

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de la eficiencia de un ensayo LAMP para la identificación de material genético de
Toxoplasma gondii en leche bovina

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

Autores:

Juan Francisco Aguilar Criollo
C.I: 0105737878
jxnfrxn@gmail.com

Pablo Ricardo Belesaca Suqui
C.I: 0105420830
ricardobelesak@gmail.com

Director:

MVZ. Teófilo Estuardo Palacios Ordóñez, *Mg. Sc.*
C.I: 0101330579

RESUMEN

El *Toxoplasma gondii* es un parásito protozoario zoonótico, considerado de gran importancia ya que es contemplado como un problema de salud pública y que afecta a población vulnerable por eso es necesario la implementación de un método diagnóstico que sea seguro y confiable.

En la actualidad el ensayo LAMP ha demostrado ser una prueba diagnóstica rentable para distintos microorganismos de carácter infeccioso. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de la técnica molecular LAMP para la identificación de material genético de *Toxoplasma gondii* en leche de vacas cuyo destino productivo sea la elaboración de queso o queso de forma artesanal. Se obtuvo 100 muestras de leche provenientes de 100 vacas, posteriormente se elaboró alícuotas de cada muestra para su almacenamiento a -80 °C y extracción del ADN purificados siguiendo el método de Ghaheri para la purificación del mismo.

En el ADN purificado se realizó un control de proceso para asegurar que las muestras obtenidas sean correctas esto mediante un ensayo LAMP el cual se realiza utilizando un set de primers para la amplificación de ADN de *B. Taurus*, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y posteriormente se fotodocumentó el resultado.

Luego se realizó un ensayo LAMP para verificar la presencia o no de material genético de *Toxoplasma gondii* siguiendo exactamente los mismos pasos que se utilizó en el ensayo LAMP para el control de proceso con la diferencia que se utilizó un set de primers específicos para amplificación de material genético de *T. gondii*.

El resultado del control de proceso fue favorable, el 100% de las muestras obtenidas fueron positivas lo que confirma que las muestras se extrajeron, transportaron y almacenaron correctamente. Por otro lado el ensayo LAMP para amplificación de material genético de *T. gondii* fue negativo en todas las muestras.

Este estudio concluye que el ensayo LAMP para amplificar material genético de *Toxoplasma gondii* no tuvo resultados positivos esto puede deberse a varios factores como: las condiciones climáticas del lugar, presencia de vectores, la sobrevivencia del parásito en el organismo de las vacas, Etc. Por lo tanto no se puede descartar definitivamente este método para el diagnóstico de *T. gondii*.

Palabras claves: *Toxoplasma gondii*. LAMP. Zoonosis. Salud pública. Leche.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a zoonotic protozoan parasite, considered of great importance since it is considered a public health problem and it affects a vulnerable population due to the need to implement a safe and reliable diagnostic method.

Currently, the LAMP assay has proven to be a cost-effective diagnostic test for infectious microorganisms. The objective of this study was to evaluate the efficiency of the LAMP molecular technique for the identification of genetic material of *Toxoplasma gondii* in milk from cows whose productive destination is the production of quesillo or cheese in an artisanal way. 100 milk samples from 100 cows were obtained, subsequently aliquots of each sample were made for storage at -80 °C and purified DNA extraction following the Ghaheri method for purification.

The purified DNA was made a process control to ensure that the samples obtained are correct, this by means of a LAMP assay which is carried out using a primer kit for the amplification of *Bos Taurus* DNA, where an agar gel was subsequently made to amplify it with electrophoresis and culminating with the photodocumentator to observe the results.

Then, a LAMP assay was performed to verify the presence or not of *Toxoplasma gondii* genetic material following exactly the same steps that were used in the LAMP assay for process control with the difference that a different primer kit was used so that the DNA of *T. gondii* can be amplified.

The result of the process control was favorable, 100% of the samples obtained were positive, which confirms that the samples were extracted, transported and stored correctly. On the other hand, the LAMP assay for amplification of genetic material of *T. gondii* was negative in all samples.

This study concluding that the LAMP assay to amplify genetic material of *Toxoplasma gondii* did not have positive results, this may be due to several factors such as: the climatic conditions of the place, the presence of vectors, and the survival of the parasite in the organism of the cows. Etc. Therefore, this method cannot be definitively ruled out for the diagnosis of *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. LAMP. Zoonotic. Public health. Milk.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	12
1.1. Justificación	12
1.2. Objetivos	13
1.2.1. Objetivo general	13
1.2.2. Objetivos específicos	13
1.3. Pregunta de investigación	13
1.4. Hipótesis	13
CAPÍTULO 2: REVISIÓN LITERARIA	14
2.1. Generalidades	14
2.2. Taxonomía y morfología	14
2.3. Ciclo biológico	15
2.4. Toxoplasma en alimentos	15
2.5. Toxoplasma en la leche	16
2.6. Métodos de diagnóstico	16
2.7. Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)	16
2.8. Prevención y control	17
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Área de estudio y unidades de análisis	20
3.2. Recolección de muestras y transporte	20
3.2.1. Materiales de campo	20
3.2.2. Procedimiento para la colecta de las muestras de leche:	21

3.3. Procesamiento de las muestras y purificación del ADN total	21
3.3.1. Materiales de laboratorio	21
3.3.2. Procedimiento:	22
3.4. Validación de las muestras de ADN total obtenido de la leche colectada (Ensayo LAMP del control de proceso)	23
3.4.1. Materiales	23
3.4.2. Procedimiento de la amplificación de ADN del bovino (<i>Bos taurus</i>) mediante el ensayo de LAMP	24
3.5. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP (Control de proceso) mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.	26
3.5.1. Materiales	26
3.5.2. Procedimiento de la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio	27
3.6. Identificación de material genético de <i>Toxoplasma gondii</i> en el ADN total obtenido de las muestras de leche bovina mediante un ensayo LAMP.	28
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	29
4.1. Recolección de muestras	29
4.2. Control De Proceso	29
4.3. Ensayo LAMP para amplificación de material genético de <i>Toxoplasma gondii</i> 30	
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	32
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	34
CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES	34

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 9: ANEXOS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de la parroquia Jima.....	20
Figura 2: Recolección de muestras de leche.....	29
Figura 3: Electroforesis de un ensayo LAMP para control de proceso; carriles MPM, marcador de peso molecular; carriles del 1 al 30 amplificación positivas de ADN de las muestras de leche.....	30
Figura 4: Electroforesis de un ensayo LAMP para detención de material genético de <i>T. gondii</i> ; carriles MPM, marcador de peso molecular; Carril (-), control negativo; Carril (+), control Positivo; Carriles del 1 al 28 amplificación negativos de ADN de <i>T. gondii</i>	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cantidad de reactivos para realizar la premezcla.....	25
Tabla 2: Desnaturalización y la hibridación de los oligonucleótidos.....	25
Tabla 3: Extensión e inactivación de los oligonucleótidos.....	26
Tabla 4: Extensión e inactivación en el baño María/termociclador.....	26

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Juan Francisco Aguilar Criollo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la eficiencia de un ensayo LAMP para la identificación de material genético de *Toxoplasma gondii* en leche bovina", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 1 de Agosto del 2022



Juan Francisco Aguilar Criollo

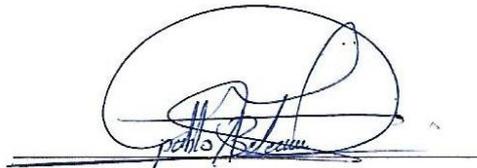
C.I: 0105737878

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Pablo Ricardo Belesaca Suquí en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la eficiencia de un ensayo LAMP para la identificación de material genético de *Toxoplasma gondii* en leche bovina", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 1 de Agosto del 2022

A handwritten signature in blue ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature is written over a horizontal line.

Pablo Ricardo Belesaca Suquí

C.I: 0105420830

Cláusula de Propiedad Intelectual

Juan Francisco Aguilar Criollo, autor del trabajo de titulación “Evaluación de la eficiencia de un ensayo LAMP para la identificación de material genético de *Toxoplasma gondii* en leche bovina”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 1 de Agosto de 2022



Juan Francisco Aguilar Criollo

C.I: 0105737878

Cláusula de Propiedad Intelectual

Pablo Ricardo Belesaca Suqui, autor del trabajo de titulación “Evaluación de la eficiencia de un ensayo LAMP para la identificación de material genético de *Toxoplasma gondii* en leche bovina”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 1 de Agosto de 2022



Pablo Ricardo Belesaca Suqui

C.I: 0105420830

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis padres Ángel y Clara ya que ellos son el pilar fundamental que me dieron todo su apoyo, su tiempo, su amor y darme todos los animamos necesarios el cual me ayudo a forjarme como un hombre de bien y a obtener este logro importante en mi vida.

A mi hermano Luis que es un ejemplo y que cada día me anima a superarme más.

A la memoria de mi abuela María Luisa y mi abuelo Luis Antonio quienes fueron parte fundamental de mi vida.

JUAN FRANCISCO AGUILAR CRIOLLO

Quiero dedicar este tema de investigación a mis amados padres Víctor y Auxiliadora, quienes fueron un pilar fundamental para terminar con mis estudios los cuales hasta hoy lo siguen siendo, a mis dos hijos Pablo Ismael y Cisne Cristina quienes han sido mi motivo y fortaleza para salir en adelante.

A mis dos hermanos Fabián y Santiago por todo su buen ejemplo, por su apoyo incondicional que hasta el momento me siguen dando, a la madre de mis hijos Tania y a su familia Julia y Fredi por estar al pendiente de mis hijos para que nada les falte y a toda mi familia quienes que con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona.

PABLO RICARDO BELESACA SUQUI

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a nuestro tutor de tesis al Dr. Estuardo Palacios que nos brido sus conocimientos y paciencia para realizar esta tesis.

Agradecer al Dr. Antonio Vallecillo que de igual manera nos brindó sus instrucciones y su laboratorio que permitió el desarrollo de esta tesis.

A mis padres que me dieron todo lo necesario para seguir adelante en la Universidad.

A mis amigos que siempre me apoyaron y compartimos grandes momentos.

A mi compañero y amigo de tesis Pablo que gracias a él y su trabajo conjunto pudimos sacar adelante este estudio.

JUAN FRANCISCO AGUILAR CRIOLLO

Quiero Agradecer a Dios a la Vida por haberme permitido llegar hasta aquí para alcanzar el tan anhelado sueño de obtener el título de Médico Veterinaria Zootecnista.

Así mismo quiero expresar mis sentidos de agradecimiento y gratitud a esta noble institución como es la Universidad de Cuenca y hasta noble carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a todos los docentes de esta carrera, de manera especial a nuestro tutor el Doctor Estuardo Palacios Ordoñez quien nos dio lo oportunidad de trabajar con él a lo largo de este proceso de investigación, al Doctor Antonio Vallecillo Maza quien fue nuestro principal colaborador los cuales nos tuvieron paciencia y nos impartieron sus conocimientos y experiencia.

A mis padres Víctor y Auxiliadora, hermanos Fabián y Santiago, mi esposa Tania quienes me han apoyado en las buenas y en las malas a pesar de todo siempre estuvieron ahí con la esperanza de que salga en adelante para que sea una persona de bien.

PABLO RICARDO BELESACA SUQUI

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una de las enfermedades zoonóticas que mantiene una amplia distribución mundial, causada por el *T. gondii* que infecta prácticamente a todos los animales de sangre caliente, incluidos los humanos, el ganado y los mamíferos marinos (1). La toxoplasmosis es la infección parasitaria asociada con el trabajo, más común entre trabajadores de laboratorios. Las infecciones se pueden adquirir por inoculación accidental, salpicaduras, inhalación o ingestión. La fuente de la infección puede ser la sangre o productos de la sangre, semen, heces o tejidos (2).

El *T. gondii* se encontró en la leche de muchos otros hospederos; sin embargo, el interés en la transmisión de *T. gondii* a través de la leche disminuyó cuando se descubrió el ciclo de vida completo en 1970 (3) y la pasteurización de la leche se hizo obligatoria para la leche comercial ya que mata al *T. gondii*. Recientemente, ha habido un auge en la agricultura orgánica y el consumo de leche cruda o productos lácteos elaborados con leche sin pasteurizar. Existe una gran preocupación sobre si es seguro consumir leche cruda (4)

1.1. Justificación

Para el diagnóstico de *T. gondii* en la leche que se consume es esencial aplicar métodos que confieran resultados que aseguren la presencia o ausencia del parásito. En la actualidad existe dos métodos que poseen alta confiabilidad en el diagnóstico de distintas enfermedades basados en la amplificación de ADN las cuales son la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) (5).

A diferencia de la PCR, LAMP necesita de 4 a 6 primers muy específicos, que provee resultados con especificidad y sensibilidad mayor que la PCR. En un estudio que compara los ensayos LAMP y PCR, se ha demostrado la mejor efectividad de LAMP para el diagnóstico de ciertas enfermedades de carácter infeccioso (6).

En la actualidad no existe un ensayo molecular que permita detectar la presencia de *T. gondii* mediante un rápido diagnóstico en la leche de vacas ya que las técnicas de Biología Molecular han sido adaptadas a la identificación de *T. gondii* en diversas muestras biológicas de animales y humanos como sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo y líquido amniótico (7). Nuestro proyecto consistió en demostrar mediante la técnica de LAMP la presencia o no de material genético de *T.*

gondii en la leche cruda que se utiliza para la elaboración artesanal de queso, quesillo o cuajada fresca.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de un ensayo LAMP para la detección de material genético de *Toxoplasma gondii* en muestras de leche bovina destinada para la elaboración de queso artesanal validadas mediante la aplicación de un control de proceso.

1.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la calidad de ADN total extraído de muestras de leche de bovinos de la parroquia Jima.
- Identificar la presencia de material genético de *Toxoplasma gondii* en muestras de ADN total de leche bovina validadas mediante un control de proceso para posteriormente estimar la frecuencia de positivos de dicho material genético.

1.3. Pregunta de investigación

¿Es posible identificar la presencia de material genético de *Toxoplasma gondii* en muestras de leche de bovinos de la parroquia de Jima mediante la aplicación de un ensayo LAMP?

1.4. Hipótesis

La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) permite un correcto diagnóstico e identificación de material genético de *Toxoplasma gondii* en leche cruda de vacas cuya producción es destinada únicamente a la elaboración de queso de forma artesanal

CAPÍTULO 2: REVISIÓN LITERARIA

2.1. Generalidades

El *Toxoplasma gondii* es un parásito protozooario intracelular obligado que infecta prácticamente a todos los animales de sangre caliente, incluidos los humanos. La transmisión de *T. gondii* puede ser llevada a cabo en humanos a través de la ingesta de taquizoitos, lo que se considera un evento poco probable, así mismo se discute la presencia en la leche bovina cuando ésta no es sometida a procesos de pasteurización según las distintas normas que rigen en cada uno de los países.

Existen indicios de que los taquizoítos podría estar presente en la leche de animales infectados y por otro lado, se ha demostrado que los taquizoitos son sensibles al pH bajo y pueden no sobrevivir al fluido gástrico humano fisiológico que exhibe un pH de aproximadamente 1 a 3. Sin embargo el pH del fluido gástrico cambiará hacia valores más o menos neutros debido a la ingesta de alimentos líquidos y sólidos dependiendo de la composición y tipo de los alimentos (8).

El *T. gondii* fue aislado por primera vez en 1908 por Alfonso Splendore en Brasil, en hígados de conejos de experimentación, y simultáneamente los franceses Charles Nicolle y Louis Manceaux, quienes estudiaban la participación del *Ctenodactylus gondii*, un roedor del norte de África, en la transmisión de la leishmaniasis. Estos últimos visualizaron parásitos libres, así como células mononucleares infectadas por un microorganismo que denominaron *Leishmania gondii*, el cual no crecía en los medios de cultivo descritos para *Leishmania spp.* Posteriormente, Nicolle sugirió el nombre de *Toxoplasma* (del griego *Toxo*, que significa arco) para identificar un nuevo género de parásito (9).

2.2. Taxonomía y morfología

La clasificación del *T. gondii* ha sido modificada en numerosas ocasiones; en la actualidad prevalece el criterio seguido por Levine en 1973 y aceptada por Frenkel en 1977, considerando que el *Toxoplasma gondii* forma parte del Reino Protozoa, Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoea, Sub-clase Coccidia, Orden Eucoccidia, sub-orden Eimeria, familia Sarcosistidae, género *Toxoplasma* (10).

Es un parásito intracelular obligatorio, móvil, sin hospedero específico (eurixeno), el parásito tiene forma arqueada, semilunar y carece de flagelos, pese a lo cual tiene autonomía de movimientos de rotación helicoidales, en los que participa toda la célula gracias a las fibrillas dispuestas sobre su superficie, su tamaño varía según el órgano de donde procedan entre 2-12 x 1.5-4 micras (11).

2.3. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *T. gondii* consiste en dos fases: asexual y sexual, la fase asexual (extra entérica) se lleva a cabo en los hospederos intermediarios (mamíferos, aves y humanos), donde el crecimiento y división del toxoplasma es rápida; en esta etapa recibe el nombre de taquizoítos (*in vitro* es de 6-8 h), éstos pueden infectar y multiplicarse en casi cualquier célula nucleada aviar o de mamíferos. Los taquizoítos se multiplican dentro de la célula hasta romper la membrana plasmática y son liberados al torrente sanguíneo, propagándose por todo el cuerpo comenzando con la enfermedad aguda (parasitemia); es en esta fase que se produce la transmisión vertical por paso transplacentario (12).

En la fase sexual (entérica) cuando un felino ingiere ooquistes (por fecalismo felino) o quistes tisulares contenidos en carnes infectadas, el protozoo penetra las células del epitelio intestinal donde se multiplica asexualmente para luego culminar con una multiplicación sexuada o gametogonia con la formación de macro y micro gametocitos. La fusión de éstos dará origen posteriormente a los ooquistes, que serán eliminados al ambiente junto con los excrementos del gato; tarda aproximadamente 3 a 20 días en liberar millones de ooquistes al ambiente. En condiciones ambientales favorables, los ooquistes pueden esporular en un período de tres semanas, pudiendo infectar a otros hospederos intermediarios de sangre caliente (11).

2.4. Toxoplasma en alimentos

Según la ubicación geográfica, se estima que el 15 a 85 % de la población humana está infectada asintóticamente con *T. gondii*. Se estima que más de 60 millones de personas en los EE. UU portan el parásito y un 30 a 50 % de la población están con anticuerpos contra *T. gondii* (13).

Además, *T. gondii* es la tercera causa de muerte por transmisión alimentaria en los EE. UU. La toxoplasmosis puede causar una amplia gama de manifestaciones clínicas en humanos, desde abortos e infecciones congénitas hasta enfermedades oculares (cuando ocurre una infección aguda en mujeres embarazadas seronegativas) y encefalitis fetal en huéspedes inmunodeprimidos con infección crónica, como pacientes con infección avanzada por VIH. El diagnóstico actual de *T. gondii* se basa en la detección serológica, el cultivo celular, los bioensayos y los métodos moleculares. La PCR es un avance importante para el diagnóstico de la infección por *T. gondii*, es así que varios estudios han demostrado mayor precisión, sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR que los métodos de diagnóstico tradicionales (14).

En orden de importancia, el mayor riesgo deriva del consumo de carne mal cocida de animales domésticos (porcina, ovina, bovina, caprina, aves de corral, conejos y caballos) y animales silvestres (jabalí, liebre, vizcachas, cérvidos, canguros y osos). La carne bovina no era considerada de riesgo epidemiológico en la toxoplasmosis, pero recientes estudios demuestran su relevancia en Sud América y algunos países de Europa. El tipo de confinamiento, la higiene del establecimiento, la presencia de gatos o felinos silvestres, la presencia de plagas como roedores, y artrópodos y el tipo de alimentación son determinantes en la prevalencia de la toxoplasmosis.

2.5. Toxoplasma en la leche

La leche se considera como un alimento completo, especialmente para los niños y personas mayores. Su alto valor en proteínas, minerales, grasas y vitaminas es innegable y millones de personas consumen leche y productos lácteos diariamente; por lo tanto, la calidad higiénica de la leche tiene una gran importancia en la salud pública, pero a veces se producen infecciones y enfermedades. Varios estudios han demostrado que el consumo de leche infectada puede causar enfermedades en humanos, debido a que la leche de los animales infectados contiene taquizoitos, lo que facilita la transmisión a la descendencia. Entre los estudios sobre transmisión horizontal, solo unos pocos informaron la presencia de taquizoitos en la leche de diferentes especies, incluyendo ovejas, cabras, camellos y vacas (15).

Dependiendo de la cepa de *T. gondii*, la ingestión de 10 ooquistes esporulados es suficiente para causar infección tisular en el hospedador intermediario. Los quistes tisulares se forman en el término de una semana postinfección y miden alrededor de 250 micras (1/4 de milímetro), por lo cual no son detectables a simple vista (16).

2.6. Métodos de diagnóstico

El diagnóstico de la toxoplasmosis constituye una importante medida de control de la enfermedad tanto en salud pública particularmente en mujeres gestantes, así como evitar pérdidas económicas en la producción de leche y sus derivados. Existen varios métodos de diagnósticos serológicos entre los cuales sobresale la técnica de LAMP la cual es de alta sensibilidad, fácil de realizar y rápida (17).

2.7. Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

LAMP es una novedosa técnica molecular de amplificación de ácidos nucleicos donde un conjunto de cuatro (o seis) primer u oligonucleótidos diferentes que hibridan en seis (u ocho) regiones diferentes en la secuencia diana, lo que lo hace altamente específico. Este conjunto de primer consta de dos primers externos (F3 y B3), dos primers internos

(cebador interno sentido (FIP) y cebador interno reverso (BIP) y primer de bucle (bucle sentido y bucle reverso). La reacción de LAMP puede realizarse simplemente en una condición isotérmica mediante el uso de la ADN polimerasa Bst, o similares, que tienen una actividad de desplazamiento de la cadena de ADN (18).

Se ha demostrado que LAMP es entre 10 a 100 veces más sensible a nivel analítico que la PCR convencional. Esta técnica ha llamado mucho la atención por su rápida, precisa y rentable detección de microorganismos como virus, bacterias y parásitos patógenos; al igual que muchos patógenos de plantas como en el caso de hongos (19).

El ensayo LAMP ha demostrado su eficiencia en el diagnóstico de toxoplasmosis en un estudio realizado para la detención de *T. gondii* en muestras de sangre de ratones experimentales en donde se pudo observar que no hubo reacción cruzada de ADN con otros protozoos por lo cual el límite de detección del ensayo LAMP es 0.6 fg de ADN. Por esto los autores de esa investigación concluyen que, debido a la simplicidad, sensibilidad y rentabilidad del ensayo para el uso común, sugieren que este ensayo se utilice como una herramienta de diagnóstico temprano para el control de la salud de la toxoplasmosis (20).

En cuanto a la utilización del ensayo LAMP en la leche existen estudios que revela la eficacia de dicho ensayo para la detención de otros microorganismos como es el caso de *Brucella spp.*, el cual ha sido estudiado y obtenido resultados positivos para la detención de dicho microorganismo por lo cual los autores de aquel estudio recalcan los resultados e indicaron que el ensayo LAMP es un método rápido, específico, sensible, económico y adecuado para el diagnóstico de *Brucella spp.* (21).

2.8. Prevención y control

Actualmente no existen sistemas de monitoreo y diagnóstico de la toxoplasmosis en animales de faena en los frigoríficos, por lo que el consumo de los quistes tisulares presentes en carne cruda o insuficientemente cocida es el principal factor de riesgo de adquirir toxoplasmosis tanto en los seres humanos como en las mascotas, la leche y sus subproductos sin pasteurizar, también son considerados potenciales fuentes de infección por *T. gondii*, por eso se recomienda la pasteurización o el hervor, sobre todo para el consumo en niños que suelen tener menor concentración de enzimas proteolíticas intestinales que los hacen más susceptibles en relación a los adultos (15).

Los quistes tisulares permanecen viables en carcasas o carne molida refrigerada (1-4 °C) por hasta 3 semanas y sobreviven en carne congelada a -1 y -8 °C por más de una semana, incluso algunos quistes pueden sobrevivir a temperaturas inferiores a -12 °C.

Por el contrario, la cocción de la carne por encima de los 56 °C en todo su grosor durante un mínimo de 10 minutos elimina los quistes tisulares, sin embargo, si se utilizan procedimientos de cocción en los que la carne se calienta de forma desigual como ocurre con la cocina de microondas, algunos quistes pueden permanecer viables (22).

T. gondii es un parásito protozoario que puede afectar a la gran mayoría de mamíferos incluidos el hombre, por lo general es de curso leve, pero si no es tratada y diagnosticada a tiempo puede transformarse en una enfermedad de cursos graves que va depender de las condiciones de las personas para que la enfermedad sea letal, en cambio en los animales es de carácter asintomático. Al tratarse de una enfermedad zoonótica, el principal problema se ve en las mujeres embarazadas y específicamente es la afección al feto, ya que en algunos casos presentan problemas neurológicos con calcificaciones intracraneales e hidrocefalia o microcefalia, muchos en un momento dado presentan coriorretinitis y problemas del aprendizaje, cabe recalcar que el 90 % de los casos son leves y los fetos infectados al momento de nacer lo hacen sin signos evidentes de toxoplasmosis (23).

El gato y los felinos en general son los hospedados definitivos para el parásito protozoario *T. gondii*, pero el contagio al hombre no se da únicamente por su relación con el gato, puesto que la gran mayoría de aves y mamíferos pueden transmitir al hombre por medio de la ingesta de productos mal elaborados o mal cocidos como es el caso de la leche y sus derivados sin un proceso adecuado de sanitización como es la pasteurización (24).

Los ooquistes de *T. gondii* se ha detectado en la leche de varias especies incluyendo la bovina, en donde el consumo de leche no pasteurizada es un factor de alto riesgo para el contagio de este parásito (13); también se ha podido observar en muchos sectores ganaderos de la región, la elaboración de productos derivados lácteos sin ningún control sanitario sumado la presencia de felinos en dichos centros de producción convirtiéndose en un componente que crea sospecha de la presencia de *T. gondii*.

En los sectores rurales de nuestro país aún no existe la tecnología adecuada tales como envases de refrigeración y almacenamiento, ordeñadoras automáticas para facilitar el trabajo y sobre todo la ausencia de detergentes adecuados para la limpieza y desinfección de utensilios, también en dichos sectores se dedican a producción extensiva sin contar con buenas prácticas de manejo e higiene de la leche bovina, la cual no es procesada adecuadamente para obtener sus derivados, existiendo así un consumo directo tanto para las personas como el resto de animales que ingieren dichos derivados, lo que implica un riesgo de contagio de toxoplasmosis. Esto podemos

corroborar gracias a estudios realizados en el país y en otros países en donde existe una relación fuerte respecto a la calidad de la leche (físico – químico y microbiológico) frente a las buenas prácticas de ordeño que en muchos casos incumplen la norma para ser procesada (25, 26).

En el país la región sierra es la principal zona productora de leche, ocupa el 90 % de la producción lechera. Según el Centro de Industrias Lácteas (CIL) en la provincia del Azuay se producen 451,985 litros de leche al día de los cuales el 53 % es destinada a la producción industrializada, el 37 % al consumo directo y el 10 % de la leche producida es destinado al mercado de producción de queso y quesillo artesanal lo que quiere decir que 45,198.5 litros de leche diarios es destinada a la producción de quesillos o quesos de manera artesanal (27).

El ensayo PCR tiene como limitante que menos sensible en distritos diagnósticos de enfermedades infecciosas comparado con el ensayo LAMP, también en un estudio realizado para comparar estas dos técnicas se mostró que el ensayo LAMP detecto más parásitos que el PCR esto puede deberse a que el PCR usa dos primers los cuales no son específicos en cambio el LAMP usa de 4 a 6 primers muy específicos (28).

La principal ventaja de LAMP en comparación de la PCR y otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos es que no requiere termociclador, ya que puede llevarse a cabo en dispositivos de calefacción simples tales como baño maría o bloque de calor de laboratorio, las pruebas de PCR requieren numerosos ciclos de calentamiento y enfriamiento para amplificar el objetivo, lo que significa que se necesita más equipo. LAMP utiliza amplificación isotérmica, por lo que solo necesita calentarse hasta una temperatura: 60 a 65 °C. LAMP también utiliza bioluminiscencia para detectar el patógeno, por lo que el equipo puede detectar la amplificación del objetivo durante la reacción en tan solo quince minutos. Esto significa que el técnico puede detectar patógenos en menos pasos y menos tiempo, utilizando equipos más pequeños y simples (29).

Por lo que PCR requiere equipo más complejo y más grande en donde solicitan calibración periódica, piezas móviles y ventiladores de refrigeración, la fluorescencia necesita una fuente de luz, filtros y detectores, menos portátil teniendo así un protocolo más complicado y pasos exagerados que realizar. La desventaja de la técnica LAMP es que no es muy conocida actualmente por ende existen menos técnicos que se especializan en dicha técnica pero con el paso del tiempo se espera que sea una técnica muy conocida y recomendada para el diagnóstico de diferentes patologías (30).

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio y unidades de análisis

Las muestras se recolectaron en su totalidad en la parroquia Jima, perteneciente al cantón Sigsig, provincia del Azuay ubicado a 2797 m.s.n.m. (**figura 1**) en donde se recolecto 100 muestras de leche de vaca cuyo destino es la elaboración de quesillo o queso de forma artesanal. Se recolecto aproximadamente 100 ml de leche de cada muestra (25 ml de cada cuarto), una vez recolectadas las muestras se llevó al laboratorio de microbiología molecular de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Cuenca en donde se elaboró alícuotas de 1 ml de cada muestra y se almaceno en tubos Eppendorf para después proceder a centrifugar y extraer el ADN basándonos en el método descrito por Ghaheri *et al* (28).

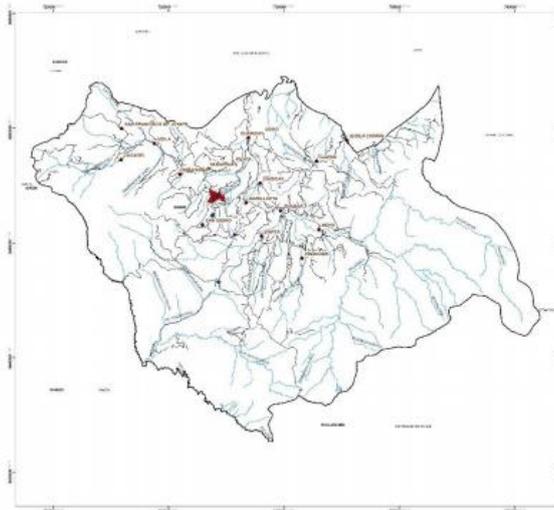


Figura 1: Mapa de la parroquia Jima (FUENTE)

3.2. Recolección de muestras y transporte

3.2.1. Materiales de campo

Físicos:

- Indumentaria de trabajo (overol y botas)
- Guantes de inspección
- Cubrebocas
- Cofia
- Rotulador
- Recipientes estériles para muestras de leche
- Gel refrigerante

- Cooler

Químicos:

- Alcohol etílico al 70 % (Antiséptico).

3.2.2. Procedimiento para la colecta de las muestras de leche:

Paso 1. Para la toma de la muestra de leche se procedió con la limpieza de los cuatro pezones, la eliminación de los primeros chorros (despunte) y la colecta en los recipientes un chorro con volumen similar (15 ml aproximadamente) de los cuatro pezones.

Paso 2. Con un rotulador identificamos el recipiente con la muestra de la leche con un código que identifique a cada vaca incluida en el estudio.

Paso 3. Una vez colectadas las muestras de leche se procedió a colocarlas en un cooler con un gel refrigerante a una temperatura aproximada a 4 °C para su transporte dentro de las 24 h como máximo para evitar que las muestras se estropeen al laboratorio de Biología Molecular en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Paso 4. En el laboratorio se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C por no más de 24 h para posteriormente preparar alícuotas (una alícuota por cada muestra) de 1 ml que se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento para la obtención de ADN total.

3.3. Procesamiento de las muestras y purificación del ADN total

Para la obtención del material genético (ADN total) de las muestras de leche (500 µl) se procedió con el protocolo que se describe a continuación:

3.3.1. Materiales de laboratorio

Físicos:

- Tubos (Eppendorf) de microcentrífuga o viales de 1.5 y 2.0 ml
- Set de micropipetas y sus puntas estériles
- Baño María
- Microcentrífuga
- Vortex
- Cabina de seguridad de flujo laminar biológica Clase II Tipo A1

Materiales químicos y reactivos:

- Solución buffer NET (50 mM de NaCl [Sigma, Cat. No.: S3014], 125 mM de EDTA [Sigma, Cat. No.: EDS], 50 mM de Tris-HCl, pH 7.6)
- Solución de Docedil sulfato de sodio (SDS) (Sigma, Cat. No.: 71725) al 24%
- Solución de Proteinasa K (Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308), 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50% de Glicerol)
- Solución de NaCl 5 M (Sigma, Cat. No.: S3014)
- Solución de CTAB/NaCl 10%/0.7M (Hexadecyl trimethylammonium bromide al 10%. (Sigma, Cat. No.: 52365) y 0.7M NaCl (Sigma, Cat. No.: S3014))
- Solución de Fenol/Cloformo/A. Isoamílico (Sigma, Cat. No.: 77619) Almacenada en refrigeración y protegido de la luz
- Solución Etanol absoluto (Sigma, Cat. No.: E7023) Almacenada en refrigeración y protegido de la luz
- Solución Etanol al 70% en agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502), almacenada en refrigeración y protegido de la luz.
- Solución Buffer TE 10:1 1X (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA pH≈8.0)
- Buffer de lisis (Proteinasa K 20 unidades/mg, Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %, Tris-HCl 1M, EDTA 0.5 M, NaCl 5 M y agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502).

Biológicos:

- Alícuotas de leche de vaca previamente colectadas y conservadas a -80 °C.

3.3.2. Procedimiento:

Para este procedimiento nos basamos en método fenol/cloroformo descrito por Ghaheri *et al* (31).

Paso 1. Una vez preparadas todas las soluciones a utilizar se procedió a la extracción y al procesamiento de las muestras de leche culminando con la purificación del ADN total.

Paso 2. Se descongelaron las muestras de leche almacenadas a -80 °C y se tomó un volumen de 500 µl de cada una de ellas para ser colocadas en tubos eppendorf de 2.0 ml.

Paso 3. A estos tubos se adicionó 100 µl de la solución buffer NET; 100 µl de la solución de SDS al 24% y se mezcló en vortex por 15 segundos; se procedió a incubar a 80 °C por 10 minutos' en baño María.

Paso 4. Terminado este proceso se adicionó 48.75 µl de la solución de Proteinasa K hasta tener una concentración final de 325 µg/ml, se mezcló en el vortex por 15 segundos y se incubó por 2 h a 50 °C en baño María.

Paso 5. Precipitamos el detritus con la adición de 125 µl de una solución 5 M de NaCl y 100 µl de una solución de CTAB/NaCl, se mezcló en el vortex por 15 segundos, y se incubó por 10 min a 65 °C en baño María y se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C.

Paso 6. Se colectó el sobrenadante (aproximadamente 500 µl) y se adicionó un volumen igual de Fenol/Cloformo/A. isoamílico 25:24:1, se mezcló en el vortex por 15 segundos, y se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C.

Paso 7. Completado este proceso, se colectó el sobrenadante (aproximadamente 400 µl) y se precipitó con la adición de 2.5 volúmenes de Etanol absoluto frío (4 °C), se procedió a mezclar por inversión y se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C para formar la pastilla de ADN total.

Paso 8. Una vez concluida la centrifugación se eliminó el Etanol absoluto y se colocó 500 µl Etanol al 70 % frío (4 °C) para lavar la pastilla de ADN total, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C para eliminar el Etanol al 70 %.

Paso 9. La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo, y posteriormente fue suspendida en 50 µl de solución buffer TE 10:1 1X, pH 8.0.

Paso 10. Las muestras de ADN total obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta su empleo en los ensayos LAMP del control de proceso y detección de material genético de *T. gondii*.

3.4. Validación de las muestras de ADN total obtenido de la leche colectada (Ensayo LAMP del control de proceso)

3.4.1. Materiales

Biológicos

- ADN total purificado de las muestras de leche

Químicos o reactivos

- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502).
- Oligonucleótidos (32):

- 100 mM BCP-FIP (F1c + F2)
(GAGGAACATTGGCTTCTGGACAAGCTGGGGATTGCTCT)
- 100 mM BCP-BIP (B1c + B2)
(AGTGGAAGCAAAGAACCCACCCAGTGAGCTCCAA)
- 100 mM BCP-LF (AGGCTGCCTCTTGTGTT)
- 100 mM BCP-LB (CATGGCCTAGAGACCAATC)
- 25 mM BCP-F3 (CCTAGATGAGGTCTATTGGC)
- 25 mM BCP-B3 (CTGCTCTCGAATTGTGACG)
- Buffer de reacción 1X (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1 %Triton X-100 pH 8.8 a 25 °C)
- 10 mM dNTP's c/u
- Bst ADN polimerasa (Thermo scientific).

Materiales de laboratorio y equipos

- Baño María o termociclador
- Tubos de PCR (200 µl)
- Set de micropipetas (1ml, 200 µl y 20 µl con puntas estériles)
- Congelador (-20 °C)
- Refrigerador (4 °C)
- Picofuga

3.4.2. Procedimiento de la amplificación de ADN del bovino (*Bos taurus*) mediante el ensayo de LAMP

Paso 1. Previo a realizar el ensayo de amplificación LAMP se procedió a descongelar los reactivos y cada una de las muestras a incluir en el ensayo.

Paso 2. Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de *B. taurus* con todos los reactivos antes descritos (Sección 3.4.1.) con el volumen requerido para el número de muestras que se analizó (12.5 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden como se muestra en la **tabla 1** exceptuando las muestras de ADN total:

Tabla 1: Cantidad de reactivos para realizar la premezcla

Reactivo:	Concentración		Volumen
	Inicial:	Final:	Por reacción*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	2.1 µl x n
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	1.25 µl x n
dNTP`s	10 mM c/u	1.4 mM	0.35 µl x n
Oligonucleótido BCP-FIP	100 µM	1.6 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido BCP-BIP	100 µM	1.6 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido BCP-F3	25 µM	0.2 µM	0.1 µl x n
Oligonucleótido BCP-B3	25 µM	0.2 µM	0.1 µl x n
Oligonucleótido BCP-LF	100 µM	0.8 µM	0.1 µl x n
Oligonucleótido BCP-LB	100 µM	0.8 µM	0.1 µl x n
Betaína	4 M	800mM	2.5 µl x n
Muestra de ADN total	--- µg/µl	--- µg/µl	5 µl x n
Volumen final	-----	-----	12 µl x n

*n= número de muestras

Paso 3. La premezcla preparada se llevó al vórtex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 segundos (Picofuga).

Paso 4. Se marcaron /rotularon los tubos de PCR (200 µl) y se les colocó 7 µl de la premezcla y se les adicionó 5 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 5. Los tubos con las reacciones de amplificación (12 µl) fueron colocados en el baño María/termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturalización y la hibridación de los oligonucleótidos a las secuencias diana:

Tabla 2: desnaturalización y la hibridación de los oligonucleótidos

Paso:	Desnaturalización	Alineamiento
Tiempo (min', s"):	5'	5'
Temperatura (°C):	94 °C	4 °C

Culminado este tiempo, se retiraron los tubos de PCR (200 µl) del baño María/termociclador y se añadió la enzima para que suceda la extensión y la inactivación:

Tabla 3: extensión e inactivación de los oligonucléotidos

Reactivo:	Concentración		Volumen por reacción
	inicial	final	
Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa	8 U/ μ l	0.32 U/ μ l	0.5 μ l
Volumen final:	----	---	12.5 μ l

Paso 7. Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el baño María/termociclador.

Tabla 4: extensión e inactivación en el baño María/termociclador.

Paso:	Extensión	Inactivación
Tiempo (min', s''):	60'	10'
Temperatura (°C):	60 °C	80 °C

Paso 8. Una vez concluido el paso de inactivación de las reacciones, las muestras del ensayo de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio o fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

3.5. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP (Control de proceso) mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

3.5.1. Materiales

Biológicos

- Productos amplificados mediante el ensayo de LAMP

Materiales químicos y reactivos

- Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100)
- Buffer TAE 1X (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH \approx 8.0 y 1 mM EDTA)
- Bromuro de etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637)
- Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA, 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

- Marcador de peso molecular 100 bp o 1 kbp (GeneRuler 100 bp o 1 kbp Plus DNA ladder, Thermo Scientific Cat. No.: SM0321).

Materiales de laboratorio y equipos

- Set de micropipetas (1 ml, 200 μ l, 50 μ l y 20 μ l con puntas estériles)
- Probeta de 100 ml
- Matraz de Erlenmeyer
- Balanza analítica (Mantener calibrada)
- Horno de microondas
- Bandeja para gel de electroforesis
- Peinillas para formar pocillos
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Congelador (-20 °C)
- Refrigerador (4 °C)
- Picofuga.

3.5.2. Procedimiento de la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio

Paso 1. Se preparó la solución de buffer TAE 10:1 1X.

Paso 2. Se realizó el gel agarosa al 1.5 % en solución buffer TAE 1X disolviendo la agarosa con el uso del horno de microondas. Antes de que se gelifique la mezcla se adiciono 1 μ l de la Solución Bromuro de etidio por cada 10 ml y vertiendo la agarosa en la bandeja para gel. Se dejó gelificar aproximadamente por 15 min a temperatura ambiente.

Paso 3. Las reacciones del ensayo LAMP sometidas al proceso de amplificación se les adicionó \pm 2.5 μ l de la Solución buffer de carga para ADN 6X. Se mezcló ambas soluciones y se colectaron en el fondo del tubo con ayuda de la Picofuga.

Paso 4. De la mezcla de cada una de las reacciones del ensayo LAMP con la Solución buffer de carga para ADN 6X se colocó el volumen total (\pm 15 μ l) en cada pocillo del gel. En uno de los pozos se colocó 450 ng del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp o 1 kbp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

Paso 5. Los fragmentos se resolvieron en el gel de agarosa, sometiendo a 80 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel (\pm 90 min).

Paso 6. Una vez resueltos los productos de amplificación del ensayo LAMP, se foto documentaron para su análisis.

Se consideró como muestra válida toda aquella en la que se logró observar el patrón, los fragmentos concatémicos correspondientes a la unidad básica de amplificación.

3.6. Identificación de material genético de *Toxoplasma gondii* en el ADN total obtenido de las muestras de leche bovina mediante un ensayo LAMP.

Para la identificación del material genético de *T. gondii* se realizó un ensayo LAMP con el uso de los reactivos descritos en la sección 3.4.1 con la excepción de los primers empleados, los cuales serán:

- Oligonucleótidos (33):

100 mM TOXOB1-FIP (F1c + F2)

(TGACGCCTTTAGCACATCTGGTTTTTGATGCTCAAAGTCGACCGC)

100 mM TOXOB1-BIP (B1c + B2)

(TCGCAACGGAGTTCTTCCCAGTTTTGGCCTGATATTACGACGGAC)

25 mM TOXOB1-F3 (GGGAGCAAGAGTTGGGACTA)

25 mM TOXOB1-B3 (CAGACAGCGAACAGAACAGA).

El procedimiento a seguir para la amplificación fue el descrito en la sección del control de proceso (sección 3.4.2.) y de la misma manera se usaron tanto los materiales como se siguió el procedimiento descrito en las secciones 3.5.1 y 3.5.2 para la visualización de las reacciones de amplificación, con la diferencia de que en donde se observó amplificación se interpretó como resultado que la muestra de leche es positiva a la presencia de material genético de *T. gondii*.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1. Resultado de la recolección de muestras

La recolección de las muestra resulto satisfactoria ya que no hubo problema en la extracción de leche (**Figura 2**) y el transporte hacia el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Cuenca se lo realizó con éxito respetando los tiempos y temperaturas ya establecidas.



Figura 2: *Recolección de muestras de leche*

4.2. Control De Proceso

Una vez que obtuvimos el ADN de *B. tauros* purificado realizamos un ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para validar que las muestras obtenidas son viables o no en donde se colocó en un gel de agarosa al 1.3% y posteriormente se realizó la electroforesis a 80 Voltios por 90 min aproximadamente.

Una vez pasado el tiempo de la electroforesis colocamos en el fotodocumentador y observamos que el 100 % de las muestras obtenidas son válidas como se puede observar en el ejemplo de la **figura 3** dando como deducción que las muestras de leche fueron recolectadas correctamente y así estando listo para realizar el ensayo LAMP para amplificar material genético de *T. gondii*.

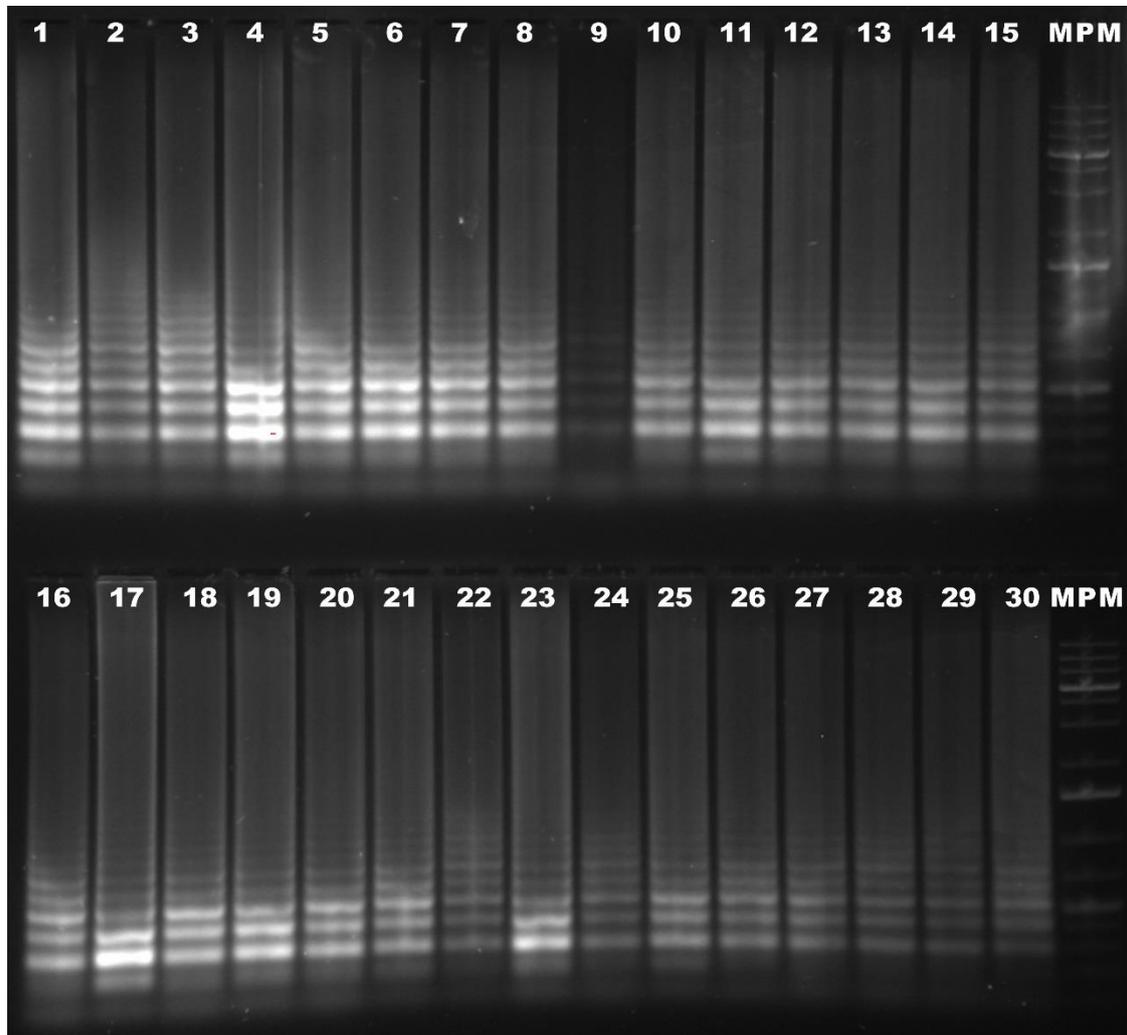


Figura 3: Electroforesis de un ensayo LAMP para control de proceso; carriles MPM, marcador de peso molecular; carriles del 1 al 30 amplificación positivas de ADN de las muestras de leche

4.3. Ensayo LAMP para amplificación de material genético de *Toxoplasma gondii*

Para la identificación de material genético de *T. gondii* se realizó un procedimiento similar al descrito en el control de proceso con la diferencia que los primers que se usó eran adecuados para amplificar material genético de *Toxoplasma*. Como podemos

observar en el ejemplo de la **figura 4** las muestras de leche indican que el 0 % del total contienen material genético de *T. gondii* capaz de amplificarse.

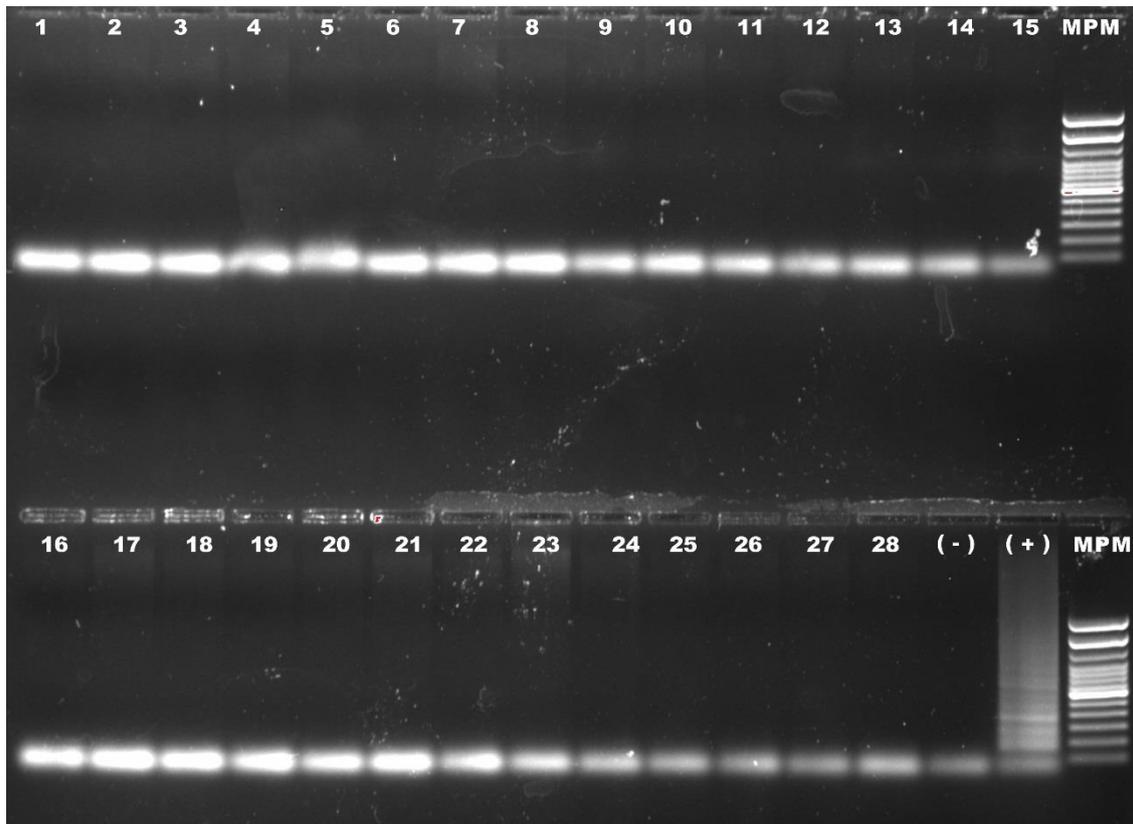


Figura 4: Electroforesis de un ensayo LAMP para detección de material genético de *T. gondii*; carriles MPM, marcador de peso molecular; Carril (-), control negativo; Carril (+), control Positivo; Carriles del 1 al 28 amplificación negativos de ADN de *T. gondii*

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

En esta investigación realizada en la parroquia Jima hemos logrado un 100% de muestras válidas mediante el Control de Proceso obtenidas de vacas cuya producción es destinada únicamente a la elaboración de queso de manera artesanal lo que quiere decir que las muestras de leche que conseguimos fueron extraídas, transportadas y almacenadas correctamente cumpliendo así uno de los objetivos propuestos y garantizando que el proyecto pueda completarse.

En cuanto al ensayo LAMP realizado para amplificar ADN de *T. gondii* no hubo ningún positivo, esto puede deberse a varios factores como: la ausencia de material genético de *Toxoplasma* o dicho material genético no fue lo suficiente para amplificarlo, ya que se necesita una concentración mínima para que el set utilizado pueda amplificarlo.

A pesar que no hubo presencia de material genético de *T. gondii* mediante el ensayo LAMP no necesariamente evidencia de que las muestras estén libres de toxoplasma, Esto puede deberse a múltiples factores uno de ellos es la ausencia de hospedadores o vectores (gatos) que puedan infectar directamente a los bovinos. No se tiene estudios que revelen la prevalencia de toxoplasmosis en gatos en dicho lugar, según Bojorque en 1994 (34) en Cuenca la prevalencia en gatos domésticos fue del 44 %, estudios recientes indican que la prevalencia en gatos domésticos ha bajado a un 16 % (35).

Otro factor para que el ensayo LAMP para amplificación de *T. gondii* sea negativo puede deberse a la forma de transmisión en las vacas, esta se da casi exclusivamente por ingesta de alimentos contaminados. En el ganado bovino la infección cursa sin signología. No es muy frecuente el aislamiento del parásito a partir de la musculatura de los bovinos infectados naturalmente, varios investigadores no lo han logrado a pesar de múltiples intentos. Se considera que existe una sensibilidad al pH ácido de los taquizoitos disminuyendo la probabilidad de contagio ya que se considera poco viable que sobreviva al paso del estómago; sin embargo, se ha demostrado que pueden perdurar durante varios días en la leche y que existen informes sobre la transmisión de toxoplasmosis a través de la lactancia (36).

Según Dubey *et al.* (4), indican que *T. gondii* puede excretarse en la leche de cabra y sobrevivir en el queso fresco elaborado mediante tratamiento con enzimas frías. Para prevenir la transmisión a humanos o animales, la leche antes de la ingesta o previa a la elaboración de subproductos debe ser pasteurizada antes del consumo.

También se puede considerar un factor importante el medio que se encuentra para que se pueda dar la infección pues en estudios realizados en Irán mostró resultados los

cuales revelaron que las muestras de leche recolectadas en verano (76.47 %) tuvieron la más alta prevalencia y las muestras de leche recolectadas en invierno la menor prevalencia de *T. gondii* (3.92 %). La alta prevalencia de *T. gondii* en la temporada de verano mostró que este parásito necesita la temperatura adecuada (clima cálido) para completar su ciclo de vida (37). Este factor puede ser crucial puesto que el clima en la región no es la adecuada para el desarrollo normal del parásito.

El ensayo de LAMP para identificar material genético de *T. gondii* en muestras de leche no ha sido descrito a profundidad en la actualidad sin embargo en estudios realizados en muestras de tejidos de diferentes órganos de ratones tuvo excelentes resultados siendo un método económico y rápido para el diagnóstico de toxoplasmosis (38). Aguirre María (39) en su estudio aplicando un ensayo LAMP en muestras de sangre de 100 gatos usando un procedimiento similar a nuestro trabajo, determinó que el 1 % de sus muestras fueron positivas a *T. gondii*, sugiere que la cantidad de material genético no es la adecuada por la diseminación del parásito a otros órganos

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Con respecto al control de proceso podemos concluir que el ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle para amplificación de ADN bovino es una técnica confiable y segura demostrando así la eficiencia de la obtención de muestras.

En relación a la amplificación de material genético de *T. gondii* mediante ensayo LAMP no podemos afirmar que dicha técnica sea deficiente para detectar la presencia del parásito en muestras de leche ya que existen estudios similares que sugieren que si es posible.

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES

El uso de un set diferente de primers que puedan amplificar cantidades mínimas de material genético para obtener mejores resultados.

Antes de utilizar esta metodología se debe como primer paso hacer un diagnóstico previo de la enfermedad utilizando pruebas serológicas donde indiquen la presencia de anticuerpos IgM e IgG para *T. gondii*. O incluso someter las muestras a la metodología directa PCR para obtener mayor posibilidad de contar con resultados positivos.

Realizar estudios de prevalencia de otros animales especialmente a gatos que conviven con las vacas en el mismo lugar.

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos AP, García LP. Reseña histórica acerca de las investigaciones relacionadas con la toxoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2001;53(2):111–7. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v53n2/mtr08201.pdf>
2. Biologics I for IC in A. Toxoplasmosis: infección por toxoplasma. 3 [Internet]. 2005;(January):1–6. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/toxoplasmosis-es.pdf>
3. Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans* [Internet]. 2nd ed. Taylor & Francis, editor. Maryland: CRC Press; 2009. 336 p. Available from: https://books.google.com.ec/books?id=5Nm7t5p9APAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
4. Dubey JP, Verma SK, Ferreira LR, Oliveira S, Cassinelli AB, Ying Y, et al. Detection and survival of *Toxoplasma gondii* in milk and cheese from experimentally infected goats. *J Food Prot* [Internet]. 2014;77(10):1747–53. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-14-167?code=FO PR -site>
5. Ardite JA, Abete JF, Navarro M de O, Sáenz JLP, Suñé TP. Procedimientos en *Microbiología Clínica*. 2010;5:320–30.
6. Faggion S, Salvador A, Jacobino K, Bortolotto L, Lopes M, Silva M, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Ehrlichia canis* DNA in blood samples from dogs. *Arch Med Vet*. 2013;45(2):197–201.
7. Janeth D, Mendoza F, Fundaci M, Gillow AS. PCR en toxoplasmosis. *Rev salud pública* [Internet]. 2002;4(1s):63–4. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v4s1/v4s1a12.pdf>
8. Boughattas S. *Toxoplasma* infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidences. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2017;57(13):2924–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1084993>
9. Giraldo ML. Macroscopic three-dimensional supramolecular networks through hierarchical self-assembly of polymer vesicles. *Acta Polym Sin* [Internet]. 2008;(4):303–8. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl087-8c.pdf>

10. Atias A. Parasitología Clínica. 3rd ed. Chile: Intermedica; 1994. 81–282 p.
11. Oré G, Rosas F. Determinación de la seroprevalencia de la toxoplasmosis. UNMSM [Internet]. 2002; Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Salud/Gomez_O_F/Rev_Lit.htm
12. Mimica F, Muñoz-Zanzi C, Torres M, Padilla O. Toxoplasmosis, zoonosis parasitaria prevalente en Chile: Recuento y desafíos. Rev Chil Infectol. 2015;32(5):541–9.
13. Kamani J, Egwu GO, Mani AU, Bitrus Y. Survey of Toxoplasma gondii DNA in aborted Ovine and Caprine fetuses by nested PCR in Borno state, Nigeria. Vet World [Internet]. 2010;360–3. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012059591>
14. Ales Reinlein J.M, Rios Mozo M. Toxoplasmosis humana. Rev clínica española [Internet]. 2017;(4):261–70. Available from: https://www.ecorfan.org/libros/BOOK_TOXOPLASMOSIS.pdf
15. Grandía G. R, Entrena G. Á, Cruz H. J. Toxoplasmosis en Felis catus: etiología, epidemiología y enfermedad. Rev Investig Vet del Peru [Internet]. 2013;24(2):131–49. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=91547537&lang=es&site=ehost-live>
16. Cardillo N, Pasqualetti M, Fariña F, Ribicich M. La alimentación con carne cruda y el riesgo de transmisión de agentes parasitarios de importancia en la Salud Pública: Toxoplasma gondii y Trichinella spp. 2018;(June 2017). Available from: https://www.researchgate.net/profile/Natalia_Cardillo/publication/309638102_La_alimentacion_con_carne_cruda_y_el_riesgo_de_transmision_de_agentes_parasitarios_de_importancia_en_la_Salud_Publica_Toxoplasma_gondii_y_Trichinella_spp/links/594133fdaca2726c285
17. Matas Andréu L. Toxoplasmosis : Diagnóstico Serológico En Las Gestantes. Control Calid SEIMC [Internet]. 2004;1–6. Available from: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/Toxogest.pdf>
18. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. J Appl Microbiol [Internet]. 2018;124(3):626–43. Available from: https://www.researchgate.net/publication/321238215_Loop_Mediated_Isotherma

- I_Amplification_LAMP_A_Versatile_Technique_for_Detection_of_Microorganisms
19. Patricia Garrido. Técnica De Amplificación Isotérmica Mediada Por Bucle O Lamp. Ventajas En El Diagnóstico Sanitario. ECUADOR ES Calid - Rev Científica Ecuatoriana [Internet]. 2016;3(1):11–4. Available from: <https://revistaecuadorestabilidad.agrocalidad.gob.ec/index.php/revista/article/view/50/126>
 20. Kong QM, Lu SH, Tong QB, Lou D, Chen R, Zheng B, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2012;5(1):2. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/2>
 21. Song L, Li J, Hou S, Li X, Chen S. Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2012;90(3):292–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701212002138>
 22. Lora F, Aricapa H. J, Pérez J, Arias L, Idarraga S, Mier D, et al. Detección de *Toxoplasma gondii* en carnes de consumo humano por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tres ciudades del eje cafetero. *Infectio* [Internet]. 2007;11(3):117–23. Available from: <https://revistaecuadorestabilidad.agrocalidad.gob.ec/index.php/revista/article/view/50/126>
 23. Díaz L, Zambrano B, Chacón G, Rocha A, Díaz S. Toxoplasmosis y embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez* [Internet]. 2010;70(3):190–205. Available from: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/592/art11.pdf>
 24. OPS. Peligros biológicos. Pan American Health Organization. 2003.
 25. Silva Pulido R, Alzate Amelines J, Reyes Manosalva C. Assessment Practices Milking, Hygienic and Nutritional Quality of Milk in the Municipality of Granada, Antioquia - Colombia. *Rev UDCA Actual Divulg Científica* [Internet]. 2014;17(2):467–75. Available from: <https://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/451>
 26. Bonifaz García N, Requelme N de J. Buenas prácticas de ordeño y la calidad higiénica de la leche en el Ecuador. *La Granja*. 2011;14(2):45.
 27. Centro de la Industria Lactea del Ecuador. Datos del sector lechero. *Cent Ind*

- Láctea del Ecuador [Internet]. 2018;1(1):2018. Available from: https://e152f73b-81b4-4206-a6ee-8b984b6a13b0.filesusr.com/ugd/6cc8de_513a9bb8db76451a9a74586d7902bb3b.pdf
28. Tiwananthagorn S, Kato H, Yeewa R, Muengpan A, Polseela R, Leelayoova S. Comparison of LAMP and PCR for molecular mass screening of sand flies for leishmania martiniquensis infection. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2017;112(2):100–7. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v112n2/0074-0276-mioc-112-2-0100.pdf>
 29. 3M Health Care Academy. Uso y ventajas de amplificación isotérmica en la detección de microorganismos patógenos en alimentos y control ambiental; Microorganismos Patógenos En Alimentos Y Control Ambiental. 3M Food Saf [Internet]. 2015;1:38. Available from: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/08/1-3M-Uso-y-ventajas-de-amplificacion-isot--rmica-en-la-deteccion-microorganismos-004.pdf>
 30. Blyth C. DNA based food testing methods: PCR vs. LAMP. [Internet]. 7 de marzo. 2020. p. 6. Available from: <https://sciencecentre.3mcanada.ca/articles/dna-based-food-testing-methods-pcr-vs-lamp>
 31. Alejos Velázquez LP, Aragón Martínez M del C, Cornejo Romero A. Extracción y purificación de ADN. Univ Nac Autónoma México [Internet]. 2004;36(4):3. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
 32. Kageyama S, Hirayama H. Sexing of Bovine Preimplantation Embryos using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). J Mamm Ova Res [Internet]. 2012 Oct;29(3):113–8. Available from: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1274/jmor.29.113>
 33. Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of Toxoplasma gondii in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(4):357–65.
 34. Espinosa Ortega GM, Espín Negrete LP. Incidencia de toxoplasmosis en gatos mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta (kit on site toxo igg / igm) en el barrio de Solanda de la ciudad de Quito. Univ Tec Cotopaxi [Internet].

- 2012;(25). Available from: <http://181.112.224.103/bitstream/27000/826/1/T-UTC-1185.pdf>
35. Bojorque MP. Actualización de la seroepidemiología de *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Cuenca. Repos Digit Univ Cuenca [Internet]. 2016;1–76. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25508/1/Tesis.pdf>
36. Koethe M, Schade C, Fehlhaber K, Ludewig M. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simulated gastric fluid and cow's milk. *Vet Parasitol* [Internet]. 2017;233:111–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.010>
37. Dehkordi FS, Haghighi Borujeni MR, Rahimi E, Abdizadeh R. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. 2013;10(2):120–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441913>
38. Krasteva D, Toubiana M, Hartati S, Kusumawati A, Dubremetz JF, Widada JS. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009;162(3–4):327–31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356855>
39. Aguirre Serrano M. Implementación del método amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras sanguíneas de gatos (*Felis catus*). Univ Cuenca [Internet]. 2019;1(1):48. Available from: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/34686/6/Trabajo de titulacion.pdf>



Anexo 1: Extracción de la muestra de leche



Anexo 2: Almacenamiento de leche para la elaboración de queso de forma artesanal



Anexo 3: Alícuotas listas para la extracción de ADN



Anexo 4: Muestras centrifugadas para la purificación del ADN



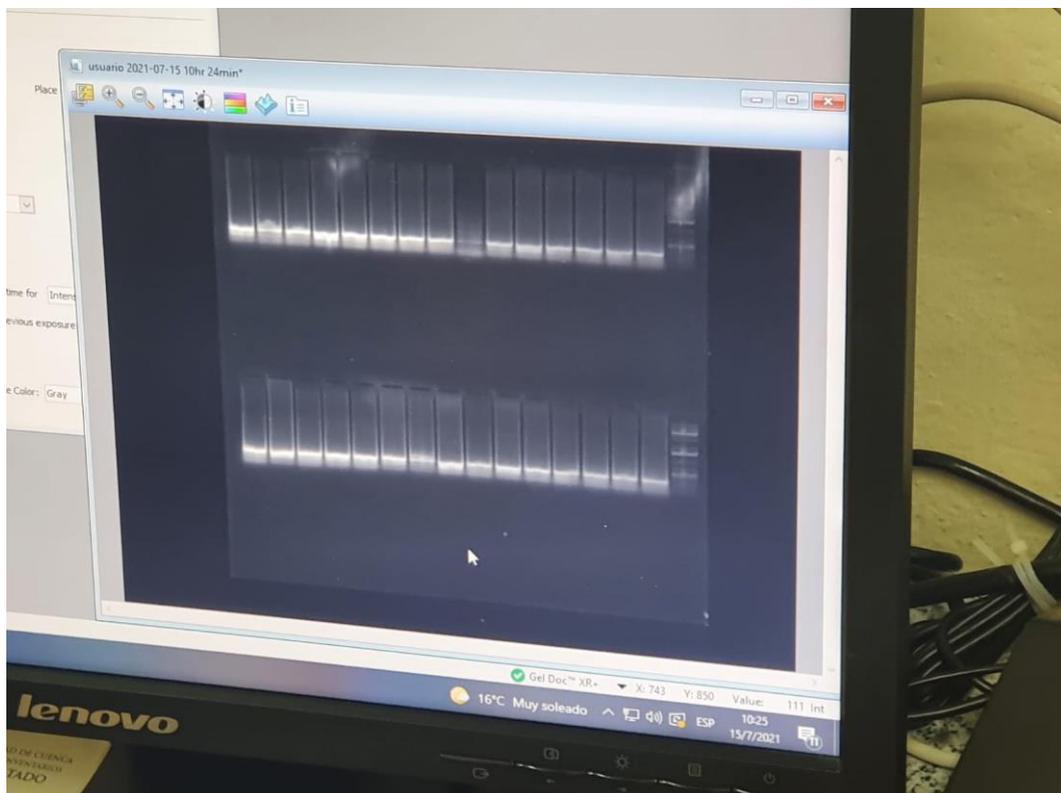
Anexo 5: Muestra después de la centrifugación



Anexo 6: Muestras sometidas al proceso de extensión e inactivación en el baño María/termociclador



Anexo 7: Muestras cargadas en el gel de agar teñido con bromuro de Etidio y corriendo en la cámara de electroforesis



Anexo 8: Resultados de la electroforesis realizados mediante la cámara fotodocumentadora.