



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

---

**Tema:** Optimización de un protocolo de extracción de ADN para la detección molecular de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en coles verdes (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) procedentes del mercado central de Ambato.

---

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

**Autor:** Carlos Alexander Barreno Vargas

**Tutor:** Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

Ambato – Ecuador

Julio – 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 Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 05 de junio de 2026.

---

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

13XXXXXX98

**TUTOR**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Carlos Alexander Barreno Vargas, 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 Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Carlos Alexander Barreno Vargas

18XXXXXX49

**AUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso 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.



---

Carlos Alexander Barreno Vargas

18XXXXXX49

**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 Alimento y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

**Presidente del Tribunal**

---

Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica

06XXXXXX71

---

Mg. Danae Fernández Rivero

17XXXXXX09

Ambato, 19 de junio de 2026

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mi madre Yolanda Vargas y mi padre Carlos Barreno, que gracias a su esfuerzo pude cumplir un sueño y a mis hermanos Marcia, Verónica y Hernán que gracias a sus esfuerzos pude alcanzar una meta más.*

*También dedico este trabajo a la memoria de mi abuelito Jaime Vargas quien sigue presente con sus enseñanzas en mi corazón.*

*También dedico este documento a todos los maestros y carpinteros que al igual que mis padres no dejaron de trabajar por alcanzar un mejor mañana.*

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a Jaime Vargas por ser el primero en confiar en mí y en mi camino a través de la ciencia y dejarme tan valiosas enseñanzas antes de partir “lo logre abuelito”.*

*Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica. A mi hermana Verónica por cuidarme cuando estuve enfermo, a mi hermana Marcia consolarme en mis momentos más tristes, A hermano Hernan por tenerme paciencia al enseñarme y a toda mi familia por estar presentes y darme una mano cuando la necesité.*

*Agradezco a mi tutora Dra. Helena de la Torre por su paciencia, dirección y enseñanzas que me permitieron poder culminar este proyecto y sobre todo mostrarme que existe un mundo entero de oportunidades fuera esperando.*

*Agradezco a mi mejor amigo Kevin Yanez y mi mejor amiga Lilian Sarabia por las risas y momentos compartidos a la distancia. A Camila, por su amor y compañía incondicional a lo largo de esta odisea. A mis amigos Darwin, Salome, Jaelly, Angie, Kevin, Dianita, Joel, Justin, Roger, Nicole, Majo, Samira, Genesis por hacer de este camino una experiencia única que guardaré en mis morías usque ad diem mortis meae.*

## 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  |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....                                                                                                 | xiv  |
| RESUMEN EJECUTIVO .....                                                                                               | ii   |
| ABSTRACT.....                                                                                                         | iii  |
| CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO .....                                                                                      | 1    |
| 1.1.    Antecedentes Investigativos.....                                                                              | 1    |
| 1.1.1.    Justificación del problema .....                                                                            | 1    |
| 1.1.2.    Toxoplasmosis y relevancia en salud pública .....                                                           | 2    |
| 1.1.2.1.    Biología y características estructurales de <i>T. gondii</i> .....                                        | 4    |
| 1.1.2.2.    La matriz vegetal como vehículo de transmisión: el caso de <i>Brassica oleracea</i><br>var. capitata..... | 6    |
| 1.1.3.    Métodos clásicos de extracción en parásitos: Fenol-Cloroformo, CTAB y<br>enfoques comerciales .....         | 6    |
| 1.1.3.1.    El desafío de inhibidores de PCR: polisacáridos, polifenoles y compuestos<br>pécticos .....               | 7    |
| 1.1.4.    Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes para detección<br>parasitaria .....               | 7    |
| 1.1.4.1.    Principios teóricos de la PCR convencional .....                                                          | 7    |



|                                 |                                                                                                                    |    |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.4.2.                        | El gen B1 y el elemento repetitivo de 196 pb: blancos moleculares de elección                                      | 8  |
| 1.1.5.                          | Optimización de protocolos de extracción de ADN para detección molecular de parásitos en alimentos .....           | 8  |
| 1.1.5.1.                        | Definición y dimensiones del concepto de optimización en biología molecular                                        | 8  |
| 1.1.5.2.                        | Especificaciones de la optimización para la detección de ooquistes de <i>T. gondii</i> en matrices vegetales ..... | 9  |
| 1.2.                            | Objetivos .....                                                                                                    | 10 |
| 1.2.1.                          | Objetivo general .....                                                                                             | 10 |
| 1.2.2.                          | Objetivos Específicos.....                                                                                         | 10 |
| CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA ..... |                                                                                                                    | 11 |
| 2.1.                            | Materiales.....                                                                                                    | 11 |
| 2.2.                            | Métodos.....                                                                                                       | 12 |
| 2.2.1.                          | Detección de ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante microscopía .....                                      | 12 |
| 2.2.1.1                         | Recolección y transporte de muestras .....                                                                         | 12 |
| 2.2.1.2                         | Recuperación y concentración de ooquistes.....                                                                     | 12 |
| 2.2.1.3                         | Concentración mediante técnica de Ritchie.....                                                                     | 13 |
| 2.2.2                           | Confirmación mediante tinción y microscopía .....                                                                  | 13 |
| 2.2.2.1                         | Tinción de Lugol.....                                                                                              | 13 |
| 2.2.2.2                         | Tinción de safranina.....                                                                                          | 13 |
| 2.2.3                           | Evaluación de parámetros de lisis para la extracción de ADN .....                                                  | 14 |
| 2.2.3.1                         | Fraccionamiento de muestras .....                                                                                  | 14 |
| 2.2.3.2                         | Condiciones del protocolo de lisis.....                                                                            | 14 |
| 2.2.4.                          | Extracción con kit comercial.....                                                                                  | 14 |
| 2.2.5.                          | Comparación del rendimiento del protocolo .....                                                                    | 15 |
| 2.2.5.1.                        | Cuantificación de ADN .....                                                                                        | 15 |
| 2.2.5.2                         | Detección mediante PCR.....                                                                                        | 15 |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.6. Análisis estadístico mediante ANOVA y t de student .....                                             | 15 |
| 2.2.6.1 Diseño de tratamientos con los parámetros a evaluar.....                                            | 16 |
| 2.2.6.2. Modelamiento matemático y análisis del ANOVA.....                                                  | 16 |
| 2.2.6.3. Selección del tratamiento optimo y análisis complementario. ....                                   | 17 |
| 2.2.6.4. Hipótesis General. ....                                                                            | 18 |
| CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                                 | 19 |
| 3.1. Análisis y discusión de los resultados.....                                                            | 19 |
| 3.1.2. Análisis de microscopía .....                                                                        | 28 |
| 3.1.2.1. Comparación morfológica de las muestras.....                                                       | 28 |
| 3.2. Resultados de parámetros de lisis térmica, mecánica y enzimática: cuantificación y pureza de ADN ..... | 28 |
| 3.2.1. Análisis estadístico de los tratamientos mediante ANOVA. ....                                        | 32 |
| 3.2.1.1. Análisis de varianzas de la concentración de ADN. ....                                             | 32 |
| 3.2.1.2. Análisis de varianzas para A260/280. ....                                                          | 33 |
| 3.2.1.3. Análisis de Varianza para A260/230 .....                                                           | 34 |
| 3.2.2. Evaluación de hipótesis.....                                                                         | 35 |
| 3.2.3. Pruebas post hoc para selección del mejor tratamiento. ....                                          | 35 |
| 3.3. Resultados sobre la tasa de detección mediante amplificación de PCR y electroforesis .....             | 38 |
| CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....                                                          | 43 |
| 4.1. Conclusiones .....                                                                                     | 43 |
| 4.2. Recomendaciones .....                                                                                  | 43 |
| BIBLIOGRAFÍA .....                                                                                          | 44 |
| ANEXOS .....                                                                                                | 49 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1</b> Insumos, material fungible y equipos requeridos para el protocolo experimental.....                                                                | 11 |
| <b>Tabla 2</b> Factores y niveles evaluados en el proceso de lisis celular. ....                                                                                  | 16 |
| <b>Tabla 3</b> Diseño de tratamientos para la optimización de la lisis celular.....                                                                               | 17 |
| <b>Tabla 4</b> Resultados de la observación microscópica mediante tinción de Lugol.....                                                                           | 19 |
| <b>Tabla 5</b> Resultados de la observación microscópica mediante tinción de safranina. ....                                                                      | 24 |
| <b>Tabla 6</b> Tabulación de datos sobre la concentración de ADN (ng/μl) y relaciones de pureza (A260/280 y A260/230) por tratamiento y réplica.....              | 29 |
| <b>Tabla 7</b> Resumen de concentración de ADN, pureza espectral (A260/280, A260/230) y amplificación por PCR por tratamiento. ....                               | 30 |
| <b>Tabla 8</b> Concentración de ADN (ng/μl) y relaciones de pureza (A260/280, A260/230) por muestra extraída con Kit de referencia y réplica. ....                | 30 |
| <b>Tabla 9</b> Resumen de concentración de ADN, pureza espectral (A260/280, A260/230) y amplificación por PCR por muestra extraída con el kit de referencia. .... | 31 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> Ciclo de biológico de <i>T. gondii</i> .                                                                     | 3  |
| <b>Figura 2</b> Formas infectantes principales de <i>Toxoplasma gondii</i> .                                                 | 5  |
| <b>Figura 3</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X.  | 20 |
| <b>Figura 4</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas a 100X.                    | 20 |
| <b>Figura 5</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X.  | 21 |
| <b>Figura 6</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X.  | 21 |
| <b>Figura 7</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 40X.   | 22 |
| <b>Figura 8</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X.  | 22 |
| <b>Figura 9</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X.  | 23 |
| <b>Figura 10</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X. | 23 |
| <b>Figura 11</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X. | 25 |
| <b>Figura 12</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X. | 25 |
| <b>Figura 13</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X. | 26 |
| <b>Figura 14</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X. | 26 |
| <b>Figura 15</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X. | 27 |
| <b>Figura 16</b> Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de <i>T. gondii</i> observadas en el microscopio a 100X. | 27 |
| <b>Figura 17</b> Análisis de Varianza para Concentración de ADN.                                                             | 33 |
| <b>Figura 18</b> Análisis de Varianza para A260/280                                                                          | 34 |

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19</b> Análisis de Varianza para A260/230.....                                                                                                   | 35 |
| <b>Figura 20</b> Comparación de tratamientos de extracción mediante prueba de Tukey para la concentración de ADN.....                                      | 36 |
| <b>Figura 21</b> Comparación de tratamientos de extracción mediante prueba de Tukey para A260/280.....                                                     | 37 |
| <b>Figura 22</b> Comparación de tratamientos de extracción mediante prueba de Tukey para A260/230.....                                                     | 38 |
| <b>Figura 23</b> Resultado de la amplificación por PCR de <i>T gondii</i> de las muestras procesada mediante los tratamientos. ....                        | 39 |
| <b>Figura 24</b> Resultado de la amplificación por PCR de <i>T gondii</i> de las muestras procesada mediante el GeneJET Genomic DNA Purification Kit. .... | 40 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|                |                                                                                     |    |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 1</b> | Conteo por gota calibrada de estructuras morfológicamente similares a ooquistes ... | 49 |
| <b>Anexo 2</b> | Diagrama de Pareto efectos de la variable de concentración de ADN.....              | 49 |
| <b>Anexo 3</b> | Diagrama de Pareto efectos de la variable A260/280 .....                            | 50 |
| <b>Anexo 4</b> | Diagrama de Pareto efectos de la variable A260/230 .....                            | 50 |

## RESUMEN EJECUTIVO

La toxoplasmosis es una zoonosis alimentaria relevante en salud pública, especialmente en gestantes, neonatos e individuos inmunocomprometidos. Las hortalizas crudas pueden actuar como vehículos de ooquistes de *Toxoplasma gondii* por contacto con agua, suelo y manipulación contaminada. En este contexto, la col verde comercializada en Ambato constituye una matriz de interés sanitario, ya que su estructura foliar compacta favorece la retención de partículas parasitarias y dificulta su eliminación mediante lavados. El estudio se enmarcó en la línea de Microbiología y Biotecnología, vinculada con seguridad alimentaria, y se desarrolló bajo enfoque experimental. Se analizaron muestras de col verde mediante recuperación con PBS 1X más Tween® 80, concentración por técnica de Ritchie, observación microscópica con Lugol y safranina, y evaluación molecular. Para optimizar la extracción de ADN se aplicó un diseño factorial 2 elevado a cubo, considerando lisis térmica, lisis mecánica y digestión con proteinasa K. El ADN recuperado se cuantificó por espectrofotometría, se valoró mediante las relaciones A260 sobre 280 y A260 sobre 230, y se verificó por PCR convencional y electroforesis, amplificando un fragmento de 196 pb. Los resultados evidenciaron estructuras compatibles con ooquistes en 8 de 21 muestras por Lugol y en 6 por safranina. El tratamiento con 10 ciclos de choque térmico, 2 ciclos de lisis mecánica y 20 µL de proteinasa K presentó el mejor desempeño integral. La novedad científica radica en proponer un protocolo combinado, costo-eficiente y adaptado a matrices vegetales, que alcanzó 100 por ciento de detección por PCR frente al 50 por ciento con GeneJET®.

**Palabras clave sugeridas:** *Toxoplasma gondii*, ooquistes, col verde, extracción de ADN, PCR

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a foodborne zoonosis of public health relevance, particularly in pregnant women, neonates, and immunocompromised individuals. Raw vegetables may act as vehicles for *Toxoplasma gondii* oocysts due to contact with contaminated water, soil, and handling practices. In this context, green cabbage marketed in Ambato represents a sanitary matrix of interest, since its compact leaf structure favors the retention of parasitic particles and hinders their removal through washing. This study was framed within the Microbiology and Biotechnology research line, linked to food safety, and was developed using an experimental approach. Green cabbage samples were analyzed through recovery with PBS 1X whit Tween® 80, concentration using the Ritchie technique, microscopic observation with Lugol and safranin staining, and molecular evaluation. To optimize DNA extraction, a 2 cubed factorial design was applied, considering thermal lysis, mechanical lysis, and proteinase K digestion. The recovered DNA was quantified by spectrophotometry, assessed using A260 out of 280 and A260 out of 230 ratios, and verified by conventional PCR and electrophoresis, amplifying a 196 bp fragment. The results showed structures compatible with oocysts in 8 of 21 samples using Lugol staining and in 6 samples using safranin staining. The treatment with 10 thermal shock cycles, 2 mechanical lysis cycles, and 20 microliter of proteinase K showed the best overall performance. The scientific novelty lies in proposing a combined, cost-efficient protocol adapted to plant matrices, achieving 100 percentage PCR detection compared with 50 percentage using the GeneJET® kit.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, oocysts, green cabbage, DNA extraction, PCR.



## CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes Investigativos

#### 1.1.1. Justificación del problema

La toxoplasmosis es una zoonosis que afecta aproximadamente al 30% de la población mundial, causada por el parásito protozario *Toxoplasma gondii* (Yu et al., 2023). La transmisión por vía alimentaria es el foco más importante de infección en humanos (Estévez et al., 2021). Estudios recientes han demostrado que el consumo de vegetales crudos contaminados con ooquistes de *Toxoplasma gondii* constituyen un factor de riesgo relevante para la salud pública, debido a que la exposición durante el embarazo puede provocar malformaciones congénitas, secuelas neurológicas en el feto e incluso aborto espontáneo. Asimismo en personas inmunodeprimidas puede causar encefalitis y otras complicaciones graves (Shiadeh et al., 2020).

En Latinoamérica, el consumo de hortalizas como las coles verdes (*Brassica oleracea var. capitata*) forman parte de su cultura gastronómica, las cuales presentan características morfológicas que favorecen la retención de contaminantes microbiológicos. Su estructura foliar compacta, la superposición de múltiples capas de hojas y la superficie irregular dificulta la eliminación de ooquistes mediante lavados convencionales (Marqués et al., 2020). Debido a esto el Mercado Central de Ambato, Ecuador, representa un factor de riesgo, donde se venden productos que mantienen las prácticas agrícolas tradicionales, sistemas de riego potencialmente contaminados, manipulación y almacenamiento inadecuados, favorecen la contaminación cruzada en alimentos (Shapiro et al., 2019).

La identificación de *T. gondii* se puede realizar mediante técnicas microscópicas, inmunológicas y detección molecular (Kim et al., 2024). Sin embargo, la detección molecular es más robusta debido a su sensibilidad y especificidad la aplicación de técnicas moleculares en coles verdes no está exenta de desafíos como la baja carga de ooquistes, su elevada resistencia estructural y la presencia de compuestos propios de las *Brassicaceae* como polifenoles y polisacáridos pueden interferir con la amplificación del ADN al actuar como inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Berrouch et al., 2020).

Los protocolos convencionales de extracción de ADN, incluidos los kits comerciales, no están diseñados específicamente para matrices vegetales complejas ni para estructuras parasitarias con barreras biológicas altamente refractarias (**Hachimi et al., 2024**). En caso de *T. gondii*, está asociada con la fisiológica del ooquiste, cuya pared está organizada en capas estructuralmente diferenciadas, ricas en proteínas entrecruzadas, glicoproteínas y componentes lipídicos que confieren baja permeabilidad, elevada estabilidad mecánica y resistencia frente a agentes químicos, osmóticos y enzimáticos (**Slana et al., 2021**). Entonces, el desarrollo de un protocolo alternativo eficiente de extracción de ADN adaptado a coles verdes (*Brassica oleracea*) permitirá mejorar la calidad y cantidad de material genético obtenido e incrementará la sensibilidad de la detección molecular de *T. gondii* fortaleciendo las capacidades diagnósticas contribuyendo a la seguridad alimentaria.

### **1.1.2. Toxoplasmosis y relevancia en salud pública**

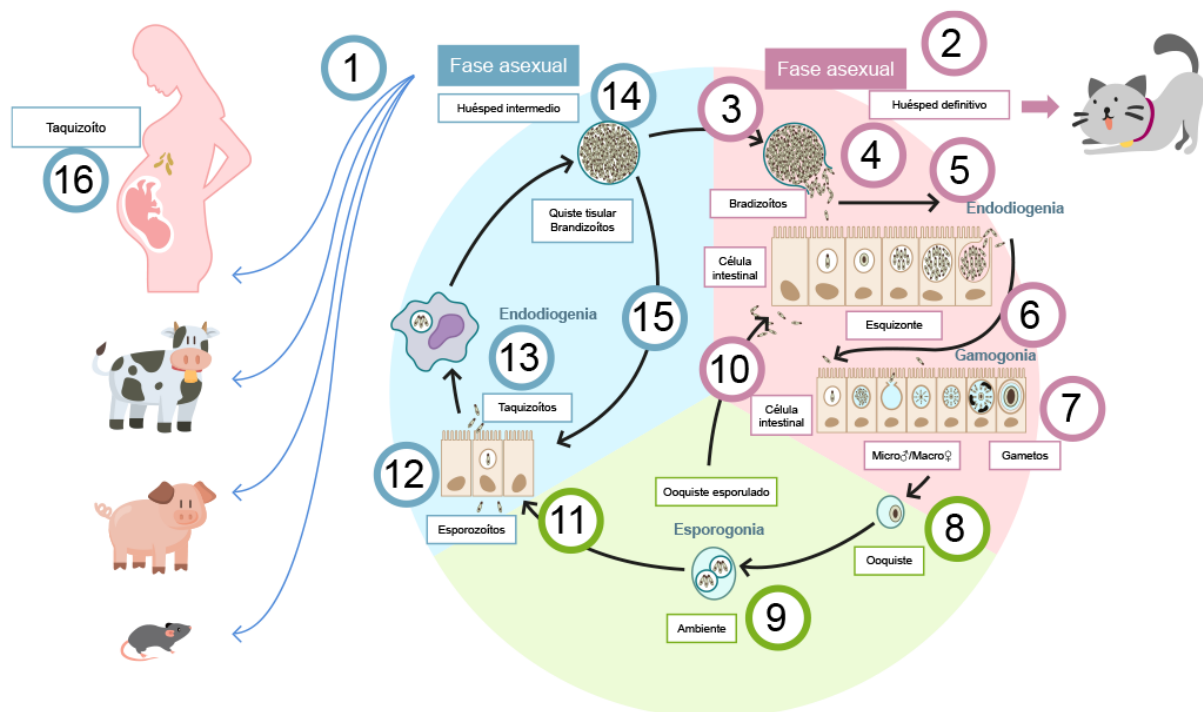
La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria de distribución mundial causada por el protozoo intracelular obligado *Toxoplasma gondii*. Este agente posee la capacidad de infectar prácticamente a todos los animales homeotermos, incluyendo humanos, aves y mamíferos domésticos y silvestres (**Mohammed, Ahmed & Ibrahim, 2024**). La importancia epidemiológica de esta enfermedad radica en su amplia prevalencia, diversidad de vías de transmisión y capacidad para producir infecciones severas en grupos de personas vulnerables, como individuos inmunocomprometidos y mujeres gestantes (**Dubey, 2020**).

El agente etiológico *T. gondii*, pertenece al filo Apicomplexa y presenta un ciclo biológico heteroxeno caracterizado por dos fases: una fase sexual y una fase asexual. Los felinos constituyen los hospedadores definitivos, mientras que humanos y otros vertebrados actúan como hospedadores intermediarios. Durante la reproducción sexual, *T. gondii* se desarrolla dentro de las células epiteliales intestinales de los felinos, ya que carecen de la enzima delta-6-desaturasa en su intestino, produciendo ooquistes inmaduros que son excretados al ambiente mediante sus heces, representando una fuente importante de contaminación ambiental y alimentaria (**Robert-Gangneux & Dardé, 2021**).

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado a *T. gondii* como uno de los patógenos de transmisión alimentaria de mayor prioridad a nivel global. Se estima que entre el 42% y el 61% de los casos de toxoplasmosis adquirida, tienen origen alimentario (Slana et al., 2021). Aunque el consumo de carne cruda o insuficientemente cocida que contiene quistes tisulares representa una ruta de infección bien documentada, un creciente cuerpo de evidencia epidemiológica y metodológica señala la relevancia de la ruta ambiental como fuente de contaminación (Barton et al., 2023).

**Figura 1**

Ciclo de biológico de *T. gondii*.



**Nota.** Tomado de Ciclo biológico de *T. gondii*, por Y. García Yáñez, A. Candil Ruíz, I. Cervantes Honorato, E. F. Gorgua Jiménez y J. C. Cadena Serrano, s. f., Facultad de Medicina, CUAED, UNAM. Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

El ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* se caracteriza por una alternancia entre una fase sexual, restringida a los hospedadores definitivos de la familia Felidae, y una fase asexual que ocurre en una amplia variedad de hospedadores intermediarios homeotermos, tal como se esquematiza en la **Figura 1**. En los félidos, la fase sexual se inicia tras la ingestión de tejidos

infectados que contienen quistes tisulares con bradizoítos (Antunes et al., 2024). Una vez en el intestino delgado, la acción del ambiente digestivo favorece la ruptura de la pared quística y la liberación de los bradizoítos, los cuales invaden los enterocitos e inician la diferenciación enteroepitelial. Durante este proceso se desarrollan formas presexuales y sexuales, incluyendo merozoítos, macrogametos y microgametos (Warschkau & Seeber, 2023). La fecundación origina ooquistes no esporulados, que son excretados al ambiente mediante las heces del hospedador definitivo (Khairullah et al., 2024). Estos ooquistes adquieren capacidad infectante después de la esporulación ambiental, lo que permite la continuidad epidemiológica del parásito (Sena et al., 2023).

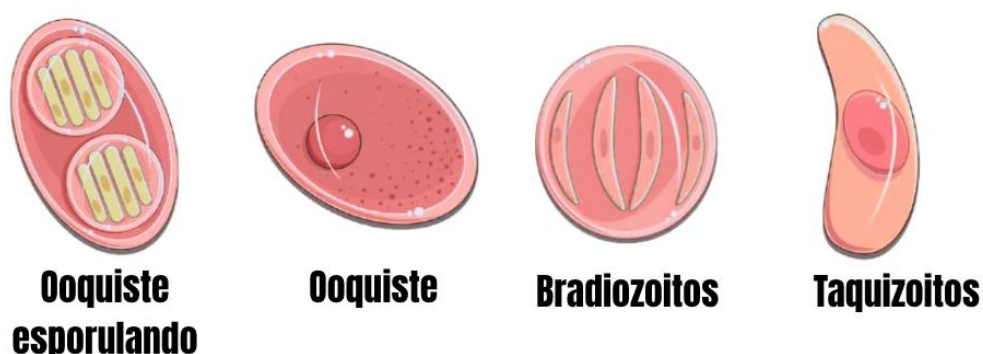
La fase taquizoítica adquiere especial relevancia durante el embarazo, debido a su capacidad de atravesar barreras biológicas y alcanzar la interfase materno-fetal (Bollani et al., 2022). Cuando la primoinfección ocurre durante la gestación, el parásito puede diseminarse por vía hematógena, interactuar con células placentarias y, en determinadas condiciones, atravesar la barrera placentaria e infectar al feto (Faral-Tello et al., 2023). Este fenómeno explica la importancia de la toxoplasmosis congénita, cuyas consecuencias dependen del momento gestacional de la infección, la carga parasitaria, la respuesta inmunitaria materna y la capacidad invasiva de las cepas circulantes (Almeira y Dubey, 2021).

#### **1.1.2.1. Biología y características estructurales de *T. gondii***

*Toxoplasma gondii* presenta tres formas infectantes principales: taquizoítos, bradizoítos y ooquistes (Figura 1). Los taquizoítos corresponden a la fase proliferativa aguda, mientras que los bradizoítos permanecen contenidos en quistes tisulares durante infecciones crónicas. Los ooquistes representan la forma ambientalmente resistente y poseen especial importancia epidemiológica debido a su elevada capacidad de supervivencia en condiciones ambientales adversas (Dubey et al., 2021).

## Figura 2

Formas infectantes principales de *T. gondii*.



**Nota.** Imagen adaptada de Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>), bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Los oocistos esporulados poseen dimensiones aproximadas de 10 a 12  $\mu\text{m}$  y están rodeados por una pared bilaminar altamente resistente, compuesta por proteínas ricas en tirosina y carbohidratos estructurales que les confieren estabilidad química y física. Esta pared constituye una de las principales limitantes para los procesos de extracción de ADN, debido a que dificulta la ruptura celular y la liberación eficiente del material genético (Fritz et al., 2023).

La elevada resistencia ambiental de los oocistos permite su persistencia durante meses en agua, suelo y superficies vegetales (Hachimi et al., 2024). Se ha demostrado que los oocistos pueden adherirse fácilmente a vegetales de hojas rugosas mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, incrementando el riesgo de transmisión alimentaria (Shapiro et al., 2020). Además, factores como las prácticas agrícolas tradicionales, el acceso limitado a sistemas de riego tratado y la presencia de poblaciones de gatos ferales en zonas periurbanas y rurales confluyen para configurar un escenario epidemiológico propicio para la contaminación de productos frescos (González-Ramírez et al. 2024). En consecuencia, las hortalizas de consumo crudo representan matrices complejas para la detección molecular del parásito.

### 1.1.2.2. La matriz vegetal como vehículo de transmisión: el caso de *Brassica oleracea* var. *capitata*

La producción de col ha demostrado un crecimiento sostenido durante los últimos años en Ecuador. En 2019, el valor bruto de la producción de coles incrementó de 1,5 millones USD a más de 5,5 millones USD en 2024, evidenciando la importancia económica y comercial de este tipo de cultivo dentro del sector hortícola nacional (**Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2026**). La col verde (*Brassica oleracea* var. *capitata*) es una hortaliza de consumo masivo en el país, lo que constituye un modelo particularmente relevante para el estudio de la contaminación por *T. gondii* por varias razones. Su estructura foliar compacta, con hojas superpuestas en capas, genera numerosas superficies de contacto, pliegues y hendiduras donde los ooquistes pueden quedar atrapados, protegiéndolos del lavado superficial. Además, al consumirse predominantemente cruda en ensaladas y preparaciones típicas de la gastronomía local, la col verde representa un riesgo directo de exposición al parásito si no se aplican medidas de higiene adecuadas (**López Ureña et al., 2022**).

### 1.1.3. Métodos clásicos de extracción en parásitos: Fenol-Cloroformo, CTAB y enfoques comerciales

Tradicionalmente, la extracción de ADN parasitario se ha realizado mediante el método de fenol-cloroformo, que se basa en la desnaturalización y partición diferencial de proteínas en una fase orgánica, mientras que los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa. Aunque este método produce ADN de alto peso molecular, su uso ha sido progresivamente relegado debido a la toxicidad de los reactivos, la laboriosidad del procedimiento y la dificultad para eliminar completamente los residuos de fenol que pueden inhibir la PCR (**Stojan et al., 2023**).

En las últimas dos décadas, los kits comerciales basados en membranas de sílice o partículas magnéticas (como los sistemas DNeasy® de Qiagen o Wizard® de Promega) han ganado popularidad por su reproducibilidad, rapidez y facilidad de estandarización (**Faucher et al., 2012**). Estos métodos aprovechan la propiedad del ADN de unirse selectivamente a matrices de sílice en presencia de sales caotrópicas. Sin embargo, su eficacia para recuperar ADN de ooquistes de *T. gondii* a partir de matrices vegetales complejas es variable y, en muchos casos, insuficiente, requiriendo modificaciones sustanciales de los protocolos estándar proporcionados por el fabricante.

### **1.1.3.1. El desafío de inhibidores de PCR: polisacáridos, polifenoles y compuestos pécticos**

Uno de los obstáculos más significativos en el análisis molecular de muestras vegetales es la presencia de inhibidores de la PCR, ya que se extraen junto con el ADN. Entre los inhibidores más prevalentes se encuentran los polisacáridos (celulosa, pectinas, hemicelulosas), los compuestos fenólicos (ácidos clorogénico y cafeico, flavonoides, taninos), los pigmentos (clorofilas, carotenoides) y los metabolitos secundarios característicos de las *brassicáceas*, como los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis (Sahu, Thangaraj & Kathiresan, 2012). Estos compuestos interfieren con la actividad de la ADN polimerasa Taq, ya sea por quelación del cofactor  $Mg^{2+}$ , por unión directa al sitio activo de la enzima o por interacción con el ADN molde, bloqueando el acceso de los cebadores (Villaplana et al., 2020).

La col verde, al igual que otras *brassicáceas*, presenta una composición bioquímica particularmente compleja. Su alto contenido de fibra dietética y su perfil característico de glucosinolatos y polifenoles la convierten en una matriz intrínsecamente "sucia" desde el punto de vista del análisis molecular (Nagel et al., 2021). En este contexto, la optimización del protocolo de extracción se orienta no solo a maximizar el rendimiento de ADN, sino principalmente a minimizar la co-extracción de estos inhibidores, garantizando así la pureza del ADN obtenido y la fiabilidad de los ensayos de PCR posteriores.

### **1.1.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes para detección parasitaria**

#### **1.1.4.1. Principios teóricos de la PCR convencional**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), concebida por Kary Mullis en 1983, revolucionó la biología molecular al permitir la amplificación exponencial *in vitro* de una secuencia específica de ADN. La técnica se fundamenta en la repetición cíclica de tres etapas térmicas: desnaturalización de la doble hélice, hibridación de los cebadores y extensión por la ADN polimerasa que, en condiciones óptimas, generan millones de copias del fragmento diana (Khehra et al., 2025).

#### **1.1.4.2. El gen B1 y el elemento repetitivo de 196 pb: blancos moleculares de elección**

La selección del blanco molecular es un determinante crítico de la sensibilidad y especificidad del ensayo de PCR. Para la detección de *T. gondii*, dos marcadores genéticos han sido ampliamente utilizados y validados:

El gen B1, identificado por primera vez por **Boothroyd et al. (1987)**, es una secuencia repetitiva de 35 copias distribuidas en tándem en el genoma del parásito. Su alta conservación entre diferentes cepas y su naturaleza multicopia lo convierten en un blanco sensible y específico para la detección molecular.

El elemento repetitivo de 196 pb (RE-196-bp), descrito posteriormente por **Homan et al. (2000)**, presenta aproximadamente 200-300 copias por genoma, lo que teóricamente le confiere una sensibilidad aún mayor que el gen B1. Sin embargo, estudios comparativos recientes han demostrado que la elección entre ambos blancos depende de la matriz analizada y del protocolo de extracción empleado. En el contexto de esta investigación, el gen B1 ha sido seleccionado como blanco molecular debido a su amplia validación en estudios previos para muestras vegetales y ambientales, así como a la disponibilidad de protocolos optimizados y secuencias de cebadores bien caracterizadas.

#### **1.1.5. Optimización de protocolos de extracción de ADN para detección molecular de parásitos en alimentos**

##### **1.1.5.1. Definición y dimensiones del concepto de optimización en biología molecular**

La optimización de un protocolo de extracción de ADN trasciende la simple modificación empírica de variables operativas. Desde una perspectiva teórica, constituye un proceso sistemático y multidimensional orientado a maximizar cuatro parámetros fundamentales e interrelacionados: (a) la eficiencia de recuperación, definida como la proporción del ADN parasitario presente en la muestra que es efectivamente extraído; (b) la pureza del ADN obtenido, evaluada mediante las relaciones de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  (indicativa de contaminación proteica) y  $A_{260}/A_{230}$  (indicativa de contaminación por polisacáridos, fenoles o sales caotrópicas); (c) la integridad del ADN, que refleja la ausencia de fragmentación excesiva y su idoneidad como molde para la amplificación; y (d) la reproducibilidad inter-ensayo, que garantiza la obtención de resultados consistentes en diferentes días y por diferentes operadores (**Mulec et al., 2020**).



### 1.1.5.2. Especificaciones de la optimización para la detección de ooquistes de *T. gondii* en matrices vegetales

La optimización de un protocolo de extracción de ADN para la detección de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en coles verdes implica desafíos metodológicos asociados con la interacción de tres factores principales: la elevada resistencia estructural del ooquiste, la complejidad bioquímica propia de la matriz vegetal y la baja carga parasitaria que suele encontrarse en muestras naturales (Slana et al., 2021). En este contexto, se han reconocido aspectos críticos para mejorar la eficiencia del proceso, entre ellos la incorporación de una etapa de disrupción mecánica con perlas de zirconio o sílice, orientada a favorecer la ruptura de la pared del ooquiste; el empleo de tampones de lavado capaces de reducir la presencia de polisacáridos, polifenoles y otros inhibidores vegetales y la selección de condiciones de elución que permitan maximizar la recuperación de ADN parasitario, disminuyendo al mismo tiempo la coelución de compuestos que puedan interferir con la amplificación molecular (Calero et al., 2025).

Un hallazgo fundamental de estos estudios es que la eficiencia de recuperación de ooquistes a partir de hojas de vegetales es generalmente baja y altamente variable, oscilando entre el 10% y el 50% del inóculo inicial según el método de elución empleado. Este dato subraya la necesidad de optimizar no solo el proceso de extracción de ADN, sino también el procedimiento de recuperación de los ooquistes de la superficie foliar, el cual constituye una etapa preanalítica crítica en la cadena de detección.

Desde un punto de vista costo – eficiente el método de lavado con solución salina PBS 1X y Tween® 80 es accesible y compatible con PCR. La solución salina permite arrastrar el material superficial sin alterar drásticamente la muestra, mientras que el Tween® 80 disminuye la tensión superficial y ayuda a desprender ooquistes adheridos a la hoja. Métodos como flotación, filtración especializada o separación inmunomagnética pueden ser más costosos y en algunos casos, dejar residuos que inhiben la PCR. Por lo tanto, para una matriz vegetal como col verde, el lavado con solución salina PBS 1 X y Tween® 80 es una opción técnica y económicamente más adecuada (Rattan et al., 2025).

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

- Optimizar un protocolo de extracción de ADN para la detección molecular de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en coles verdes (*Brassica oleracea* var. *capitata*) procedentes del Mercado Central de Ambato.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Detectar la presencia de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en muestras de coles verdes obtenidas en el Mercado Central de Ambato mediante microscopía.
- Evaluar parámetros de lisis térmica, mecánica y enzimática para mejorar el rendimiento y la pureza del ADN recuperado.
- Comparar el método optimizado y el método de extracción de referencia mediante indicadores de concentración, pureza y tasa de detección por PCR.

## CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

### 2.1. Materiales

**Tabla 1**

Insumos, material fungible y equipos requeridos para el protocolo experimental.

| <b>Material</b>                                            | <b>Cantidad</b> |
|------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Reactivos</b>                                           |                 |
| <b>Agarosa (100 g)</b>                                     | 1 frasco        |
| <b>Agua destilada</b>                                      | 3,5 L           |
| <b>Alcohol 70%</b>                                         | 2 L             |
| <b>BSA (grado biología molecular)</b>                      | 1 frasco        |
| <b>Buffer PCR</b>                                          | 2 viales        |
| <b>Buffer TAE 50X (1 L)</b>                                | 1 frasco        |
| <b>DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (PCR convencional)</b> | 1 kit           |
| <b>Éter etílico</b>                                        | 70 ml           |
| <b>Formaldehído 10%</b>                                    | 250 ml          |
| <b>Formaldehído 5%</b>                                     | 120 ml          |
| <b>Hielo seco</b>                                          | 1 libra         |
| <b>Isopropanol</b>                                         | 500 ml          |
| <b>Kit de extracción</b>                                   | 1 kit           |
| <b>Marcador molecular 1000 bp DNA ladder (500 µL)</b>      | 1 vial          |
| <b>Primer TOXO1 Forward</b>                                | 1 vial          |
| <b>Primer TOXO2 Reverse</b>                                | 1 vial          |
| <b>Proteinasa K (100 mg)</b>                               | 1 frasco        |
| <b>RNasa A (0,7 mL)</b>                                    | 1 frasco        |
| <b>Sybr Green</b>                                          | 1 vial          |
| <b>Tampón Tris-EDTA</b>                                    | 500 ml          |
| <b>β-Mercatoetanol</b>                                     | 100 ml          |
| <b>Material Fungible</b>                                   |                 |
| <b>Filtros jeringa</b>                                     | 4               |

|                                                |        |
|------------------------------------------------|--------|
| <b>Puntas de micropipetas (100 µl y 10 µl)</b> | 10 c/u |
| <b>Tubos de PCR</b>                            | 30     |
| <b>Equipos</b>                                 |        |
| <b>Balanza analítica</b>                       | 1      |
| <b>Cabina de seguridad</b>                     | 1      |
| <b>Cámara de electroforesis</b>                | 1      |
| <b>Congeladora</b>                             | 1      |
| <b>Laptop</b>                                  | 1      |
| <b>Micropipeta (0.1 – 10 µl)</b>               | 1      |
| <b>Micropipeta (10 – 100 µl)</b>               | 1      |
| <b>Microscopio óptico</b>                      | 1      |
| <b>Potenciómetro</b>                           | 1      |
| <b>Refrigeradora</b>                           | 1      |
| <b>Termociclador</b>                           | 1      |

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Detección de ooquistes de *Toxoplasma gondii* mediante microscopía

#### 2.2.1.1 Recolección y transporte de muestras

La recolección de muestras se realizó siguiendo los lineamientos del Instituto Ecuatoriano de Normalización 1750 (INEN, 1994) para ensayos en hortalizas. Se llevó a cabo un muestreo aleatorio de 21 coles verdes (*Brassica oleracea* var. *capitata*) en el Mercado Central de Ambato (coordenadas 1°14'33.0"S 78°37'32.0"W). Las muestras fueron transportadas en fundas plásticas Ziploc hacia los laboratorios de la UODIDE de la Universidad Técnica de Ambato y se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

#### 2.2.1.2 Recuperación y concentración de ooquistes

Se seleccionaron las hojas externas de cada muestra, las cuales se homogenizaron y se cortaron en trozos pequeños. Posteriormente, se pesaron 200 g de muestra y se colocaron en bolsas estériles, a las que se añadieron 200 mL de solución PBS 1X con 0.1% de Tween® 80 (pH 7.4). La mezcla se agitó vigorosamente durante 10–20 minutos para favorecer el desprendimiento de los ooquistes (Slana et al., 2021).

### **2.2.1.3 Concentración mediante técnica de Ritchie**

La suspensión obtenida se filtró a través de 10 capas de gasa estéril para eliminar material particulado grueso y se transfirió a tubos Falcon de 15 mL y se concentró aplicando la técnica de sedimentación de Ritchie (Anécimo et al., 2012). La muestra se centrifugó a  $3500 \times g$  durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento obtenido se resuspendió con 10 mL de formalina al 10 % y se homogeneizó mediante agitación suave. Posteriormente, se incorporaron 3 mL de éter etílico y se agitó vigorosamente durante 30 segundos para facilitar la separación de lípidos, restos vegetales y partículas interferentes.

La suspensión se centrifugó nuevamente a  $3500 \times g$  durante 10 minutos, tras lo cual se diferenciaron cuatro fases: una capa superior de éter, un tapón de residuos sólidos, una fase acuosa de formalina y un sedimento compacto en el fondo del tubo. Las tres fases superiores se eliminaron por decantación.

El sedimento recuperado se lavó con 10 mL de PBS 1X y se centrifugó nuevamente a  $3500 \times g$  durante 10 minutos para eliminar residuos del reactivo de concentración. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 400  $\mu$ L de PBS 1X y se almacenó a 4 °C.

## **2.2.2 Confirmación mediante tinción y microscopía**

Se preparó dos portaobjetos por muestra, en los cuales se colocaron 15  $\mu$ L de la suspensión final recolectada en cada uno. Ambos portaobjetos se sometieron a diferentes tinciones.

### **2.2.2.1 Tinción de Lugol**

Una vez homogeneizada la muestra, se depositaron 15  $\mu$ L sobre un portaobjetos y se añadieron 10  $\mu$ L de solución de Lugol directamente sobre la preparación. Tras colocar el cubreobjetos, se procedió a la observación con microscopio colocando aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y observando en el objetivo 100x.

### **2.2.2.2 Tinción de safranina.**

Tras homogeneizar la muestra, se depositaron 15  $\mu$ L sobre un portaobjetos y se extendió un frotis fino, el cual se dejó secar completamente al aire. La fijación se realizó cubriendo la preparación con etanol al 96% y dejándola actuar durante 3 minutos. Posteriormente, el frotis se cubrió con safranina al 1% y se sometió a un calentamiento suave por 2 minutos. Después de un lavado cuidadoso con agua destilada, se procedió a la decoloración con alcohol ácido al 1% durante 15 segundos. Una vez seca la muestra, se colocó el cubreobjetos y se llevó a cabo la observación al microscopio con un objetivo de 100X.

### 2.2.3 Evaluación de parámetros de lisis para la extracción de ADN

#### 2.2.3.1 Fraccionamiento de muestras

Las muestras positivas a microscopía fueron homogenizadas mediante vortex durante 15 segundos. Se determinó la concentración de ooquistes realizando conteo por gota calibrada, colocando 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión homogenizada y realizando el conteo de estructura semejantes a ooquiste promediando 5 repeticiones.

Seguidamente, cada muestra se dividió en dos alícuotas de 300  $\mu\text{L}$ . Una alícuota fue sometida al protocolo de lisis optimizado y la otra al protocolo del kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit. Ambas se conservaron en formaldehído al 5% a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.3.2 Condiciones del protocolo de lisis

Se aplicó un protocolo combinado de lisis térmica, mecánica y enzimática:

- **Lisis térmica:** Se realizaron ciclos de choque térmico comparando 10 y 15 ciclos, cada uno compuesto por incubación a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos seguida de enfriamiento criogénico ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 5 minutos mediante slurry de etanol.
- **Lisis mecánica:** Se añadieron 0.3 g de perlas de sílice (0.5 mm) y se evaluaron dos condiciones: 2 ciclos y 3 ciclos de bead-beating a  $3500 \times \text{g}$  durante 1 minuto, con enfriamiento intermedio en hielo.
- **Digestión enzimática:** Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  de proteinasa K, incubando a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas con agitación periódica. Posteriormente, se incorporaron 20  $\mu\text{L}$  de RNasa y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- **Eliminación de inhibidores:** Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol para neutralizar compuestos fenólicos.

#### 2.2.4. Extracción con kit comercial

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit GeneJET Genomic DNA Purification. Las muestras se incubaron con proteinasa K y buffer de lisis a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Posteriormente, se añadió etanol al 50% y la mezcla se transfirió a columnas de sílice.

Se realizaron dos lavados con los buffers correspondientes y el ADN fue eluido en 50  $\mu\text{L}$  de buffer de elución precalentado a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2.5. Comparación del rendimiento del protocolo**

### **2.2.5.1. Cuantificación de ADN**

La concentración y pureza del ADN se midió mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop™, empleando 2 µL de muestra. La pureza se determinó mediante la relación A260/A280 y A260/230.

### **2.2.5.2 Detección mediante PCR**

La detección de *T. gondii* se realizó mediante PCR dirigida al gen B1 (fragmento de ~194 pb) con los cebadores Forward (5' GGA ACT GCA TCC GTT CAT GAG 3') y Reverse (5' TCT TTA AAG CGT TCG TGG TC 3') en una concentración de 10 mM. La reacción se preparó en un volumen final de 25 µL, con 12,5 µL de DreamTaq Green PCR Master Mix 2X, 1 µL de cada cebador específico, 1 µL de BSA 0,1 % (p/v), 1 µL de ADN y se completó con agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen final.

Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 41 ciclos a 94 °C por 30 s de desnaturalización, 55 °C por 30 s de alineamiento, 72 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 10 minutos (**Khan & Noordin, 2020**).

Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 90 Voltios y 300 mA durante 45 minutos.

### **2.2.6. Análisis estadístico mediante ANOVA y t de student**

Los resultados experimentales se trataron mediante un análisis ANOVA para la optimización, además se empleó la prueba post hoc tukey para determinar el mejor tratamiento en función de las variables de respuesta de concentración de ADN, A260/280 y A260/230 y la aplicación de parámetros de pureza e integridad que fueron evaluados mediante espectrofotometría y electroforesis en gel, con el propósito de determinar el mejor tratamiento y establecer la combinación de ciclos de lisis térmica, ciclos de lisis mecánica y concentración de proteinasa K que permita aumentar la sensibilidad de detección de ADN de *Toxoplasma gondii* en matrices vegetales. Finalmente se aplicó una t student entre el método de referencia y los tratamientos realizados para la confirmación de las hipótesis.

### 2.2.6.1 Diseño de tratamientos con los parámetros a evaluar.

Se realizó un diseño experimental factorial  $2^3$  para el cual se consideró a los ciclos de choque térmico, ciclos de lisis mecánica en el equipo y la cantidad de microlitros de proteinasa K como variables independientes, con dos niveles definidos previamente como son de 10 a 15 ciclos de choque térmico, 2 a 3 ciclos de lisis mecánica y usando 20  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  de proteinasa K respectivamente, como se observa en la **Tabla 2**.

**Tabla 2**

Factores y niveles evaluados en el proceso de lisis celular.

| Factores          | Niveles                         |
|-------------------|---------------------------------|
| A: Lisis Térmica  | A1: 10 Ciclos de choque térmico |
|                   | A2: 15 Ciclos de choque térmico |
| B: Lisis Mecánica | B1: 2 ciclos                    |
|                   | B2: 3 ciclos                    |
| C: Proteinasa K   | C1: 20 $\mu\text{L}$            |
|                   | C2: 30 $\mu\text{L}$            |

**Nota.** Se utilizó un diseño factorial completo  $2^3$ , considerando como factores la lisis térmica (A), la lisis mecánica (B) y el volumen de proteinasa K (C), cada uno con dos niveles experimentales.

### 2.2.6.2. Modelamiento matemático y análisis del ANOVA

Los efectos provocados por las variables independientes se evaluarán mediante un ANOVA para el diseño factorial  $2^3$  evaluando los efectos principales de la interacción de los factores y sus efectos tomando a “Y” como respuesta a los efectos del tratamiento. El modelamiento matemático es el siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_A A + \beta_B B + \beta_C C + \beta_{AB} AB + \beta_{AC} AC + \beta_{BC} BC + \beta_{ABC} ABC + \varepsilon$$

Donde los términos son:

$\beta_0$  = Término independiente.

$\beta_A, \beta_b$  y  $\beta_c$  = Representan los efectos de lisis térmica, lisis mecánica y proteinasa K.

$\beta_{ABC}$  = Representa las interacciones entre factores.

$\varepsilon$  = Representa el error aleatorio.



Según el modelamiento matemático planteado existen 8 tratamientos posibles a evaluar como se muestra en la **Tabla 3** estos serán evaluados empleando el software estadístico minitab.

**Tabla 3**

Diseño de tratamientos para la optimización de la lisis celular.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Lisis<br/>térmica</b> | <b>Lisis<br/>mecánica</b> | <b>Proteinasa<br/>K</b> |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>T1</b>          | 10 ciclos                | 2 ciclos                  | 20 µL                   |
| <b>T2</b>          | 15 ciclos                | 2 ciclos                  | 20 µL                   |
| <b>T3</b>          | 10 ciclos                | 3 ciclos                  | 20 µL                   |
| <b>T4</b>          | 15 ciclos                | 3 ciclos                  | 20 µL                   |
| <b>T5</b>          | 10 ciclos                | 2 ciclos                  | 30 µL                   |
| <b>T6</b>          | 15 ciclos                | 2 ciclos                  | 30 µL                   |
| <b>T7</b>          | 10 ciclos                | 3 ciclos                  | 30 µL                   |
| <b>T8</b>          | 15 ciclos                | 3 ciclos                  | 30 µL                   |

**Nota.** Combinaciones experimentales evaluadas para la optimización del proceso de lisis para extracción de ADN de ooquistes de *Toxoplasma gondii*.

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  para cada una de las respuestas obtenidas. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos efectos cuyo p-valor resultó inferior a 0,05.

#### **2.2.6.3. Selección del tratamiento óptimo y análisis complementario.**

Se seleccionó la combinación de condiciones que se acerque a los parámetros de concentración y calidad de ADN estándar:

- Ratio A260/280 que indican la presencia de proteínas, el valor ideal se encuentra entre 1.7 a 2.0.
- Ratio A260/230 que indican la contaminación por reactivos, el valor ideal se encuentra entre 1.8 a 2.2.
- Concentración entre 20 a 40 ng/µl

Finalmente, este tratamiento se hizo una comparación de mediante t student frente al kit GeneJET Genomic DNA Purification de referencia.

#### 2.2.6.4. Hipótesis General.

##### Hipótesis nula ( $H_0$ )

**H<sub>0</sub>:** Los parámetros de lisis térmica, lisis mecánica y concentración de Proteinasa K no producen cambios significativos en el rendimiento ni en la pureza del ADN recuperado.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8$$

##### Hipótesis alternativa ( $H_i$ )

**H<sub>i</sub>:** Al menos uno de los parámetros de lisis térmica, lisis mecánica o concentración de Proteinasa K produce cambios significativos en el rendimiento y/o la pureza del ADN recuperado.

$$H_1: \exists \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8$$

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1 Resultados de la observación microscópica.

Mediante la tinción con Lugol, se examinaron un total de 21 muestras de col verde (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) recolectadas en el mercado central de Ambato. Este colorante permitió identificar estructuras parasitarias con mayor claridad. De las 21 muestras analizadas, 8 mostraron la presencia de estructuras con morfología compatible con ooquistes de *Toxoplasma gondii*, lo que representa un 38,1 % de positividad. Este hallazgo sugiere una posible contaminación parasitaria en el producto comercializado en dicha zona. Los resultados se resumen en la **Tabla 4**.

**Tabla 4**

Resultados de la observación microscópica mediante tinción de Lugol.

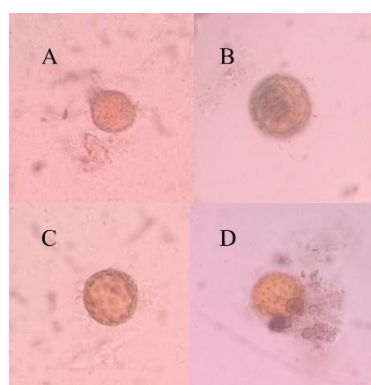
| Puesto | Muestra | Resultado Lugol | Imagen   |
|--------|---------|-----------------|----------|
| 1      | P1M1    | Positivo        | Figura 2 |
|        | P1M2    | Positivo        | Figura 3 |
|        | P1M3    | Positivo        | Figura 4 |
| 2      | P2M1    | Positivo        | Figura 5 |
|        | P2M2    | Negativo        | -        |
|        | P2M3    | Negativo        | -        |
| 3      | P3M1    | Negativo        | -        |
|        | P3M2    | Negativo        | -        |
|        | P3M3    | Negativo        | -        |
| 4      | P4M1    | Negativo        | -        |
|        | P4M2    | Negativo        | -        |
|        | P4M2    | Negativo        | -        |
| 5      | P5M1    | Positivo        | Figura 6 |
|        | P5M2    | Negativo        | -        |
|        | P5M3    | Negativo        | -        |
| 6      | P6M1    | Negativo        | -        |
|        | P6M2    | Positivo        | Figura 7 |
|        | P6M3    | Positivo        | Figura 8 |

|   |      |          |          |
|---|------|----------|----------|
| 7 | P7M1 | Positivo | Figura 9 |
|   | P7M2 | Negativo | -        |
|   | P7M3 | Negativo | -        |

**Nota.** Las estructuras morfológicamente compatibles con ooquistes se observaron en las muestras P1M1, P1M2, P1M3, P2M1, P5M1, P6M2, P6M3 y P7M1, cuyos registros foto micrográficos se presentan en las Figuras 2 a 8.

### Figura 3

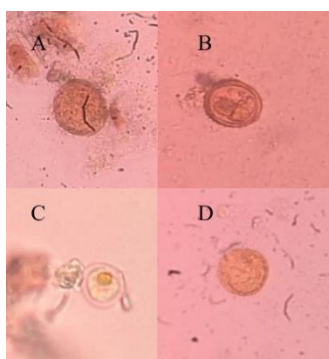
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 1, Muestra 1. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de Lugol.

### Figura 4

Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas a 100X.

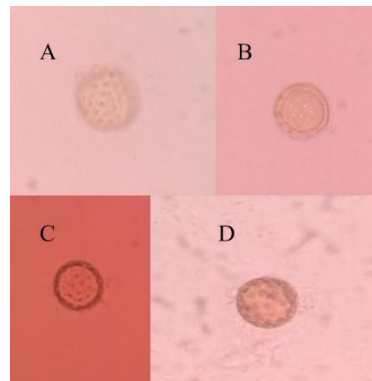


**Nota.** Puesto 1, Muestra 2. Estructuras esféricas u ovoideas morfológicamente similares a ooquistes de *Toxoplasma gondii* observadas mediante microscopía óptica en muestras de col

verde (*Brassica oleracea* var. *capitata*). En los campos A–D se evidencian estructuras con pared definida y contenido interno granular, características compatibles con formas ooquisticas.

### Figura 5

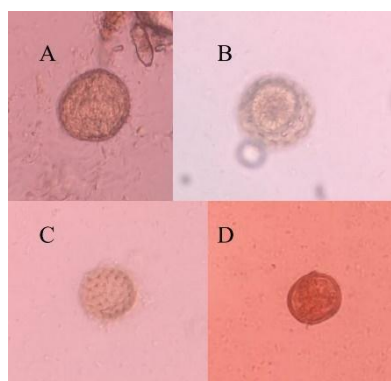
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X.



**Nota.** Puesto 1, Muestra 3. En los campos A, B y C se aprecian estructuras esféricas con pared delimitada y contenido interno granular, mientras que en D se observa una estructura ovoidea con mayor densidad interna morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas mediante microscopía óptica en muestras de col verde.

### Figura 6

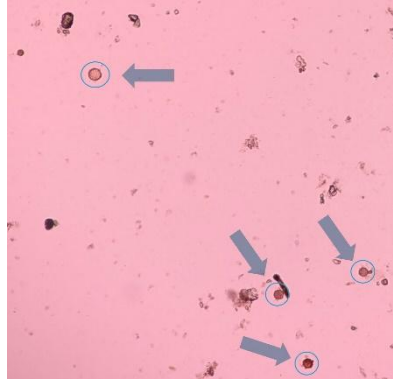
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X.



**Nota.** Puesto 2, Muestra 1. Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en col verde. En A, B y C predominan formas esféricas con contenido granular, mientras que en D se aprecia una forma ovoidea de mayor densidad interna.

### Figura 7

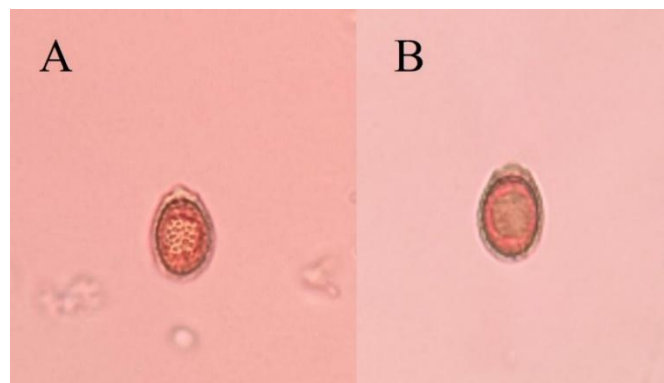
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 40X.



**Nota.** Puesto 5, Muestra 1. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de lugol.

### Figura 8

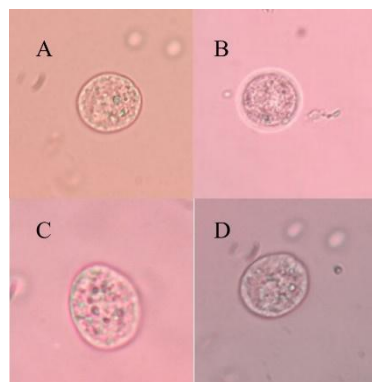
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X.



**Nota.** Puesto 6, Muestra 2. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de lugol.

### Figura 9

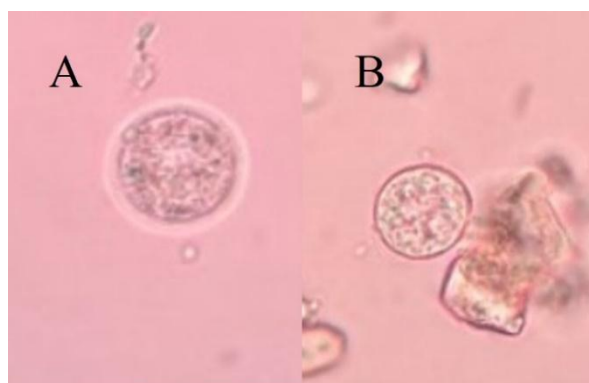
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X.



**Nota.** Puesto 6, Muestra 3. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de lugol.

### Figura 10

Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 7, Muestra 1. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de lugol.

Mediante la tinción con safranina, se volvieron a examinar las 21 muestras de col verde (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) recolectadas en el mercado central de Ambato. Este colorante permitió resaltar posibles estructuras parasitarias debido a la afinidad del colorante por la pared ooquistica que contiene componentes lipídicos y proteicos que limitan la permeabilidad, pero bajo condiciones de tinción modificada y calentamiento, permiten la

retención del colorante, generando una coloración rojiza-anaranjada característica de manera complementaria a la tinción previa con Lugol (CDC, 2024). De las 21 muestras analizadas, 6 revelaron la presencia de estructuras con morfología compatible con ooquistes de *Toxoplasma gondii*, lo que representa un 28,6 % de positividad. Estos resultados, que se presentan en la Tabla 2, refuerzan la evidencia de contaminación por este parásito en el producto comercializado en dicha zona.

**Tabla 5**

Resultados de la observación microscópica mediante tinción de safranina.

| Puesto | Muestra | Resultado Safranina | Imagen    |
|--------|---------|---------------------|-----------|
| 1      | P1M1    | Positivo            | Figura 10 |
|        | P1M2    | Positivo            | Figura 11 |
|        | P1M3    | Negativo            | -         |
| 2      | P2M1    | Positivo            | Figura 12 |
|        | P2M2    | Negativo            | -         |
|        | P2M3    | Negativo            | -         |
| 3      | P3M1    | Negativo            | -         |
|        | P3M2    | Negativo            | -         |
|        | P3M3    | Negativo            | -         |
| 4      | P4M1    | Negativo            | -         |
|        | P4M2    | Negativo            | -         |
|        | P4M2    | Negativo            | -         |
| 5      | P5M1    | Negativo            | -         |
|        | P5M2    | Negativo            | -         |
|        | P5M3    | Negativo            | -         |
| 6      | P6M1    | Negativo            | -         |
|        | P6M2    | Positivo            | Figura 13 |
|        | P6M3    | Positivo            | Figura 14 |
| 7      | P7M1    | Positivo            | Figura 15 |
|        | P7M2    | Negativo            | -         |
|        | P7M3    | Negativo            | -         |



**Nota.** Las estructuras morfológicamente compatibles con ooquistes se observaron en las muestras P1M1, P1M2, P2M1, P6M2, P6M3 y P7M1, cuyos registros foto micrográficos se presentan en las Figuras 10 a 15.

### **Figura 11**

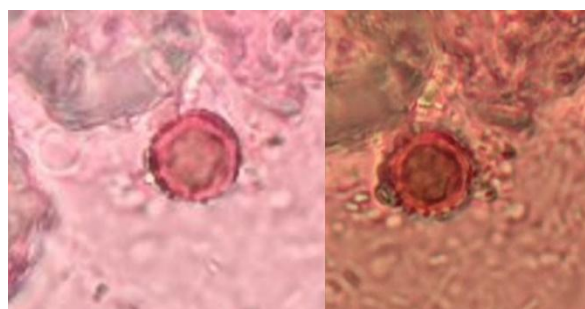
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 1, Muestra 1. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de safranina.

### **Figura 12**

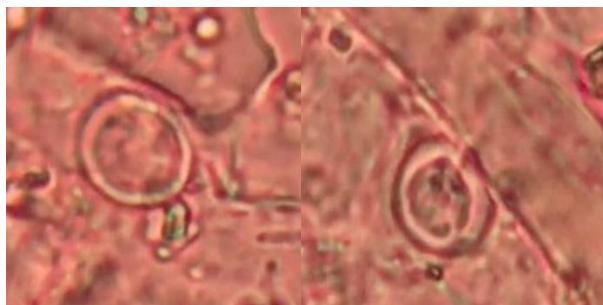
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 1, Muestra 2. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de safranina.

### Figura 13

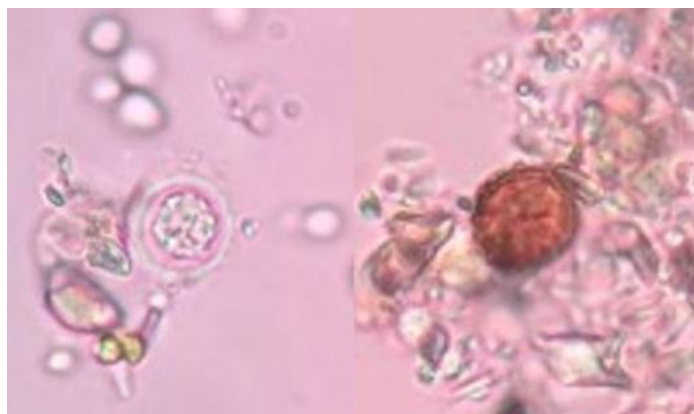
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 2, Muestra 1. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de safranina.

### Figura 14

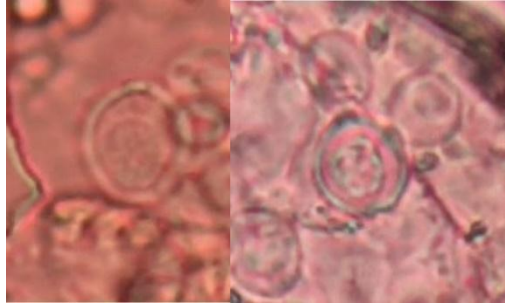
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 6, Muestra 2. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de safranina.

### Figura 15

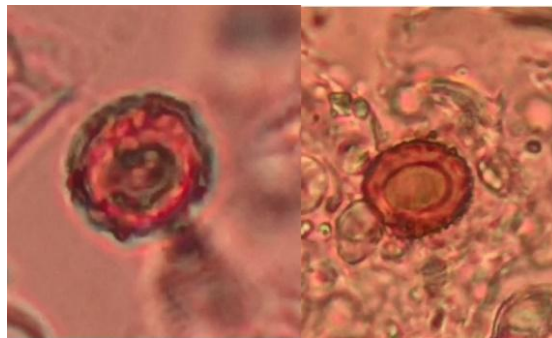
Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 6, Muestra 3. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de safranina.

### Figura 16

Estructuras morfológicamente similares a ooquistes de *T. gondii* observadas en el microscopio a 100X



**Nota.** Puesto 7, Muestra 1. Estructuras esféricas con pared definida, similar a ooquiste de *Toxoplasma gondii*, observadas mediante microscopía óptica a un objetivo de 100X y tinción de safranina.

### 3.1.2. Análisis de microscopía

#### 3.1.2.1. Comparación morfológica de las muestras.

Se analizaron un total de 21 muestras de col verde (*Brassica oleracea* var. *capitata*) mediante observación microscópica utilizando tinción con Lugol y safranina. Con la tinción de Lugol, 8 de las 21 muestras (38,1%) presentaron estructuras con morfología compatible con ooquistes de *Toxoplasma gondii*. Por otra parte, la tinción con safranina permitió detectar 6 muestras positivas (28,6%). Estos resultados evidencian la presencia de posibles formas parasitarias en vegetales comercializados en el Mercado Central de Ambato.

La frecuencia observada (28,6–38,1%) es consistente con reportes recientes en vegetales frescos, donde la contaminación por *T. gondii* varía según matriz y entorno, con valores que pueden alcanzar ~30–40% en hortalizas de hoja (Lass et al., 2021). La discrepancia entre tinciones se explica por limitaciones de la microscopía: la identificación morfológica (ooquistes ~10–12 µm) es susceptible a confusión con dentritos o estructuras ambientales, lo que afecta la especificidad, considerando la microscopía como un tamizaje preliminar (Boughattas, 2022).

Sin embargo, la presencia de estructuras compatibles en distintos puestos sugiere contaminación heterogénea, coherente con rutas ambientales (agua de riego, suelo y manipulación), especialmente relevantes en vegetales de hoja por su superficie que favorece la adhesión de ooquistes (Dumètre et al., 2020). Por lo tanto, los resultados apoyan la posible presencia de *T. gondii* en las muestras analizadas; no obstante, la confirmación requiere métodos moleculares para reducir falsos positivos y aumentar la validez diagnóstica (Ferreira et al., 2022).

### 3.2. Resultados de parámetros de lisis térmica, mecánica y enzimática: cuantificación y pureza de ADN

Las Tablas 6 y 7 presentan los resultados de la extracción de ADN sometiendo las muestras a 8 tratamientos diferentes (T1 a T8), con tres réplicas cada uno. Se midió la concentración de ADN (ng/µl) y las relaciones de pureza espectral A260/280 (indicador de contaminación por

proteínas o fenol) y A260/230 (indicador de contaminación por carbohidratos, sales o compuestos orgánicos residuales).

**Tabla 6**

Tabulación de datos sobre la concentración de ADN (ng/μl) y relaciones de pureza (A260/280 y A260/230) por tratamiento y réplica

| <b>Tratamiento</b> | <b>Réplica</b> | <b>Concentración<br/>de ADN (ng/μl)</b> | <b>A260/280</b> | <b>A260/230</b> |
|--------------------|----------------|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|
| <b>T1</b>          | R1             | 39,8                                    | 1,49            | 1,20            |
|                    | R2             | 38,6                                    | 1,47            | 1,18            |
|                    | R3             | 40,3                                    | 1,51            | 1,22            |
| <b>T2</b>          | R1             | 16,4                                    | 1,26            | 0,29            |
|                    | R2             | 16,8                                    | 1,25            | 0,27            |
|                    | R3             | 15,9                                    | 1,28            | 0,31            |
| <b>T3</b>          | R1             | 11,6                                    | 1,18            | 0,32            |
|                    | R2             | 11,2                                    | 1,17            | 0,31            |
|                    | R3             | 12,0                                    | 1,19            | 0,33            |
| <b>T4</b>          | R1             | 12,4                                    | 1,55            | 0,51            |
|                    | R2             | 12,7                                    | 1,53            | 0,50            |
|                    | R3             | 12,1                                    | 1,56            | 0,53            |
| <b>T5</b>          | R1             | 33,0                                    | 1,18            | 0,40            |
|                    | R2             | 33,5                                    | 1,19            | 0,41            |
|                    | R3             | 32,4                                    | 1,17            | 0,39            |
| <b>T6</b>          | R1             | 54,4                                    | 1,32            | 0,54            |
|                    | R2             | 53,8                                    | 1,31            | 0,52            |
|                    | R3             | 55,1                                    | 1,34            | 0,55            |
| <b>T7</b>          | R1             | 42,0                                    | 1,31            | 0,49            |
|                    | R2             | 42,6                                    | 1,32            | 0,50            |
|                    | R3             | 41,5                                    | 1,30            | 0,48            |
| <b>T8</b>          | R1             | 21,3                                    | 1,46            | 0,80            |
|                    | R2             | 22,0                                    | 1,45            | 0,78            |
|                    | R3             | 20,8                                    | 1,47            | 0,82            |

**Nota.** Los resultados en base a la concentración y pureza el T1 destaca por acercarse más a los parámetros de aceptación evaluados.

**Tabla 7**

Resumen de concentración de ADN, pureza espectral (A260/280, A260/230) y amplificación por PCR por tratamiento.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Concentración de ADN (ng/μl)</b> | <b>A260/280</b> | <b>A260/230</b> | <b>PCR</b> |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| <b>T1</b>          | 39,57                               | 1,49            | 1,20            | Si         |
| <b>T2</b>          | 16,37                               | 1,26            | 0,29            | Si         |
| <b>T3</b>          | 11,60                               | 1,18            | 0,32            | Si         |
| <b>T4</b>          | 12,40                               | 1,55            | 0,51            | Si         |
| <b>T5</b>          | 32,97                               | 1,18            | 0,40            | Si         |
| <b>T6</b>          | 54,43                               | 1,32            | 0,54            | Si         |
| <b>T7</b>          | 42,03                               | 1,31            | 0,49            | Si         |
| <b>T8</b>          | 21,37                               | 0,97            | 0,53            | Si         |

**Nota.** Los tratamientos T1, T5, T6 y T7 presenta una mayor concentración de ADN, pero en la relación A260/230 solo el T1 es próximo a los requerimientos evaluados.

Las **Tablas 8 y 9** muestran los resultados de extracción con un kit comercial de referencia, utilizado como control. Se analizaron las 8 muestras (M1 a M8), con tres réplicas cada uno.

**Tabla 8**

Concentración de ADN (ng/μl) y relaciones de pureza (A260/280, A260/230) por muestra extraída con Kit de referencia y réplica.

| <b>Muestra</b> | <b>Réplica</b> | <b>Concentración de ADN (ng/μl)</b> | <b>A260/280</b> | <b>A260/230</b> |
|----------------|----------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| <b>M1</b>      | R1             | 18,2                                | 1,16            | 0,23            |
| <b>M1</b>      | R2             | 17,3                                | 1,14            | 0,22            |
| <b>M1</b>      | R3             | 18,6                                | 1,17            | 0,24            |

|           |    |       |      |      |
|-----------|----|-------|------|------|
| <b>M2</b> | R1 | 11,5  | 1,09 | 0,22 |
| <b>M2</b> | R2 | 9,8   | 1,11 | 0,3  |
| <b>M2</b> | R3 | 13,1  | 1,07 | 0,27 |
| <b>M3</b> | R1 | 8,5   | 1,04 | 0,14 |
| <b>M3</b> | R2 | 8,1   | 1,06 | 0,17 |
| <b>M3</b> | R3 | 7,8   | 1,03 | 0,2  |
| <b>M4</b> | R1 | 12,3  | 1,27 | 0,38 |
| <b>M4</b> | R2 | 11,9  | 1,22 | 0,31 |
| <b>M4</b> | R3 | 9,7   | 1,3  | 0,33 |
| <b>M5</b> | R1 | 27,4  | 1,08 | 0,19 |
| <b>M5</b> | R2 | 20,5  | 1,11 | 0,16 |
| <b>M5</b> | R3 | 26,9  | 1    | 0,22 |
| <b>M6</b> | R1 | 22,6  | 1,15 | 0,42 |
| <b>M6</b> | R2 | 25,1  | 1,07 | 0,49 |
| <b>M6</b> | R3 | 23,2  | 1,19 | 0,37 |
| <b>M7</b> | R1 | 30,27 | 1,32 | 0,2  |
| <b>M7</b> | R2 | 32,01 | 1,35 | 0,17 |
| <b>M7</b> | R3 | 29,9  | 1,3  | 0,21 |
| <b>M8</b> | R1 | 15,4  | 1,39 | 0,7  |
| <b>M8</b> | R2 | 16,7  | 1,42 | 0,74 |
| <b>M8</b> | R3 | 14,9  | 1,37 | 0,8  |

**Tabla 9**

Resumen de concentración de ADN, pureza espectral (A260/280, A260/230) y amplificación por PCR por muestra extraída con el kit de referencia.

| <b>Tratamiento</b> | <b>Concentración de ADN (ng/μl)</b> | <b>A260/280</b> | <b>A260/230</b> | <b>PCR</b> |
|--------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| <b>M1</b>          | 18,03                               | 1,16            | 0,23            | Si         |
| <b>M2</b>          | 11,47                               | 1,09            | 0,26            | Si         |
| <b>M3</b>          | 8,13                                | 1,04            | 0,17            | No         |

|           |       |      |      |    |
|-----------|-------|------|------|----|
| <b>M4</b> | 11,30 | 1,26 | 0,34 | No |
| <b>M5</b> | 24,93 | 1,06 | 0,19 | Si |
| <b>M6</b> | 23,63 | 1,14 | 0,43 | Si |
| <b>M7</b> | 30,73 | 1,32 | 0,19 | No |
| <b>M8</b> | 15,67 | 1,39 | 0,75 | No |

### 3.2.1. Análisis estadístico de los tratamientos mediante ANOVA.

Para evaluar la influencia de los tratamientos en la optimización del protocolo de extracción de ADN se implementó en diseño factorial  $2^3$  con los factores de Lisis térmica, lisis mecánica y cantidad de proteinasa K que se planteó en la metodología. Los resultados experimentales se mostraron en las **Tablas 6, 7, 8 y 9** donde se manejó un nivel alto y uno bajo como se muestra en la **Tabla 2**.

#### 3.2.1.1. Análisis de varianzas de la concentración de ADN.

En la **Figura 16**, el análisis de varianza aplicado a la concentración de ADN evidenció que los tres factores estudiados tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta. Entre ellos, la Proteinasa K fue el factor con más impacto, debido a que presentó la mayor suma de cuadrados ajustada, con 1883,28, y el valor F más alto, con 5772,51. Esto sugiere que la cantidad de Proteinasa K utilizada tuvo un papel importante en el rendimiento del proceso de extracción. La lisis mecánica también mostró una influencia, con una suma de cuadrados ajustada de 1173,20 y un valor F de 3596,02. En cambio, los ciclos de choque térmico, aunque fueron estadísticamente significativos, presentaron una menor participación en comparación con los otros factores, con una suma de cuadrados ajustada de 174,96 y un valor F de 536,28. Además, la interacción entre ciclos de choque térmico, lisis mecánica y Proteinasa K fue significativa, lo que indica que la concentración de ADN no estuvo determinada solo por el efecto individual de cada factor, sino también por la combinación entre ellos.



**Figura 17**

Análisis de Varianza para Concentración de ADN.

### Análisis de Varianza

| Fuente                                       | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|----------------------------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo                                       | 7  | 5220,30   | 745,76    | 2285,84 | 0,000   |
| Lineal                                       | 3  | 3231,44   | 1077,15   | 3301,60 | 0,000   |
| Ciclos de choque                             | 1  | 174,96    | 174,96    | 536,28  | 0,000   |
| Lisis mecánica                               | 1  | 1173,20   | 1173,20   | 3596,02 | 0,000   |
| Proteinasa K                                 | 1  | 1883,28   | 1883,28   | 5772,51 | 0,000   |
| Interacciones de 2 términos                  | 3  | 348,75    | 116,25    | 356,32  | 0,000   |
| Ciclos de choque*Lisis mecánica              | 1  | 123,31    | 123,31    | 377,95  | 0,000   |
| Ciclos de choque*Proteinasa K                | 1  | 201,84    | 201,84    | 618,67  | 0,000   |
| Lisis mecánica*Proteinasa K                  | 1  | 23,60     | 23,60     | 72,34   | 0,000   |
| Interacciones de 3 términos                  | 1  | 1640,11   | 1640,11   | 5027,15 | 0,000   |
| Ciclos de choque*Lisis mecánica*Proteinasa K | 1  | 1640,11   | 1640,11   | 5027,15 | 0,000   |
| Error                                        | 16 | 5,22      | 0,33      |         |         |
| Total                                        | 23 | 5225,52   |           |         |         |

**Nota.** los valores  $P = 0,000$  para todos los términos del modelo, los cuales son menores a 0,05, indicando que tanto los efectos principales como las interacciones influyen significativamente sobre la variable respuesta.

#### 3.2.1.2. Análisis de varianzas para A260/280.

En la **Figura 17** se observa el modelo aplicado a la relación A260/280 indica que los factores evaluados influyeron de manera significativa en la pureza del ADN. De forma individual, los ciclos de choque térmico presentaron el mayor efecto sobre la respuesta, con un valor F de 375,56, seguido de la lisis mecánica, con un valor F de 115,20, y la Proteinasa K, con un valor F de 85,42. Las interacciones entre los factores también fueron significativas, la interacción ciclos de choque, lisis mecánica, con un valor F de 720,00, y la interacción triple ciclos de choque, lisis mecánica y Proteinasa K, con un valor F de 688,36. Esto indican que la pureza del ADN no depende únicamente de cada factor por separado, sino de la combinación entre ellos durante el proceso de extracción.

**Figura 18**

Análisis de Varianza para A260/280

**Análisis de Varianza**

| Fuente                                       | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|----------------------------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo                                       | 7  | 0,413183  | 0,059026  | 314,81  | 0,000   |
| Lineal                                       | 3  | 0,108033  | 0,036011  | 192,06  | 0,000   |
| Ciclos de choque                             | 1  | 0,070417  | 0,070417  | 375,56  | 0,000   |
| Lisis mecánica                               | 1  | 0,021600  | 0,021600  | 115,20  | 0,000   |
| Proteinasa K                                 | 1  | 0,016017  | 0,016017  | 85,42   | 0,000   |
| Interacciones de 2 términos                  | 3  | 0,176083  | 0,058694  | 313,04  | 0,000   |
| Ciclos de choque*Lisis mecánica              | 1  | 0,135000  | 0,135000  | 720,00  | 0,000   |
| Ciclos de choque*Proteinasa K                | 1  | 0,008817  | 0,008817  | 47,02   | 0,000   |
| Lisis mecánica*Proteinasa K                  | 1  | 0,032267  | 0,032267  | 172,09  | 0,000   |
| Interacciones de 3 términos                  | 1  | 0,129067  | 0,129067  | 688,36  | 0,000   |
| Ciclos de choque*Lisis mecánica*Proteinasa K | 1  | 0,129067  | 0,129067  | 688,36  | 0,000   |
| Error                                        | 16 | 0,003000  | 0,000188  |         |         |
| Total                                        | 23 | 0,416183  |           |         |         |

**Nota.** Análisis de varianza del modelo factorial para la relación de pureza A260/280 del ADN obtenido bajo diferentes condiciones de lisis.

**3.2.1.3. Análisis de Varianza para A260/230**

La **Figura 18** del modelo aplicado para la relación A260/230 presentó que las condiciones de extracción utilizadas sí modificaron la pureza del ADN. Al revisar los factores por separado, la lisis mecánica fue la que mostró mayor influencia, con un valor F de 140,36, seguida por los ciclos de choque térmico, con 111,20. La Proteinasa K también tuvo un efecto significativo, aunque menor, con un valor F de 14,25 y un valor p de 0,002. Sin embargo, los resultados más relevantes se observaron en las combinaciones entre factores, principalmente en la interacción entre ciclos de choque y lisis mecánica, que alcanzó un valor F de 2486,25. También fueron importantes las interacciones entre ciclos de choque y Proteinasa K, así como entre lisis mecánica y Proteinasa K. Además, la interacción de los tres factores fue significativa, lo que indica que la calidad del ADN, medida mediante la relación A260/230, estuvo condicionada

principalmente por la forma en que se combinaron los tratamientos y no solo por el efecto individual de cada uno.

### Figura 19

Análisis de Varianza para A260/230

#### Análisis de Varianza

| Fuente                                       | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|----------------------------------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Modelo                                       | 7  | 1,89093   | 0,270133  | 1098,85 | 0,000   |
| Lineal                                       | 3  | 0,06535   | 0,021782  | 88,60   | 0,000   |
| Ciclos de choque                             | 1  | 0,02734   | 0,027337  | 111,20  | 0,000   |
| Lisis mecánica                               | 1  | 0,03450   | 0,034504  | 140,36  | 0,000   |
| Proteinasa K                                 | 1  | 0,00350   | 0,003504  | 14,25   | 0,002   |
| Interacciones de 2 términos                  | 3  | 1,50125   | 0,500415  | 2035,59 | 0,000   |
| Ciclos de choque*Lisis mecánica              | 1  | 0,61120   | 0,611204  | 2486,25 | 0,000   |
| Ciclos de choque*Proteinasa K                | 1  | 0,50750   | 0,507504  | 2064,42 | 0,000   |
| Lisis mecánica*Proteinasa K                  | 1  | 0,38254   | 0,382537  | 1556,08 | 0,000   |
| Interacciones de 3 términos                  | 1  | 0,32434   | 0,324337  | 1319,34 | 0,000   |
| Ciclos de choque*Lisis mecánica*Proteinasa K | 1  | 0,32434   | 0,324337  | 1319,34 | 0,000   |
| Error                                        | 16 | 0,00393   | 0,000246  |         |         |
| Total                                        | 23 | 1,89486   |           |         |         |

**Nota.** Análisis de varianza del modelo factorial para la relación de pureza A260/230 del ADN obtenido bajo diferentes condiciones de lisis térmica, mecánica y enzimática.

#### 3.2.2. Evaluación de hipótesis

De acuerdo con los análisis de varianza realizados para la concentración de ADN y las relaciones de pureza A260/280 y A260/230, se evidenció que los modelos fueron estadísticamente significativos, con valores  $p < 0,05$ . Estos resultados indican que los tratamientos de extracción empleados difieren significativamente en al menos uno de los parámetros evaluados en comparación con el método de referencia GeneJET Genomic DNA.

#### 3.2.3. Pruebas post hoc para selección del mejor tratamiento.

Una vez comprobada la existencia de diferencias estadísticamente significativas mediante el análisis de varianza, se aplicó la prueba post hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95 %, con para identificar qué tratamientos presentaron diferencias reales entre sus medias y

establecer la combinación más adecuada de lisis térmica, mecánica y enzimática para la extracción de ADN.

Para la variable concentración de ADN, la prueba de Tukey (**Figura 19**) mostró que el tratamiento T6, compuesto por 15 ciclos de choque térmico, 2 ciclos de lisis mecánica y 30  $\mu$ L de proteinasa K, presentó la media más alta, con 54,43 ng/ $\mu$ L. Este resultado evidencia que una mayor intensidad de choque térmico junto con una mayor cantidad de proteinasa K favoreció la liberación de material genético, la ruptura eficiente de ooquistes de *Toxoplasma gondii* requiere tratamientos físicos o mecánicos debido a la elevada resistencia de su pared (**Slana et al., 2021**). Los procedimientos basados en disrupción mecánica por bead-beating mejoran la recuperación de ADN de protozoarios en matrices alimentarias complejas (**Cazeaux et al. 2022**). Sin embargo, el hecho de que T6 haya presentado la mayor concentración no implica necesariamente que sea el tratamiento óptimo, ya que el exceso de lisis puede favorecer la coextracción de proteínas, polisacáridos, polifenoles o residuos químicos que afectan la pureza del ADN.

#### Figura 20

Comparación de tratamientos de extracción mediante prueba de Tukey para la concentración de ADN.

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| Ciclos de choque*Lisis<br>mecánica*Proteinasa K N |   |         | Media Agrupación |
|---------------------------------------------------|---|---------|------------------|
| 15 2 30                                           | 3 | 54,4333 | A                |
| 10 3 30                                           | 3 | 42,0333 | B                |
| 10 2 20                                           | 3 | 39,5667 | C                |
| 10 2 30                                           | 3 | 32,9667 | D                |
| 15 3 30                                           | 3 | 21,3667 | E                |
| 15 2 20                                           | 3 | 16,3667 | F                |
| 15 3 20                                           | 3 | 12,4000 | G                |
| 10 3 20                                           | 3 | 11,6000 | G                |

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Nota.** El tratamiento 15 ciclos de choque térmico, 2 ciclos de lisis mecánica y 30  $\mu$ L de Proteinasa K presentó la media más alta.

En relación con la pureza A260/280 (**Figura 20**), el tratamiento T4, conformado por 15 ciclos de choque térmico, 3 ciclos de lisis mecánica y 20 µL de proteinasa K, obtuvo la media más alta, con un valor aproximado de 1,55. Aunque este fue el mejor resultado relativo para este parámetro, el valor aún se mantuvo por debajo del rango ideal cercano a 1,8, lo que sugiere la presencia residual de proteínas que absorben a 280 nm (**López et al., 2025**). Esto indican que la relación A260/280 es un indicador útil de contaminación proteica, pero debe interpretarse junto con otros parámetros de calidad, especialmente cuando se trabaja con matrices vegetales ricas en metabolitos secundarios. Por ello, aunque T4 mostró mejor pureza relativa frente a proteínas, su baja concentración de ADN limita su selección como tratamiento óptimo.

### Figura 21

Comparación de tratamientos de extracción mediante prueba de Tukey para A260/280.

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| Ciclos de choque*Lisis<br>mecánica*Proteinasa K N |   |         | Media Agrupación |
|---------------------------------------------------|---|---------|------------------|
| 15 3 20                                           | 3 | 1,54667 | A                |
| 10 2 20                                           | 3 | 1,49000 | B                |
| 15 3 30                                           | 3 | 1,46000 | B                |
| 15 2 30                                           | 3 | 1,32333 | C                |
| 10 3 30                                           | 3 | 1,31000 | C                |
| 15 2 20                                           | 3 | 1,26333 | D                |
| 10 2 30                                           | 3 | 1,18000 | E                |
| 10 3 20                                           | 3 | 1,18000 | E                |

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Nota.** El tratamiento 15 ciclos de choque térmico, 3 ciclos de lisis mecánica y 20 µL de Proteinasa K presentó la media más alta.

Respecto a la relación A260/230 (**Figura 21**), el tratamiento T1, constituido por 10 ciclos de choque térmico, 2 ciclos de lisis mecánica y 20 µL de proteinasa K, presentó el valor más alto, con una media de 1,20. Aunque este valor no alcanzó el rango ideal de 1,8 a 2,2, fue el más favorable entre los tratamientos evaluados. Este resultado es relevante porque la relación A260/230 permite estimar la presencia de contaminantes como polifenoles, sales caotrópicas y otros compuestos orgánicos residuales. En matrices vegetales, estos contaminantes son

especialmente problemáticos, ya que pueden interferir con la amplificación por PCR. (Ren et al., 2025). señalan que la evaluación de un método de extracción no debe basarse únicamente en el rendimiento, sino también en las relaciones de pureza y en la capacidad del ADN para ser amplificado mediante PCR.

## Figura 22

Comparación de tratamientos de extracción mediante prueba de Tukey para A260/230.

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| Ciclos de choque*Lisis<br>mecánica*Proteinasa K N | Media     | Agrupación |
|---------------------------------------------------|-----------|------------|
| 10 2 20                                           | 3 1,20000 | A          |
| 15 3 30                                           | 3 0,80000 | B          |
| 15 2 30                                           | 3 0,53667 | C          |
| 15 3 20                                           | 3 0,51333 | C D        |
| 10 3 30                                           | 3 0,49000 | D          |
| 10 2 30                                           | 3 0,40000 | E          |
| 10 3 20                                           | 3 0,32000 | F          |
| 15 2 20                                           | 3 0,29000 | F          |

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Nota.** El tratamiento 10 ciclos de choque térmico, 2 ciclos de lisis mecánica y 20 µL de Proteinasa K presentó la media más alta.

Al evaluar los tres criterios, concentración de ADN, A260/280 y A260/230, se determinó que el tratamiento T1 presentó el mejor equilibrio entre rendimiento y pureza. Aunque T6 obtuvo la mayor concentración y T4 el valor más alto de A260/280, ninguno de estos tratamientos cumplió de manera balanceada con los parámetros definidos. En cambio, T1 presentó una concentración de 39,57 ng/µL, dentro del rango aceptable establecido para el estudio, además de una relación A260/280 de 1,49 y el valor más alto de A260/230. Estos resultados indican que T1 permitió recuperar una cantidad suficiente de ADN con menor interferencia relativa de contaminantes propios de la matriz vegetal.

### 3.3.Resultados sobre la tasa de detección mediante amplificación de PCR y electroforesis

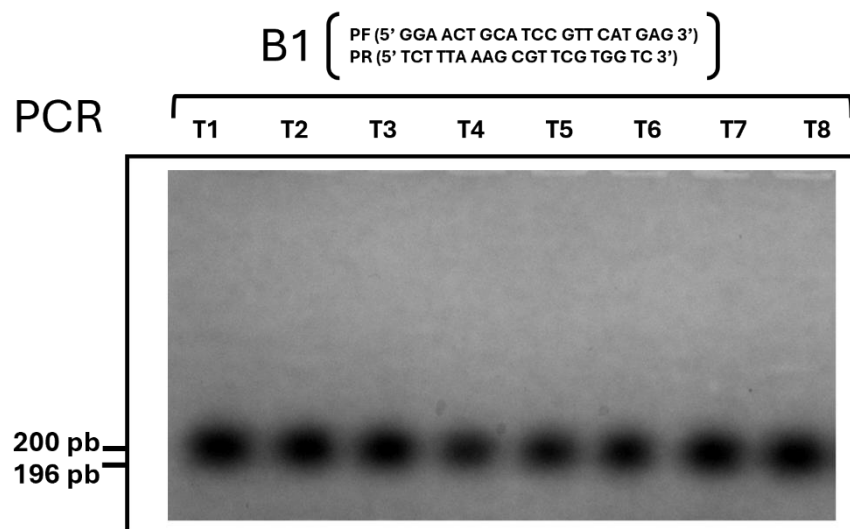
La amplificación por PCR permitió evaluar la utilidad molecular del ADN recuperado mediante los tratamientos de lisis optimizados y mediante el método comercial de referencia. Los

productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, considerando como resultado positivo la presencia de una banda compatible con el fragmento esperado de aproximadamente 196 pb correspondiente al blanco molecular evaluado para *Toxoplasma gondii*. Este criterio permitió complementar los resultados espectrofotométricos, ya que la cuantificación por Nanodrop indica concentración y pureza relativa del ADN, pero no confirma por sí sola que el material genético extraído sea amplificable por PCR.

En las muestras procesadas mediante los tratamientos de lisis térmica, mecánica y enzimática, se observó amplificación positiva en los ocho tratamientos evaluados, lo que representa una tasa de detección del 100 % (**Figura 22**). Este resultado indica que, a pesar de las diferencias observadas previamente en concentración y pureza, todos los tratamientos permitieron obtener ADN utilizable como molde para la reacción de PCR. La presencia de bandas en la electroforesis confirma que el protocolo combinado de choque térmico, bead-beating y digestión con proteinasa K favoreció la liberación de ADN de estructuras compatibles con ooquistes de *T. gondii*, cuya pared presenta alta resistencia física y química.

### Figura 23

Resultado de la amplificación por PCR de *Toxoplasma gondii* de las muestras procesada mediante los tratamientos.

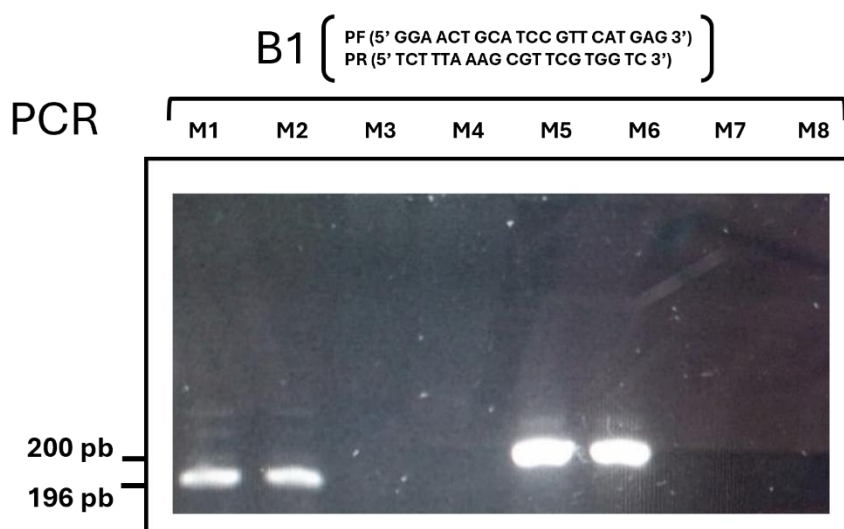


**Nota.** Productos de amplificación por PCR de un fragmento de 196 pb obtenidos a partir de ADN extraído mediante los diferentes tratamientos evaluados para la recuperación de *Toxoplasma gondii*, visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

En contraste, las muestras procesadas mediante el GeneJET Genomic DNA Purification Kit mostraron amplificación positiva únicamente en cuatro de las ocho muestras evaluadas, correspondientes a M1, M2, M5 y M6. Esto equivale a una tasa de detección del 50 % (**Figura 23**). Las muestras M3, M4, M7 y M8 no presentaron amplificación detectable, a pesar de que algunas de ellas mostraron concentraciones cuantificables de ADN. Este resultado muestra que la presencia de ADN medible no garantiza necesariamente la amplificación del blanco molecular, debido a que pueden existir inhibidores residuales, ADN degradado o baja proporción de ADN parasitario respecto al ADN total extraído.

#### Figura 24

Resultado de la amplificación por PCR de *Toxoplasma gondii* de las muestras procesada mediante el *GeneJET Genomic DNA Purification Kit*.



**Nota.** Productos de amplificación por PCR de un fragmento de 196 pb obtenidos a partir de ADN extraído mediante el GeneJET Genomic DNA Purification Kit evaluados para la recuperación de *Toxoplasma gondii*, visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

La menor tasa de detección observada con el kit comercial puede explicarse por la complejidad de la matriz vegetal y la alta resistencia de los ooquistes de *T. gondii*, factores que limitan la liberación y recuperación de ADN amplificable. Además, la presencia de compuestos inhibidores propios de los vegetales puede afectar la eficiencia de la PCR y reducir la sensibilidad del método. Diversos autores han señalado que la detección molecular de *T. gondii* en alimentos aún presenta desafíos asociados a la falta de protocolos estandarizados y a la variabilidad de las matrices analizadas (**Marín-García et al., 2022**). Asimismo, se ha demostrado que la aplicación de procedimientos validados y armonizados mejora la capacidad



de detección en vegetales frescos y listos para el consumo, especialmente cuando la carga parasitaria es baja (**Calero-Bernal et al., 2025**).

La comparación entre ambos métodos mostró un mejor desempeño molecular del protocolo optimizado. Mientras que el kit GeneJET obtuvo una tasa de detección del 50 % (4/8 muestras), los tratamientos optimizados alcanzaron el 100 % de amplificación positiva (8/8 muestras). Estos resultados indican que la combinación de lisis térmica, mecánica y enzimática favoreció una liberación más eficiente del ADN parasitario, mejorando la sensibilidad de detección de *T. gondii* en matrices vegetales.

### **3.3.1. Análisis sobre la tasa de detección de PCR.**

La eficiencia de los métodos de extracción se evaluó mediante la tasa de detección por PCR, calculada como la proporción de muestras con amplificación positiva respecto al total procesado por cada técnica. El protocolo optimizado alcanzó una detección del 100 % (8/8), mientras que el kit comercial GeneJET® presentó una tasa del 50 % (4/8). Esta diferencia indica una mayor eficiencia del protocolo optimizado para recuperar ADN amplificable de *Toxoplasma gondii* en muestras de col verde (*Brassica oleracea* var. capitata).

El menor rendimiento del kit comercial puede explicarse por la presencia de inhibidores endógenos en tejidos vegetales. Las hortalizas contienen polisacáridos, polifenoles y pigmentos que interfieren con la PCR mediante quelación del  $Mg^{2+}$ , unión a la ADN polimerasa o interacción directa con el ADN molde (**Chen et al., 2021**). Por lo tanto, una concentración detectable por espectrofotometría no garantiza que el ADN sea amplificable, ya que no refleja la presencia de inhibidores funcionales.

Se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol durante la lisis para reducir la oxidación de compuestos fenólicos y limitar su interacción con los ácidos nucleicos, una estrategia recomendada para tejidos vegetales recalcitrantes (**Angulo Graterol et al., 2023**). Segundo, se incluyó albúmina sérica bovina (BSA) en la mezcla de PCR. La BSA neutraliza inhibidores fenólicos y polisacáridos, estabilizando la ADN polimerasa y mejorando la amplificación (**Sidstedt et al., 2020**). La acción combinada de ambos reactivos redujo la carga inhibitoria residual, lo que explica la mayor tasa de detección. En contraste, el bajo desempeño del kit GeneJET sugiere que no elimina ni neutraliza eficazmente los inhibidores propios de la matriz vegetal.

Por lo tanto, las condiciones de lisis del tratamiento T1 (protocolo optimizado) resultaron adecuadas para recuperar ADN amplificable de *T. gondii* en col verde (*Brassica oleracea* var. *capitata*).

## CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

Se detectaron estructuras morfológicamente compatibles con ooquistes de *Toxoplasma gondii* en muestras de col verde (*Brassica oleracea* var. *capitata*) procedentes del Mercado Central de Ambato. La tinción con Lugol permitió identificar 8 muestras positivas de un total de 21 analizadas, mientras que la tinción con safranina corroboró la presencia de estructuras compatibles en 6 muestras. Estos resultados evidencian una posible contaminación parasitaria en la matriz vegetal evaluada y respaldan la necesidad de complementar la observación microscópica con métodos moleculares para aumentar la confiabilidad diagnóstica.

La evaluación de los parámetros de lisis térmica, mecánica y enzimática demostró que la recuperación de ADN en matrices vegetales depende de una combinación equilibrada entre rendimiento y pureza. Aunque algunos tratamientos presentaron concentraciones superiores de ADN, el tratamiento T1 mostró el mejor desempeño integral, al alcanzar valores más próximos a los criterios de calidad espectrofotométrica y permitir amplificación positiva por PCR. Por tanto, la combinación de 10 ciclos de choque térmico, 2 ciclos de lisis mecánica y 20  $\mu$ L de proteinasa K se consideró la condición más adecuada para obtener ADN amplificable de *T. gondii* en col verde (*Brassica oleracea* var. *Capitata*).

La comparación entre el protocolo optimizado y el método comercial de referencia evidenció un mejor desempeño molecular del protocolo propuesto. El método optimizado alcanzó una tasa de detección por PCR del 100 % (8/8), mientras que el kit GeneJET® presentó una detección del 50 % (4/8). Esta diferencia indica que la incorporación de lisis combinada,  $\beta$ -mercaptoetanol durante la extracción y BSA en la reacción de PCR favoreció la recuperación de ADN funcional y redujo el efecto de inhibidores propios de la matriz vegetal. En consecuencia, el protocolo optimizado constituye una alternativa técnica más eficiente para la detección molecular de *T. gondii* en coles verdes.

### 4.2. Recomendaciones

- Se sugiere implementar técnicas de inmunoprecipitación o separación inmunomagnética para mejorar la recuperación selectiva de ooquistes de *Toxoplasma gondii* antes de la extracción de ADN.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeria, S., & Dubey, J. P. (2021). Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 135, pp. 371–385). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.019>
- Anécimo, R. S., Tonani, K. A., Fregonesi, B. M., Mariano, A. P., Ferrassino, M. D., Trevilato, T. M., Rodrigues, R. B., & Segura-Muñoz, S. I. (2012). Adaptation of Ritchie's Method for Parasites Diagnosing with Minimization of Chemical Products. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012, 409757. <https://doi.org/10.1155/2012/409757>
- Angulo Graterol, L., et al. (2023). Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN en tejido foliar de cacao. *Revista Científica Ecociencia*, 10(4), 68-87. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.104.835>
- Antunes, A. V., Shahinas, M., Swale, C., Farhat, D. C., Ramakrishnan, C., Bruley, C., Cannella, D., Robert, M. G., Corrao, C., Couté, Y., Hehl, A. B., Bougdour, A., Coppens, I., & Hakimi, M.-A. (2024). In vitro production of cat-restricted *Toxoplasma* pre-sexual stages. *Nature*, 625, 366–376. doi: 10.1038/s41586-023-06821-y
- Barton, A. R., Gilbert, I. H., & Huston, C. D. (2023). Waterborne and foodborne transmission of *Toxoplasma gondii*: A systematic review and meta-analysis. *Trends in Parasitology*, 39(8), 645–657. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.05.007>
- Boothroyd, J. C., Burg, J. L., Nagel, S. D., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L., Prince, J. B., Sharma, S. D., & Remington, J. S. (1987). Antigen and tubulin genes of *Toxoplasma gondii*. En N. Agabian, H. Goodman, & N. Nogueira (Eds.), *Molecular Strategies of Parasitic Invasion* (pp. 237–250). Alan R. Liss.
- Boughattas, S., Ayari, A., & Bouratbine, A. (2021). Optimization of DNA extraction from *Toxoplasma gondii* oocysts for qPCR detection: A multivariate approach. *Experimental Parasitology*, 220, 108035. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108035>
- Calero-Bernal, R., Betson, M., Chaudhry, U., Slana, I., Bartosova, B., Marucci, G., Possenti, A., Álvarez-García, G., & colaboradores. (2025). *Molecular detection of Toxoplasma gondii in ready-to-eat salad mixes: Multi-country survey using a validated and*

- harmonised standard operating procedure, Europe, 2021 to 2022. Eurosurveillance, 30(22), 2400594. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2025.30.22.2400594>*
- Cazeaux, C., Lalle, M., Durand, L., Aubert, D., Favennec, L., Dubey, J. P., Geffard, A., Villena, I., & La Carbona, S. (2022). Evaluation of real-time qPCR-based methods to detect the DNA of the three protozoan parasites *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* in the tissue and hemolymph of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Food Microbiology, 102*, 103870. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103870>
- Chen, Y., et al. (2021). An improved method for purifying genomic DNA from forest leaf litters and soil suitable for PCR. *Journal of Soils and Sediments, 21(3)*, 1234-1245.
- Dubey, J. P., Hotea, I., Olariu, T. R., Jones, J. L., & Dărăbuș, G. (2020). Epidemiological review of toxoplasmosis in humans and animals in Romania. In *Parasitology (Vol. 141, Issue 3, pp. 311–325)*. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001509>
- Dumètre, A., Dubey, J. P., Ferguson, D. J. P., Bongrand, P., Azas, N., & Puech, P. H. (2021). Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(28)*, 11535–11540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308425110>
- FAO/WHO. (2022). Prevention and control of microbiological hazards in fresh fruits and vegetables – Part 4: Specific commodities. In *Prevention and control of microbiological hazards in fresh fruits and vegetables – Part 4: Specific commodities*. FAO; WHO; <https://doi.org/10.4060/cc7460en>
- Faucher, B., Miermont, F., Ranque, S., Franck, J., & Piarroux, R. (2012). Optimization of *Toxoplasma gondii* DNA extraction from amniotic fluid using NucliSENS easyMAG and comparison with QIAamp DNA minikit. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 31(6)*, 1035–1039. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1402-z>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2026). FAOSTAT: Crops and livestock products – Cabbages production in Ecuador. <https://www.fao.org/faostat/>
- Homan, W. L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., & Verschueren, H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use

- for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, 30(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00170-8)
- 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, e18749445281387. doi: 10.2174/0118749445281387240202094637
- Khehra, N., Padda, I. S., & Zubair, M. (2025). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kim, M., Lee, S. E., & Goo, Y. K. (2024). Trend in serological and molecular diagnostic methods for *Toxoplasma gondii* infection. *Parasites, Hosts and Diseases*, 62(4), 303–317. <https://doi.org/10.3347/PHD.24075>
- López Ureña, N. M., Chaudhry, U., Calero-Bernal, R., Cano Alsua, S., Messina, D., Evangelista, F., Betson, M., Lalle, M., Jokelainen, P., Ortega-Mora, L. M., & Álvarez-García, G. (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>
- López, L. M. S., Gonzales, H. L., Garcia, W. E. V., De Jesus Velez Chicoma, R. L., & Greta, M. C. (2025). Rapid and efficient DNA extraction protocol from Peruvian native cotton (*Gossypium barbadense* L.) Lambayeque, Peru. *Methods and Protocols*, 8(3), 50. <https://doi.org/10.3390/mps8030050>
- Marqués, C. S., Sousa, S., Castro, A., & da Costa, J. M. C. (2021). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in fresh vegetables and berry fruits. *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04040-2>
- Mohammed, A., Ahmed, M., & Ibrahim, N. (2024). The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in workers occupationally exposed to animals (1972-2023): a systematic review and meta-analysis. *The veterinary quarterly*, 44(1), 1–18. <https://doi.org/10.1080/01652176.2024.2396577>

- Mulec, J., Križaj, I., & Gunde-Cimerman, N. (2020). Optimization of DNA extraction from environmental samples: A systematic approach. *Journal of Microbiological Methods*, 173, 105934. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105934>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Nagel, M., Schmidt, J., & Ulber, R. (2021). PCR inhibitors in plant-based food matrices: A comprehensive review. *Food Chemistry*, 350, 129249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129249>
- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(9), 2009–2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
- Rattan, D., Datta, P., Sharma, D., Bhusal, C. K., & Sehgal, R. (2025). *First report of molecular detection and phylogenetic analysis of Toxoplasma gondii in soil, water and vegetables from Chandigarh city, India. Scientific Reports*, 15, 10537. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90469-3>
- Ren, Y., Ma, Y., Li, Y., Song, Y., Zhao, W., Huang, X., Yu, D., Li, J., Xu, Z., & Zhao, W. (2025). Comparative evaluation of various DNA extraction methods and analysis of DNA degradation levels in commercially marketed chestnut rose juices and beverages. *BMC Biotechnology*, 25, 9. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00933-7>
- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN molecular biology*, 2012, 205049. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- Sena, F., Cancela, S., Bollati, M., & Francia, M. E. (2023). Exploring *Toxoplasma gondii*'s biology within the intestinal epithelium: Intestinal-derived models to unravel sexual differentiation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1134471. doi: 10.3389/fcimb.2023.1134471
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L. A., VanWormer, E., & Villena, I. (2021). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water,

- soil and food. In Food and Waterborne Parasitology (Vol. 15). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>
- Slana, I., Bier, N., Bartosova, B., Marucci, G., Possenti, A., Mayer-Scholl, A., Jokelainen, P., & Lalle, M. (2021). Molecular methods for the detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in fresh produce: An extensive review. *Microorganisms*, 9(1), 167. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010167>
- Stojan, I., Dragosavac, D., Žuljević, A., Šantić, D., Fredotović, Ž., & Šolić, M. (2023). Evaluation of DNA extraction methods and direct PCR in metabarcoding of mock and marine bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1151907. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151907>
- Villaplana, L., Barrera, V., & Fernández, S. (2020). PCR inhibitors in plant-derived food: Identification and strategies for removal. *Food Control*, 112, 107152. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107152>
- Warschkau, D., & Seeber, F. (2023). Advances towards the complete in vitro life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Faculty Reviews*, 12, 1. doi: 10.12703/r/12-1



## ANEXOS

### Anexo 1

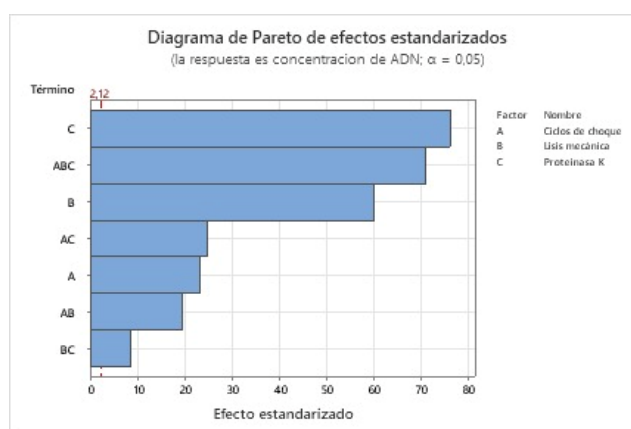
Conteo por gota calibrada de estructuras morfológicamente similares a ooquistes

| Muestra | Conteo<br>1 | Conteo<br>2 | Conteo<br>3 | Conteo<br>4 | Conteo<br>5 | Promedio<br>en 10 $\mu$ L | Concentración<br>estimada<br>(estructuras/mL) |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|-----------------------------------------------|
| P1M1    | 4           | 4           | 3           | 4           | 3           | 3,6                       | 360                                           |
| P1M2    | 2           | 2           | 3           | 2           | 2           | 2,2                       | 220                                           |
| P1M3    | 1           | 2           | 1           | 1           | 2           | 1,4                       | 140                                           |
| P2M1    | 2           | 2           | 2           | 3           | 2           | 2,2                       | 220                                           |
| P5M1    | 5           | 5           | 6           | 5           | 4           | 5,0                       | 500                                           |
| P6M2    | 5           | 4           | 5           | 5           | 6           | 5,0                       | 500                                           |
| P6M3    | 6           | 6           | 7           | 5           | 6           | 6,0                       | 600                                           |
| P7M3    | 3           | 3           | 4           | 3           | 3           | 3,2                       | 320                                           |

**Nota.** La concentración se calculó multiplicando el promedio de estructuras observadas en 10  $\mu$ L por 100 para expresar el resultado en estructuras/mL.

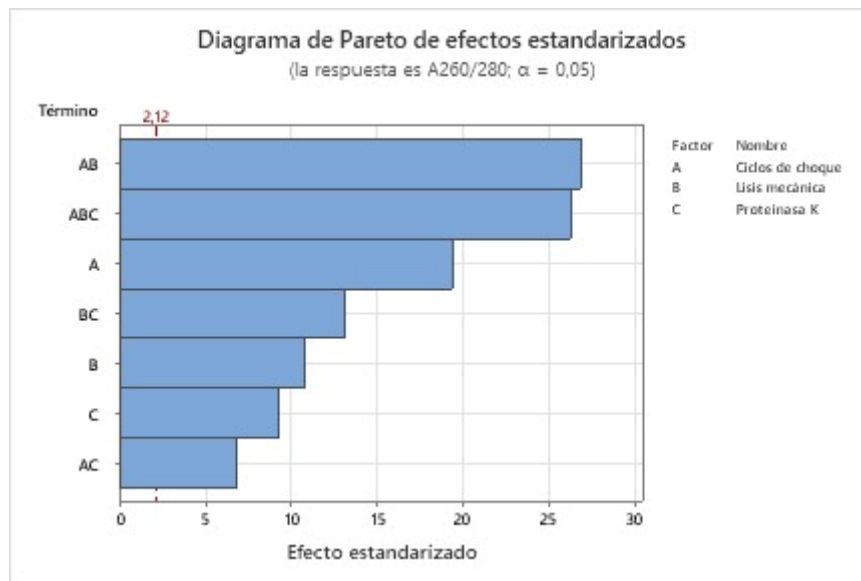
### Anexo 2

Diagrama de Pareto efectos de la variable de concentración de ADN



### Anexo 3

Diagrama de Pareto efectos de la variable A260/280



### Anexo 4

Diagrama de Pareto efectos de la variable A260/230

