., (2021)** con algunas modificaciones. Las lechugas se trocearon y se separaron en pequeñas porciones de 200 g y se guardaron en pequeñas fundas Ziploc. Posteriormente, se preparó una solución salina al 0,95% con Tween al 0,05% para el lavado de las lechugas. Estas porciones con la solución de lavado se homogenizaron y se dejaron reposar toda la noche, esto con el objetivo de que los ooquistes se desprendan de la lechuga.

1.2.5 Microscopía de las muestras

1.2.5.1 Preparación de solución de Sheather

Se calentaron 355 ml de agua destilada hasta alcanzar una temperatura aproximada de 70°C (punto previo a ebullición). Se incorporaron 454 g de azúcar granulada, mezclando constantemente hasta lograr su completa disolución. Posteriormente, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente antes de adicionar 6 ml de formaldehído al 37%, llegando a una concentración final de 0,6% (v/v). Finalmente, se verificó la densidad de la solución, realizando los ajustes necesarios para obtener una densidad de 1.27 ($\rho = 1.27$), según la metodología propuesta por (Leutenegger et al., 2023).

1.2.5.2 Flotación de ooquistes con solución de Sheather

Al siguiente día, se recolectó esa solución de lavado y se filtró con el fin de eliminar cualquier hoja o residuo no deseado y esta solución se transfirió a tubos centrífuga de 15 mL y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 2 ml de agua destilada. Tras homogenizar la muestra, se tomaron 1,5 mL de alícuota y se transfirió a un tubo de ensayo, donde se adicionó la solución de Sheather hasta formar un menisco convexo en la parte superior del tubo. Se colocó un cubreobjeto en el menisco y se dejó reposar por 20 minutos para permitir la flotación de los ooquistes y se tomó ese cubreobjeto para la observación en el microscopio.

Se realizó un barrido con todos los objetivos para la observación de las muestras a 10X, 40X y 100X. Las muestras que resultaron positivas en la observación se aplicó una tinción con Lugol al 1% y se verificó nuevamente que la muestra sea positiva. Las muestras que resultaron positivas fueron preservadas en formaldehído al 5% y conservadas a -20°C, para su posterior confirmación mediante análisis de PCR (Amairia et al., 2016).

1.2.6 Extracción de ADN

Se realizó un pretratamiento con choque térmico para romper la pared de los ooquistes. Se realizaron 15 ciclos de 5 minutos de congelación a -90°C con hielo seco y alcohol IPA (99,9%) y 5 minutos de calentamiento a 90 °C por 5 minutos. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit comercial GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, Lituania) a partir del sedimento resuspendido, siguiendo estrictamente el protocolo establecido por el fabricante. Para la detección del gen B1, los precipitados finales fueron resuspendidos en 30 μ L de tampón Tris-EDTA (10 mM Tris y 1 mM EDTA, pH 7,2) y conservados a -20°C hasta proceder con el análisis mediante PCR.

1.2.7 Diseño de las condiciones de la PCR y utilización de primers

Se realizó un ensayo de PCR convencional diseñado para dirigirse al fragmento de 194 pb del gen B1, 35 veces repetitivo, utilizando un par de cebadores: TOXO1 (5' GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG 3') y TOXO2 (5' TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC 3'). Todos los componentes se añadieron de la siguiente manera: 7,5 µL de Máster Mix, 0,75 µL de cada primer, 0,5 µL de BSA, 4 µL de ADN molde y se completó con agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 15 µL. La amplificación se realizó según las condiciones descritas por **Schwab y McDevitt (2003)**.

Para cada muestra, la amplificación PCR se realizó en un termociclador, donde las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 56°C para el alineamiento y 30 segundos a 72°C para la extensión; y un ciclo final de elongación de 10 min a 72°C (**Khan & Noordin, 2020**). Se utilizó agua libre de nucleasas como control negativo, y una muestra de *Toxoplasma gondii* RH como control positivo. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a un tiempo de 45 min, a 90V y 70 mA. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta y se identificaron las muestras que sean positivas de *T. gondii* que hayan amplificado el fragmento de 194 pb del gen B1. Las muestras positivas se conservaron a -20°C para su identificación genotípica.

1.2.8 Diseño de las condiciones de la PCR anidada

Este método se basó en la metodología utilizada por (**Howe et al., 1997**) con algunos cambios propuestos por **Shanebeck et al., (2025)**. Para la amplificación de los extremos 5' y 3' del locus del gen SAG2, se realizó dos rondas de PCR para cada extremo.

1.2.8.1 Primera ronda de PCR anidada

Para el extremo 5' se utilizaron los primers externos SAG2 5' Forward (5'GCTACCTCGAACAGGAACAC3') y SAG2 5' Reverse (5'GCATCAACAGTCTTCGTTGC3'). En la primera ronda se utilizó 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de cada primer, 1,5 µL de BSA, 4 µL de ADN molde y se completó con agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 25 µL. Para el extremo 3' se utilizaron los primers externos SAG2 3' Forward (5'TCTGTTCTCCGAAGTGAAGTCC3') y SAG2 3' Reverse (5'TCAAAGCGTGCA TTATCGC3'). De igual manera, en la primera ronda se utilizó 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de cada primer, 1,5 µL de BSA, 4 µL de ADN molde y se completó con agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 25 µL.

Las condiciones de la PCR fueron: Desnaturalización a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 52°C para el alineamiento y 30 segundos a 72°C para la extensión; y un ciclo final de elongación de 10 min a 72°C.

1.2.8.2 Segunda ronda de PCR anidada

Para el extremo 5' se utilizaron los primers internos SAG2 5' Forward (5'GAAATGTTTCAGGTTGCTGC3') y SAG2 5' Reverse (5'GCAAGAGCGAAC TTGAACAC3'). En la primera ronda se utilizó 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de cada primer, 2 µL de del producto amplificado y se completó con agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 25 µL. Para el extremo 3' se utilizaron los primers internos SAG2 3' Forward (5'ATTCTCATGCCTCCGCTTC3') y SAG2 3' Reverse (5'AACGTTTCACGAAGG CACAC3'). De igual manera, en la primera ronda se utilizó 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de cada primer, 2 µL de del producto amplificado y se completó con agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 25 µL.

Las condiciones de la PCR fueron: Desnaturalización a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 52°C para el alineamiento y 30 segundos a 72°C para la extensión; y un ciclo final de elongación de 10 min a 72°C.

Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 1,8% bajo luz ultravioleta.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3 Análisis y discusión de resultado

1.3.1 Resultados de observación microscópica

Se procesaron un total de 21 muestras de lechuga (*Lactuca sativa L*) recolectadas del mercado América, de las cuales 11 muestras revelaron la presencia de estructuras similares a ooquistes de *Toxoplasma gondii*. Estos resultados se visualizan en la **Tabla 2**.

Tabla 2.

Resultados de la observación microscópica de posibles ooquistes es muestras de lechuga

Puesto	Muestra	Resultado	Imagen
1	M1	Positivo	Figura 3A
	M2	Positivo	Figura 3B, 3C
	M3	Positivo	Figura 3D, 3E, 3F, 3G
2	M1	Positivo	Figura 4A
	M2	Positivo	Figura 4B
	M3	Positivo	Figura 4C, 4D
3	M1	Negativo	-
	M2	Positivo	Figura 5A, 5B
	M3	Negativo	-
4	M1	Negativo	-
	M2	Positivo	Figura 6A, 6B, 6C
	M3	Negativo	-
5	M1	Positivo	Figura 7A
	M2	Negativo	-
	M3	Positivo	Figura 7B, 7C
6	M1	Negativo	-
	M2	Positivo	Figura 8A, 8B
	M3	Negativo	-
7	M1	Negativo	-
	M2	Negativo	-
	M3	Negativo	-



Figura 3. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 1.

Nota. Diferentes estructuras similares a ooquistes en diferentes muestras del puesto 1. **(A)** Resultado de M1. **(B)** Resultado de la muestra M2. **(C)** Resultado de la muestra M2. Tinción con Lugol. **(D)** Resultado de la muestra M3 **(E)** Resultado de la muestra M3 **(F)** Resultado de la muestra M3. Tinción con Lugol. **(G)** Resultado de la muestra M3.

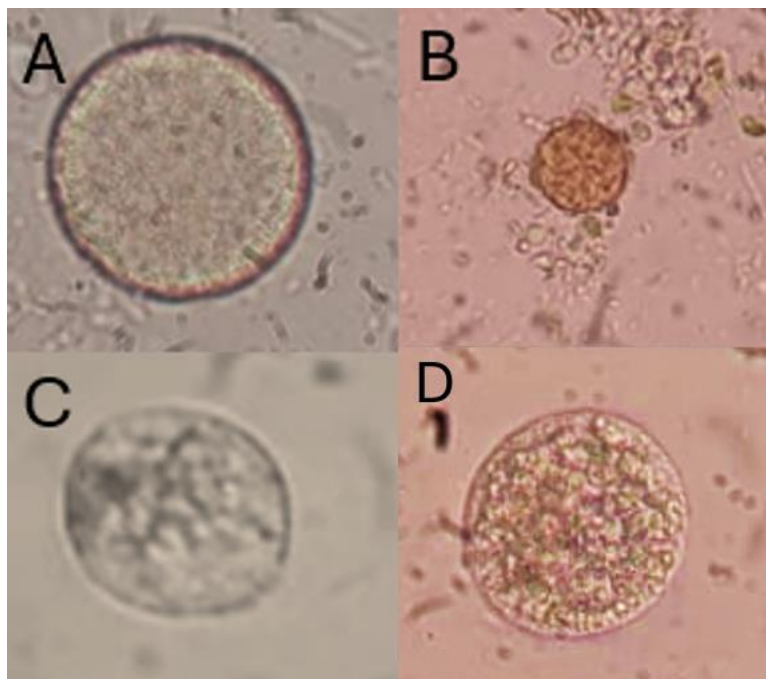


Figura 4. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 2.

Nota. Diferentes estructuras similares a ooquistes en diferentes muestras del puesto 2. **(A)** Resultado de M1. **(B)** Resultado de la muestra M2. Tinción con Lugol. **(C)** Resultado de la muestra M3. **(D)** Resultado de la muestra M3.

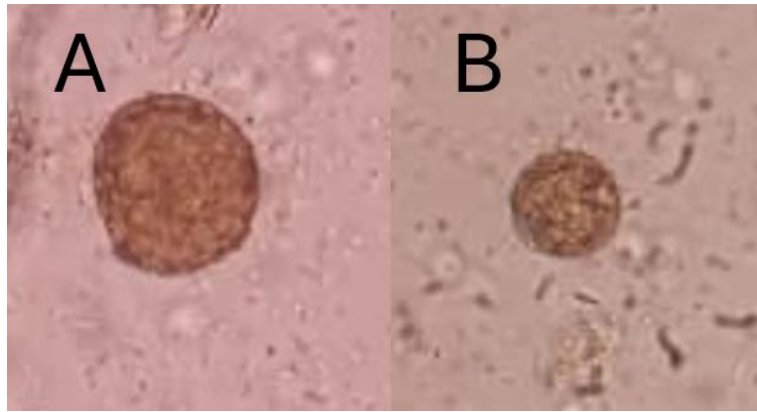


Figura 5. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 3.

Nota. Diferentes estructuras similares a ooquistes en diferentes muestras del puesto 1. **(A)** Resultado de M2. Tinción con Lugol. **(B)** Resultado de la muestra M2.

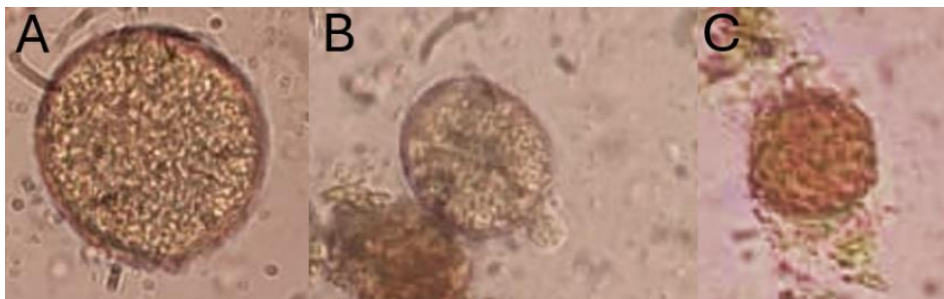


Figura 6. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 4.

Nota. Diferentes estructuras similares a ooquistes en diferentes muestras del puesto 1. **(A)** Resultado de M2. **(B)** Resultado de la muestra M2. **(C)** Resultado de la muestra M2. Tinción con Lugol.

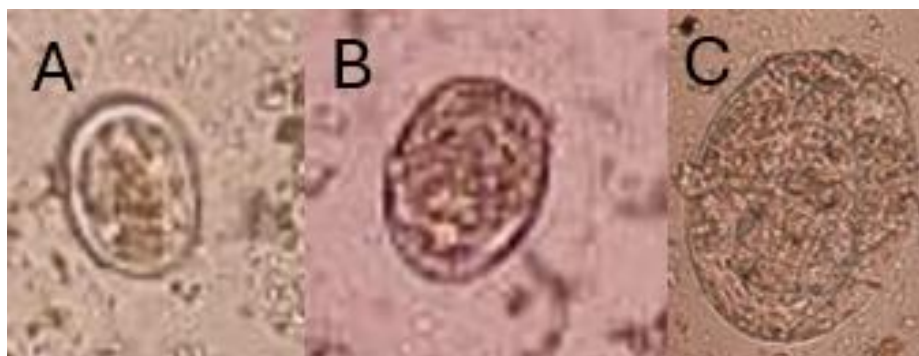


Figura 7. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 5.

Nota. Diferentes estructuras similares a ooquistes en diferentes muestras del puesto 1. **(A)** Resultado de M1. **(B)** Resultado de la muestra M3. **(C)** Resultado de la muestra M3. Tinción con Lugol.

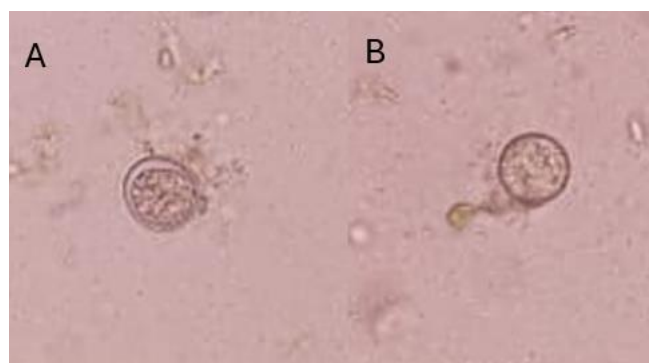


Figura 8. Posibles ooquistes visualizados a 100X del puesto 6.

Nota. Diferentes estructuras similares a ooquistes en diferentes muestras del puesto 6. **A)** Resultado de M2. **(B)** Resultado de la muestra M2. Tinción con Lugol.

1.3.2 Análisis de microscopía

1.3.2.1 Comparación morfológica de las diferentes muestras

En la **Figura 3** se observan estructuras circulares y ovaladas, con un tamaño entre 9,3 a 11,5 μm , en muchas de ellas con una doble capa, lo que permite que no se tiña el interior con Lugol, sin embargo, hay estructuras que destacan y tienen una mayor similitud a la morfología de *T. gondii*. La **Figura 3C** muestra una forma similar a la de un quiste tisular, ya que presenta estructuras similares a la de los bradizoítos con un núcleo en su interior, similares a los descritos por **Dubey (2020)**. Además, la **Figura 3F** hay una estructura similar a la de un ooquiste maduro y esporulado, debido a la división que se encuentra en el interior, dando lugar a la formación de esporoquistes. Esto representa un riesgo, debido a que es cuando el ooquiste se encuentra en la fase de mayor resistencia ambiental, capaz de permanecer viable durante meses o incluso años.

En la **Figura 4**, todas las muestras presentan una estructura similar, con tamaños variables entre 8,7 μm a 12,2 μm redonda, con un interior homogéneo no diferenciado. Presenta una capa delgada, pero resistente, ya que con la tinción de Lugol el interior no se encuentra de otro color, manteniendo su estructura y color intactos. En la **Figura 5** se observan estructuras similares de forma redonda y con un centro homogéneo, indicando que es probablemente un ooquiste no esporulado de tamaño aproximado de 10,3 μm .

En la **Figura 6** se observan estructuras redondas, con un centro homogéneo no diferenciado, especialmente en la **Figura 6A** y **Figura 6C**, sin embargo, en la última se observa en el interior un tono amarillento, demostrando que no es un ooquiste ya que no cuenta con la membrana que lo caracteriza

que protege de cualquier factor externo. En la **Figura 6B** se observa levemente una separación en su interior, donde se observan dos sacos, similares a la **Figura 3F**, indicando un posible ooquiste maduro.

En la **Figura 7A** se observa una capa doble característica de *T. gondii*, en donde su interior se encuentra relleno homogéneamente sin distinción de estructuras secundarias. Hay similitud con las otras figuras en cuanto a morfología, sin embargo, la última cuenta con un tamaño superior a 13 μm , descartando esta muestra como ooquiste de *T. gondii* y pertenecer a otro parásito coccidio. En la **Figura 8A** y **Figura 8B** se observa la característica pared doble, con un contenido homogéneo sin estructuras secundarias, con un tamaño aproximado de 10,2 μm y 9,7 μm , respectivamente.

1.3.2.2 Prevalencia en los puestos de venta

La prevalencia corresponde al 52,38%, 11 muestras positivas de 21 muestras procesadas de manera preliminar por medio de microscopía. Esto representa un valor elevado a comparación de otros países que han reportado una prevalencia mucho menor, como Marruecos con el 10,7% y Polonia con el 18% (**Berrouch et al., 2020; Lass et al., 2011**). A pesar de ser un valor tentativo antes de confirmar por medio de PCR, esto es un asunto de extrema importancia, ya que se encuentran parásitos en productos de consumo diario como es la lechuga, usada como base esencial para las comidas. En Tungurahua, en la ciudad de Quero, se ha demostrado la prevalencia de toxoplasmosis del 27% de 30 mujeres embarazadas, de las cuales el 83% no afirman en su totalidad que lavan bien los alimentos que consumen crudos, representando el alcance de los mercados como fuente de transmisión de *T. gondii* (**Aguayo, 2013**). En Ambato no existe información en base a la prevalencia de *T. gondii* en mujeres embarazadas o en alimentos, solamente hay un estudio que afirma que hay una prevalencia de *T. gondii* en gatos del 26,6% (8/20), lo que supone una brecha en la colaboración de investigación sobre la epidemiología parasitaria tanto en la ciudad como en el país (**Cousen, 2016**).

1.3.2.3 Posibles fuentes de contaminación

Además de *T. gondii* que puede propagarse en el ambiente por medio de las heces de los felinos, existen otros parásitos capaces de contaminar los cultivos y con una misma morfología de *T. gondii*. Así que se describen las posibles fuentes de contaminación que haya ocasionado que la lechuga esté contaminada con parásitos:

- El uso de fertilizantes con estiércol de animales, ya que no hay un adecuado manejo y uso de estos insumos, siendo estos un posible vehículo de contaminación microbiológica. Además, son

los más usados en el sector rural, lo que representa un riesgo a la salud de las comunidades agricultoras (Aghaindum et al., 2019; Yahia et al., 2023).

- El agua de riego está contaminada con parásitos, capaces de contaminar cultivos y en muchas ocasiones, sirven como fuente de hidratación para animales y humanos. En Colombia, se ha demostrado la prevalencia de *T. gondii* en agua de consumo en un 58,6% de las muestras analizadas, correspondientes a agua cruda superficial, agua de planta de tratamiento y agua de grifo de los hogares (Campo-Portacio et al., 2021).

1.3.2.4 Limitaciones de la técnica de microscopía

La visualización con técnicas de microscopía fue fundamental para la observación de estructuras como lo son los ooquistes de *T. gondii*. Sin embargo, esto puede ser un riesgo ya que la fiabilidad de determinar específicamente una especie es muy baja, debido a la similitud en la morfología de algunas especies. En este caso, se han observado ooquistes con morfología y características similares a los de *T. gondii*, sin embargo, la lechuga puede presentar contaminación de otros parásitos protozoarios como *Cyclospora cayetanensis* y *Acanthamoeba* spp, quienes son similares en forma de ooquiste y también son capaces de adherirse a la superficie de la lechuga (Moreno-Mesonero et al., 2023).

1.4 Resultados de análisis molecular

1.4.1 PCR del gen B1

Para la corroboración de *T. gondii* se usó la técnica de PCR, enfocado al fragmento específico de 194 pb del gen B1. Es un área altamente conservada y muy utilizada en pruebas de PCR para una detección molecular rápida y sensible. Los resultados de la amplificación de este fragmento se visualizan en la **Figura 9**.



Figura 9. Amplificación del fragmento B1 de las muestras

Nota. Electroforesis en gel al 2% de agarosa de productos de PCR de muestras de *T. gondii*. **MM:** escalera de ADN de 1000 pb, **C-:** control negativo, **C+:** control positivo, **1:** Puesto 2, muestra 2. **2:** Puesto 3, muestra 2. **3:** Puesto 4, muestra 2. **4:** Puesto 6, muestra 2. **5:** Puesto 1, muestra 3. **6:** Puesto 2, muestra 3. **7:** Puesto 5, muestra 3.

Las muestras que no se amplificaron fueron Puesto 1, Muestra 1; Puesto 2, Muestra 1; Puesto 5, Muestra 1 y Puesto 1, Muestra 2, el cual se puede observar en el **Anexo 1**.

De las 11 muestras que presentaron una morfología similar a *T. gondii*, solamente 7 de ellas se confirmaron de manera exacta, representando el 33% de prevalencia en muestras de lechuga, mientras que las demás muestras representan a un falso positivo, debido a que no cuentan con esa región del parásito.

1.4.2 Resultados de PCR anidada

Las 7 muestras fueron procesadas en dos rondas de PCR para la amplificación de la región SAG2 de los extremos 3' y 5'. Sin embargo, ninguna de las muestras amplificó la región determinada, dando como resultado un 0/7 para subtipo II y 0/7 para subtipo III.

1.4.3 Interpretación de los resultados

1.4.3.1 Análisis de la amplificación del gen B1

Los resultados obtenidos evidenciaron que, de las 21 muestras de lechuga analizadas, 11 fueron positivas mediante microscopía, pero solo 7 mostraron amplificación específica del gen B1 (196 pb). La **Figura 9** confirma la presencia de *Toxoplasma gondii* en estas muestras mediante bandas definidas en el gel al 2 % de agarosa. Esta discrepancia entre ambas técnicas es frecuente en estudios que involucren matrices vegetales, ya que la microscopía puede sobreestimar resultados por estructuras similares a ooquistes, mientras que la PCR muestra mayor especificidad, aunque depende de la integridad del ADN y de la ausencia de inhibidores.

Aunque el protocolo de extracción fue optimizado y se incluyó BSA para neutralizar inhibidores de PCR, la reducción parcial de inhibición no garantiza una amplificación eficiente en todas las muestras. Diversos compuestos de la matriz vegetal, como polisacáridos y polifenoles, pueden persistir aun después de la purificación y afectar la actividad de la ADN polimerasa (**Abolmaaty et al., 2007**). Esto podría explicar por qué cuatro de las once muestras positivas al microscopio no lograron amplificar el fragmento esperado, lo cual ha sido reportado también por estudios recientes que analizan vegetales como reservorios del parásito.

La detección del gen B1 en siete muestras confirma la presencia de *T. gondii* en productos frescos comercializados en el mercado América de Ambato, lo que representa un riesgo potencial para consumidores, especialmente porque la lechuga se consume cruda. El gen B1, por su alta repetitividad, continúa considerándose uno de los blancos moleculares más sensibles para la identificación del parásito, lo que respalda la validez de los resultados obtenidos. No obstante, estudios recientes han señalado que la eficiencia de detección de *T. gondii* en vegetales depende de la recuperación efectiva de ooquistes durante la fase de pretratamiento y de la integridad del ADN obtenido (**Lass et al., 2011**). Los hallazgos subrayan la importancia de complementar métodos microscópicos con técnicas moleculares para obtener diagnósticos más fiables en estudios de contaminación parasitaria en alimentos. Asimismo, evidencian la necesidad de mantener medidas estrictas de higiene y vigilancia sanitaria en la comercialización de vegetales frescos. Los resultados aportan evidencia local actualizada sobre la circulación de *T. gondii* en alimentos de origen vegetal.

1.4.3.2 Análisis de la PCR anidada

La ausencia de amplificación de los segmentos del gen SAG2 3' y SAG2 5' sugiere que las cepas identificadas de *T. gondii* no corresponden a los subtipos II o III, tampoco hay evidencia de que haya

una combinación de estas amplificaciones, por lo que esto refuerza que la prevalencia de linajes clonales no son los más comunes en América Latina. Esto demuestra que *T. gondii* presenta una alta diversidad genética de cepas no arquetípicas, por lo cual los marcadores de tipos clonales no son los más adecuados para la amplificación de estas cepas.

El locus SAG2 utilizado para identificación genotípica de *T. Gondii* permite la discriminación de cepas arquetípicas predominantes de Norteamérica y Europa., sin embargo, los marcadores SAG2 3' y SAG2 5' utilizados como regiones diana para la identificación pueden presentar variaciones, reduciendo su especificidad y afinidad (**Shanebeck et al., 2025**). Esta es una posible causa de porqué la amplificación no se cumplió, imposibilitando la identificación de los subtipos II o III. Esta ausencia de amplificación sugiere una selección diferentes marcadores para la identificación de los subtipos como GRA6, BTUB o SAG1 (**Sami et al., 2025**). No obstante, la ausencia de los subtipos II y III en las muestras positivas a la primera etapa de la identificación responde a que la población parasitaria si existe, pero pertenecen a variables no detectables por este esquema de amplificación, es decir, pertenecen a genotipos atípicos que presenten variaciones genéticas en las regiones SAG2 3' y SAG2 5'.

En Latinoamérica abundan principalmente las cepas no arquetípicas de *T. gondii*, siendo estas abundantes en varias especies animales. La mayoría de estas cepas son distribuidas en Brasil, que puede estar asociado a los anfitriones en las que se encuentran estas cepas (**Pena et al., 2008**). En Ecuador no hay estudios preliminares sobre la identificación molecular de *T. gondii*, lo que indica un vacío de investigación que puede ser primordial en estudios de relevancia parasitológica.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.5 Conclusiones

- Se confirmó la presencia de ooquistes del parásito *Toxoplasma gondii* en muestras de lechuga (*Lactuca sativa L*) comercializadas en el mercado América de Ambato, con una prevalencia del 33,33% (7/21 muestras) confirmadas por la combinación de métodos microscópicos como moleculares. El conjunto de estas técnicas permitió la identificación de ooquistes de este parásito, reportando un porcentaje significativo de una contaminación alarmante, lo cual genera preocupación y denota un riesgo en la salud pública.
- La detección del gen B1 para la detección de *T. gondii* mediante PCR indicó una técnica adecuada, con una buena sensibilidad y especificidad, para la identificación de *T. gondii* en matrices vegetales. Aun cuando la carga parasitaria fue baja en muchas muestras, esta técnica permitió respaldar la confiabilidad del enfoque metodológico, validada por estudios similares en otras matrices y en diferentes regiones.
- La aplicación de PCR anidada no evidenció la presencia de los subtipos II y III, sugiriendo que los aislamientos detectados no pertenecen a los tipos clonales arquetípicos. Esto refuerza la idea de que en América Latina predominan las cepas no arquetípicas, con perfiles genéticos diferentes y abriendo campo a la investigación genotípica tanto a nivel local como a nivel nacional.
- Los resultados obtenidos demuestran la escasez de información con respecto a la caracterización molecular de *T. gondii* no solo en matrices vegetales, sino también en matrices biológicas y serológicas. Por lo tanto, el presente estudio contribuye a aportar una base preliminar en la parte parasitológica, destacando la posibilidad de una circulación de cepas atípicas.

1.6 Recomendaciones

- Se recomienda incentivar el desarrollo de nuevas metodologías y que sean más eficientes para una mejor identificación de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en matrices alimentarias, considerando las características de adaptación y resistencia del parásito. La implementación de técnicas avanzadas como digestión enzimática o uso de compuestos químicos, mejorará la lisis celular, lo cual permitirá recolectar una mayor cantidad de ADN y de mejor calidad.
- Se recomienda realizar estudios de caracterización molecular mediante métodos de secuenciación de diferentes cepas de *T. gondii* para generar una base bibliográfica que permita entender la virulencia y la epidemiología parasitaria en el país. Esto no debe solo limitarse a matrices vegetales, puede ampliarse a matrices de tejidos, sangre y líquido amniótico de mujeres embarazadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abolmaaty, A., Gu, W., Witkowski, R., & Levin, R. E. (2007). The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 349–352. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2006.09.012>
- Aghaindum, A. G., Atud, A. Q., & Nadège, O. A. T. (2019). Implications of soils around domestic water points in the spread of intestinal parasites in the city of Yaounde (Cameroon). *Journal of Water and Health*, 17(2), 318–328. <https://doi.org/10.2166/WH.2018.159>
- Aguayo, A. (2013). *PREVALENCIA DE TOXOPLASMOSIS Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS EN EMBARAZADAS QUE ACUDEN AL PRIMER CONTROL PRENATAL EN EL CENTRO DE SALUD DE QUERO, PROVINCIA TUNGURAHUA* [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/flc60add-a3d9-4d7c-9e63-20788be12964/content>
- Akins, G. K. H., Furtado, J. M., & Smith, J. R. (2024). Diseases Caused by and Behaviors Associated with *Toxoplasma gondii* Infection. *Pathogens* 2024, Vol. 13, Page 968, 13(11), 968. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS13110968>
- Amairia, S., Rouatbi, M., Rjeibi, M. R., Nouasri, H., Sassi, L., Mhadhbi, M., & Gharbi, M. (2016). Molecular prevalence of *Toxoplasma gondii* DNA in goats' milk and seroprevalence in Northwest Tunisia. *Veterinary Medicine and Science*, 2(3), 154–160. <https://doi.org/10.1002/VMS3.29;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION>
- Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & Vectors* 2020 13:1, 13(1), 588-. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04445-Z>
- Berrouh, S., Escotte-Binet, S., Amraouza, Y., Flori, P., Aubert, D., Villena, I., & Hafid, J. (2020). *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* detection in fresh vegetables consumed in Marrakech, Morocco. *African Health Sciences*, 20(4), 1669–1678. <https://doi.org/10.4314/AHS.V20I4.19>
- Brenier-Pinchart, M. P., Filisetti, D., Cassaing, S., Varlet-Marie, E., Robert-Gangneux, F., Delhaes, L., Guitard, J., Yéra, H., Bastien, P., Pelloux, H., & Sterkers, Y. (2022). Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis: Multicenter Evaluation of the *Toxoplasma* RealCycler Universal PCR Assay on 168 Characterized Human Samples. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 24(6), 687–696. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2022.03.009>
- Brito, R. M. de M., de Lima Bessa, G., Bastilho, A. L., Dantas-Torres, F., de Andrade-Neto, V. F., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T., & Magalhães, L. M. D. (2023). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in South America: occurrence, immunity, and fate of infection. *Parasites & Vectors*, 16(1), 461. <https://doi.org/10.1186/S13071-023-06080-W>

- Caiza, A., & Caiza, C. (2019). *Determinación de parásitos intestinales humanos transmitidos por frutas y verduras* [Universidad Nacional de Chimborazo]. <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/6093/1/Determinaci%3fb3n%20de%20par%3%a1sitos%20intestinales%20humanos%20transmitidos%20por%20frutas%20y%20verduras.%20San%20Andr%3%a9s.%20Chimborazo%2c%202019.pdf>
- Campo-Portacio, D. M., Guerrero-Velásquez, L. F., Castillo-García, A. P., Orozco-Méndez, K., & Blanco-Tuirán, P. J. (2021). Detection of *Toxoplasma gondii* in water for human consumption from water wells (jagüeyes) in the rural area of the municipality of Sincelejo. *Biomédica*, 41(Suppl 1), 82. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.5858>
- Cousen, V. (2016). *PREVALENCIA DE Toxoplasma gondii EN FELINOS DOMÉSTICOS (Felis catus) EN LAS CLÍNICAS VETERINARIAS DE LA CIUDAD DE AMBATO* [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/a5a2c215-5123-46ee-9040-f1fd824747ad/content>
- Dardona, Z., Al Hindi, A., Hafidi, M., Boumezzough, A., & Boussaa, S. (2021). Occurrence of *Toxoplasma gondii* on Raw Leafy Vegetables in Gaza, Palestine. *Journal of Food Protection*, 84(2), 255–261. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-160>
- Deganich, M., Boudreaux, C., & Benmerzouga, I. (2022). Toxoplasmosis Infection during Pregnancy. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.3390/TROPICALMED8010003>
- Dubey, J. P. (2020). Chapter 1 - The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In L. M. Weiss & K. Kim (Eds.), *Toxoplasma gondii (Third Edition)* (pp. 1–19). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>
- Ferreira, I. M. R., Vidal, J. E., de Mattos, C. de C. B., de Mattos, L. C., Qu, D., Su, C., & Pereira-Chiocola, V. L. (2011). *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP–PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Experimental Parasitology*, 129(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2011.06.002>
- García, Y., Candil, A., Cervantes, I., Gorgua, E., & Cadena, J. (2023). *Ciclo Biológico de Toxoplasma gondii*.
- Giraldo, M. (2008). Toxoplasmosis. *Medicina & Laboratorio*, 14. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl087-8c.pdf>
- Hotea, I., & Darabus, G. (2023). Biology and Morphology of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasmosis. Epidemiology, Prevention and Control* (1st ed., Vol. 1). MDPI. <https://doi.org/doi.org/10.3390/books978-3-0365-2698-0>

- Howe, D. K., Honoré, S., Derouin, F., & Sibley, L. D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1411–1414. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1411-1414.1997>
- Ibarra, J. (2025). *Análisis de la presencia de ooquistes de Toxoplasma gondii en coles verdes (Brassica oleracea var. capitata) comercializados en el Mercado Central de Ambato, Ecuador*. [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/700817de-2af0-4379-be79-6a97df25373a/content>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (1996). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1750:1994. Hortalizas y frutas frescas. Muestreo. *Quito, Ecuador: INEN*.
- Jones, J. L., Parise, M. E., & Fiore, A. E. (2014). Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(5), 794–799. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.13-0722>
- Khairullah, A. R., Kurniawan, S. C., Widodo, A., Effendi, M. H., Hasib, A., Silaen, O. S. M., Ramandinianto, S. C., Moses, I. B., Riwu, K. H. P., Yanestria, S. M., Samodra, M. E. E., & Afnani, D. A. (2024). A Comprehensive Review of Toxoplasmosis: Serious Threat to Human Health. *The Open Public Health Journal*, 17(1). <https://doi.org/10.2174/0118749445281387240202094637>
- Khan, A., Su, C., German, M., Storch, G. A., Clifford, D. B., & Sibley, L. D. (2005). Genotyping of *Toxoplasma gondii* Strains from Immunocompromised Patients Reveals High Prevalence of Type I Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5881. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5881-5887.2005>
- Lass, A., Ma, L., Kontogeorgos, I., Zhang, X., Li, X., & Karanis, P. (2019). First molecular detection of *Toxoplasma gondii* in vegetable samples in China using qualitative, quantitative real-time PCR and multilocus genotyping. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-54073-6>
- Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., & Myjak, P. (2011). The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2011 31:6, 31(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1007/S10096-011-1414-8>
- Lee, K. H., Jiamsakul, A., Kiertiburanakul, S., Borse, R., Khol, V., Yuniastuti, E., Azwa, I., Ketut Agus Somia, I., Chaiwarith, R., Pham, T. N., Khusuwan, S., Do, C. D., Kumarasamy, N., Gani, Y., Ditangco, R., Ng, O. T., Pujari, S., Lee, M. P., Avihingsanon, A., ... Choi, J. Y. (2024). Risk factors for toxoplasmosis in people living with HIV in the Asia-Pacific region. *PLOS ONE*, 19(7), e0306245. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0306245>
- Leutenegger, C. M., Lozoya, C. E., Tereski, J., Andrews, J., Mitchell, K. D., Meeks, C., Willcox, J. L., Freeman, G., Richmond, H. L., Savard, C., & Evason, M. D. (2023). Comparative study of a broad qPCR panel and centrifugal flotation for detection of gastrointestinal parasites in fecal samples

- from dogs and cats in the United States. *Parasites & Vectors* 2023 16:1, 16(1), 288-. <https://doi.org/10.1186/S13071-023-05904-Z>
- Lilly, E. L., & Webster, N. J. (2021). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts on organic and conventionally grown produce. *Food Microbiology*, 99. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103798>
- Liu, Q., Wang, Z. D., Huang, S. Y., & Zhu, X. Q. (2015). Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 292. <https://doi.org/10.1186/S13071-015-0902-6>
- Marín-García, P. J., Planas, N., & Llobat, L. (2022). *Toxoplasma gondii* in Foods: Prevalence, Control, and Safety. *Foods*, 11(16), 2542. <https://doi.org/10.3390/FOODS11162542>
- Marques, C. S., Sousa, S., Castro, A., & Da Costa, J. M. C. (2020). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in fresh vegetables and berry fruits. *Parasites & Vectors* 2020 13:1, 13(1), 180-. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04040-2>
- Merks, H., Iqbal, A., Measures, L., & Dixon, B. R. (2025). *Toxoplasma gondii* and related parasites in beluga (*Delphinapterus leucas*) harvested as country foods by Inuit hunters in Nunavut, Canada. *Arctic Science*, 11, 1–10. <https://doi.org/10.1139/AS-2024-0023>
- Moreno-Mesonero, L., Soler, L., Amorós, I., Moreno, Y., Ferrús, M. A., & Alonso, J. L. (2023). Protozoan parasites and free-living amoebae contamination in organic leafy green vegetables and strawberries from Spain. *Food and Waterborne Parasitology*, 32, e00200. <https://doi.org/10.1016/J.FAWPAR.2023.E00200>
- Pardini, L., Bernstein, M., Carral, L. A., Kaufer, F. J., Dellarupe, A., Gos, M. L., Campero, L. M., Moré, G., Messina, M. T., Schneider, M. V., Freuler, C. B., Durlach, R. A., Unzaga, J. M., & Venturini, M. C. (2019). Congenital human toxoplasmosis caused by non-clonal *Toxoplasma gondii* genotypes in Argentina. *Parasitology International*, 68(1), 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.10.002>
- Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, 38(5), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- Pinto-Ferreira, F., Caldart, E. T., Pasquali, A. K. S., Mitsuka-Breganó, R., Freire, R. L., & Navarro, I. T. (2019). Patterns of Transmission and Sources of Infection in Outbreaks of Human Toxoplasmosis. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), 2177–2182. <https://doi.org/10.3201/EID2512.181565>
- Plaza, J., Dámek, F., Villena, I., Innes, E. A., Katzer, F., & Hamilton, C. M. (2020). Detection of *Toxoplasma gondii* in retail meat samples in Scotland. *Food and Waterborne Parasitology*, 20, e00086. <https://doi.org/10.1016/J.FAWPAR.2020.E00086>
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

- Sami, M., Pestechian, N., Kalantari, R., & Toghiani, S. (2025). Molecular Identification of *Toxoplasma gondii* in Domestic and Industrial Chickens in Isfahan Region, Iran, 2022. *Journal of Food Quality*, 2025(1), 4699915. <https://doi.org/10.1155/JFQ/4699915>
- Shanebeck, K. M., Hernández-Ortiz, A., Jenkins, E. J., Thomas, P. J., Dixon, B. R., Merks, H., & Lagrue, C. (2025). Detection of *Toxoplasma gondii* (Types I, II, III and 12) and *Sarcocystis* spp. in the brains of river otter (*Lontra canadensis*) from Alberta, Canada. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 27, 101069. <https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2025.101069>
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L. A., VanWormer, E., & Villena, I. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00049. <https://doi.org/10.1016/J.FAWPAR.2019.E00049>
- Sheng, L., Xue, Q., Xu, S., Can, F., Yao, N., Zou, M., Teng, Q., Li, Y., El-Ashram, S., Ji, Y., & Zhao, J. (2023). Rapid and visual detection of *Toxoplasma gondii* oocyst in cat feces using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 17269-. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44658-7>
- Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
- Téllez-Isaías, G., Hargis, B. M., El-Ashram, S., M. Petrone-Garcia, V. M., Alouffi, A., A. Castellanos-Huerta, I., Dinçel, G. Ç., M.R. Abdel-Latif, H., Farouk, M. H., Iqbal, S., & Aguilar-Tipacamú, G. (2023). Introductory Chapter: The Significance of *Toxoplasma gondii* in Humans, and in Domestic and Wild Animals. In S. El-Ashram, G. Téllez-Isaías, F. Alali, & A. Alouffi (Eds.), *Towards New Perspectives on Toxoplasma gondii*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110405>
- Temesgen, T. T., Robertson, L. J., & Tysnes, K. R. (2019). A novel multiplex real-time PCR for the detection of *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, and *Cyclospora cayetanensis* on berries. *Food Research International*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108636>
- Ubaid, M., Zuberi, U. F., Muhammad, S., Ghalib, S., Hashmi, F., & Aqeel, S. (2025). A meta-analysis and survey on the prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats (*Felis catus*). *The Journal of Basic and Applied Zoology* 2025 86:1, 86(1), 21-. <https://doi.org/10.1186/S41936-025-00440-X>
- Ureña, N. M. L., Chaudhry, U., Bernal, R. C., Alsua, S. C., Messina, D., Evangelista, F., Betson, M., Lalle, M., Jokelainen, P., Mora, L. M. O., & García, G. Á. (2022). Contamination of Soil, Water, Fresh Produce, and Bivalve Mollusks with *Toxoplasma gondii* Oocysts: A Systematic Review. *Microorganisms*, 10(3), 517. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10030517/S1>
- Uzelac, A., & Djurković-Djaković, O. (2025). Isolation, genotyping and phenotyping *Toxoplasma gondii* in Europe – A critical perspective. *Food and Waterborne Parasitology*, 40, e00279. <https://doi.org/10.1016/J.FAWPAR.2025.E00279>

- Vidal, J. E. (2019). HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*, 18. <https://doi.org/10.1177/2325958219867315>
- Wang, X., Cheng, M., Yang, S., Xing, C., Li, Q., Zhu, Y., Ji, Y., & Du, Y. (2023). CRISPR/Cas12a combined with RPA for detection of *T. gondii* in mouse whole blood. *Parasites & Vectors* 2023 16:1, 16(1), 256-. <https://doi.org/10.1186/S13071-023-05868-0>
- Yahia, S. H., Etewa, S. E., Al Hoot, A. A. A., Arafa, S. Z., Saleh, N. S., Sarhan, M. H., Rashad, S. I., & Hassan, S. S. (2023). Investigating the Occurrence of Soil-Transmitted Parasites Contaminating Soil, Vegetables, and Green Fodder in the East of Nile Delta, Egypt. *Journal of Parasitology Research*, 2023, 6300563. <https://doi.org/10.1155/2023/6300563>
- Yu, C. P., Chen, B. C., Chou, Y. C., Hsieh, C. J., & Lin, F. H. (2023). The epidemiology of patients with toxoplasmosis and its associated risk factors in Taiwan during the 2007–2020 period. *PLOS ONE*, 18(8), e0290769. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0290769>
- Zavala-Hoppe, A. N., Piguave-Cacao, R. R., & Ponce-Macias, N. N. (2025). Epidemiología y Factores de riesgo de la Toxoplasmosis en los países de Latinoamérica. *MQRInvestigar* , 9(1), e234. <https://doi.org/10.56048/MQR20225.9.1.2025.e234>

ANEXOS



Anexo 1. Electroforesis en gel al 2% de agarosa de productos de PCR de muestras de *T. gondii*. **MM:** escalera de ADN de 1000 pb, **C-:** control negativo, **C+:** control positivo, **1:** Puesto 1, muestra 1. **2:** Puesto 2, muestra 1. **3:** Puesto 5, muestra 1. **4:** Puesto 1, muestra 2.

GEN	Forward	Reverse
SAG2-5' (Externos)	5'GCTACCTCGAACAGGAACAC3'	5'GCATCAACAGTCTTCGTTGC3'
SAG2-5' (Internos)	5'GAAATGTTTCAGGTTGCTGC3'	5'GCAAGAGCGAAC TTGAACAC3'
SAG2-3' (Externos)	5'TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC3'	5'TCAAAGCGTGCA TTATCGC3'
SAG2-3' (Internos)	5'ATTCTCATGCCTCCGCTTC3'	5'AACGTTTCACGAAGG CACAC3'

Anexo 2. Lista de primers para PCR anidada. Obtenido de **Howe et al., (1997)**