



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE GUAYAQUIL

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE
TOXOPLASMA GONDII MEDIANTE ENSAYOS QPCR EN DIFERENTES
MUESTRAS BIOLÓGICAS**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del título
de Ingeniero (a) en Biotecnología.*

AUTORES:

MILDRED IVETTE MORÁN GARCÍA
NELSON JOEL RONQUILLO SÓCOLA

TUTORA:

PhD. BRENDA PATRICIA LÓPEZ ULLOA

GUAYAQUIL - ECUADOR

2025

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, **Mildred Ivette Morán García** con documento de identificación N° 0929442077 y **Nelson Joel Ronquillo Sócola** con documento de identificación N° 1752617272; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



Mildred Ivette Morán García
CI: 0929442077



Nelson Joel Ronquillo Sócola
CI: 1752617272

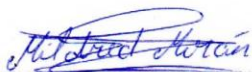
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **Mildred Ivette Morán García** con documento de identificación N° 0929442077 y **Nelson Joel Ronquillo Sócola** con documento de identificación N° 1752617272, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *TOXOPLASMA GONDII* MEDIANTE ENSAYOS QPCR EN DIFERENTES MUESTRAS BIOLÓGICAS**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera/o en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



Mildred Ivette Morán García
CI: 0929442077



Nelson Joel Ronquillo Sócola
CI: 1752617272

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Brenda Patricia López Ulloa** con documento de identificación N° 0960450922, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *TOXOPLASMA GONDII* MEDIANTE ENSAYOS QPCR EN DIFERENTES MUESTRAS BIOLÓGICAS**, realizado por **Mildred Ivette Morán García** con documento de identificación N° 0929442077 y **Nelson Joel Ronquillo Sócola** con documento de identificación N° 1752617272, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



PhD. Brenda Patricia López Ulloa

CI: 0960450922

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Naomi Daniela Mora Jaramillo** con documento de identificación N° 0927529990, analista de laboratorio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE TOXOPLASMA GONDII MEDIANTE ENSAYOS QPCR EN DIFERENTES MUESTRAS BIOLÓGICAS**, realizado por **Mildred Ivette Morán García** con documento de identificación N° 0929442077 y **Nelson Joel Ronquillo Sócola** con documento de identificación N° 1752617272, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 14 de febrero del año 2025

Atentamente,



Ing. Naomi Daniela Mora Jaramillo

CI: 0927529990

Dedicatoria

Mildred Morán

Con inmensa gratitud y profunda emoción, dedico este trabajo a todas las personas que han sido parte de mi vida y de este camino lleno de aprendizajes y desafíos.

A mi familia, por ser el motor de cada una de mis metas. En especial a mis padres y hermanos, quienes han sido mis pilares fundamentales y mi mayor inspiración, recordándome siempre que con unidad y perseverancia puedo alcanzar todo lo que me proponga.

A mis amigos y compañeros, por sus palabras de ánimo, su apoyo constante y por los momentos compartidos. Gracias por su verdadera amistad.

Y para concluir, quiero expresar mi agradecimiento a mis profesores, por su dedicación en mi formación. Cada consejo y cada aliento que me brindaron fueron esenciales para avanzar y superar cada reto.

Con mi más sincero agradecimiento.

Mildred Ivette Morán García

Dedicatoria

Nelson Ronquillo

Dedico este trabajo primero a mis padres, quienes con su ejemplo y sacrificio han sido pilares de mis logros, dándome su apoyo incondicional.

A mi enamorada, por su paciencia y aliento durante todo este proceso, también a mi hermano quien me ha motivado a ser un ejemplo principal para él.

A mis amigos y compañeros por recordarme la importancia de disfrutar el proceso universitario.

Y en último término, quiero agradecer a mis docentes, por brindarme sus conocimientos, su apoyo y dedicación, lo que ha sido fundamental para mi crecimiento académico y profesional.

Gracias, totales.

Nelson Joel Ronquillo Sócola

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue posible gracias al valioso aporte de muchas personas, a quienes expresamos nuestra más sincera gratitud. Su apoyo incondicional nos ha permitido superar los desafíos y alcanzar esta meta.

En primer lugar, agradecemos a Dios, quien ha sido nuestra guía y fortaleza en cada paso de este camino, dándonos perseverancia para enfrentar los retos que se presentaron.

A nuestras familias, por ser nuestro pilar fundamental, brindándonos su apoyo constante, ánimo y confianza en cada etapa de este proyecto.

A la Universidad Politécnica Salesiana, por proporcionarnos una formación académica integral, y a todos los profesores que, con su dedicación y esfuerzo, nos han transmitido conocimientos invaluable. En especial, queremos agradecer a nuestra tutora, PhD. Brenda López, por su paciencia, guía y compromiso incondicional durante el desarrollo de esta tesis.

Extendemos nuestro agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública - INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, por abrirnos sus puertas y brindarnos acceso a sus laboratorios y recursos esenciales para la realización de este proyecto. En particular, expresamos nuestra gratitud a la Dra. Mirella Rivera, cuya gestión y apoyo permitieron que esta investigación se llevara a cabo. Asimismo, agradecemos al Dr. Alberto Orlando y a la Ing. Naomi Mora, por guiarnos con su experiencia y enseñarnos los conocimientos necesarios para comprender y desarrollar el tema de este trabajo, en el marco de nuestra participación en uno de sus proyectos. Su dedicación a fomentar la investigación y promover el desarrollo en el campo de la salud ha sido clave para motivarnos a culminar, inspirándonos a seguir en la investigación y contribuyendo al país.

De igual forma, a la Dirección de Bienestar Animal y todas aquellas personas que nos apoyaron con la recolección de muestras para la evaluación de este estudio, que, aunque no sean mencionadas, contribuyeron de manera directa o indirecta a este proyecto, les damos nuestras más sinceras gracias. Este logro no habría sido posible sin sus aportaciones.

Resumen

El trabajo titulado Desarrollo de un protocolo para la detección molecular de *Toxoplasma gondii* mediante ensayos qPCR en diferentes muestras biológicas tiene como objetivo implementar un método diagnóstico más preciso y eficiente para identificar este parásito en Ecuador. *Toxoplasma gondii*, un protozoo intracelular del filo Apicomplexa, es el causante de la toxoplasmosis, una enfermedad zoonótica que afecta al 30% de la población mundial, siendo peligrosa para mujeres embarazadas e individuos inmunocomprometidos. Las condiciones climáticas cálidas y húmedas del Ecuador, junto con la abundancia de felinos, incrementan el riesgo de transmisión ambiental del parásito. Además, la ingesta de alimentos y agua mal cocinada, de igual forma aumenta los casos de la enfermedad.

El protocolo desarrollado se basa en técnicas de qPCR, que ofrecen mayor sensibilidad y especificidad en comparación con métodos serológicos tradicionales. En el estudio, se realizó una búsqueda exhaustiva de secuencias genéticas únicas de *T. gondii* mediante herramientas bioinformáticas, donde se seleccionó los primers y sondas más adecuadas. Además, se adquirieron muestras biológicas de sangre, heces y tejidos para evaluar el protocolo, y se utilizó control positivo adquirido de cepas certificadas.

Los ensayos de qPCR mostraron alta efectividad en la detección del parásito con bajos ciclos umbral (Ct), lo que evidencia su robustez para identificar incluso bajas concentraciones de ADN. Este protocolo aporta de manera importante a mejorar la vigilancia epidemiológica y la gestión de salud pública, en regiones con alta prevalencia del parásito.

Así mismo, la investigación destaca la necesidad de continuar fortaleciendo los métodos moleculares para la detección de *T. gondii* en Ecuador, promoviendo estrategias de prevención y diagnóstico temprano en poblaciones vulnerables.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Detección molecular, qPCR, Sensibilidad, Especificidad, Muestras biológicas.

Abstract

The study titled Development of a protocol for molecular detection of *Toxoplasma gondii* through qPCR assays in different biological samples aims to implement a more precise and efficient diagnostic method to identify this parasite in Ecuador. *Toxoplasma gondii*, an intracellular protozoan from the phylum Apicomplexa, is the causative agent of toxoplasmosis, a zoonotic disease that affects 30% of the global population. It poses a significant risk, particularly for pregnant women and immunocompromised individuals. Ecuador's warm and humid climate, combined with the abundance of felines, increases the risk of environmental transmission of the parasite. Additionally, the consumption of undercooked food and contaminated water further raises the incidence of the disease.

The developed protocol is based on qPCR techniques, which provide greater sensitivity and specificity compared to traditional serological methods. The study conducted an exhaustive search for unique *T. gondii* genetic sequences using bioinformatics tools, selecting the most suitable primers and probes. Biological samples, including blood, feces, and tissues, were collected to evaluate the protocol, and a positive control from certified strains was used.

The qPCR assays demonstrated high effectiveness in detecting the parasite with low cycle threshold (Ct) values, highlighting their robustness in identifying even low concentrations of DNA. This protocol significantly contributes to improving epidemiological surveillance and public health management, especially in regions with a high parasite prevalence.

Finally, the research emphasizes the need to continue strengthening molecular methods for *T. gondii* detection in Ecuador, promoting prevention strategies and early diagnosis in vulnerable populations.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, Molecular detection, qPCR, Sensitivity, Specificity, Biological samples.

Índice de contenido

Capítulo 1.....	¡Error! Marcador no definido.
Antecedentes	1
1.1. Introducción	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.2.1. Justificación	2
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos	4
1.4. Hipótesis.....	4
Capítulo 2.....	5
Marco Teórico.....	5
2.1. Taxonomía y Clasificación.....	5
2.2. Apicomplexa	5
2.3. <i>Toxoplasma gondii</i>	6
2.4. Toxoplasmosis.....	8
2.4.1. Síntomas	9
2.5. Métodos de detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
2.5.1 Eficiencia mediante la curva estándar y su estandarización de qPCR	12
Capítulo 3.....	14
Materiales y Métodos.....	14
3.1. Revisión bibliográfica de estudios de detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	14

3.2. Recopilación de datos en el programa de Excel y uso de herramientas bioinformáticas	14
3.3. Obtención de primers	16
3.4. Obtención de control positivo de <i>Toxoplasma gondii</i>	17
3.5. Obtención de las muestras biológicas	17
3.6. Extracción de ADN para muestras biológicas.....	18
3.7. Cuantificación por fluorometría y curva de calibración	21
3.8. Ensayos qPCR para desarrollo de protocolo.....	22
Capítulo 4.....	26
Resultados y Discusiones	26
4.1. Resultados	26
4.1.1. Identificación y validación de secuencias de nucleótidos de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
mediante herramientas bioinformáticas	26
4.1.2. Cuantificación de ADN mediante fluorometría.....	40
4.1.3. Curva de estándar	41
4.1.4. Estandarización del protocolo	42
4.1.5. Amplificación en muestras de heces, sangre y tejidos	43
4.2. Discusión.....	44
Capítulo 5.....	47
Conclusiones y Recomendaciones.....	47
5.1. Conclusiones	47
5.2. Recomendaciones.....	49
Referencias Bibliográficas	49
Anexos	53

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía y Clasificación de <i>Toxoplasma gondii</i> . -----	5
Tabla 2. Métodos serológicos para la detección de <i>T. gondii</i> . -----	10
Tabla 3. Métodos moleculares para la detección de <i>T. gondii</i> . -----	12
Tabla 4. Primers y sondas seleccionadas. -----	16
Tabla 5. Códigos de muestras de heces de gato. -----	17
Tabla 6. Códigos de muestras de sangre de gato. -----	18
Tabla 7. Códigos de muestras de carnes de res y chanco. -----	18
Tabla 8. Tratamientos según el tipo de muestra para la extracción de ADN. -----	19
Tabla 9. Ensayos para estandarización de protocolo qPCR. -----	21
Tabla 10. Concentraciones y volúmenes de máster mix, primers, sonda, agua y control positivo para ensayos de qPCR en un volumen de 20 µL ensayo 1. -----	22
Tabla 11. Concentraciones y volúmenes de máster mix, primers, sonda, agua y control positivo para ensayos de qPCR en un volumen de 20 µL ensayo 2. -----	22
Tabla 12. Condiciones o parámetros de la qPCR. -----	23
Tabla 13. Datos de estudio, Genes diana, pb, primers y sondas. -----	26
Tabla 14. Resultados de dianas F y R y totales, No dianas F y R y totales, Dianas blanco Sonda y totales y Especificidad. -----	34
Tabla 15. Datos de cuantificación. -----	37
Tabla 16. Promedio de Ct de diluciones. -----	38
Tabla 17. Datos de Ct de cada ensayo. -----	40
Tabla 18. Ct de control positivo y muestras. -----	41

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	8
Figura 2. Placa de PCR en tiempo real de muestras de heces (T001H-T0010H) y de tejidos (T001MC-T0010MC). CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, Numeración (1-6): Diluciones.	24
Figura 3. Placa de PCR en tiempo real de diluciones seriadas con sus 3 réplicas (1 – 6) y muestras de sangre (T001S-T0010S) CN: Control Negativo, CP: Control Positivo.	24
Figura 4. Curva estándar del control positivo de <i>Toxoplasma gondii</i>	39

Índice de anexos

Anexo 1. Curvas de amplificación de concentraciones de 10 μ M y 100 μ M.	50
Anexo 2. Amplificación de parámetros del control positivo, réplicas de diluciones y muestras de sangre.	50
Anexo 3. Amplificación de parámetros del control positivo, diluciones y muestras de heces y tejidos.	51
Anexo 4. Caja de primers y sonda.	51
Anexo 5. Control positivo.	52
Anexo 6. Elaboración de alícuotas de primers y sonda.	52
Anexo 7. Fast Advanced® MasterMIX.	52
Anexo 8. Preparación de los ensayos 1 con una concentración de 100 μ M. y el ensayo 2 con una concentración de 10 μ M.	53
Anexo 9. Kits de extracción de ADN para muestras de sangre y las muestras de heces y de tejidos.	53
Anexo 10. Muestras biológicas.	54
Anexo 11. Extracción y almacenamiento de muestras biológicas.	54
Anexo 12. kit QuantiFluor® ONE dsDNA System Promega y Equipo Fluorímetro Quantus™	55
Anexo 13. Elaboración de placa qPCR y colocación de la misma en el termociclador.	55

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AEE: Anticuerpos Específicos para Ensayos.

AHG: Hemaglutinación Indirecta.

Ct: Ciclo de umbral.

DNA/RNA: Ácidos nucleicos desoxirribonucleico/ácidos ribonucleicos.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgE: Inmunoglobulina E.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M.

ISAGA: Ensayo de Aglutinación Inmunoabsorbente Específico para IgM.

LAT: Prueba de Aglutinación en Látex.

PBS: Solución Salina Fosfatada.

PIA: Prueba de Inmunoabsorción de Partículas.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real. *T*

gondii: *Toxoplasma gondii*.

TIC: Prueba de Inmunocromatografía.

WB: Western Blot.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Introducción

El *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un parásito protozoario intracelular del filo Apicomplexa de distribución global que provoca la toxoplasmosis, una enfermedad zoonótica capaz de afectar a diversos animales, así como a los seres humanos alrededor del 30% de la población mundial (Dubey et al., 2021). Su transmisión puede producirse por el contacto con heces de felinos infectados o el consumo de carne y aguas contaminadas, siendo esta última una vía de transmisión de creciente interés en la investigación epidemiológica, en la cual su detección temprana y precisa es crucial para mitigar riesgos, sobre todo en mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas (Zhao & Ewald, 2020).

La detección oportuna y precisa de *T. gondii* es esencial para implementar medidas de control y tratamiento, en donde las técnicas moleculares como la PCR en tiempo real (qPCR) han emergido como métodos robustos para identificar y cuantificar ADN del parásito, que superan las técnicas serológicas tradicionales en términos de especificidad y sensibilidad (Liu et al., 2015). Recientes estudios han explorado diversas técnicas para la detección de *T. gondii* en diferentes muestras, como agua y tejidos de animales salvajes. En un estudio realizado en Denizli, Turquía, se amplificó el gen *BI* con una secuencia específica de 529 pb, que utilizaron la técnica de PCR para identificar la presencia del parásito en muestras de agua (Sağlam et al., 2022).

Por otro lado, una investigación realizada en Italia ha analizado la presencia de *T. gondii* en los tejidos de jabalíes salvajes, que representan un reservorio potencial para este parásito, en regiones donde la interacción entre humanos y fauna silvestre es notable, para ello la técnica de

PCR en tiempo real fue crucial para la detección del parásito en muestras tisulares con evidencias de una elevada prevalencia y carga parasitaria en los jabalíes analizados (Santoro et al., 2021).

1.2. Planteamiento del problema

La presencia de *T. gondii* en el Ecuador, en especial en la provincia del Guayas donde los felinos domésticos y silvestres son comunes, representa un problema significativo debido a la transmisión ambiental del parásito a través de ooquistes excretados en las heces de los gatos. Las condiciones climáticas cálidas y húmedas favorecen la supervivencia de los ooquistes en el medio ambiente, lo que aumenta el riesgo de exposición para humanos y animales (Mosquera et al., 2024).

Esto plantea la necesidad de desarrollar un protocolo molecular de detección que no solo sean específicos y sensibles, sino también viables en términos de costo y adaptables a diversas condiciones de laboratorio el cual permitiría identificar infecciones de manera más eficiente, contribuyendo a programas de vigilancia epidemiológica más efectivos y a una mejor gestión de la salud pública.

1.2.1. Justificación

En Ecuador, aunque la toxoplasmosis es una enfermedad reconocida en términos de la salud humana y veterinaria (Rosado et al., 2024), el conocimiento de este patógeno sigue siendo limitado entre la población. En comunidades donde se consumen productos como carne y leche sin pasteurizar, los riesgos de infección son muy altos. Sin embargo, la desinformación generalizada hace que las personas se expongan al parásito sin ser conscientes del peligro (Khan et al., 2023).

El diagnóstico temprano y preciso de *T. gondii* es fundamental para prevenir estas complicaciones y para implementar medidas de control efectivas. No obstante, los métodos de diagnóstico tradicionales, como las pruebas serológicas, presentan limitaciones, incluyendo baja sensibilidad en infecciones recientes o crónicas y la incapacidad de diferenciar entre infecciones activas y pasadas en donde un estudio realizado en Ecuador investiga la comparación entre la seropositividad de *T. gondii* y su manifestación psicopatológica en individuos con esquizofrenia, concluyendo de como la toxoplasmosis tiene efecto en la salud mental (Rosado et al., 2024).

Otra investigación, relacionada al ámbito veterinario, se centra en como las cabras de fincas ecuatorianas están en riesgo por la infección de parásito, produciendo consecuencias graves en la reproducción de las cabras, esto en temas de aborto o descendencia débil (Celi et al., 2022).

Por último, un artículo con lugar en los archipiélagos Kerguelen y Galápagos, detecta *T. gondii* en bivalvos silvestres, tanto en islas con presencia de felinos como en aquellas sin ellos. Mediante la técnica de PCR en tiempo real se logró ooquistes que podrían haber sido transportados por corrientes marinas (Mosquera et al., 2024).

Los estudios analizados han enfrentado dificultades en la variabilidad de carga parasitaria dentro de los tejidos que se analizan, los cuales perjudican en la comparación y cuantificación de las muestras, así mismo, detectan ooquistes, con la presencia de inhibidores naturales en las muestras de agua de riego que afectan el proceso de la PCR, en particular su sensibilidad.

Por lo tanto, esta investigación contribuye en el desarrollo y validación de un protocolo optimizado de PCR en tiempo real, para la detección de *T. gondii*, con mejoras en la capacidad

del diagnóstico, fortaleciendo la vigilancia epidemiológica y reducción del impacto de la enfermedad a grandes escalas en poblaciones vulnerables, que ofrece un protocolo más eficiente y preciso.

1.3. Objetivos

1.3.1. *Objetivo General*

Desarrollar un protocolo de PCR en Tiempo Real (qPCR) para la detección específica y sensible del parásito *Toxoplasma gondii*, contribuyendo al diagnóstico preciso de la Toxoplasmosis.

1.3.2. *Objetivos Específicos*

1. Identificar secuencias de nucleótidos únicas y específicas de *Toxoplasma gondii* a partir de una búsqueda exhaustiva en la literatura científica.
2. Validar los genes específicos mediante herramientas bioinformáticas, empleando programas como Primer Blast, Nucleotide Blast y uGene.
3. Implementar la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real en los nucleótidos seleccionados, comprobando su especificidad y sensibilidad.

1.4. Hipótesis

El desarrollo de un protocolo de PCR en tiempo real permite una detección más precisa y efectiva de *Toxoplasma gondii* en comparación con protocolos existentes, mejorando la vigilancia epidemiológica en el ámbito clínico en el Ecuador.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Taxonomía y Clasificación

La clasificación y taxonomía de los organismos son esenciales para el análisis de sus propiedades biológicas, ecológicas y evolutivas. Para *Toxoplasma gondii*, la adecuada identificación en las categorías taxonómicas no solo facilita una mejor comprensión de su biología y ciclo vital, sino que también promueve la creación de estrategias para su diagnóstico, tratamiento y prevención. Esta categorización también es vital para la investigación molecular, pues proporciona un esquema para la comparación con otras especies del mismo filo y constituye un fundamento para futuras investigaciones en genética, inmunología y epidemiología. La información de su taxonomía y clasificación, reino, filo, clase, subclase, orden, suborden, familia, subfamilia, género, y especie, se encuentra en la Tabla 1 (Fortier et al, 2000).

Tabla 1. Taxonomía y Clasificación de *Toxoplasma gondii*.

Taxonomía y Clasificación		Referencia	
Reino	Protozoa	(Fortier et al, 2000)	
Filo	Apicomplexa		
Clase	Sporozoea		
Subclase	Coccidia		
Orden	Eucoccidiida		
Suborden	Eimeriina		
Familia	Sarcocystidae		
Subfamilia	Toxoplasmatinae		
Género	<i>Toxoplasma</i>	Especie	<i>gondii</i>

Elaborado por: Los autores, 2025.

2.2. Apicomplexa

El filo Apicomplexa abarca a un grupo de parásitos intracelulares obligados pertenecientes al supergrupo SAR (Stramenopile, Alveolata, Rhizaria), que incluye los géneros

como *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Cryptosporidium*, en el cual el filo Apicomplexa se caracteriza por una organización específica del citoesqueleto y diferentes maneras distintivas de replicación e invasión. La división celular asexual, y la esquizogonia, en el supergrupo SAR, es un proceso que implica varias rondas sucesivas de mitosis, obteniendo resultados a organismos descendientes (Morlon et al., 2016).

2.3. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, un protozoo intracelular perteneciente al filo Apicomplexa, y al género *Toxoplasma*, en donde es la única especie reconocida válida de este género que es objeto de estudio (Zhao & Ewald, 2020). Se destaca como uno de los parásitos patógenos más exitosos debido a su amplio número de especies hospedadoras, y el porcentaje de animales infectados a escala mundial, que representan el tercio de la población humana, donde infectan toda clase de células, tanto de hospedadores definitivos como intermediarios, y lo realizan de manera activa la invasión célula (Kochanowsky & Koshy, 2018).

El ciclo de vida de *T. gondii* abarca fases tanto sexuales (Figura 1), como asexuales; la vida sexual se desarrolla en los gatos, los cuales son los considerados los hospederos definitivos para este parásito (Zhao & Ewald, 2020). Para que se realice la reproducción sexual, el protozoo se distingue en gametocitos tanto masculinos y femeninos, esto siendo presente en el epitelio intestinal del gato, favoreciendo la reproducción. Por otro lado, el ciclo de vida asexual se da en los hospederos intermediarios, provenientes de pájaros, roedores, vacas, humanos, entre otros; en donde el protozoo se replica y se dividen en células hijas (Kochanowsky & Koshy, 2018).

El ciclo de vida del parásito comprende tres fases de infección, los taquizoitos, que promueven la propagación durante el proceso de infección aguda mediante la proliferación en diversos tipos de células anfitrionas; los bradizoitos, que sostienen la infección crónica y se

manifiestan a través de la presencia de quistes tisulares; en último lugar; los esporozoítos, que se expulsan en el entorno a través de heces de huéspedes definitivos de gatos (Lau et al., 2016).

La propagación de *T. gondii* puede realizarse por varias rutas. Una de las prácticas más habituales es la ingesta de carne contaminada que no ha sido muy bien preparada, en particular de cerdo, cordero o venado, que podría albergar quistes del parásito. Otro método de contagio es el contacto directo con excremento de gatos infectados, dado que los gatos son los únicos albergadores permanentes del parásito y emiten oocistos en sus excrementos, los cuales pueden contaminar el entorno. Por otro lado, el consumo de agua contaminada con oocistos supone un peligro considerable en zonas con sistemas de saneamiento insuficientes. Estas vías de transmisión subrayan la relevancia de implementar acciones de higiene, tales como el lavado de manos, la preparación correcta de los alimentos y la gestión meticulosa de los residuos (Zhao & Ewald, 2020).

Cuando los humanos ingieren ooquistes o quistes tisulares de *Toxoplasma gondii*, el parásito inicia su ciclo de vida en el huésped en donde al llegar al intestino delgado, los ooquistes liberan esporozoítos, los cuales invaden las células del epitelio intestinal. Estos esporozoítos se diferencian en taquizoítos, una forma activa que se multiplica y se disemina a través del torrente sanguíneo hacia diversos órganos, como el hígado, los pulmones y el sistema nervioso central. Con el tiempo, algunos taquizoítos evolucionan a bradizoítos, que se encapsulan y forman quistes en los tejidos los cuales permanecen latentes durante largos periodos, permitiendo al parásito evadir el sistema inmunológico y establecer infecciones crónicas en el ser humano (Zhao & Ewald, 2020).

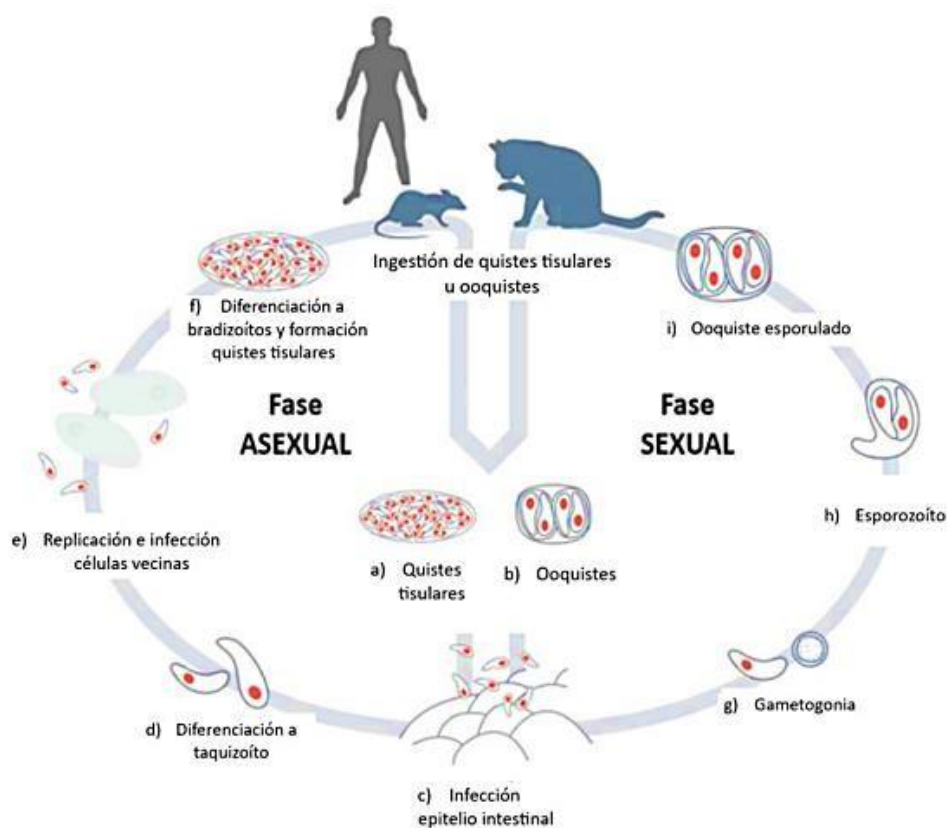


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Se muestra su fase sexual con la formación de ooquistes esporulados en huésped definitivo (gato) y su fase asexual con el desarrollo de taquizoítos y bradizoítos en huésped intermediarios humanos, roedores y aves). Fuente: (García González, 2023)

2.4. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria de alcance global, reconocida como una causa frecuente de hospitalización en humanos y una infección común en animales. Esta enfermedad se transmite a través del consumo de alimentos o agua, contaminados con ooquistes esporulados, así como por la ingesta de quistes pertenecientes de tejidos infectados. Es una enfermedad que suele ser asintomática o que causa síntomas muy leves similares a la gripe, sin embargo, en individuos inmunodeprimidos y neonatos, los síntomas pueden ser graves, donde generan daños oculares o cerebrales, o malformaciones (Dubey et al., 2021).

En Ecuador, entre 2013 y 2018, la incidencia de toxoplasmosis mostró una distribución geográfica heterogénea, siendo más alta en la provincia de Sucumbíos y la región noreste de la

Amazonía, mientras que provincias como Guayas, Chimborazo y Cañar reportaron menor incidencia, estos datos enfatizan la necesidad de implementar programas de prevención y educación, dirigidos a mujeres en edad reproductiva y comunidades en áreas de mayor riesgo, para reducir el impacto de esta enfermedad en el país (Simancas A, 2019).

2.4.1. Síntomas

La infección por *T. gondii* presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas que dependen del estado inmunológico del individuo en el cual las personas con un sistema inmune intacto y bien desarrollado, la enfermedad suele ser asintomática o manifestarse con síntomas leves semejantes a los de una gripe, como fiebre, fatiga, dolor muscular y ganglios linfáticos inflamados en el cuello. En raras ocasiones, estas infecciones leves pueden derivar en cuadros más específicos, como la mononucleosis o afectaciones oculares, incluyendo infección de la retina (Kochanowsky & Koshy, 2018).

Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, como aquellos con VIH/SIDA o bajo tratamiento contra el cáncer, el protozoo puede alcanzar el sistema nervioso central, debido a su tropismo por el cerebro, y provocar síntomas neurológicos graves, como confusión, convulsiones y alteraciones en la coordinación. La toxoplasmosis ocular puede también afectar a esta población, que ocasionan daño a la retina con consecuencias como visión borrosa o incluso pérdida de visión. Por otro lado, en mujeres embarazadas, la transmisión al feto puede causar complicaciones severas, como hidrocefalia, calcificaciones intracraneales y retinocoroiditis, que pueden derivar en discapacidades permanentes (Simancas A, 2019).

2.5. Métodos de detección de *Toxoplasma gondii*.

Hoy en día existen varios métodos para la de detección de *T. gondii*, entre ellos se encuentra el diagnóstico microscópico, que es una técnica menos sensible y poco fiable, y que requiere mucho tiempo. También están los bioensayos, que no son recomendables para la

detección en muestras con un gran volumen del parásito de interés, debido a su alto costo y al tiempo que demandan. Además, se incluyen las técnicas serológicas, que se basan en la detección de anticuerpos específicos (IgG, IgM, IgA) que el sistema inmune produce en respuesta del parásito analizado; estos métodos son las pruebas de aglutinación modificada, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas y de aglutinación inmunoabsorbentes, la prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos y los ensayos de hemaglutinación indirecta, en la tabla 2 se muestran los métodos serológicos (Liu et al., 2015).

Tabla 2. Métodos serológicos para la detección de *T. gondii*.

Métodos serológicos	Antígenos o anticuerpos utilizados	Tipo de anticuerpo/antígeno analizado	Referencia
Densidad	Taquizoíto vivo	IgG, IgM,	(Liu et al., 2015).
		IgA	
ESTERA	Taquizoíto fijado con formalina	IgG	
IATA	Mató a todo el taquizoíto	IgG, IgM	
AHI (Asociación Internacional de la Salud)	Glóbulos rojos bronceados sensibilizados con antígenos solubles	IgG	
Prueba ELISA	Antígenos de lisado de taquizoítos, antígenos recombinantes, anticuerpos específicos	IgG, IgM, IgA, antígenos	PIA
ISAGA	anticuerpos anti-IgM humana	IgM	
LAT	Partículas de látex recubiertas de antígeno soluble	IgG, IgM	
	Nanopartículas de oro recubiertas de antígeno	IgG	
WB	Antígenos de lisado de taquizoítos, antígenos recombinantes	IgG, IgM	
TIC	Antígenos o anticuerpos marcados con oro coloidal	IgG, AEE	

Prueba de avidez antígeno de lisado de taquizoíto, IgG, IgA, IgE antígenos recombinantes

Elaborado por: Los autores, 2025

Debido a que los métodos tradicionales para la detección de *T. gondii* presentan limitaciones en términos de especificidad y confiabilidad, se ha comenzado a recurrir al diagnóstico molecular como una alternativa más precisa, ya que estas técnicas permiten identificar el material genético del parásito con mayor sensibilidad, mejorando su detección. Entre los métodos moleculares más empleados tenemos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR convencional nos permite amplificar nucleótidos específicos que emplean múltiples genes, lo que garantiza una detección eficaz incluso en muestras con bajas concentraciones del parásito. Por otro lado, la PCR en tiempo real (qPCR) ofrece ventajas adicionales al permitir no solo la identificación del ADN del parásito, sino también la cuantificación precisa de la carga parasitaria, información que resulta crucial para evaluar la gravedad de la infección (Zhao & Ewald, 2020).

Otros enfoques moleculares incluyen la PCR anidada, que mejora aún más la sensibilidad mediante la amplificación en dos rondas sucesivas, y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que proporciona resultados rápidos sin requerir equipos complejos. Además, los métodos de secuenciación permiten identificar genotipos específicos del parásito, contribuyendo al entendimiento de la epidemiología de la enfermedad, en la tabla 3 se muestra los diferentes métodos los cuales son esenciales para un diagnóstico temprano y preciso, sino también para el monitoreo de la eficacia del tratamiento y la caracterización de las infecciones en diferentes contextos clínicos (Liu et al., 2015).

Tabla 3. Métodos moleculares para la detección de *T. gondii*.

Métodos moleculares	Propósitos principales	Regiones diana del ADN	Referencia
PCR convencional	Detección de especies	Gen <i>B1</i> , elemento repetido de 529 pb, gen 18S rDNA, <i>SAG1</i> , <i>SAG2</i> y <i>GRA1</i>	
PCR en tiempo real	Detección de especies	Gen <i>B1</i> , elemento repetido de 529 pb, gen rDNA 18S, <i>SAG1</i>	
Análisis de microsatélites	Genotipado	TUB2, W35, TgM-A, B18, B17; M33, IV.1, XI.1, M48, M102, N60, N82, AA, N61 y N83	
Tipificación de secuencias multilocus	Genotipado	<i>BTUB</i> , <i>SAG2</i> , <i>GRA6</i> y <i>SAG3</i>	
PCR-RFLP	Genotipado	<i>SAG1</i> , <i>SAG2</i> , <i>SAG3</i> , <i>BTUB</i> , <i>GRA6</i> , <i>c22-8</i> , <i>c29-2</i> , <i>L358</i> , <i>PK1</i> y <i>Apico</i>	
LÁMPARA	Detección de especies	Elemento repetitivo de 529 pb, <i>B1</i> , <i>SAG1</i> , <i>SAG2</i> , <i>GRA1</i> , genes de proteína de la pared del ooquiste	

(Liu et al., 2015).

PCR-RAPD Genotipado ADN genómico**Análisis de fusión de Genotipado Gen *B1* alta resolución (HRM)**

Elaborado por: Los autores, 2025

2.5.1 Eficiencia mediante la curva estándar y su estandarización de qPCR

La estandarización de la curva estándar en ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) es un paso crítico para garantizar la precisión y reproducibilidad de los resultados. Este proceso consiste en la preparación de una serie de diluciones seriadas del ADN control positivo, cuya

concentración es conocida. Cada dilución se amplifica en replicados, obteniendo valores de ciclo umbral (Ct) que se grafican frente al logaritmo de la concentración inicial. La pendiente de la curva generada, junto con el coeficiente de correlación (R^2) lo que indica una relación lineal entre el logaritmo de la concentración y el Ct, esto permite evaluar la eficiencia del ensayo, la cual debe situarse entre 90% y 110%, lo que corresponde a una pendiente entre -3.1 y -3.6 (Liu et al., 2015).

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Revisión bibliográfica de estudios de detección de *Toxoplasma gondii*

Se hizo una revisión exhaustiva en la literatura científica en la base de datos Pubmed, que contiene artículos científicos de distintas áreas, de secuencias de nucleótidos únicas y específicas de *Toxoplasma gondii*. Se revisaron cerca de 100 artículos, de los cuales se seleccionó 25 que cumplieran con criterios específicos. Estos incluyeron la identificación de nucleótidos y la detección del patógeno de interés mediante técnicas de PCR convencional o en tiempo real. Además, se evaluó los métodos utilizados en investigaciones anteriores para el diseño de cebadores y sondas, poniendo especial atención a sus limitaciones y ámbitos de aplicación, este análisis permitió identificar brechas en el conocimiento y establecer los criterios de selección de las herramientas bioinformáticas que fueron utilizadas.

3.2. Recopilación de datos en el programa de Excel y uso de herramientas bioinformáticas

En un archivo de Excel se recopilaron los datos obtenidos, organizados de la siguiente manera: en la primera columna, el dato de estudio, que incluye el autor y el año de publicación de la investigación; en la segunda columna, el enlace del artículo; en la tercera, la especie diana, que en este caso corresponde a *Toxoplasma gondii* en todos los artículos revisados. Se añadió un apartado para el gen diana, seguido del tamaño del fragmento en pares de bases (pb) de dicho gen, y, para concluir, los primers Forward (F, 5'-3') y Reverse (R, 5'-3') y sondas utilizadas. Para confirmar la identidad del gen diana y el tamaño del fragmento, según lo indicado en los artículos, se empleó la herramienta bioinformática Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on). En este programa, los primers fueron ingresados para realizar la búsqueda y validación de la información. Los datos obtenidos, como el gen diana confirmado por NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el tamaño del fragmento correspondiente, se registraron en las columnas "Gen diana (NCBI)" y "Tamaño (pb, NCBI)".

Los primers y sonda seleccionados se escogieron mediante la búsqueda en la página del NCBI de cada gen diana confirmado por la misma plataforma para la selección de una secuencia, en nuestro caso se seleccionó secuencias que tuvieran el doble de los pb. Se descargaron las secuencias en formato FASTA para garantizar una detección molecular específica de *Toxoplasma gondii*, se identificó regiones objetivo dentro de su genoma, para ello se utilizó la herramienta bioinformática BLAST para pegar el formato descargado y realizar la búsqueda que compare las secuencias genéticas con bases de datos públicas, como GenBank, que facilitan la identificación de secuencias relevantes. Las regiones genómicas debieron cumplir con varios criterios esenciales, que sean conservadas en las diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*, el cual garantiza su especificidad para este patógeno y que no presenten homología significativa con los genomas de otros microorganismos o con el hospedador, lo que ayudaría a evitar resultados falsos positivos en la detección.

En los parámetros antes de obtener los resultados de la búsqueda se colocó para obtener 5000 secuencias, en donde puede existir esa cantidad o no, que mostraran secuencias con toda cantidad de porcentajes de cobertura y de identidad que fueron beneficiosos o perjudiciales en la búsqueda, sin embargo, con los datos se procedió a descargarlos en formato FASTA con el apartado de secuencias alineadas. Este archivo se lo llevó a otro programa bioinformático, uGene, en el cual el formato se lo ingresaba con la selección de abrir en un alineamiento múltiple, donde las secuencias se observaron y se eliminaron aquellas que no correspondían al gen diana de interés, cabe recalcar que todos estos pasos se dieron con cada uno de los genes. Este alineamiento se guardó en formato FASTA y se lo colocó en una página de alineamiento online, MAFFT, en el cual se ajustó la direccionalidad a la primera secuencia y se descargó el

nuevo alineamiento. En el Unipro uGene v50.0 versión 64-bit (<https://ugene.net/>) se colocó el alineamiento y se buscó en la barra de herramientas la palabra “Acción” que abre la herramienta de “Navegación” seguida de “Búsqueda de secuencias”, en donde se buscó los primers F y R de cada gen. Aquellos primers que no se encontraron, en una plataforma online, Reverse Complement, se hizo la opción de cambio para poder obtener datos.

A continuación, se colocó los primers en el Primer Blast, pero con la diferencia que se buscó los organismos más cercanos a *Toxoplasma gondii*, los cuales, al observar la filogenia del mismo parásito, se encontró que los más cercanos pertenecen a *Neospora caninum* Liverpool y *Hammondia hammondi*, esto para confirmar la especificidad de los primers, se registró los datos de cada uno de estos organismos y los datos totales.

En definitiva, con toda la información recolectada se calculó la especificidad, y se seleccionó los primers para trabajar. Todo el proceso realizado para la obtención de los primers funcionó de la misma manera para la selección de la sonda, por lo que se realizó el mismo procedimiento con la sonda de cada estudio.

3.3. Obtención de primers

Los primers se obtuvieron de la empresa Humanizing Genomics MACROGEN procedente de Corea del Sur, que se encargan de proveer materiales biológicos y recursos genéticos para la investigación científica, en la tabla 4 se muestran los primers adquiridos con sus respectivas especificaciones de secuencia.

Tabla 4. Primers y sondas seleccionadas.

Gen Diana	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Sonda (qPCR)
-----------	------------------	------------------	--------------

<i>B1 Gene</i>	TCCCCTCTGCTG GCGAAAAGT	AGCGTTCGTGGTC AACTATCGATTG	6FAM- TCTGTGCAACTTTGGTG TATTCGCAG-TAMRA
<i>B1 Gene</i>	GGAAGTGCATCC GTTTCATGAG	TCTTTAAAGCGTT CGTGGTC	-
<i>APICO Ex</i>	TGGTTTAAACCC TAGATTGTGG	AAACGGAATTAAT GAGATTTGAA	-
<i>APICO En</i>	GCAAAATTCTTG AATTCTCAGTT	GGGATTCGAACCC TTGATA	-

Elaborado por: Los autores, 2025.

3.4. Obtención de control positivo de *Toxoplasma gondii*

La obtención del control positivo de *Toxoplasma gondii* para los ensayos qPCR, se realizó mediante la compra de una cepa secuenciada del genoma, a la empresa American Type Culture Collection ATCC® con el código 50174D™ procedente de EE. UU con una masa de 2 ug y almacenada en un buffer 1X Tris-EDTA (TE) de grado molecular con un pH 8,0 y compuesto por 10 mM de Tris-HCl que contiene 1 mM de EDTA.

3.5. Obtención de las muestras biológicas

En este estudio, se seleccionaron 30 muestras para analizar el protocolo final, las muestras biológicas escogidas se basaron en 10 muestras de sangre de gato, 10 muestras de heces de gato, y 10 muestras de carnes, entre ellas, de res y chanco. Las cuales, las 10 muestras de sangre de gato fueron obtenidas de la Dirección de Bienestar Animal de la ciudad de Guayaquil ubicada en el norte de la ciudad de Guayaquil en el sector de la Av. Francisco de Orellana y Autopista Narcisca de Jesús; las 10 muestras de heces de gato se obtuvieron de diferentes dueños de la ciudad de Guayaquil, de sectores como la Alborada, Ceibos, Suburbio y Domingo Savio; y las 10 muestras de carnes se escogieron de mercados de Guayaquil del sector de la Martha de Roldós; para realizar la extracción del ADN, y los ensayos posteriores de qPCR.

3.6. Extracción de ADN para muestras biológicas

Para la extracción de ADN de las muestras biológicas, se empezó por separar las muestras de heces y sangre de felinos y de carnes de res y de chanco, para colocar el respectivo código, el cual se estableció como se plantea en la tabla 5, 6, 7, por el INSPI para su registro y procesamiento.

De acuerdo con las normas de bioética y para garantizar la privacidad de la información, los propietarios de los felinos y los nombres de estos no serán mencionados en este estudio, en su lugar se les asignará una numeración y un código identificador, teniendo una fidelidad de los datos.

Tabla 5. Códigos de muestras de heces de gato.

Sector	Numeración	Código
Alborada		
	Gato 1	<u>T001H</u>
Alborada	Gato 2	<u>T002H</u>
Suburbio	Gato 3	<u>T003H</u>
Suburbio	Gato 4	<u>T004H</u>
Domingo Savio	Gato 5	<u>T005H</u>
Ceibos	Gato 6	<u>T006H</u>
Ceibos	Gato 7	<u>T007H</u>
Ceibos	Gato 8	<u>T008H</u>
Ceibos	Gato 9	<u>T009H</u>
Ceibos	Gato 10	T0010H

Elaborado por: Los autores, 2025.

Tabla 6. Códigos de muestras de sangre de gato.

Sector	Numeración	Código
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 1</u>	<u>T001S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 2</u>	<u>T002S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 3</u>	<u>T003S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 4</u>	<u>T004S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 5</u>	<u>T005S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 6</u>	<u>T006S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 7</u>	<u>T007S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 8</u>	<u>T008S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 9</u>	<u>T009S</u>
<u>Albergue Municipal</u>	<u>Gato 10</u>	<u>T0010S</u>

Elaborado por: Los autores, 2025.

Tabla 7. Códigos de muestras de carnes de res y chancho.

Muestra	Código
Res	T001MC
Res	T002MC
Res	T003MC
Res	T004MC
Chancho	T005MC
Chancho	T006MC
Chancho	T007MC
Chancho	T008MC
Chancho	T009MC
Chancho	T0010MC

Elaborado por: Los autores, 2025.

Los kits comerciales utilizados para la extracción de muestras recolectadas (Tabla 8) fueron:

- Kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System Catálogo número: Part #9FB069, además, los productos indicados asociados a este sistema son A2360, A2361 y A2365.
- Kit comercial Zymo Research Quick-DNA TM Miniprep Kit Catálogo número: D7020, D7021.

Tabla 8. Tratamientos según el tipo de muestra para la extracción de ADN.

Trat.	Kit comercial	Tipo de muestra	# Muestras
1	Wizard SV Genomic DNA Purification System.	Heces	10
1	Wizard SV Genomic DNA Purification System.	Tejido (Carnes)	10
2	Zymo Research Quick-DNA TM Miniprep Kit.	Sangre	10

Elaborado por: Los autores, 2025.

En el Tratamiento 1, se siguieron las indicaciones del protocolo del kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System, para preparar la muestra, se tomó 20 mg de tejido, se cortó en trozos pequeños y se colocó en un tubo de 1.5 mL. Se añadieron 275 µL de una Mezcla Maestra (EDTA 0.5 M, proteinasa K y ARNasa A) y se incubó a 55 °C durante 14h. Luego, se agregaron 250 µL de tampón de lisis Wizard® SV, agitar en vórtex. Para purificar el ADN, el lisado se transfirió a una minicolumna Wizard® SV, se centrifugó y lavó dos veces con solución de lavado (CWA con etanol al 95%). Se secó la matriz, se eluyó el ADN con 100 µL de solución libre de nucleasas y se almacenó entre -20 °C y -70 °C.

Para el tratamiento 2 se siguió las instrucciones del fabricante del kit Zymo Research

Quick-DNA™ Miniprep Kit en el cual para extraer ADN de sangre se recolectó 200 µl en un tubo eppendorf, con 200 µl de DNA/RNA Shield™ (1:1) y se realizó vortex. Se añadió 20 µl Proteinasa K, y se hizo vortex e incubó durante 15 minutos. Se colocó 800 µl de Viral DNA/RNA Buffer y realizó vortex. Se transfirió la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IICXLR en un tubo de colección y se centrifugó a 14,000 rcf durante 2 minutos; se desechó el residuo y a continuación se lavó la columna con 500 µl de Viral Wash Buffer, y se centrifugó durante 30 segundos y se repitió este paso. Luego, se añadió 500 µl de etanol al 95% y se llevó a centrifugar 1 minuto para ser transferida la columna a un tubo libre de nucleasas. Para eluir el ADN, se añadió 50 µl de agua libre de DNasa/RNasa a la matriz de la columna, se incubó a 15 segundos y se centrifugó durante 30 segundos. Al fin y al cabo, el ADN que se eluyó y se almacenó entre -20°C a -70°C.

3.7. Cuantificación por fluorometría y curva de calibración

La cuantificación del ADN mediante la técnica de fluorometría se realizó utilizando diluciones del control positivo del patógeno, estas se realizaron mediante la solución inicial, en donde se mezcló 18 µl de agua ultrapura con 2 µl de control positivo; a partir de esta se prosiguió con las 6 diluciones, en donde cada uno tenía los 18 µl de agua y se colocó poco a poco los 2 µl diluidos del tubo anterior.

A continuación, para calcular en el fluorómetro se utilizó el kit QuantiFluor® ONE dsDNA System Promega, en donde se colocó 8 tubos con 199 µl del reactivo QuantiFluor® ONE dsDNA Dye. Por otra parte, el volumen final fue de 200 µl, por lo que los tubos fueron distribuidos de la siguiente manera, al primer tubo se le añadió 1 µl del control positivo del kit, es decir, el reactivo QuantiFluor® ONE Lambda DNA, al segundo tubo se le añadió 1 µl del control positivo de nuestro patógeno (*T. gondii*), y desde el tercer al octavo tubo se le añadió 1 µl de cada dilución en un tubo diferente. Para tener un control negativo, se usó 200 µl del reactivo QuantiFluor® ONE dsDNA Dye en un tubo. Se tuvieron 15 tubos eppendorf de 1,5 µl

para este proceso, los cuales se llevaron al fluorómetro, y se realizó la respectiva lectura, donde se calibro el equipo con el control negativo, y el control positivo del kit para detectar el estándar, y a continuación leer las diluciones. Se realizó una PCR en tiempo real siguiente el ensayo 2, con el control positivo de *Toxoplasma gondii*, el control negativo y las diluciones del control para poder realizar la curva de calibración, se utilizó los datos de ct y concentraciones en el programa GraphPad Prism Versión 10.4.1 (627).

3.8. Ensayos qPCR para desarrollo de protocolo

Para estandarizar el protocolo qPCR, se utilizaron los primers seleccionados y el control positivo ATCC descrito con anterioridad. En el primer ensayo (E1) y segundo ensayo (E2), se optó por el Fast Advanced® MasterMix, para el cual se calcularon los volúmenes requeridos de los reactivos y de la muestra de control positivo en función de la cantidad de reacciones a realizar que se detallan a continuación en las tablas 9, 10 y 11.

Tabla 9. Ensayos para estandarización de protocolo qPCR.

Ensayo	Kit	Concentración	Descripción
E1	Fast Advanced® MasterMix	100 uM	Final Volume: 20 µL Mix Volume: 10µL Primers: Ftox <i>B1</i> 98pb; Rtox <i>B1</i> 98pb Sonda toxo <i>B1</i> Agua Control positivo
E2	Fast Advanced® MasterMix	10 uM	Final Volume: 20 µL Mix Volume: 10µL Primers: Ftox <i>B1</i> 98pb; Rtox <i>B1</i> 98pb Sonda toxo <i>B1</i> Control positivo

Elaborado por: Los autores, 2025.

Tabla 10. Concentraciones y volúmenes de máster mix, primers, sonda, agua y control positivo para ensayos de qPCR en un volumen de 20 µL ensayo 1.

Componente	Concentración	Volumen por reacción (µL)
Máster Mix	2x	10
Forward Toxo <i>B1</i> 98pb	5 uM	1
Reverse Toxo <i>B1</i> 98pb	5 uM	1
Sonda Toxo <i>B1</i> 98pb	2 uM	0,4
H₂O Ultrapure	-	2,6
Control positivo (<i>Toxoplasma gondii</i>) y negativo (Agua)	Template	5
Total		20

Elaborado por: Los autores, 2025.

Tabla 11. Concentraciones y volúmenes de máster mix, primers, sonda, agua y control positivo para ensayos de qPCR en un volumen de 20 µL ensayo 2.

Componente	Concentración	Volumen por reacción (µL)
Máster Mix	2x	10
Forward Toxo <i>B1</i> 98pb	1 uM	2
Reverse Toxo <i>B1</i> 98pb	1 uM	2
Sonda Toxo <i>B1</i> 98pb	0,5 uM	1
H₂O Ultrapure	-	0
Control positivo (<i>Toxoplasma gondii</i>) y negativo (Agua)	Template	5
Total		20

Elaborado por: Los autores, 2025.

Para llevar a cabo las reacciones, los reactivos se dispusieron en una placa multipocillos dentro de una cabina de flujo laminar ubicada en la zona blanca del laboratorio. La muestra de ADN correspondiente al control positivo y control negativo se agregaron a la placa junto con el mix realizado.

Luego, la placa fue transferida al termociclador de PCR en tiempo real, modelo LightCycler® 480 System de Roche Diagnostics. Este equipo, junto con su software asociado, permitió programar las condiciones específicas del proceso, incluyendo las etapas de amplificación, el número de ciclos, la duración y la temperatura. Estas condiciones consistieron en la activación inicial de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold a una temperatura de 95°C durante 10 min, seguido de la realización de 40 ciclos de PCR durante 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. (Tabla 12)

Tabla 12. Condiciones o parámetros de la qPCR.

Activación de la 95°C		1 ciclo polimerasa 10 minutos
95°C		15 segundos Desnaturalización
Alineamiento y	40 ciclos	
Extensión	60°C	1 minuto

Elaborado por: Los autores, 2025.

3.9. Ensayos qPCR con las muestras biológicas comprobando el protocolo desarrollado.

Basándonos en el ensayo 2, se realizó la PCR en tiempo real para analizar el protocolo con las muestras biológicas, tanto de sangre, heces y carnes, bajo las mismas condiciones planteadas en el punto 3.4. del segundo ensayo para evaluar el gen *BI*. Como se muestra en la figura 2 se analizaron 28 reacciones en la placa, que abarcan la PCR de las diluciones para la realización de la curva, punto 3.5. del estudio, las muestras de heces y de carne, y los controles positivo y negativo. Por otro lado, en la figura 3 se analizaron 30 reacciones en la placa, correspondientes a las muestras de sangre y las diluciones seriadas con su respectivo control positivo y negativo.

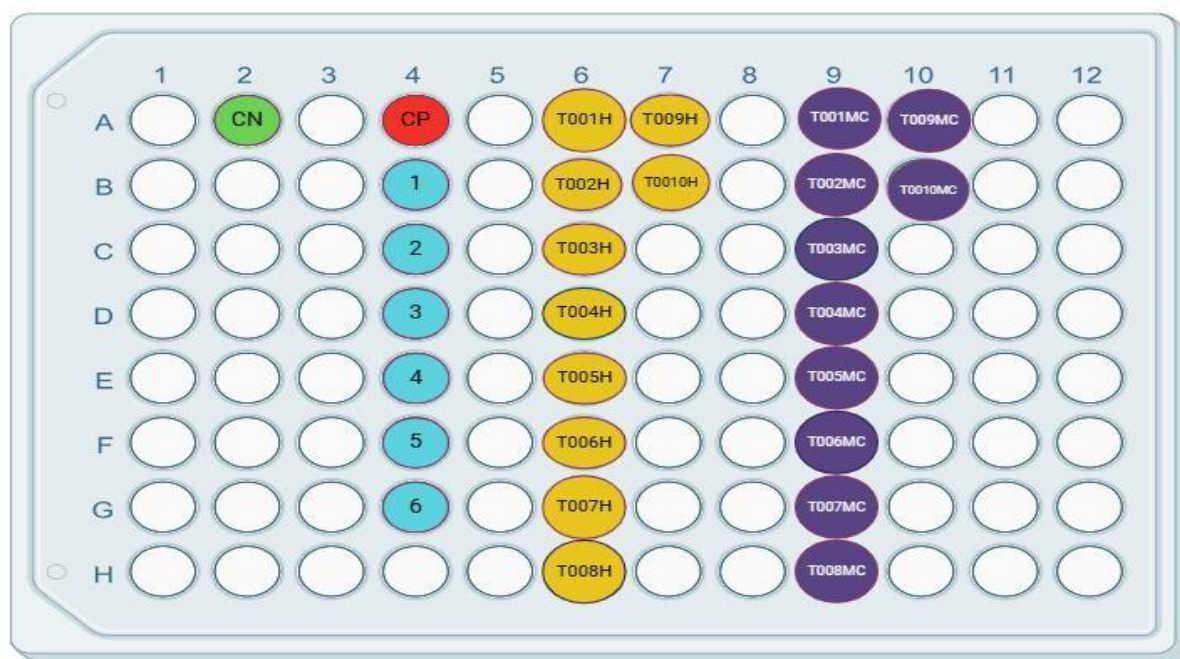


Figura 2. Placa de PCR en tiempo real de muestras de heces (T001H-T0010H) y de tejidos (T001MC-T0010MC). CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, Numeración (1-6): Diluciones.

Se muestra el diseño de la placa de qPCR para el análisis con sus respectivos códigos.

Elaborado por: Los autores, 2025

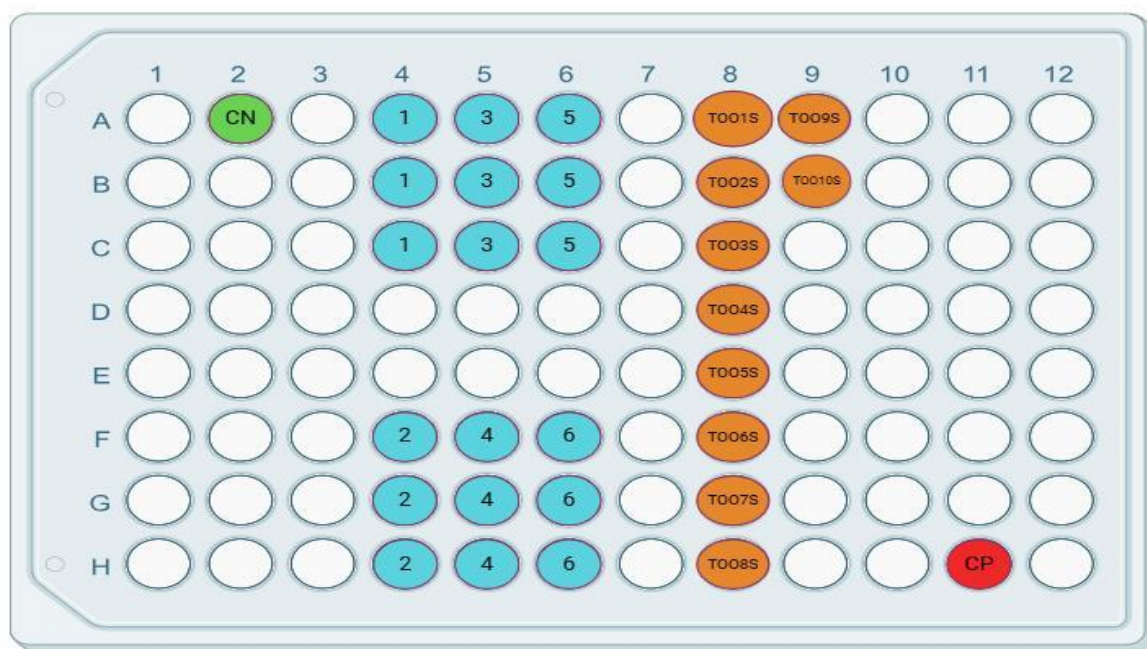


Figura 3. Placa de PCR en tiempo real de diluciones seriadas con sus 3 réplicas (1 – 6) y muestras de sangre (T001S-T0010S) CN: Control Negativo, CP: Control Positivo.

Se muestra el diseño de la placa de qPCR para el análisis con sus respectivos códigos.

Elaborado por: Los autores, 2025.

Capítulo 4

Resultados y Discusiones

4.1. Resultados

4.1.1. Identificación y validación de secuencias de nucleótidos de *Toxoplasma gondii*

mediante herramientas bioinformáticas

Mediante el uso de las herramientas bioinformáticas se obtuvo en la tabla 13 los resultados del gen diana confirmado por NCBI y el tamaño del fragmento correspondiente para cada estudio, en donde se pudo confirmar que ciertos genes si tenían una variación respecto a su tamaño real presente en el NCBI y la investigación.

Tabla 13. Datos de estudio, Genes diana, pb, primers y sondas.

Estudio	Gen Diana	Product size (bp)	Gen Diana NCBI	xpected Size NCE	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Sonda (qPCR)
Zamora, 2018	Gen <i>Bl</i> (<i>AF179871.1</i>)	107	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	107	TCCCGCTGGCA AATACAGGT	CGGCAGC GTCTCTTC CTCTT	6-FAM TGCGGCAATG TGCCACCTCG CCT NFQ
Modificado Zamora, 2018	Gen <i>Bl</i> (<i>AF179871.1</i>)	107	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	107	TCCCGCTGGCA AATACASGT	CGGCAGC GTCTCTTC CTCTT	6-FAM TGCGGCAATG TGCCACCTCG CCT NFQ
Matrajt, 1997	<i>ABGTg8.l</i>	500	genomic DNA	518	AAATAACGATC CATGAATCG	TTGTCTGG CGGACAT GGAGG	-
Saglam, 2021.	529-bp sequence	529	genomic DNA/putative microsatellite/DNA repeat region	420	TGACTCGGGCC C AGCTGC GT	CTCCTCCC TTCGTCCA AGCTCC	-
Saglam, 2021.	<i>Bl</i> Gene	194	glycerol-3-phosphate dehydrogenase <i>Bl</i>	194	GGAAGTGCATC CGTTCAT GAG	TCTTTAAA GCGTCGTG GTC	-
Santoro, 2021.	<i>Bl</i> Gene	193	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>) gene	98	TCCCCTCTGCTG GCGAAAAGT	AGCGTTTCG TGGTCAAC TATCGATT G	6FAM-TCT GTGCAACTTT GGTGTATT CGCAGTAMRA
Yu H, Huang B, Zhuo X, Chen X, Du A, 2023.	<i>SAGI</i>	128	Surface antigen (<i>SAGI</i>) gene for secretory antigen 1 protein	128	CTGATGTCGTTC TTGCGATGTGG C	GTGAAGT GGTTCTCC GTCGGTGT	-

Lass, 2022.	<i>SAG1</i> Ex	390	<i>Toxoplasma gondii</i> VEG, chromosome chrVIII, complete genome/ <i>Toxoplasma gondii</i> gene for major surface antigen P30 (<i>SAG1</i>)		GTTCTAACCAC GCACCCTGAG	AAGAGTG GGAGGCT CTGTGA	-
Lass, 2022.	<i>SAG1</i> En	390	SIN RESULTADOS		CAATGTGCACC TGTAGGAAGC	GTGGTTCT CCGTCGG GTGTGAG	-
Lass, 2022.	<i>SAG2</i> Ex	546	Secuencia relacionada con SAG ME49 de <i>Toxoplasma gondii</i> SRS34A (SRS34A), ARNm/ <i>Toxoplasma gondii</i> , cromosoma chrVIII, genoma completo/ADNc de <i>Toxoplasma gondii</i> , clon: XTG05125.2, ADNc completo, biblioteca de ADNc de XTG Sugano	729/726/729	GGAACGCGAAC AATGAGTTT	GCACTGTT GTCCAGG GTTTT	-
Lass, 2022.	<i>SAG2</i> En	546	SIN RESULTADOS		ACCCATCTGCG AAGAAAACG	ATTTCGAC CAGGCGG GAGCAC	-
Lass, 2022.	<i>SAG3</i> Ex	311	surface antigen (<i>SAG3</i>) gene	311	CAACTCTCACC ATTCCACCC	GCGCGTTG TTAGACA AGACA	-
Lass, 2022.	<i>SAG3</i> En	311	surface antigen 3 (<i>SAG3</i>) gene	226	TCTTGTCGGGTG TTCACCTCA	CACAAGG AGACCGA GAAGGA	-
Lass, 2022.	<i>C22-8</i>	521	SIN RESULTADOS		TGAGCATCCAT GCGTTTAT	CCTCCAC TTCTTCGG TTCCA	-

Lass, 2022.	C22-8 En	521	SIN RESULTADOS		TTCTCTCTACGT GGACGCC	AGGGCTT GGATATTC GC	-
Lass, 2022.	C29-2	446	<i>Toxoplasma gondii</i> VEG, chromosome chrIII, complete genome	687	ACCCACTGAGC GAAAAGAAA	AGGGTCTC TTGCGCAT ACAT	-
Lass, 2022.	C29-2 En	446	C29-2 genomic sequence	446	AGTTCTGCAGA GTGTCGC	TGTCTAGG AAAGAGG CGC	-
Lass, 2022.	L358 Ex	418	hypothetical protein partial mRNA	690	TCTCTCGACTTC GCCTCTTC	GCAATTTC CTCGAAG ACAGG	-
Lass, 2022.	L358 En	418	L358 genomic sequence	417	AGGAGGCGTAG CGCAAGT	CCCTCTGG CTGCAGTG CT	-
Lass, 2022.	BTUB Ex	411	Sisyra nigra genome assembly, chromosome: 5	1249	TCCAAAATGAG AGAAATCGT	AAATTGA AAATGAC GGAAGAA	-
Lass, 2022.	BTUB En	411	SIN RESULTADOS		GAGGTCATCTC GGACGAACA	TTTGAGGA ACACCCG GAGCG	-
Lass, 2022.	Paquete 1: L358 Ex	903	hypothetical protein partial mRNA	690	TCTCTCGACTTC GCCTCTTC	GCAATTTC CTCGAAG ACAGG	-
Lass, 2022.	Paquete 1: L358 En	903	L358 genomic sequence	417	AGGAGGCGTAG CGCAAGT	CCCTCTGG CTGCAGTG CT	-

Lass, 2022.	<i>GRA6</i> Ex	344	SIN RESULTADOS		ATTTTGTGTTTC CGAGCAGGT	GCACCTTC GCTTTGTG GTT	-
Lass, 2022.	<i>GRA6</i> En	344	SIN RESULTADOS		TTTCCGAGCAG GGTGACCT	TCGCCGA AGAGTTG ACATAG	-
Lass, 2022.	<i>APICO</i> Ex	640	genomic DNA containing <i>Apico</i> region	845	TGGTTTAAACCC TAGATTGTGG	AAACGGA ATTAATGA GATTTGAA	-
Lass, 2022.	<i>APICO</i> En	640	genomic DNA containing <i>Apico</i> region	639	GCAAAATTCTT GAATTCTCAGTT	GGGATTC GAACCCTT GATA	-
Yang W,2009	<i>Bl</i> gene	126	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	126	GGAGGACTGGC AACCTGGTGTC G	TTGTTTCA CCCGGAC CGTTTAGC AG	-
Rodrigues,20 23	Gen <i>l8S</i>	290	SIN RESULTADOS		GTTACCCGTCA CTGCCAC	TGCCACG GTAGTCCA ATAC	-
Aziz, 2023.	Gen <i>GRA6</i> Externo	340	SIN RESULTADOS		ATTTGTGTTTCC GAGCAGGT	GCACCTTC GCTTTGTG GTT	-
Aziz, 2023.	Gen <i>GRA6</i> Interno	310	granule antigen <i>GRA6</i> (<i>GRA6</i>) gene	344	TTTCCGAGCAG GTGACCT	TCGCCGA AGAGTTG ACATAG	-
Aghdam, Moosavy, 2023	Gen <i>Bl</i>	529	SIN RESULTADOS		TOX4CGCTGCA GGGAGGAAGAC GAAAGTTG	TOX5CGCT GCAGACC AGTGCATC TGGATT	-

Truong, 2023.	<i>TgBl</i>	529	DNA repeat region	112	AGAGAC ACCGGA ATGCGA TCT	TTCGTCCA AGCCCCG ACT	SUN-TCGTGG TGA/ZEN/TGG CGGAGAGAAT TGA-IABkFQ
Truong, 2023.	TgREP	529	genomic DNA	-	GAAAGCCATGA GGCACTC CA	TTCACCCG CGGGCGAGT/Z AGC	6-FAMGACCGTTT EN/AGC ACC TGAGGAGAT ACA-IABkFQ
Dardona, Hafidi, Boumezzough , Boussaa, 2021	Gen <i>Bl</i>	194	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	194	TOXO1GGAAC GCATCCGTTT GAG	TOXO2CTT TAAAGCG TTCGTGGT C	-
Dardona, Hafidi, Boumezzough , Boussaa, 2021	TgREP	194	529REP repeat region	133	TOXO- FAGGCGAGGGT GAGGATGA	TOXORTCGTCTC GTCTGGAT CGCAT	-
Bourdin, Busse, Kouamou, Touafek, 2014.	Gen <i>Bl</i>	529	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	71	GAAAGCCATGA GGCACTCCA	TTCACCCG GACCGTTT AGC	-
Bourdin, Busse, Kouamou, Touafek, 2014.	TgREP	529	DNA repeat region	112	AGAGACACCGG AATGCGATCT	TTCGTCCA AGCCTCCG ACT	6(FAM)TCGTG GTGATGGCGG AGAGAATTGA -TAMRA

Marciano, Silva, Barbosa, Ferreira, 2020.	REP-529	112	DNA repeat region	112	AGAGACACCGG AATGCGATC T	TTCGTCCA AGCCTCCG ACT	TCGTGGTGAT GGCGGAGAAT TGA
Medina, 2022.	Gen <i>Bl</i>	97	SIN RESULTADOS		TGCATAGGTTG CCAGTCACTG	GGCGACC AATCTGCG AATACA	-
Wang, Zhang, Ren, Fuchang Yu, Yang, 2017	Gen <i>Bl</i>	194	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	194	TCTTTAAAGCGT TCGTGGTC	GGAAGT CATCCGTT CATGAG	-
Wang, Zhang, Ren, Fuchang Yu, Yang, 2017	Gen <i>Bl</i>	194	SIN RESULTADOS		GGCGACCAATC TGGCGAATACA CC	TGCATAG GTTGCAGT CACTG	-
Marqués, Sousa, Castro, 2020.	REP-529	183	529REP repeat region	183	AGCCACAGAAG GGACAGAAG	TCCAGGA AAAGCAG CCAAG	-
S M Costa, 2016	Gen <i>GRA7E</i>	322	granule antigen protein (<i>GRA7</i>) gene	322	CAAGCACCCGT TGACAGTCT	ACGATGC ACCCATAC CAACAG	-
S M Costa, 2016	Gen <i>GRA7I</i>	222	granule antigen protein (<i>GRA7</i>) gene	222	CACCAGCATGG ATAAGGCATC	GCGAGCTT CTTCAGCA AGTCT	-
Marino et al., 2017.	Gen <i>Bl</i>	98	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	98	CGTCCGTCGTA ATATCAG	GACTTCAT GGGACGA TATG	-

Marino, Percipalle, Giunta, Salvaggio, Caracappa, Alfonzetti, Aparo, Reale, 2017.	Gen <i>Bl</i>	98	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	72	GGGAATGAAAG AGACGCTAATG TG	CTTTTCGC CAGCAGA GGG	-
Marino, Percipalle, Giunta, Salvaggio, Caracappa, Alfonzetti, Aparo, Reale, 2017.	AF-529	98	529REP repeat region	94	CACAGAAGGGA CAGAAGT	TCGCCTTC ATCTACAG TC	TaqMan AF 529 marcada (6FAM- CTCTCCTCCA AGACGGCTGG -BHQ)
Rahumatulla h, Khoo, Noordin, 2015	HemM	61	chromosome 1, complete sequence	76	TATTCTACGTGC CATTCC	ATTACGA GTTGAATG AACAA	Cy5- ACACTCTTGC CACTCTCACC A-BHQ2
Rahumatulla h, Khoo, Noordin, 2015	Gen <i>Bl</i>	67	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	60	GGTCCGGGTGA AACAATA GAGA	GGCATGA CAACTGG GCAGTA	6FAM- ACTGGAACGT CGCCGMGBNFQ
Rahumatulla h, Khoo, Noordin, 2015	ITS-1	60	internal transcribed spacer 1	67	ATTCGTGTCTCT GTTGGGATACT G	GGTGTGG GAAAAAA GAATGCA	VIC- TTTCCAGGAG TTTCTTC- MGBNFQ
Bahreh, Hajimohammadi, 2021.	Gen <i>Bl</i>	94	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	97	TGCATAGGTTG CAGTCACTG	GGCGACC AATCTGCG AATACAC C	-

Vergara, Pennisi, Paludi, 2018.	REP-529	529	repetitive DNA sequence	532	Toxo4CGCTGCA GGGAGGAAGAC GAAAGTTG	Toxo5CCGT GCAGACA CAGTGCAT CTGGATT	-
Vergara, Pennisi, Paludi, 2018.	Gen <i>Bl</i>	129	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	129	ToxB41TCGAAG CTGAGATGCTC AAAGTC	ToxB169AA TCCACGTC TGGGAAG AACTC	-
Rodríguez da Silva, 2017.	REP-529	529	repetitive DNA sequence	533	Tox4CGCTGCAG GGAGGAAGACG AAAGTTG	Tox5CGCT GCAAGAC ACAGTGC ATCTGGAT T	-
Gouda, 2023.	Gen <i>Bl</i>		glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	521	CGACAGCCGCG GTCATTCTC	GCAACCA GTCAGCGT CGTCC	-
Ling, 2016.	Gen <i>Bl</i>		glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	432	CCGTTGGTTCCG CCTCCTTC	GCAAAAC AGCGGCA GCGTCT	-
Ling, 2016.	Gen <i>Bl</i>		glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Bl</i>)	213	CCGCCTCCTTCG TCCGTCGT	GTGGGGG CGGACCTC TCTTG	-

Elaborado por: Los autores, 2025.

Se utilizaron las herramientas bioinformáticas Nucleotide Blast, Blast y uGene las cuales proporcionaron los siguientes resultados presentes en la tabla 14, en donde se plantearon los resultados de dianas F y R y totales para cada una, No dianas y totales, Dianas blanco Sonda y totales, de igual forma no todas dieron resultados por lo que se observa solo los estudios que sí tuvieron. También, en la misma tabla, se incluyó la especificidad con el objetivo de analizar la efectividad de los primers y sondas, el cual se calculó con los datos obtenidos de las dianas F y R, y sus totales, mediante la siguiente formula:

$$\frac{\text{Dianas } F}{(\text{Dianas totales } F)} + \frac{\text{Dianas } R}{(\text{Dianas totales } R)} \\ 2$$

Tabla 14. Resultados de dianas F y R y totales, No dianas F y R y totales, Dianas blanco Sonda y totales y Especificidad.

Estudio	Dianas F	Dianas totales F	Dianas R	Dianas totales R	No dianas <i>Neospora</i>	No dianas <i>Hammondia</i>	No dianas totales	Especificidad	Dianas blanco sonda	Dianas totales sonda
Zamora, 2018	178	246	227	234	145	0	145	84,68%	235	246
Modificado Zamora, 2018	209	246	227	234	294	0	294	90,98%	235	246
Saglam, 2021.	52	52	38	38	2	0	2	100,00%		
Santoro, 2021.	51	52	47	47	0	0	0	99,04%	46	47
Yu H, Huang B, Zhuo X, Chen X, Du A, 2023.	114	123	35	35	0	0	0	96,34%		
Lass, 2022.	8	8	48	48	3	0	3	100,00%		
Lass, 2022.	33	35	3	3	4	0	4	97,14%		
Lass, 2022.	294	295	166	176	2	0	2	96,99%		
Lass, 2022.	382	437	292	293	270	0	270	93,54%		
Lass, 2022.	1	1	9	11	175	0	175	90,91%		

Lass, 2022.	3	3	15	15	70	0	70	100,00%
Lass, 2022.	0	0	15	15	70	0	70	NO DA RESULTADO
Lass, 2022.	14	14	13	13	2	0	2	100,00%
Lass, 2022.	0	0	24	24	3	0	3	NO DA RESULTADO
Aziz, 2023.	137	138	410	412	14	0	14	99,39%
Dardona, Hafidi, Boumezzough, Boussaa, 2021	60	61	47	47	2	0	2	99,18%
Dardona, Hafidi, Boumezzough, Boussaa, 2021	88	113	17	17	132	3	135	88,94%
Wang, Zhang, Ren, Fuchang Yu, Yang, 2017	47	47	60	61	2	0	2	99,18%
Marqués, Sousa, Castro, 2020.	89	95	92	119	151	0	151	85,50%
S M Costa, 2016	228	262	256	262	2	0	2	92,37%
S M Costa, 2016	228	262	255	256	0	0	0	93,32%

Marino, Percipalle, Giunta, Salvaggio, Caracappa, Alfonzetti, Aparo, Reale, 2017.	169	172	206	207	0	0	0	98,89%		
Marino, Percipalle, Giunta, Salvaggio, Caracappa, Alfonzetti, Aparo, Reale, 2017.	50	61	51	52	31	0	31	90,02%		
Marino, Percipalle, Giunta, Salvaggio, Caracappa, Alfonzetti, Aparo, Reale, 2017.	89	95	118	149	226	0	226	86,44%	121	134

Rahumatullah, Khoo, Noordin, 2015	189	199	352	362	12	0	12	96,11%	193	197
Bahreh, Hajimohamma di, 2021.	61	61	46	47	3	0	3	98,94%		
Ling, 2016.	109	201	227	241	38	0	38	74,21%		

Elaborado por: Los autores, 2025.

4.1.2. Cuantificación de ADN mediante fluorometría

La concentración y calidad del ADN extraído, así como las diluciones realizadas durante la cuantificación, presento los siguientes datos como resultados, presentes en la tabla 15.

Tabla 15. Datos de cuantificación.

Indicador	Medición 1 (ng/μl)	Medición 2 (ng/μl)	Medición 3 (ng/μl)	Medición 4 (ng/μl)	Concentración (Promedio) (ng/μl)
Control negativo	0	0	0,057	0,0214	0,0392
Control positivo Kit Fluorómetro	404	404	404	401	403,25
Control positivo <i>Toxoplasma gondii</i>	50	50	52	47	49,75
Dilución 1	3,51	3,24	3,55	3,10	3,35
Dilución 2	0,139	0,200	0,111	0	0,15
Dilución 3	0,0025	0	0	0	0,0025
Dilución 4	No dieron resultados				
Dilución 5					
Dilución 6					

Elaborado por: Los autores, 2025.

Los resultados de la cuantificación de ADN mediante fluorometría muestran que el control negativo presentó una concentración mínima de 0,0392 ng/μl, lo que confirma la ausencia de contaminación en el ensayo. El control positivo del kit registró 403,15 ng/μl, el cual demostró que la eficacia del método es efectiva, mientras que el control positivo de *T. gondii* alcanzó 49,75 ng/μl, demostrando la correcta extracción del ADN y la validación del protocolo para su uso con las muestras biológicas. Por otro lado, tenemos que las diluciones seriadas mostraron una reducción gradual de la concentración de ADN partiendo con 3,35 ng/μl hasta llegar a concentraciones cercanas a cero, esto se relaciona con la linealidad ya que evidencia la sensibilidad del método.

4.1.3. Curva de estándar

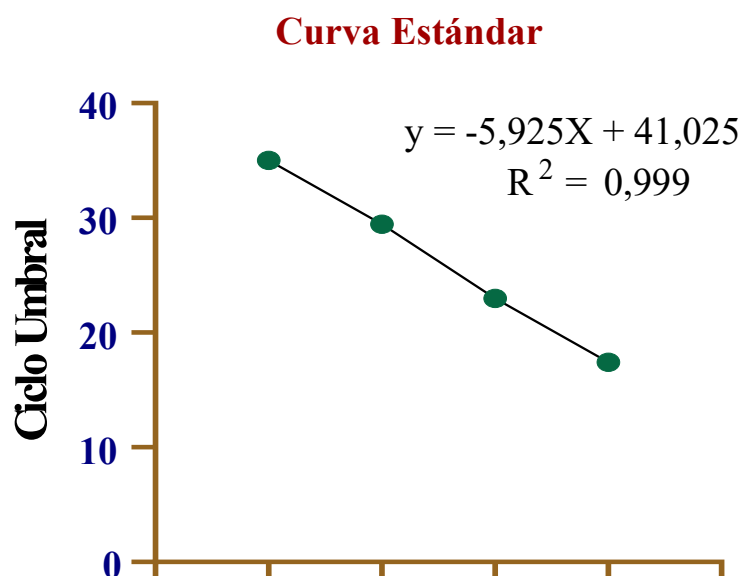
En la qPCR para la amplificación de la curva estándar, (anexo 2) los resultados demostraron una disminución progresiva en los valores de ciclo umbral conforme aumenta la dilución del ADN, con promedios de 35, 29,46, 22,98 y 17,41 para las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , presentes en la tabla 16.

Tabla 16. Promedio de Ct de diluciones.

<u>Log DNA</u>	<u>CT de diluciones</u>			<u>Promedio</u>
10-1	35	35	35	35
10-2	29,46	29,42	29,5	29,46
10-3	22,97	22,94	23,03	22,98
10-4	17,35	17,37	17,51	17,41

Elaborado por: Los autores, 2025.

Estos datos evidencian la relación inversa entre la concentración inicial del ADN y el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de detección. La linealidad observada en los valores obtenidos asegura la confiabilidad de la curva estándar como herramienta para la cuantificación de muestras desconocidas mediante interpolación en el modelo. Además, el coeficiente de determinación ($R^2=0.999$) demuestra un ajuste casi perfecto de los datos experimentales al modelo lineal, se puede observar en la figura 4.



0 1 2 3 4 5

Logaritmo de la concentración

Figura 4. Curva estándar del control positivo de *Toxoplasma gondii*.

Se muestra la relación lineal entre el ciclo umbral (Ct) y el logaritmo de la concentración del ADN objetivo. La pendiente de -5.925 y el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.999$) indican una alta eficiencia en la reacción de amplificación y una excelente correlación lineal entre los puntos de la curva realizada en el programa GraphPad Prism Versión 10.4.1 (627).

Elaborado por: Los autores, 2025

El porcentaje de la eficiencia de los primers mediante la curva estándar dió el siguiente resultado en base a la ecuación:

$$E = 10 \left(-\frac{1}{-5,295} \right) - 1 = 0,89 * 100 = 89\%$$

4.1.4. Estandarización del protocolo

Los resultados de los ensayos 1 con una concentración de 100 μ M. y el ensayo 2 con una concentración de 10 μ M, para la estandarización del protocolo fueron los siguientes en la tabla 17.

Tabla 17. Datos de Ct de cada ensayo.

Ensayo	Ct
E1	14.18
E2	13.27

Elaborado por: Los autores, 2025.

Los resultados de la estandarización del protocolo de qPCR con controles fueron analizados en el termociclador LightCycler® 480 System, el cual nos dió la confirmación de que los controles negativos no mostraron señal detectable de amplificación siendo un resultado crucial que el procedimiento se llevó a cabo sin contaminaciones externas. Por otro lado, al

analizar los resultados de los ensayos con una concentración de 10 µM, con 10 µM, se observó que ambas presentaron valores de ciclo umbral (Ct) bajos, lo que evidencia una alta concentración de ADN positivo para *T. gondii* como control positivo, lo que es indicativo de una amplificación exitosa y eficaz, en donde se observa en el anexo 1 las curvas de amplificación.

4.1.5. Amplificación en muestras de heces, sangre y tejidos

La qPCR realizada para la detección del ADN en las muestras de heces, sangre y tejidos no presentó amplificación, siendo todas las reacciones de la placa negativas. Esto se reflejó en la ausencia de valores de Ct en las muestras analizadas, lo que indica que no se detectó material genético del patógeno de interés. Sin embargo, el control positivo, si mostró amplificación el cual confirma un adecuado funcionamiento del ensayo (tabla 18). En el anexo 3 se puede observar la amplificación de las muestras de heces y tejidos, y en el anexo 2 la de sangre.

Tabla 18. Ct de control positivo y muestras.

Especie	Tipo de muestra	Código	Ct
<i>Toxoplasma gondii</i>	Control positivo	50174D™	13.93
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T001H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T002H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T003H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T004H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T005H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T006H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T007H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T008H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T009H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Heces de gato	T0010H	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T001S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T002S	Negativo

<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T003S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T004S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T005S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T006S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T007S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T008S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T009S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Sangre de gato	T0010S	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Res)	T001MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Res)	T002MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Res)	T003MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Res)	T004MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Chanco)	T005MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Chanco)	T006MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Chanco)	T007MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Chanco)	T008MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Chanco)	T009MC	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Tejido (Carne de Chanco)	T0010MC	Negativo

Elaborado por: Los autores, 2025.

4.2. Discusión

En esta investigación, se seleccionaron cuatro primers diseñados para la detección de *Toxoplasma gondii*, pero se optó por utilizar el gen *BI* de 98 pb con su respectiva sonda, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Este gen es reconocido como un marcador molecular confiable gracias a la presencia de múltiples copias repetitivas en el genoma del parásito, lo que incrementa la detección incluso en condiciones de baja concentración de ADN. La inclusión de una sonda específica para la región objetivo mejoró la especificidad del ensayo, disminuyendo el riesgo de resultados falsos positivos (Dubey et al., 2021).

En comparación, aunque el gen *BI* de 194 pb también pertenece a la misma región del genoma, no fue seleccionado debido a ciertas limitaciones técnicas. Su mayor tamaño puede disminuir la eficiencia de amplificación, ya que amplificar fragmentos más grandes puede

resultar en una menor estabilidad de la reacción e incluso en la inhibición de esta. Además, la falta de una sonda específica para esta región podría comprometer la precisión de los resultados, el cual aumenta la posibilidad de obtener señales inespecíficas. (Santoro et al., 2021).

Por su parte, el gen *APICO* fue considerado como una alternativa para casos de secuenciación, debido a que tiene un menor número de copias en el genoma del parásito, lo que lo hace menos eficiente para aplicaciones de PCR en tiempo real. Al no contar con una sonda específica, este marcador también limita la precisión en la cuantificación de los resultados (Celi, 2022).

En síntesis, el gen *BI* de 98 pb fue seleccionado como la mejor opción debido a su alta capacidad para generar resultados precisos, confiables y reproducibles, como se ha documentado en la literatura. Este marcador molecular, combinado con una sonda específica, aseguró la detección del ADN objetivo incluso en bajas concentraciones, permitiendo la generación de una curva estándar bien elaborada (Liu et al., 2015).

Por otro lado, la elección del protocolo de 10 μ M se fundamentó en su eficiencia al obtener un ciclo umbral de 13.27, comparable al protocolo de 100 μ M pero con un menor consumo de reactivos. Este enfoque no solo optimizó los recursos del ensayo, sino que mantuvo una alta sensibilidad y especificidad en la detección. La ausencia de amplificación en los controles negativos confirmó la pureza del proceso y validó la confiabilidad de los resultados obtenidos. La menor concentración de reactivos también contribuyó a la estabilidad del ensayo, consolidándose como la opción más eficiente para los análisis realizados (Sağlam et al., 2022).

En resumen, es importante mencionar que no se obtuvo amplificación en las diluciones 10-5 y 10-6. Esto se debe a que estas diluciones contenían concentraciones de ADN por debajo del límite de detección del ensayo de qPCR utilizado. Aunque el Gen *BI* de 98 pb es sensible, la cantidad de ADN en estas diluciones posiblemente era demasiado baja para ser detectada, lo

cual es un fenómeno común en ensayos de dilución seriada. Este comportamiento está relacionado con la sensibilidad del método y confirma que el límite de detección del ensayo es adecuado para aplicaciones en concentraciones más altas, pero insuficiente para niveles demasiados bajos de ADN. Además, la eficiencia de los primers obtenida mediante la curva estándar se calculó en 89%, lo que, aunque se encuentra levemente por debajo del rango ideal (90-110%), sigue siendo aceptable para ensayos de qPCR. Este valor indica que los primers son capaces de amplificar el ADN objetivo, pero podría haber ligeras pérdidas en la amplificación por ciclo. En el desarrollo de este protocolo, se utilizó un enfoque bioinformático para seleccionar los primers más adecuados, que prioriza secuencias específicas para *Toxoplasma gondii* y disminuyendo la posibilidad de formación de dímeros o estructuras secundarias. Sin embargo, es posible que ajustes adicionales en las condiciones experimentales puedan mejorar esta eficiencia (Mosquera et al., 2024).

Capítulo 5

Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

El desarrollo del protocolo de PCR en tiempo real (qPCR) diseñado nos permitió la detección específica y sensible del parásito *Toxoplasma gondii* en diferentes tipos de muestras biológicas, cumpliendo con los objetivos propuestos. Los resultados obtenidos demostraron que los genes diana seleccionados y validados a través de las herramientas bioinformáticas como Primer-BLAST y uGene, ofrecieron una alta especificidad hacia *T. gondii*, disminuyendo riesgos de falsos positivos con otros microorganismos relacionados, como *Neospora caninum* y *Hammondia hammondi*. Además, el protocolo mostró una capacidad de amplificación efectiva, reflejada en valores de ciclo umbral (Ct) bajos y consistentes en los controles positivos, fortaleciendo el diagnóstico molecular.

El protocolo optimizado fue validado con éxito en muestras de heces, sangre y tejidos, por lo tanto, demuestra su adaptabilidad y eficiencia. La cuantificación del ADN extraído mediante fluorometría confirmó la calidad del material genético y la ausencia de contaminantes en los controles negativos, que garantizan la confiabilidad del proceso. Asimismo, la estandarización de los ensayos nos permitió la obtención de resultados precisos, demostrando que la técnica desarrollada supera las limitaciones de los métodos tradicionales de diagnóstico en términos de sensibilidad y especificidad, aporta un enfoque innovador para la vigilancia epidemiológica de *T. gondii*.

En conclusión, esta investigación contribuye al conocimiento científico sobre *T. gondii* en el Ecuador, específicamente en la provincia del Guayas, donde la alta prevalencia del parásito representa un riesgo importante para la salud pública. La implementación del protocolo no solo refuerza las capacidades locales de diagnóstico, sino que también sienta las bases para futuras

investigaciones en el INSPI enfocadas en la prevención y control de la toxoplasmosis en poblaciones vulnerables y sistemas agropecuarios, siendo este avance una innovación en la biotecnología dando un paso crucial hacia la mejora de los programas de monitoreo y gestión de enfermedades zoonóticas en la región.

5.2. Recomendaciones

- Validar el protocolo desarrollado en muestras biológicas adicionales, como agua y productos alimenticios, para ampliar su aplicación en estudios relacionados con la contaminación ambiental y la seguridad alimentaria, contribuyendo a un monitoreo más integral de *Toxoplasma gondii*.
- Desarrollar programas de capacitación dirigidos a técnicos de laboratorio y profesionales de salud en el uso y optimización del protocolo de qPCR, que aseguran su correcta implementación y maximizan su impacto en el diagnóstico y control de la toxoplasmosis.
- Implementar el protocolo en laboratorios de salud pública y centros de diagnóstico animal, donde priorizan áreas de alta prevalencia del parásito, con el objetivo de mejorar la vigilancia epidemiológica y facilitar la detección temprana de casos en humanos y animales.

Referencias Bibliográficas

1. Celi, K., & Celi, L. G. (2022). Apicomplejos en cabras: prevalencia de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. y factores de riesgo en granjas de Ecuador. PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9454992>.
2. Dubey, J. P., Camargo, F. H. A. M., Chaudhary, K. C.-C., Oliveira, C. H., Kim, H. K., & Vemulapalli, I. V. (2021). Toxoplasmosis congénita en humanos: una actualización sobre la tasa mundial de infecciones congénitas. PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11010219>.

3. Fortier, B., Dao, A., & Ajana, F. (2000). *Toxoplasma* y toxoplasmosis. EMC - Pediatría, 35(3), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(00\)72014-2](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(00)72014-2).

4. González, S. (2023). Asociación entre *Toxoplasma gondii* y las enfermedades psiquiátricas. Repositorio Institucional UDC. https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/33372/GarciaGonzalez_Senda_TFG_2023.pdf?sequence=2.

5. Khan, S., Rehman, K., Noor, M., Khan, K., Bashir, M., Khan, S., ... & Ahmad, K. (2023). *Toxoplasma gondii* en animales lactantes: riesgo potencial para la población consumidora de leche en Khyber Pakhtunkhwa. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36790276>.

6. Kochanowsky, J. A., & Koshy, A. A. (2018). *Toxoplasma gondii*. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30040931>.

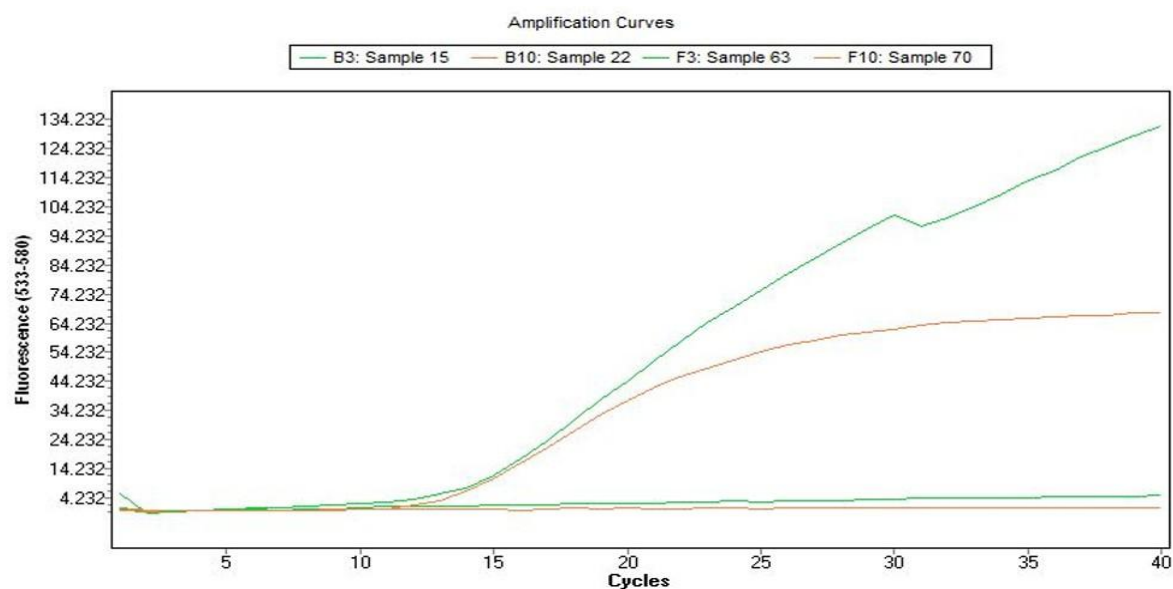
7. Lau, Y.-L., Lee, W.-C., Gudimella, R., Zhang, G., Tang, X., Ching, X. T., ... & Fong, M.-Y. (2016). Descifrando el genoma preliminar de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4927122>.

8. Liu, Q., Wang, Z.-D., Huang, S.-Y., & Zhu, X.-Q. (2015). Diagnóstico de toxoplasmosis y tipificación de *Toxoplasma gondii*. PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4451882>.

9. Morlon-Guyot, J., Francia, M. E., Dubremetz, J., & Daher, W. (2016). Hacia una arquitectura molecular del centrosoma en *Toxoplasma gondii*. Cytoskeleton, 74(2), 55–71. <https://doi.org/10.1002/cm.21353>.

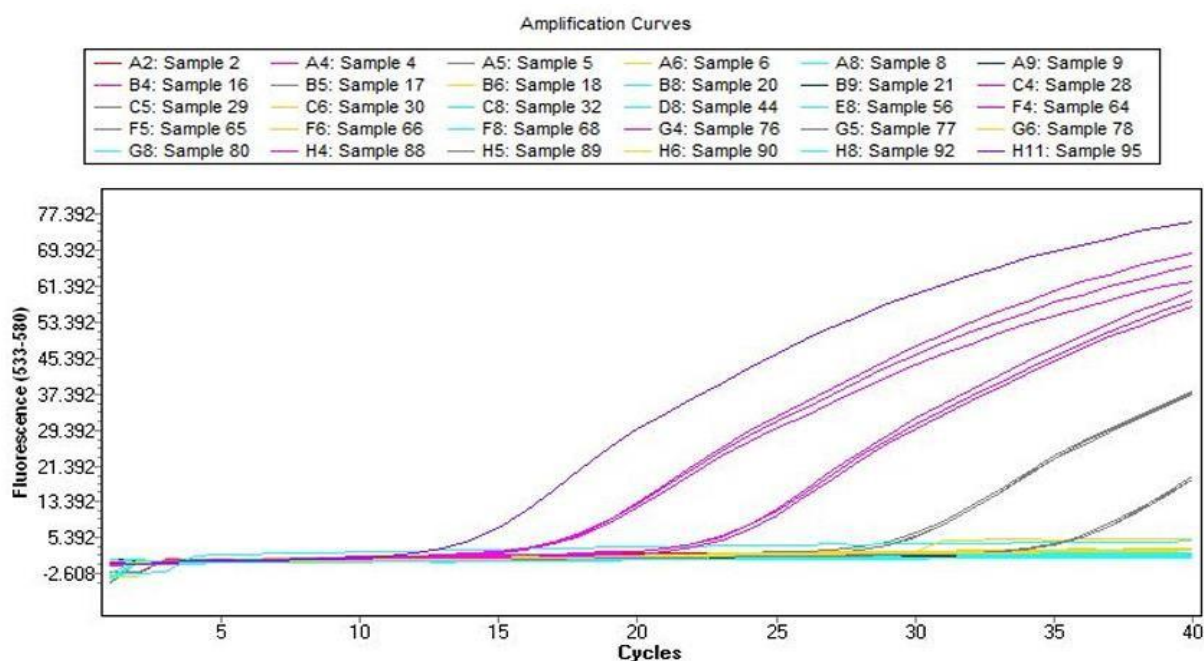
10. Mosquera, J. D., Espinosa-Barrera, S., Martínez-López, M., Palacios-Salgado, B. Y., Solano-Pérez, F. C., Zárate-Ramírez, D. L. & Rodríguez-Valencia, I. V. (2024). Detección de *Toxoplasma gondii* en bivalvos silvestres de los archipiélagos Kerguelen y Galápagos: influencia de la proximidad a poblaciones de gatos, exposición a corrientes marinas y densidad de algas. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38885873>.
11. Sağlam, T., Düşen, S., Mete, E., & Karaman, Ü. (2022). Evaluación comparativa de la secuencia Re 529-Bp y el gen *BI* en la detección de *Toxoplasma gondii* mediante PCR en muestras de agua de Denizli, Turquía. Acta Parasitológica, 67(1), 555–559. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00494-1>.
12. Santoro, M., Viscardi, M., Sgroi, G., D'Alessio, N., Veneziano, V., Pellicano, R., ... & Fusco, G. (2021). Corrección a: Detección por PCR en tiempo real de *Toxoplasma gondii* en muestras de tejido de jabalíes (*Sus scrofa*) del sur de Italia revela alta prevalencia y carga parasitaria. Parasites & Vectors, 14(1), 335. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05004-w>.
13. Zhao, X.-Y., & Elsheikha, H. M. (2020). La biología molecular y el control inmunológico de la infección crónica por *Toxoplasma gondii*. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32609097>.

Anexos



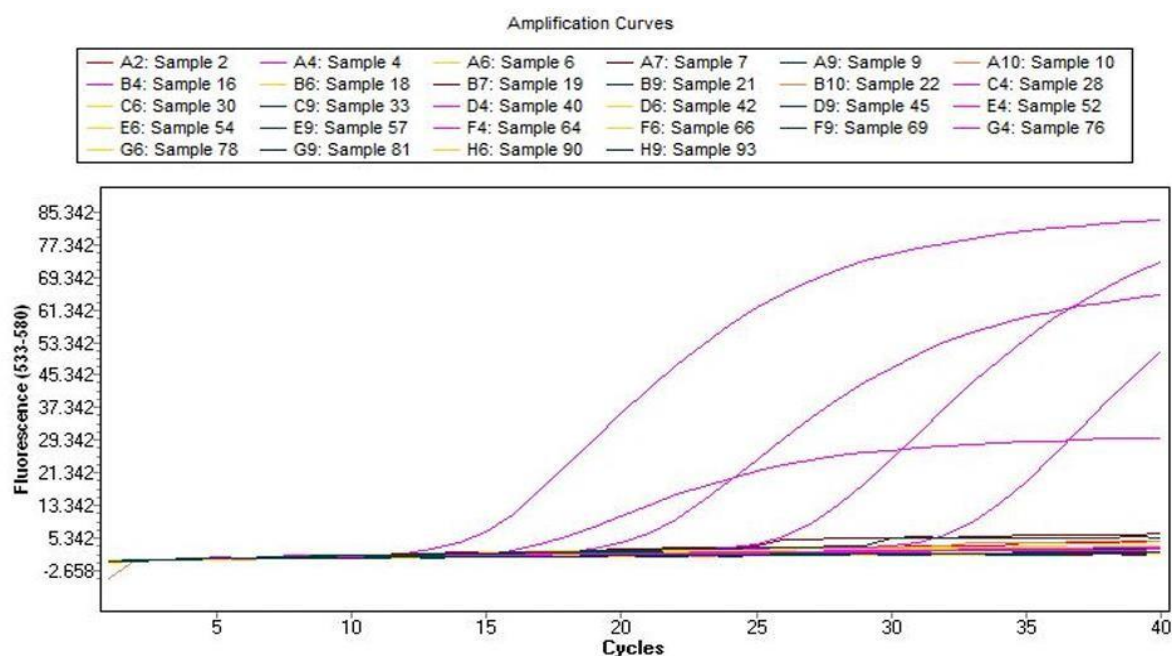
Anexo 1. Curvas de amplificación de concentraciones de 10 μ M y 100 μ M.

Elaborado por: LightCycler Roche System, 2025.



Anexo 2. Amplificación de parámetros del control positivo, réplicas de diluciones y muestras de sangre.

Elaborado por: LightCycler Roche System, 2025.



Anexo 3. Amplificación de parámetros del control positivo, diluciones y muestras de heces y tejidos.

Nota. Las curvas que se observan son de diluciones para realizar una curva estándar, sin embargo, no se utilizó esos datos, la correcta amplificación está en el anexo 2. Por otro lado, las muestras saliendo negativas.

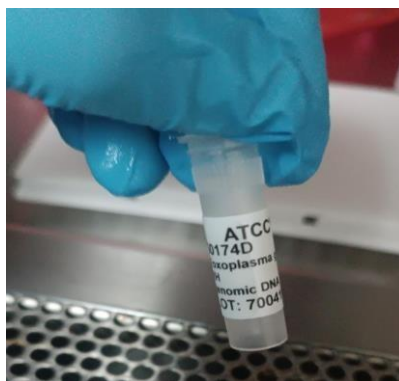
Elaborado por: Elaborado por: LightCycler Roche System, 2025.



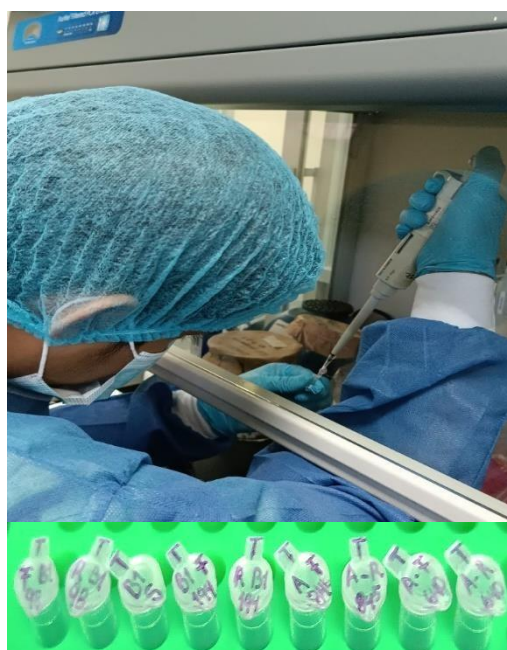
Anexo 4. Caja de primers y sonda.

Se observa los primers y sondas que se pidieron en conjunto con otras tesis en el laboratorio del Instituto Nacional de Salud Pública.

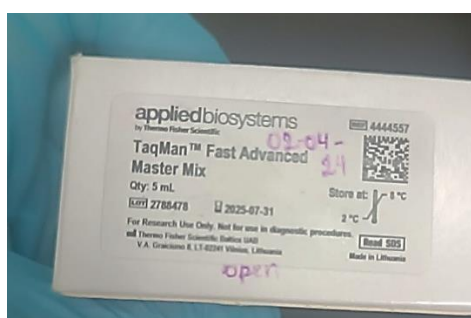
Elaborado por: Los autores, 2025.



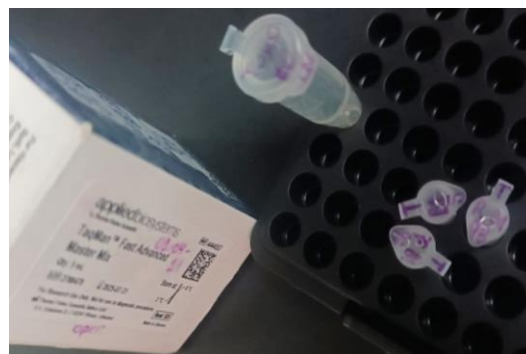
Anexo 5. Control positivo.
Elaborado por: Los autores, 2025.



Anexo 6. Elaboración de alícuotas de primers y sonda.
Elaborado por: Los autores, 2025.

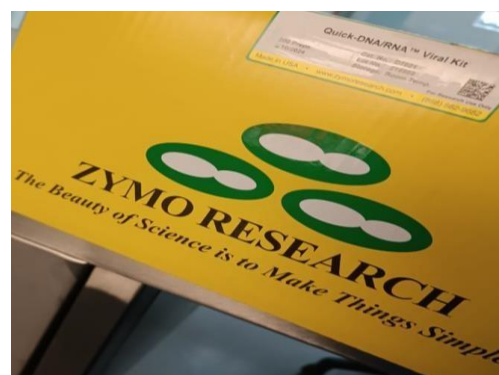


Anexo 7. Fast Advanced® MasterMIX.
Elaborado por: Los autores, 2025.



Anexo 8. Preparación de los ensayos 1 con una concentración de 100 μ M. y el ensayo 2 con una concentración de 10 μ M.

Se observa el Maxter mix, y los primers y sonda para la elaboración del ensayo 1, y el Maxter mix con las alícuotas de los primers y sonda para el ensayo 2. Elaborado por: Los autores, 2025.



Anexo 9. Kits de extracción de ADN para muestras de sangre y las muestras de heces y de tejidos.

Se observan los Kits de extracción: Kit comercial Wizard SV Genomic DNA Purification System Catalogo y Kit comercial Zymo Research Quick-DNA TM Miniprep Kit Catalogo.

Elaborado por: Los autores, 2025.



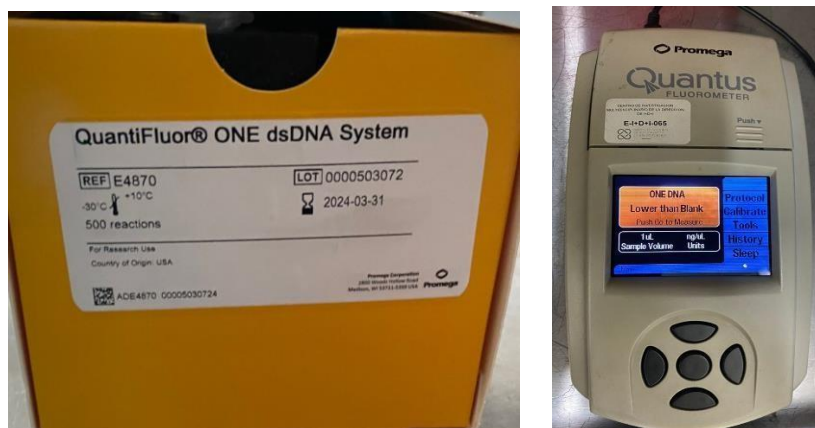
Anexo 10. Muestras biológicas.

Se observan las muestras de tejidos, en donde se puede ver que las cuatro primeras son correspondientes a carne de res y las seis siguientes a carne de chanco. Adicional, se observan los nombres de los felinos de donde fue recolectada las heces. Elaborado por: Los autores, 2025.



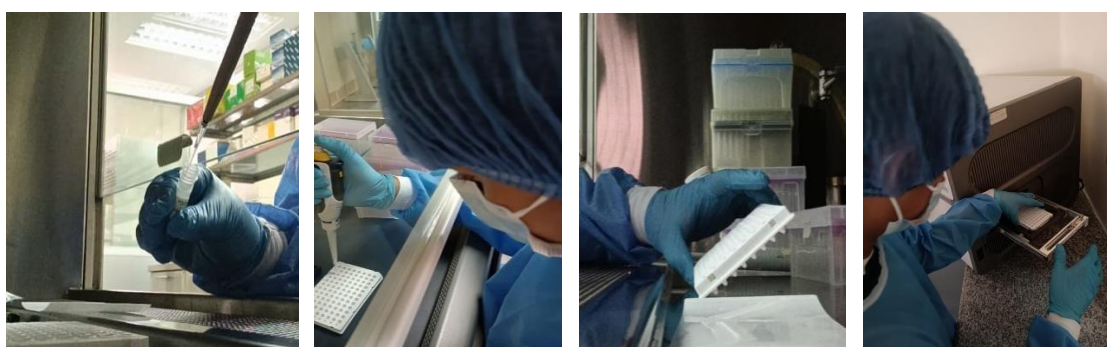
Anexo 11. Extracción y almacenamiento de muestras biológicas.

Se observa el proceso de corte de muestras, de extracción para tener el resultado final del ADN de las muestras y el almacenamiento de estas a -80° . Elaborado por: Los autores, 2025.



Anexo 12. kit Quantifluor® ONE dsDNA System Promega y Equipo Fluorímetro Quantus™
Kit.

Elaborado por: Los autores, 2025.



Anexo 13. Elaboración de placa qPCR y colocación de la misma en el termociclador.

Se observa el proceso de toma de reactivos y muestras para colocar en la placa de 96 pocillos de la qPCR. También, la colocación de la placa en el termociclador para el respectivo análisis.

Elaborado por: Los autores, 2025.