



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARÁSITOLOGÍA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL**

TRABAJO DE TESIS

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y GENOTIPIFICACIÓN DE *Toxoplasma gondii* EN TRES GÉNEROS DE MOLUSCOS BIVALVOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL EN PANAMÁ”

***MSc. NIVIA J. RÍOS CARRERA.
C.I.P. 9-218-877***

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. NIDIA SANDOVAL
ASESOR DE TESIS:
DRA. ZULEIMA CABALLERO**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MÁSTER EN
MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL**

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2021

AGRADECIMIENTO

Primero deseo agradecer a Dios por darme la fortaleza para terminar esta nueva etapa de mi vida. A la Dra. Nidia Raquel Sandoval y la Dra. Zuleima Caballero por todo el esfuerzo y tiempo dedicado en la asesoría de este trabajo, a los profesores Alex Martínez Torres, Jordi Querol-Audi y Fermín Mejía por sus sabios y atinados consejos en la asesoría y elaboración de mi tesis.

A las Licenciadas Delba Villalobos y Evelyn Henríquez por el apoyo brindado durante mi estadía en los Laboratorios de INDICASAT-AIP y a las estudiantes Isabel Cuevas, Mardi Spalding y Yeraldi Frías por todo el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras de moluscos bivalvos.

A mi familia y a todas aquellas personas que me dieron el apoyo moral y espiritual para lograr la terminación de este trabajo.

Este trabajo fue financiado gracias a los fondos adquiridos en la Convocatoria Universitaria para Fondos de Investigación VIP por un monto de \$ 10,000.00 (Consejo Administrativo, Reunión N°1-19 del 30 de enero de 2019); Convenio 041-53-2019 de los Fondos del Fideicomiso de Agua, Áreas Protegidas y Vida Silvestre del Ministerio de Ambiente (MA) por \$ 91200.00 y el Sistema Nacional de Investigación, Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación (SNI-SENACYT).

La parte experimental fue realizada gracias al apoyo logístico de los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y el Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA) de la Universidad de Panamá, para el procesamiento y preservación del material biológico y a los Laboratorios de INDICASAT-AIP donde se realizó la parte de detección y genotipificación molecular de *T. gondii* en las muestras de moluscos bivalvos.

Mil gracias a todos!

DEDICATORIA

A mis padres, Hilda N. Carrera de Ríos y Verísimo Ríos, mis hermanas (Gloria J. Ríos, Verónica I. Ríos e Hilda A. Ríos), por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida y siempre darme buenos consejos, los que me han llevado hasta donde estoy hoy día.

A mi esposo Luis B. Turner M. y mi hija Nery L. Turner Ríos quienes, con todo su esfuerzo, amor y dedicación, me apoyaron y dieron ánimos en los momentos más difíciles.

A mis profesores asesores, compañeros de carrera, amigos y a todas las personas que de una u otra forma estuvieron presentes y pendientes de que culminara esta etapa en mi vida.

Mil gracias.

Índice de Contenido

AGRADECIMIENTO	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>v</i>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>vii</i>
RESUMEN	<i>2</i>
ABSTRACT	<i>5</i>
1. INTRODUCCIÓN	<i>8</i>
2. REVISIÓN DE LITERATURA	<i>12</i>
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	<i>12</i>
2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	<i>12</i>
2.1.2 Ciclo de Vida de <i>T. gondii</i>	<i>13</i>
2.1.3 Estadios en el ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	<i>15</i>
2.1.3.1 Ooquistes:.....	<i>15</i>
2.1.3.2 Taquizoitos:	<i>16</i>
2.1.3.3 Bradizoítos:.....	<i>16</i>
2.2 Rutas de Transmisión de <i>T. gondii</i>	<i>17</i>
2.2.1 Ruta Fecal-Oral	<i>17</i>
2.2.2 Ruta Vertical	<i>18</i>
2.2.3 Contacto con Mucosas	<i>18</i>
2.2.4 Trasplantes de tejidos y órganos	<i>18</i>
3. Los Moluscos Bivalvos	<i>20</i>
3.1. Hábitats de Moluscos Bivalvos	<i>20</i>
3.2. Importancia Socioeconómica de los Moluscos Bivalvos	<i>21</i>
3.3. Bivalvos de Importancia Comercial en Panamá	<i>22</i>
3.3.1. <i>Leukoma asperima</i>	<i>22</i>
3.3.2. <i>Anadara tuberculosa</i>	<i>23</i>
3.3.3. <i>Donax spp.</i>	<i>25</i>
4. Los alimentos-Vehículos de transmisión de enfermedades parasitarias <i>25</i>	

5.	<i>Seguridad Alimentaria y el Consumo de Moluscos Bivalvos</i>	28
6.	<i>T. gondii en moluscos bivalvos y su impacto en salud pública</i>	29
7.	<i>Detección Molecular de T. gondii</i>	32
8.	<i>Genotipificación de T. gondii</i>	33
9.	OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	37
9.1	Objetivo General	37
9.2	Objetivos Específicos	37
10.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	37
11.	METODOLOGÍA	39
11.1.	Área de estudio y recolección de moluscos bivalvos	39
11.2	Diseño Experimental	40
11.4	Extracción y Cuantificación de ADN.....	41
11.5	Detección por PCR anidada del marcador molecular Gen B1 de <i>T. gondii</i>	42
11.6	Genotipificación de <i>T. gondii</i> utilizando el marcador molecular SAG2	42
11.7	Análisis estadístico	43
11.2	Frecuencia de infección de <i>T. gondii</i> en tres especies de bivalvos colectados en diferentes estaciones del año.....	45
11.3	Determinación de los principales linajes de <i>T. gondii</i> mediante la técnica de PCR-RFLP	46
13.	DISCUSIÓN	49
14.	CONCLUSIONES	55
15.	RECOMENDACIONES	55
16.	BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de los apicomplexa de importancia médica en humanos (Fresnadillo-Martínez et al., 2010).	13
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> (Black & Boothroyd, 2000).	14
Figura 3 Forma del quiste esporulado y no esporulado de <i>T. gondii</i> (Dubey, 2010).	15
Figura 4 Forma del taquizoíto de <i>T. gondii</i> (Tomada de: Ryan y Ray, 2017).	16
Figura 5 Formas tisulares quísticas (bradizoíto) de <i>T. gondii</i> (Galván y Mondragón, 2017).	17
Figura 6 Un "árbol" de transmisión de ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> (Adaptado de Bahia-Oliveira et al., 2017).	19
Tabla 1 Explicación de figura 6 Un "árbol" de transmisión de ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> (Adaptado de Bahia-Oliveira et al., 2017).	19
Figura 7 <i>Leukoma asperrima</i> . 1. Superficie externa formada por numerosas costillas radiales pequeñas, cruzadas por hilos concéntricos dando a la concha un aspecto enrejado o rugoso. 2. Coloración de blanco tiza a grisáceo, con manchas café oscuro o brillantes.	23
Figura 8 <i>Anadara tuberculosa</i> . 1. Concha bien sólida, de contorno ovalado y moderadamente alargada, superficie de color blanco, bajo una capa marrón o negra que la recubre (perióstraco). 2. Presenta unas 35 costillas radiales en cada valva, relativamente juntas.	24
Figura 9 <i>Donax</i> spp. 1. Región posterior corta, con porción externa punteada. 2. Región anterior alargada, con punta redondeada. 3. Superficie de las valvas de color violeta a marrón, casi lisas, con líneas o costillas inaparentes o bajas. 4. Vértice de las valvas (umbo) agudo.	25
Figura 10 Sitios de recolección de muestras de moluscos bivalvos en el Golfo de Panamá.	39
Figura 11 Porcentaje de positividad de <i>T. gondii</i> en los moluscos bivalvos.	45
Figura 12 Frecuencia mensual de <i>T. gondii</i> en las tres especies de bivalvos marinos recolectadas en el Golfo de Panamá.	46

Figura 13 Determinación por PCR anidada del marcador molecular alelo 3' SAG2 y 5' SAG2 en muestras de moluscos bivalvos positivas para el <i>gen B1</i>	47
Figura 14 Productos de la digestión enzimática de Alelo 3' SAG2 con la enzima Hha I. En las muestras se observa el patrón de restricción del tipo clonal II. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: Control negativo; Carril 3: vacío, Carril 4: Control positivo; Carril 5 y 6: Anadara marzo; carril 7: Donax octubre; carril 8: Anadara noviembre, carril 9 Leukoma noviembre; Carril 10 Donax noviembre; carril 11 y 12 Leukoma octubre y septiembre, para estas últimas no se obtuvo una amplificación (N/A) para este marcador molecular.	47

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1 Explicación de figura 6 Un "árbol" de transmisión de ooquistes de <i>Toxoplasma gondii</i> (Adaptado de Bahia-Oliveira et al., 2017).	19
Tabla 2 Número de genotipos aislados en diferentes regiones del mundo (Fuente: Shwab et al., 2014).	34
Tabla 3 Diseño Experimental para recolección de moluscos bivalvos.....	40
Tabla 4 Genotipificación directa de <i>T. gondii</i> mediante el marcador molecular SAG2 en moluscos bivalvos recolectados en el Golfo de Panamá.	47

RESUMEN

RESUMEN

T. gondii, es un parásito protozoo zoonótico de distribución mundial, capaz de infectar una amplia gama de animales de sangre caliente, incluyendo al hombre; su transmisión se da principalmente por la ingestión de ooquistes infectantes en el agua y/o alimentos de consumo crudo (frutas y vegetales) contaminados o a través del consumo de carne mal cocida con quistes tisulares del parásito.

La investigación sobre especies de mariscos contaminados con *T. gondii* representa un campo de estudio relativamente nuevo, dándose el primer reporte en el 2008 (Miller *et al.*, 2008); donde se informa que los moluscos bivalvos debido a su forma de alimentación por filtración, pueden concentrar los ooquistes en sus tejidos (branquias, sistema digestivo), convirtiéndose en una fuente de contaminación para animales que los consumen, incluyendo al hombre (Miller *et al.*, 2008; Putignani *et al.*, 2011; Aksoy *et al.*, 2014; Marquis *et al.*, 2015; Cong *et al.*, 2017; Ghozzi *et al.*, 2017; Coupe *et al.*, 2018; Santoro *et al.*, 2020).

En este estudio, se analizaron un total de 3.939 individuos de moluscos bivalvos, agrupados en 90 muestras (100 gramos cada una); divididas en 3 réplicas por especie de molusco bivalvo por semana de muestreo, completando 45 muestras por cada estación del año (Estación Seca y Lluviosa). Los puntos de muestreo elegidos fueron (Bahía de Chame - *Anadara tuberculosa*, Bahía de Bique - *Leukoma asperrima* y Playa Chinina - *Donax* spp.). Para la extracción de ADN, se utilizaron aproximadamente 200 mg de muestra de tejido homogenizado y se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Stool Minikit (Qiagen, Alemania). La detección del ADN del parásito se llevó a cabo mediante la prueba de PCR anidada (nPCR) utilizando el *gen B1* de *T. gondii* como marcador molecular. Como control positivo, se añadió ADN genómico de la cepa de *T. gondii* RH (tipo I). Los resultados obtenidos demostraron una frecuencia de infección de *T. gondii* en la población estudiada del 13,33% (12/90). Las especies de moluscos bivalvos se analizaron por separado, y los porcentajes de positividad fueron *Anadara* sp 5,56% (5/90), *Donax* sp. 4,44% (4/90) y *Leukoma* sp. 3,33% (3/90). No se muestran diferencias significativas en la frecuencia de infección de *T. gondii* entre las tres especies de moluscos bivalvos analizadas, ni entre los meses de muestreo (Estación seca o lluviosa; $\chi^2 = 0.3846$, $df = 2$, $p = 0.825$;). Adicionalmente, se determinó mediante la técnica de PCR-RFLP utilizando el marcador moléculas SAG2, que el genotipo que mayormente circula entre las especies de almejas estudiadas es el genotipo

II, siendo éste reportado en diferentes estudios alrededor del mundo, indicando nuestros resultados estan de acuerdo a los reportes internacionales.

ABSTRACT

ABSTRACT

T. gondii is a zoonotic protozoan parasite of worldwide distribution, capable of infecting a wide range of warm-blooded animals, including humans; its transmission occurs mainly through the ingestion of infecting oocysts in contaminated water and/or raw food (fruits and vegetables) or through the consumption of undercooked meat with parasite tissue cysts. Research on seafood species contaminated with *T. gondii* represents a relatively new field of study, with the first report coming in 2008 (Miller *et al.*, 2008); where it is reported that bivalve mollusks, due to their filter feeding, can concentrate the oocysts in their tissues (gills, digestive system), becoming a source of contamination for animals that consume them, including humans (Miller *et al.*, 2008; Putignani *et al.*, 2011; Aksoy *et al.*, 2014; Marquis *et al.*, 2015; Cong *et al.*, 2017; Ghazzi *et al.*, 2017; Coupe *et al.*, 2018; Santoro *et al.*, 2020).

In this study, a total of 3,939 individuals of bivalve mollusks were analyzed, grouped in 90 samples (100 grams each); divided into 30 samples per bivalve mollusk species and 45 samples for each season of the year analyzed (Dry and Rainy Season). The sampling points chosen were (Chame Bay - *Anadara tuberculosa*, Bique Bay - *Leukoma asperrima* and Chinina Beach - *Donax* spp.). For DNA extraction, approximately 200 mg of homogenized tissue sample was used and the commercial kit QIAamp DNA Stool Minikit (Qiagen, Germany) was used. Parasite DNA detection was performed by nested PCR (nPCR) using the *T. gondii* B1 gene as a molecular marker. As a positive control, genomic DNA of *T. gondii* strain RH (type I) was added. The results obtained showed a frequency of *T. gondii* infection in the studied population of 13.33% (12/90). The bivalve mollusk species were analyzed separately, and the percentages of positivity were *Anadara* sp 5.56% (5/90), *Donax* sp. 4.44% (4/90) and *Leukoma* sp. 3.33% (3/90). The frequency of *T. gondii* infection among the three species of bivalve mollusks analyzed showed no significant differences between bivalve mollusk species or between sampling months (dry or rainy season) ($\chi^2 = 0.3846$, $df = 2$, $p = 0.825$). Additionally, it was determined by PCR-RFLP technique using the SAG2 molecular marker, that the

genotype that mostly circulates among the clam species studied is genotype II, being this genotype reported in different studies around the world, indicating that our results agree with international reports.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias afectan a millones de personas que habitan principalmente en zonas tropicales. La mayoría de los países de América Latina no escapan de esta realidad principalmente por la falta de agua potable en zonas marginadas; este hecho conlleva a la falta de higiene y a malos hábitos en cuanto al manejo e ingestión de alimentos. La importancia de las Enfermedades Parasitarias Transmitidas por los Alimentos (EPTAs), ha aumentado en las últimas décadas debido a un conjunto de circunstancias que contribuyen con su aparición y dificultan su prevención. El inadecuado saneamiento ambiental, la acelerada urbanización, el no acceso al agua potable, la internacionalización de los viajes, la globalización del comercio, el alza en el consumo de alimentos preparados “listos para consumir” o fallas en el procesamiento de alimentos, son algunos de los factores que promueven la transmisión parasitaria a través de los alimentos (Fuentes *et al.*, 2014).

Las EPTAs son producidas por agentes etiológicos con ciclos de vida complejos, variadas rutas de transmisión, alta variabilidad antigénica y períodos prolongados entre la infección y la aparición de síntomas, lo cual conlleva a una patogenia compleja, transformándose en una carga para los Programas de Salud Pública (Bintsis, 2017). Estas enfermedades parasitarias poseen una alta relación con el ambiente o entorno donde interactúan con sus hospederos; es decir, los factores bióticos y abióticos juegan un papel muy importante en el establecimiento y desarrollo de la interacción ecológica, ya que éstos pueden ocasionalmente alterar el macro y microambiente necesario para la existencia, transmisión y subsistencia de los parásitos, tanto dentro de sus hospederos como en el ambiente externo (Salvatella, 1996, Tenter *et al.*, 2000).

La mayoría de los alimentos pueden ser potencialmente vehículos de transmisión de parásitos a la especie humana: desde el agua, las frutas y las verduras, los productos cárnicos y piscícolas, así como sus derivados, hasta todo tipo de

productos almacenados, cuyo proceso de conservación no impida la viabilidad de las formas parasitarias infectantes para el hombre (Nichols, 1999; Ortega, 2006).

Enfermedades como la amebiosis, la ascaridiosis e infecciones con protozoos como *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* y *Giardia*, provocan millones de infecciones a nivel mundial, con altos niveles de morbilidad y provocando entre 20000 a 100000 muertes cada año (Salvatella, 1996; Bintsis, 2017).

Brotos de gastroenteritis de diferentes etiologías bacterianas, virales, protozoarios y por toxinas, han sido reportados por el consumo de moluscos bivalvos contaminados (almejas, mejillones y ostras), ya que estos organismos se caracterizan por alimentarse por filtración de fitoplancton y materia orgánica en suspensión, por lo cual concentran los patógenos presentes en ambientes acuáticos o sitios de producción (Schet *et al.*, 2013). Este proceso de alimentación por filtración también puede dar lugar a la concentración de patógenos transmitidos por el agua, como los ooquistes de *T. gondii*, que pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo tanto en agua dulce como en agua salada (Lindsay y Dubey, 2009).

El consumo de moluscos contaminados con ooquistes de *T. gondii* crudos o poco cocidos puede ser un potencial riesgo para sus consumidores (Koutsoumanis *et al.*, 2018). La contaminación natural de los moluscos bivalvos por *T. gondii* está estrechamente relacionada con la capacidad de sus ooquistes para sobrevivir a las condiciones salinas que se encuentran en las aguas marinas de estuarios y costas. Los ooquistes de *T. gondii* pueden esporular en agua de mar a salinidades de 15 y 32 ppm a 24°C (Lindsay y Dubey, 2009). Experimentalmente, los ooquistes esporulados de *Toxoplasma* conservan su infectividad en agua dulce durante 15 meses a 20 - 25°C y 54 meses a 4°C, y al menos 6 meses en agua de mar a 15 ppm a la mismas temperaturas (Dubey, 1998; Wainwright, 2008; Lindsay y Dubey, 2009).

En Panamá, se consume muchos tipos de moluscos bivalvos, por lo que el riesgo de adquirir el *T. gondii* por su consumo es elevado. Indudablemente, los moluscos

bivalvos son un grupo de invertebrados que constituyen recursos de alta importancia comercial en nuestro país, ya que se reporta un alto consumo de estos organismos, especialmente de las especies *Donax* spp., *Leukoma asperrima* y *Anadara tuberculosa*, razón por la cual han sido seleccionadas para esta investigación, cuya finalidad es determinar mediante técnicas moleculares la presencia de *T. gondii* en estas tres especies de bivalvos.

La presencia de parásitos junto con muchas especies de virus y bacterias entéricas ha sido reportada en otras partes del mundo en muestras de moluscos bivalvos, pero aún en Panamá no hay reportes documentados de este hallazgo.

REVISIÓN DE LITERATURA

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Toxoplasma gondii*

2.1.1 Clasificación Taxonómica

T. gondii (del griego “*toxon*”, que significa “arco”), es un protozooario intracelular obligado, descrito por primera vez en la ciudad de Túnez (al norte de Africa) por Nicolle y Manceaux en 1908, y casi simultáneamente en Brasil por Splendore.

Nicolle y Manceaux aislaron este parásito de células mononucleares del bazo e hígado del roedor africano *Ctenodactylus goundii* y establecieron el género del parásito un año después. En un principio se consideró como una especie de *Leishmania*, pero años después, se concluyó que se trataba de una nueva especie de parásito intracelular. Debido a su forma arqueada y al nombre vulgar del roedor del que fue aislado se le denominó *Toxoplasma gondii* (Dubey, 2010). Luego, en 1937, Wolff y Cowen, en colaboración con Sabin; observaron un agente parecido, en el aislado del cerebro de un niño que presentaba problemas cefálicos, logrando determinar que se trataba de *T. gondii* (Thierman, 1973).

Este parásito pertenece al Filo Apicomplexa, Clase Sporozoea, Subclase Coccidia, Orden Eucoccidida, Suborden Eimeriina, Familia Sarcocystidae y Subfamilia Toxoplasmatinae (Petersen y Dubey, 2001) (Figura 1). Para completar su ciclo de vida, los miembros de esta subfamilia deben tener uno o más hospedadores vertebrados. Otros miembros pertenecientes a esta familia son los coccidios que afectan a los bovinos, causando abortos, como la *Neospora caninum*, *Besnoitia besnoiti*, agente causal de la besnoitiosis y también se incluye la *Hammondia hammondi*, que necesita de los felinos como sus hospedadores definitivos y que a la vez es un protozooario muy relacionado con *T. gondii* (Petersen *et al.*, 2001; Raiden *et al.*, 2013).

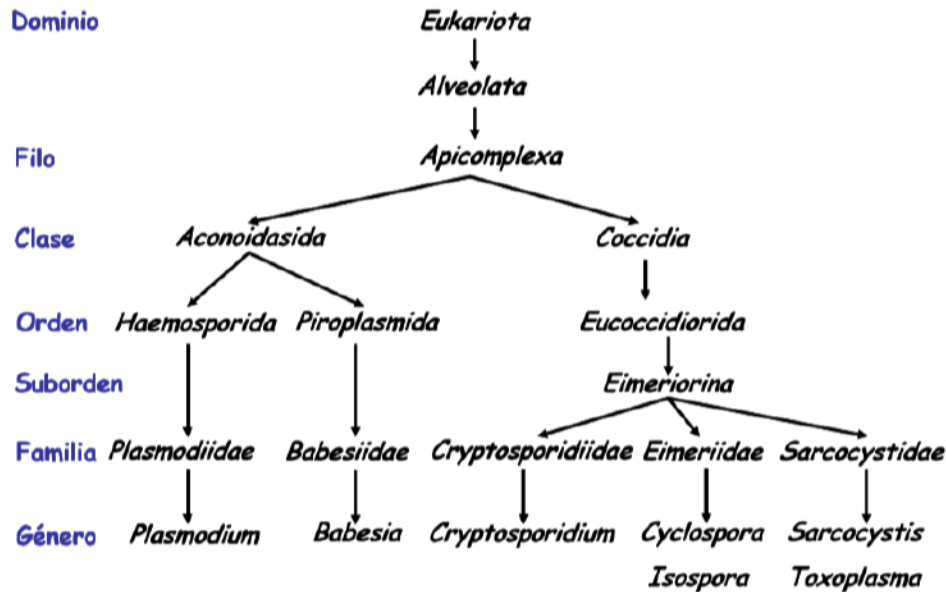


Figura 1 Clasificación de los apicomplexa de importancia médica en humanos (Fresnadillo-Martínez *et al.*, 2010).

2.1.2 Ciclo de Vida de *T. gondii*

El ciclo de vida de *T. gondii* comprende tres fases: la enteroepitelial (en hospederos definitivos), la extraintestinal (en hospederos intermediarios y definitivos) y la esporogónica, que ocurre en el medio ambiente (Dubey, 2010).

Una vez se da la ingestión de ooquistes o quistes tisulares por los hospederos definitivos (felinos), comienza la digestión disolviendo la pared de estos por enzimas proteolíticas. Los esporozoítos y bradizoítos son liberados y penetran el epitelio intestinal y es en esta fase enteroepitelial donde se desarrollan numerosas generaciones en los cinco tipos o estadios asexuales. Dos días después, inicia la reproducción sexual (gametogonia) que ocurre exclusivamente en el intestino del gato, cuando los merozoítos inician la formación de los gametos a partir de 3 a 15 días de la infección. El cigoto se forma, debido a que los microgametos masculinos penetran los macrogametos femeninos. Más tarde se transforman en ooquistes, que van al lumen intestinal y posteriormente, salen al ambiente en las heces del felino (Dubey, 2006; Dubey, 2010).

En los hospedadores definitivos e intermediarios, las formas infectivas en la fase extra-intestinal llegan a la lámina propia del intestino, donde se multiplican en el endotelio vascular, fibroblastos, células mononucleares y leucocitos segmentados, dándose la formación de los taquizoítos y por ende, los bradizoítos (Dubey, 2006 y 2010). Estos últimos se mantienen dentro de quistes tisulares en diferentes órganos o tejidos. Sin embargo, prefieren establecerse en el tejido nervioso, los ojos, el músculo esquelético y el músculo cardíaco, desarrollándose la fase crónica de la enfermedad (Giraldo *et al.*, 2008; Berdión *et al.*, 2015).

En la última fase esporogónica, los ooquistes no esporulados que se encuentran esparcidos en el ambiente tienen la capacidad de esporular bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Durante este proceso de esporulación los ooquistes producen cuatro esporozoítos a partir de los dos esporozoítos presentes inicialmente, formándose así el estadio infeccioso del parásito (Dubey, 2010; Figura 2).

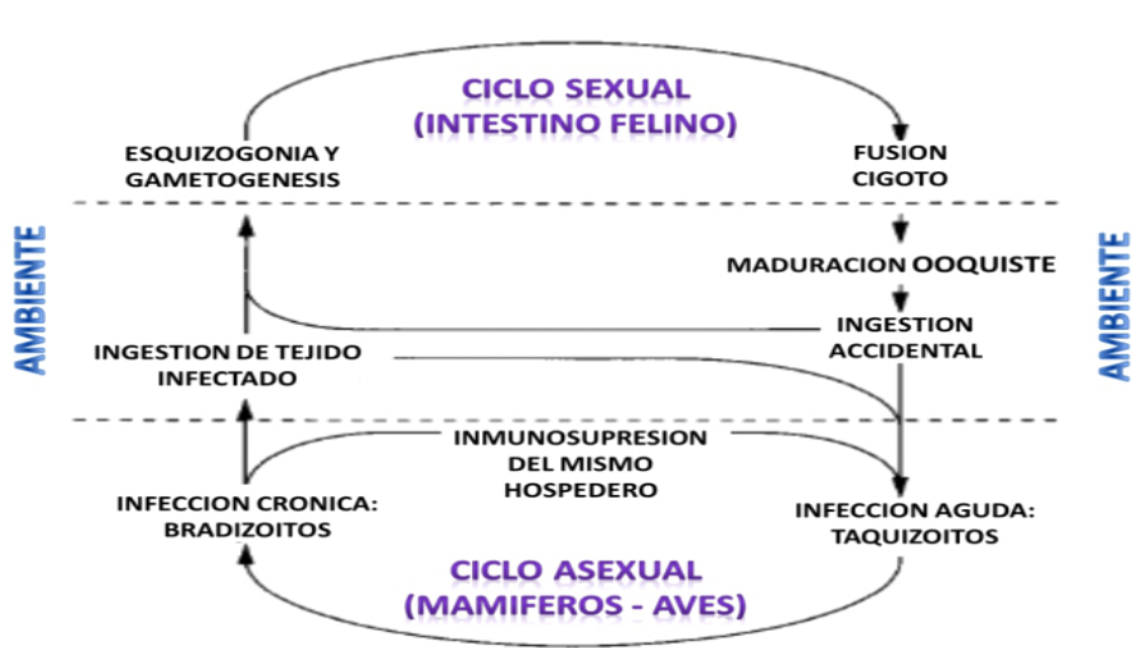


Figura 2 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Black & Boothroyd, 2000).

2.1.3 Estadios en el ciclo de vida de *T. gondii*

T. gondii posee una reproducción sexual que ocurre exclusivamente en los hospederos definitivos, los felinos; y su reproducción asexual ocurre tanto en los hospedadores definitivos como en los hospederos intermediarios (especies de sangre caliente, incluyendo al hombre).

Este parásito presenta tres formas o estadios diferentes:

2.1.3.1 **Ooquistes:**

Tienen forma ovoide y miden entre 10 a 15 μm de diámetro y poseen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno (Figura 3). Esta forma solo se encuentra en el intestino de los felinos (hospedador definitivo) como resultado de su fase sexual. Cuando los felinos se encuentra en una infección primaria activa, tienen la capacidad de excretar millones de ooquistes en su materia fecal en un lapso aproximado de 7 a 21 días. Los ooquistes excretados se convierten en infecciosos tras la esporulación. Este proceso da lugar a la formación de dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoitos (Figura 3). Suele completarse en 7 días a 20 - 25 °C en condiciones aeróbicas y de humedad apropiadas, aunque puede retrasarse a temperaturas más bajas (4 -11 °C) (Dubey *et al.*, 1970), e incluso anularse tras una congelación constante a -21 °C durante 1 día o -6 °C durante 7 días (Frenkel y Dubey, 1973). Se considera que los ooquistes esporulados son más resistentes a las agresiones ambientales que los no esporulados. Este aumento de la resistencia puede deberse a la presencia adicional de la pared del esporocisto y a la supuesta capacidad de los esporozoitos de protegerse contra las variaciones de temperatura, la desecación y la radiación ultravioleta (Fritz *et al.*, 2012b). Estas formas de vida pueden permanecer hasta 18 meses viables en tierras húmedas, las cuales sirven de reservorio ambiental (Toro-Montoya, 1995; Dubey, 2010).

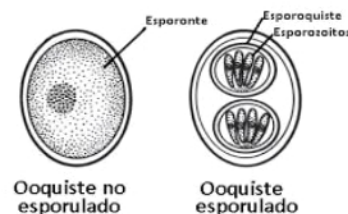


Figura 3 Forma del quiste esporulado y no esporulado de *T. gondii* (Dubey, 2010)

2.1.3.2 Taquizoitos:

Presentan forma de luna creciente y son la forma asexual invasiva del parásito (Figura 4). Infectan prácticamente casi todas las células nucleadas y después de varios ciclos de replicación, se acumulan en grupos de 8 a 32 (**Pseudoquistes**) antes de lisar las células hospederas. Una vez lisada la célula, los taquizoitos son liberados y diseminados por vía sanguínea, donde emprenden su viaje para infectar diversos tejidos, preferentemente el sistema nervioso central-SNC, ojos, corazón y placenta. Los pseudoquistes juegan un papel importante en la transmisión de la Toxoplasmosis a los félicos por ingestión ya sea de roedores, aves u otros hospederos en fase aguda, ya que el estado evolutivo infectivo en este caso serían los taquizoitos embebidos en los pseudoquistes.

Los Taquizoitos son las formas o estadios que inducen la respuesta inflamatoria y la destrucción de los tejidos, que está asociada con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Cuando la fase aguda de la infección concluye, estos se transforman en bradizoitos para formar los quistes tisulares (Montoya y Liesenfeld, 2004).

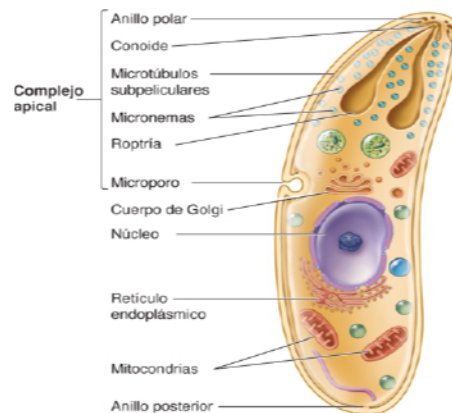


Figura 4 Forma del taquizoito de *T. gondii* (Tomada de: Ryan y Ray, 2017).

2.1.3.3 Bradizoitos:

Poseen un aspecto arqueado y miden entre 6-7 μm e longitud. Persisten durante toda la vida del hospedero y se reproducen lentamente en los tejidos (tienen preferencia por cerebro, músculo esquelético y cardíaco). Estos surgen como mecanismo de defensa al sistema inmune del hospedador y se encuentran

contenidos en estructuras denominadas quistes tisulares, permaneciendo latentes en el organismo, sin causar ninguna respuesta inflamatoria.

Sin embargo, ante una deficiencia del sistema inmune, pueden transformarse nuevamente en taquizoitos y causar sintomatología (Giraldo *et al.*, 2008; Berdión *et al.*, 2015). Aunque sean sensibles a temperaturas mayores a 60°C, son relativamente resistentes a los jugos digestivos y por esta razón, pueden transmitir la infección cuando son ingeridos en carnes crudas o mal cocidas (Montoya y Liesenfeld, 2004).

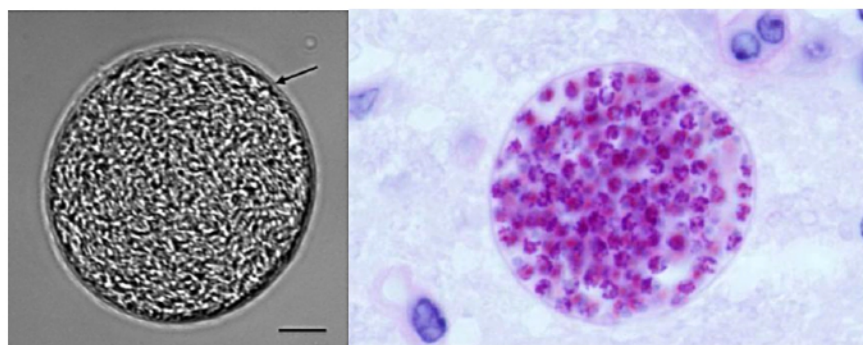


Figura 5 Formas tisulares quísticas (bradizoíto) de *T. gondii* (Galván y Mondragón, 2017).

2.2 Rutas de Transmisión de *T. gondii*

2.2.1 Ruta Fecal-Oral

En los humanos, la principal fuente de transmisión es debida al consumo de carne poco cocida o cruda (Carnivorismo), la cual puede contener quistes tisulares del parásito. Otras rutas de infección pueden ser el mal lavado de frutas o vegetales, los cuales pueden contaminarse con ooquistes del parásito debido a suelos y fuentes de agua contaminados. Los ooquistes generalmente son liberados a través de las heces de gatos enfermos con toxoplasmosis aguda (Montoya y Liesenfeld, 2004; Dubey, 2004; Dawson, 2005). Es por esta razón, que tanto los hábitos alimenticios como los hábitos de higiene, desempeñan un papel importante en la transmisión de *T. gondii* (Dubey y Dubey, 2011).

Por otro lado, *Toxoplasma* es capaz de infectar una amplia gama de hospederos (Lehmann *et al.*, 2006). Casi todas las clases de animales de sangre caliente (mamíferos, aves) y algunos reptiles, son hospederos intermediarios y pueden

infectarse a través de la caza de otros animales infectados con quistes tisulares o con agua contaminada con ooquistes esporulados del parásito (Cabezón *et al.*, 2011; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2011). Recientemente, se ha demostrado que el consumo de mariscos también es un factor de riesgo para adquirir la infección por *Toxoplasma gondii* entre animales y seres humanos (Figura 6) (Jones *et al.*, 2009; Conrad *et al.*, 2005).

2.2.2 Ruta Vertical

Una importante ruta de contagio es la transmisión vertical o congénita, la cual se produce cuando la madre adquiere la infección primaria durante la gestación y el parásito atraviesa la placenta hasta llegar al feto (Dunn *et al.*, 1999). Cuando la fase aguda sucede en mujeres gestantes, tiene lugar la toxoplasmosis congénita. La probabilidad de infección congénita es prácticamente nula en hijos de mujeres con anticuerpos e inmunidad específica contra el parásito. No obstante, puede ser difícil discriminar el momento de la infección aguda y el inicio de la gestación (Elsheikha, 2008).

2.2.3 Contacto con Mucosas

Una fuente de contaminación significativa pueden ser las salpicaduras con material infeccioso de *T. gondii*, ya sean muestras viables manipuladas en el laboratorio o heces de gatos, sobre superficies del cuerpo como las mucosas ocular y bucal (Dubey, 2010).

2.2.4 Trasplantes de tejidos y órganos

Antes de realizar el procedimiento de trasplantes de tejidos y órganos, los pacientes dadores deben ser examinados para evitar una transmisión de *T. gondii* a las personas receptoras (este cuidado también se debe realizar cuando aplica con animales) (Dubey, 2010). Asimismo, la transfusión de sangre constituye también un elemento esencial en la transmisión del parásito. Por ello, es de vital importancia una evaluación previa del donante (Dubey, 2010).

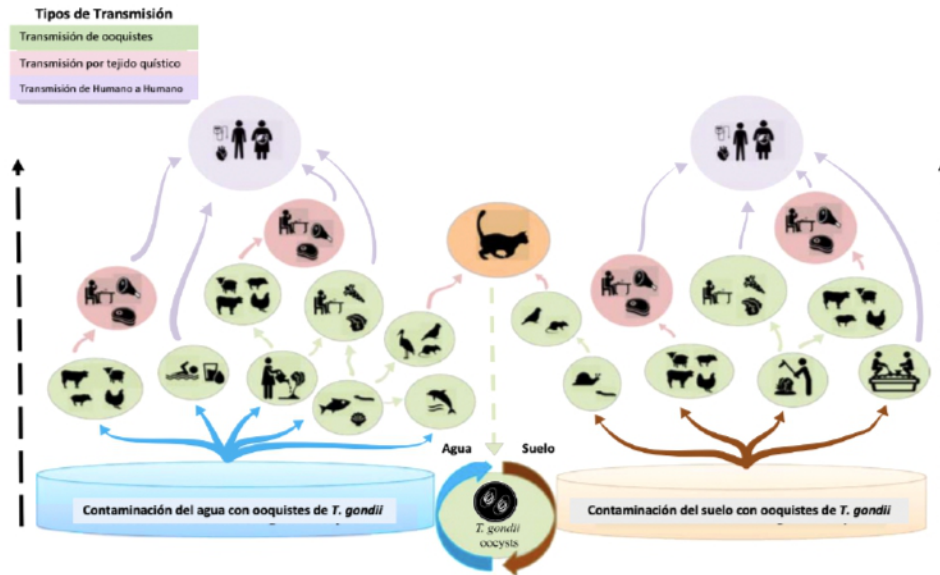


Figura 6 Un "árbol" de transmisión de ooquistes de *Toxoplasma gondii* (Adaptado de Bahia-Oliveira et al., 2017).

Nota: El flujo de transporte ambiental e infección por *T. gondii* comienza con los ooquistes vertidos en las heces de los gatos, que contaminan el suelo y/o el agua, y se transmiten posteriormente a los hospederos (intermedios, paraténicos y definitivos).

Tabla 1 Explicación de figura 7 Un "árbol" de transmisión de ooquistes de *Toxoplasma gondii* (Adaptado de Bahia-Oliveira et al., 2017).

Coloraciones Esquema	Representan:
Óvalos y las flechas verdes	Diferentes fuentes/escenarios de contaminación/infecciones causadas por la ingestión de ooquistes.
Óvalos y las flechas rosas	Son escenarios de transmisión a través de bradizoítos (tejido quístico).
Óvalos y las flechas púrpuras	La transmisión entre humanos, causada por infecciones verticales (congénitas), transfusionales o de trasplante de órganos.
El agua se representa en azul con flechas azules	La infección o la contaminación transmitida directamente de las fuentes de agua a los hospederos.
El suelo se representa en marrón con flechas marrones	La infección o contaminación transmitida directamente de las fuentes de suelo a los hospederos.

3. Los Moluscos Bivalvos

Los moluscos bivalvos, son componentes clave de los entornos marinos y estuarios porque, como filtradores, desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la calidad del agua y la integridad del ecosistema (Coen *et al.*, 2007). También, los bivalvos son un recurso importante para los habitantes de las costas y en la mayoría de los lugares donde se desarrolle la recolección tradicional de estas poblaciones naturales de estos organismos. Aunque actualmente, en todo el mundo está siendo sustituida por iniciativas de acuicultura semi-intensiva (Dumbauld *et al.*, 2009). De acuerdo con las estadísticas de la FAO en 2012, para el año 2010 los moluscos representaron el 23.6% de la producción mundial de productos acuícolas, equivalentes a 14.2 millones de toneladas. En las Américas, su contribución a la producción se estimó en el 20.4% (Martinez y Vasquez, 2014).

Pasar de la recolección de camas naturales a las iniciativas de acuicultura, ha aumentado el riesgo, incluida la presencia de patógenos protozoarios capaces de producir pérdidas significativas en su producción, esto derivado de su condición de alimentarse por filtración, por lo cual, poseen alta capacidad de concentrar patógenos humanos que ponen en riesgo a sus consumidores (Robertson, 2007).

3.1. Hábitats de Moluscos Bivalvos

Los bivalvos han colonizado prácticamente cualquier hábitat acuático, aunque mayoritariamente viven enterrados en sedimentos en el fondo del mar o en ambientes de agua dulce. La mayoría habita en la zona de los trópicos, así como en aguas templadas. Algunas especies son muy sensibles a su hábitat y sólo se encuentran en ecosistemas muy concretos. La mayoría de los bivalvos viven en hábitats bentónicos donde excavan y se entierran a diferentes profundidades. Se considera como hábitat de un bivalvo al formado por tres aspectos interrelacionados: forma de vida, forma de locomoción o asentamiento y forma de alimentación. Sobre esta base, se relacionan las características de la concha y el tipo de hábitat que está asociado con las mismas. Muchos tienen una vida sedentaria o incluso sésil, en ocasiones pasando toda su vida en la misma área

donde se asentaron en su etapa juvenil. Muchos de estos viven en la zona intermareal, donde solo hay agua cuando la marea es alta pero los sedimentos se mantienen húmedos siempre. En el caso de los bivalvos no sésiles, usan la estructura muscular del pie para moverse entre sus hábitats (Darrigran, 2013; Recio, 2016).

La temperatura y la salinidad son factores que no solo establecen límites en la distribución espacial de bivalvos, sino que también afectan todos los aspectos de su biología, incluida la alimentación, reproducción, crecimiento, respiración, osmorregulación y las interacciones entre parásitos y enfermedades. En las regiones costeras y estuarinas, la salinidad es un factor limitante de mucha importancia (Getchell *et al.*, 2016).

3.2. Importancia Socioeconómica de los Moluscos Bivalvos

El Pacífico este tropical es uno de los lugares más ricos en diversidad y recursos marinos del mundo. La costa Pacífica de Costa Rica, Panamá y Colombia se extiende por más de 4000 km, en el centro del Pacífico Americano, en medio de las importantes corrientes marinas que aportan riqueza de nutrientes. Gracias a la posición privilegiada de estos tres países, se ha desarrollado la pesca de manera artesanal en las costas del Pacífico (Posada *et al.*, 2014).

De acuerdo a la Guía Básica para el cultivo de moluscos bivalvos del Pacífico panameño, en Panamá se promueve el cultivo de moluscos y bivalvos como una alternativa para la producción de alimentos, generar empleos, divisas y para el repoblamiento con fines de recuperación de las poblaciones silvestres o naturales (ARAP, 2012).

La recolección de moluscos bivalvos es una actividad realizada por hombres, mujeres y jóvenes, a nivel rural a pequeña escala. Esta actividad supone una alternativa de producción viable para las comunidades pesqueras que viven en condiciones de extrema pobreza. Estos organismos poseen un gran potencial para

contribuir al alivio de la pobreza, como fuente económica y de proteína animal, además de generar empleos y fuentes de ingresos alternativas a la pesca. La recolección de moluscos bivalvos normalmente se realiza de forma artesanal por las comunidades de pescadores de la zona, en las que, en algunos casos, la actividad se practica meramente por subsistencia (Rodríguez, 2009). Estos organismos han tenido usos tradicionales en la manufactura y la industria textil: nácar en botones, colorantes, etc. Adicionalmente, sus conchas trituradas se utilizan para reducir la acidez y mejorar la calidad de los suelos.

Su recolección se ha mantenido en el tiempo y ha dado paso a una presencia importante en la gastronomía, así como en ensayos de reproducción en cautividad para satisfacer la demanda alimentaria (García-Meseguer *et al.*, 2017).

3.3. Bivalvos de Importancia Comercial en Panamá

Leukoma asperrima, *Donax spp.* y *Anadara tuberculosa* son especies de gran consumo y explotación en las playas arenosas y manglares, constituyéndose en un recurso de gran importancia económica en algunos países, incluyendo Panamá (López *et al.*, 2005).

3.3.1. *Leukoma asperrima*

Leukoma asperrima, anteriormente conocida como *Prototaca asperrima*, pertenece al Phylum Mollusca, de la Clase Bivalvia, Familia Veneridae. Su concha es grisácea-amarillenta o blancuzca en adultos, con una gran variedad de manchas café en los estadios juveniles, que la confunden en el sustrato donde se localiza. Sus valvas poseen costillas finas dándole un aspecto áspero. Concha subcircular o subovada, generalmente de aspecto tosco, moderadamente convexa, esculturada, pero muy toscamente y con radios (Figura 7).



Figura 8 *Leukoma asperrima*. 1. Superficie externa formada por numerosas costillas radiales pequeñas, cruzadas por hilos concéntricos dando a la concha un aspecto enrejado o rugoso. 2. Coloración de blanco tiza a grisáceo, con manchas café oscuro o brillantes.

Los radios son esculturados y las costillas radiales tienden a disecarse de forma que se convierten en pares o tríos en el margen ventral (Campos Machado, 2007). Representa un producto marino muy apetecido por la población panameña. Para muchas poblaciones humanas costeras, este bivalvo es una fuente importante de proteína en su dieta y además de ser una fuente de ingreso económico en muchos hogares, por ser un producto muy cotizado en los restaurantes (López *et al.*, 2003). Tiene como preferencia playas de sustrato arenoso fangoso con mucha materia orgánica.

En nuestro país hay varias playas con las condiciones adecuadas para su desarrollo. Sin embargo, en Playa Bique, Arraiján, es donde la extracción de esta especie es mayor, supliendo los requerimientos para la ciudad de Panamá.

3.3.2. *Anadara tuberculosa*

Anadara tuberculosa, es un molusco bivalvo de la familia Arcidae, compuesto por dos valvas, conchas grandes y ovaladas. Las valvas presentan entre 33 y 37 costillas. El color es blanco recubierto por una membrana (periostraco) de color café oscuro, hasta negro (Figura 8).

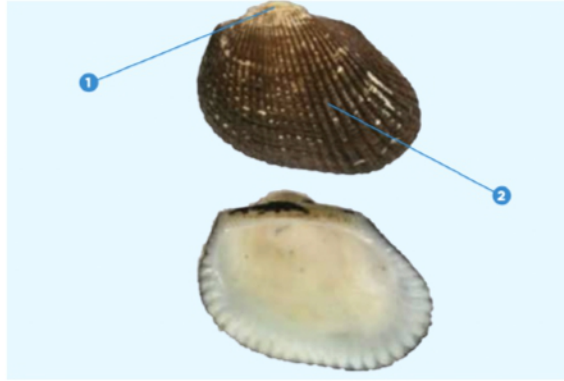


Figura 9 Anadara tuberculosa. 1. Concha bien sólida, de contorno ovalado y moderadamente alargada, superficie de color blanco, bajo una capa marrón o negra que la recubre (periostraco). 2. Presenta unas 35 costillas radiales en cada valva, relativamente juntas.

Como el suelo del manglar es ácido, el periostraco se destruye a medida que el molusco envejece y se observa el color de la concha (blanca). Es habitante de manglares y se les asocia a las raíces del mangle rojo, mangle caballero y el piñuelo. Se distribuye en suelos blandos, fangosos, con salinidades del agua retenida en el manglar no inferior a 10 ups (unidades prácticas de salinidad). Es un molusco que se utiliza comercialmente en toda su área de distribución. En áreas de manglares con pequeñas dimensiones, los habitantes la utilizan para el autoconsumo. Se considera que la “concha negra” es uno de los principales recursos extractivos de las comunidades que viven aledañas a los sistemas de manglares, aportando proteínas a su dieta y recursos económicos como producto de comercialización. Se recolecta de forma manual. Se comercializa entero, con su concha, por docena o se extrae la carne y se comercializa por peso. Se utiliza para la preparación de ceviches y diferentes platos de mariscos, ya sea solo o mezclado con otros moluscos y crustáceos (Cubilla Ríos, 2016).

Como fuente de proteínas y recurso económico, para los habitantes de las costas del Pacífico litoral panameño, *A. tuberculosa* se convierte en uno de los recursos más importantes siendo uno de los moluscos más explotados (Jordán y Gómez, 2006). En Panamá, existe una fuerte explotación pesquera en los manglares de San Miguel, Montijo, Chiriquí y Chame (Cubilla Ríos, 2016).

3.3.3. *Donax spp.*

Es un molusco bivalvo de la Familia Donacidae que habita en los fondos arenosos en aguas someras tropicales y subtropicales. Es ovalada romboidal con el extremo anterior redondeado y el extremo posterior truncado, con puntuaciones en las estrías longitudinales, las cuales son más grandes en el extremo anterior y la vertiente posterior. Coloración blanquecina, interior púrpureo claro, más oscuro en el extremo posterior (Figura 9) (Paredes y Cardoso, 2001). Son una fuente de alimento para el hombre y se le conoce como conchita blanca, conchuela o almejita.



Figura 10 *Donax spp.* 1. Región posterior corta, con porción externa punteada. 2. Región anterior alargada, con punta redondeada. 3. Superficie de las valvas de color violeta a marrón, casi lisas, con líneas o costillas inaparentes o bajas. 4. Vértice de las valvas (umbo) agudo.

4. Los alimentos-Vehículos de transmisión de enfermedades parasitarias

La transmisión de enfermedades a través de los alimentos puede ser causada por contaminantes: físicos, como fragmentos de vidrio, metal, plástico o madera, piedras, agujas, espinas, conchas, arena, u otros materiales extraños que pueden ingresar vía oral y dañar al consumidor; productos químicos como pesticidas, contaminantes inorgánicos tóxicos, antibióticos, promotores del crecimiento, aditivos alimenticios tóxicos, lubricantes, pinturas, toxinas de mariscos, histamina (pescado), micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina), dioxinas, nitrosaminas, partículas materiales de embalaje y biológicos como: bacterias, virus y parásitos patógenos (ASAE, 2017; Vejarano *et al.* 2017).

El desarrollo de la economía en la industria alimentaria, la aparición de nuevas tendencias alimentarias, el desarrollo del comercio y el interés del consumidor por conocer cada vez más el valor nutricional de los alimentos, conduce a un mayor control sobre la calidad y la seguridad de los alimentos (Boqvist *et al.*, 2018). Aunque a lo largo de los años las políticas de alimentación y nutrición han evolucionado a nivel mundial, el progreso es desigual y los brotes de contaminación de alimentos causados por microorganismos, productos químicos y toxinas son comunes en muchos países (Fuentes *et al.*, 2014). Hay más de 250 enfermedades transmitidas por los alimentos, la mayoría de las cuales son causadas por bacterias, seguidas de virus y parásitos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2.2 millones de personas en todo el mundo pueden morir por enfermedades diarreicas causadas por bacterias, virus y parásitos (OMS, 2008). La contaminación por microorganismos puede ocurrir en varios puntos críticos de control (PCC) hasta llegar al consumidor, desde la producción, manipulación a la preparación del alimento (ASAE, 2017; Vejarano *et al.*, 2017).

Los parásitos se identifican como la segunda causa etiológica más frecuente de mortalidad entre los niños menores de cinco años. A nivel mundial, son responsables de 1700 millones de casos de diarrea, lo que conduce a 842000 muertes por año (Baldursson y Karanis, 2011; Efstratiou *et al.*, 2017). Además, son de interés para la salud pública, ya que poseen cubiertas externas de protección y resistencia a factores externos que les asegura la supervivencia en condiciones hostiles. Se transmiten por las vías fecal-oral y por transmisión zoonótica, pudiendo causar graves enfermedades gastrointestinales. También, se han asociado con el retraso en el crecimiento y la malnutrición en los niños (Chekley *et al.*, 1998).

Los principales protozoos parásitos que causan enfermedades transmitidas por alimentos y agua contaminados son *Cryptosporidium spp.*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis* y *Toxoplasma gondii* (Gómez-Couso *et al.*, 2004; Dawson, 2005; Efstratiou *et al.*, 2017). Estas especies causan infección en una amplia variedad de hospederos vertebrados, incluyendo al hombre,

causando la criptosporidiosis, la giardiosis, amebiosis, cyclosporidiosis y toxoplasmosis, siendo esta última una de las infecciones más comunes en todo el mundo.

Estos patógenos parásitos se encuentran también citados en el Top 10 de las enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos y el agua contaminada (WHO, 2008; CDC, 2015). Los virus y las bacterias son los más estudiados, y reportados a nivel mundial y aunque los protozoos también juegan un papel importante en el riesgo de infección a través de estas matrices, no se han estudiado ampliamente (Palos Ladeiro *et al.*, 2013).

Los parásitos protozoos como *T. gondii* son ubicuos en el medio ambiente y se encuentran principalmente en suelo y el agua, donde llegan por escorrentías a ríos, arroyos, lagos, aguas recreativas, estuarios y océanos, pudiendo alcanzar otros vehículos para su transmisión como el agua, frutas, legumbres y animales acuáticos. Actualmente, la toxoplasmosis se considera como una de las principales causas de muerte atribuidas a enfermedades transmitidas por alimentos.

Los patógenos transmitidos por los alimentos pueden causar enfermedades agudas y crónicas, de diversos grados de gravedad, que en algunos casos pueden causar la muerte. En la política de seguridad alimentaria, la relevancia de los patógenos se determina mediante la comparación cuantitativa de su impacto en la salud pública, siendo una información esencial en la toma de decisiones para alertar al sistema de gestión y evaluación de riesgos (Mangen *et al.*, 2015).

La reducción de las enfermedades transmitidas por los alimentos se puede lograr, analizando cada etapa de la cadena de producción de alimentos. Sin embargo, es un proceso difícil, ya que depende de identificar la fuente de los riesgos, así como el proceso para eliminarlos (Cody y Stretch, 2014).

5. Seguridad Alimentaria y el Consumo de Moluscos Bivalvos

Los moluscos bivalvos son una fuente de alimento nutritivo cuyo consumo y valor comercial ha aumentado dramáticamente en todo el mundo. Aunque el consumo de bivalvos puede contribuir a una dieta saludable, algunos pueden transmitir enfermedades (Oliveira *et al.*, 2011). Los patógenos protozoarios transmitidos por los alimentos y el agua pueden causar enfermedades graves en las personas. Tres especies comunes, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* y *Toxoplasma gondii*, pueden contaminar diversas especies de mariscos comerciales, incluidas los moluscos bivalvos. (Hohweyer *et al.*, 2013; Ghazi *et al.*, 2017; Coupe *et al.*, 2018).

En todo el mundo, las autoridades responsables de proteger el medio ambiente y la salud humana están cada vez más preocupadas por la calidad del agua de mar. Los ecosistemas costeros se han visto amenazados por la eliminación inadecuada de las aguas domésticas sin previo tratamiento, las descargas ilegales de aguas residuales y los desechos industriales (Ghozzi *et al.*, 2017), siendo este uno de los problemas sanitarios más críticos en los países de América Latina y otras zonas en desarrollo, ya que se contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las áreas costeras, afectando algunas zonas de importancia turística y/o pesquera (González *et al.*, 2000). El Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas reportó en el 2017, que más del 80% de las aguas residuales resultantes de las actividades humanas se vierten en los ríos o en el océano sin ningún tipo de tratamiento. Por otra parte, la OMS asocia las enfermedades gastrointestinales y respiratorias con la frecuente exposición a aguas superficiales contaminadas con residuos fecales (OMS, 2003).

La producción de mariscos y sus derivados es muy importante en la cultura culinaria en muchos países, teniendo un gran impacto económico principalmente en áreas costeras y mediterráneas (Giangaspero *et al.*, 2014). Los moluscos bivalvos se utilizan frecuentemente como bioindicadores en la evaluación de la calidad del medio ambiente. Entre sus varias características, su extensa distribución geográfica

y su naturaleza estacionaria los convierten en valiosos indicadores de la contaminación química y biológica (Koh *et al.*, 2013).

La mayoría de los moluscos bivalvos marinos se alimentan por filtración a través de las branquias, por acción ciliar del fitoplancton que se suspende en el agua. Los microorganismos patógenos que se encuentran en el agua, pueden filtrarse por las branquias durante la alimentación, concentrándose en el tracto intestinal (glándulas digestivas), acumulando cantidades considerables de estos contaminantes incluso si están en bajas concentraciones (Schets *et al.*, 2007; Tei *et al.*, 2016).

La calidad microbiológica de los moluscos bivalvos está relacionada con las condiciones sanitarias de las aguas donde se producen o habitan, lo cual es un problema de salud pública (Souza *et al.*, 2012). Las heces de origen humano y animal pueden contaminar diversos entornos, como tierras agrícolas, aguas urbanas, aguas residuales, ríos y aguas costeras, lo cual conlleva a la contaminación del agua del mar. Si la contaminación llega a los moluscos, cuando los consumidores los comen crudos o semicrudos, pueden representar un riesgo potencial para la salud pública (Giangaspero *et al.*, 2014).

Dada la capacidad de filtración de los moluscos bivalvos, se espera que las estructuras infecciosas suspendidas en el agua se concentren en estos organismos (Adell *et al.*, 2014; Palos Ladeiro *et al.*, 2014). De hecho, varios estudios han demostrado que los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium* y *Toxoplasma gondii* se acumulan en estos organismos (Schets *et al.*, 2007; Robertson, 2007).

6. *T. gondii* en moluscos bivalvos y su impacto en salud pública

Los invertebrados acuáticos pueden influir considerablemente en el transporte de *T. gondii* a través del agua, al aumentar la sedimentación y la posterior concentración de bentos, y al facilitar la ingestión por otros invertebrados vectores (Mazzillo *et al.*, 2013; Aguirre *et al.*, 2019). Se ha demostrado que el consumo de

mariscos es un factor de riesgo para adquirir la infección por *T. gondii* en animales y seres humanos (Arkush *et al.*, 2003; Conrad *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2009; Van Wormer *et al.*, 2016). Los ooquistes de *T. gondii* pueden permanecer viables durante al menos 2 años en el agua de mar y al menos 21 días después de su internalización por los moluscos bivalvos como *Mytilus galloprovincialis* (Arkush *et al.*, 2003; Lindsay y Dubey, 2009).

Recientemente, en países como Brasil, Italia, España y China, se ha demostrado que los moluscos bivalvos están infectados con parásitos intestinales humanos como *C. parvum*, *Giardia* y *T. gondii* (Potasman *et al.*, 2002; Esmerini *et al.*, 2010; Aksoy *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2015). Así pues, los bivalvos podrían utilizarse como biocentinelas o bioindicadores para los parásitos humanos (Villegas, 2014; Marquis, *et al.*, 2015).

T. gondii se ha estudiado durante mucho tiempo en los ambientes terrestres. Sin embargo, no es hasta años recientes que se ha vinculado a la infección de mamíferos marinos y a los brotes de enfermedades transmitidas por el agua y el consumo de moluscos en todo el mundo (Lindsay *et al.*, 2001; Arkush *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2010). Sus ooquistes son excepcionalmente resistentes en su etapa ambiental, jugando un papel clave en la transmisión de *T. gondii* a los nuevos hospederos y otros ecosistemas no conocidos (Arkush *et al.*, 2003).

La aparición de brotes diarreicos periódicos provocados por el consumo de moluscos bivalvos ha contribuido a la desconfianza pública con respecto a la seguridad en el consumo de estos mariscos, lo que a su vez contribuye a grandes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura (Souza *et al.*, 2012). Por lo tanto, es relevante aclarar el papel de los moluscos bivalvos como vehículos de transporte de parásitos que pueden causar infecciones en humanos (Ribeiro *et al.*, 2015).

T. gondii es posiblemente el parásito protozoario más extendido y prevalente sobre la tierra, e infecta aproximadamente a quinientos (500) millones de personas

alrededor del mundo (CDC, 2015; WHO, 2015). El Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (EEUU) (CDC), ha dado prioridad a *T. gondii* como una de las "Cinco Infecciones Parasitarias Desatendidas" debido a la gravedad de la enfermedad y su alta incidencia (Pappas *et al.*, 2009).

Mundialmente, la seroprevalencia de este parásito medida por anticuerpos IgG específicos anti-*Toxoplasma* varía entre el 1% y el 100%, dependiendo del entorno y condiciones socioeconómicas, incluidos los hábitos alimentarios, las prácticas relacionadas con la salud, nivel general de higiene, susceptibilidad del hospedero, la ubicación geográfica (geolatitud) y la humedad del suelo (Tenter, 2000). En Europa y EEUU se han reportado tasas de seroprevalencia similares, que oscilan entre el 30 y 40%. Sin embargo, en países de América Latina, las tasas reportadas oscilan entre el 65 y 85% (Flegr *et al.*, 2014). Entre los animales, se ha informado que la seroprevalencia oscila entre el 15 y 45% en la mayoría de las especies de ganado y en pequeños rumiantes y cerdos (Miller *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2018). Sin embargo, no es hasta años recientes, que se ha estudiado la prevalencia en animales acuáticos como nutrias (Mazillo *et al.*, 2013), cetáceos y delfines (Forman *et al.*, 2009; Dubey *et al.*, 2020) e invertebrados como los moluscos (Potasman *et al.*, 2002; Esmerini *et al.*, 2010; Aksoy *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2015).

T. gondii se considera una sola especie, pero se han encontrado 12 haplogrupos en América y parte de Europa, y además, de variantes atípicas. La estructura de población clonal en América del Norte y Europa, con 3 linajes predominantes tipos I, II y III que se dan tanto en animales como en humanos y que han sido definidos por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), polimorfismo de restricción de fragmentos largos-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-RFLP) o análisis de microsatélite (Darde *et al.*, 1992; Howe y Sibley, 1995; Ajzenberg *et al.*, 2002). Las cepas de *T. gondii* no definidas como tipo I, II o III, son designadas como cepas "atípicas". El amplio desequilibrio de los alelos es una característica común de las poblaciones clónicas, que permite que un solo locus sirva como marcador sustitutivo

del tipo de cepa. Esto sugiere que el parásito ha sufrido una amplia recombinación sexual (Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2006).

Estudios realizados en los EEUU y Taiwán, han indicado que el consumo de moluscos es un factor de riesgo para adquirir toxoplasmosis (Jones *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que los ooquistes de *T. gondii* pueden sobrevivir y mantenerse viables hasta 85 días en moluscos bivalvos después de su ingestión (Lindsay *et al.*, 2004). En este caso, es necesario explorar el impacto de *T. gondii* en la salud humana a través del consumo de alimentos de origen marino. Como sabemos, la toxoplasmosis puede ser grave y tal vez mortal en individuos inmunocomprometidos, como los pacientes con VIH. Los niños menores de 5 años y los ancianos, y además, es un importante patógeno teratogénico (Dubey, 2010). Por lo tanto, es muy importante educar al público sobre el riesgo de adquirir *T. gondii* a través del consumo de mariscos crudos, especialmente moluscos bivalvos (CDC, 2015; WHO, 2015).

7. Detección Molecular de *T. gondii*

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, así como también, en otras matrices como el agua, el suelo y los alimentos. Para ello, se han utilizado como blancos de amplificación de genes únicos (*P30*) o repetidos (*gen B1*), la secuencia TGRIE, el ADNr 18s y los locus SAG1 y SAG2.

Burg y col. (1989), propusieron una PCR anidada (n-PCR) para la detección directa y sensible del *gen B1* de *T. gondii*, inicialmente con fines diagnóstico en humanos. El *gen B1* ha sido ampliamente utilizado porque al estar repetido 35 veces en el genoma del parásito y conservarse en todas las cepas, ofrece mayor sensibilidad en su detección. Estudios indican que el *gen B1* puede detectar hasta 10 parásitos en 100000 células de leucocitos humanos (Nauli y Suspendi, 2020). Adicionalmente, la evaluación de los cebador o primers utilizados contra este blanco, indicaron su sensibilidad y su alta especificidad, ya que no amplifican para

otros parásitos como *Sarcocystis*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Absidia* spp., lo cual hace de esta prueba un método confiable para la detección de este parásito (Burg *et al.*, 1989).

Los primers propuestos por Burg y col. (1989), han sido modificados a lo largo del tiempo. Por ejemplo, Jones *et al.* (2000), estandarizaron el diagnóstico de *T. gondii* en humor vítreo y retina, indicando que son los más sensibles y específicos. Ponce y Gomez-Marín (2003), realizaron la estandarización y validación para el diagnóstico de toxoplasmosis cerebral en pacientes infectados por VIH. Estos primers, Toxo N2, han sido rectificadas y sus condiciones de amplificación modificadas, siendo estas pruebas las utilizadas actualmente para evaluar la presencia de *T. gondii* en agua, carnes, humanos y otras matrices con excelentes resultados (Alvarez *et al.*, 2015; Campo-Portacio *et al.*, 2014; Franco-Hernandez, Acosta *et al.*, 2015; Triviño-Valencia *et al.*, 2016).

8. Genotipificación de *T. gondii*

Howe y Sibley (1995), propusieron que los aislamientos de *T. gondii* pueden agruparse en tres tipos (I, II, III), basándose en el polimorfismo del ADN de locus simple detectados por PCR-RFLP, indicando que la mayoría de las cepas eran clonales. Es decir, que *T. gondii* presentaba una estructura de población clonal con baja diversidad genética. Adicionalmente, indicaron que el genotipo I es el más letal para ratones, y que el II y III son menos patogénicos (Howe y Sibley, 1995; Derouin, *et al.*, 1997; Sibley *et al.*, 2002; Morisset *et al.*, 2008).

Estudios recientes empleando polimorfismos por microsatélites detectados por PCR multiplex y multilocus PCR-RFLP, han revelado algunos linajes atípicos (Ajzenberg *et al.*, 2002, 2009; Su *et al.*, 2006; Cañón-Franco *et al.*, 2014). Por lo que, en la actualidad, se establece que la tipificación típica de tres linajes clonales no es suficiente debido a que se ha encontrado una naturaleza polimórfica de las cepas, especialmente en la región de Suramérica (Cañón-Franco *et al.*, 2014; Pfaff *et al.*, 2014).

Shwab *et al.* (2014), reportan 189 genotipos diferentes alrededor del mundo, donde solo unos pocos genotipos dominan en el hemisferio norte, mientras que cientos de genotipos coexisten y unos pocos tienen una frecuencia relativamente más alta en el hemisferio sur. Estos resultados sugieren una estructura de población clonal en el norte y una estructura de población epidémica en el sur (ver Tabla 1).

Tabla 2 Número de genotipos aislados en diferentes regiones del mundo (Fuente: Shwab *et al.*, 2014).

REGIONES GEOGRÁFICAS	NÚMERO DE AISLADOS	GENOTIPOS “NO COMPARTIDOS” CON OTRAS REGIONES
África	141	13
Asia	102	10
Europa	64	9
Norte América	501	40
Centro/Sur América	646	156

En el estudio de Shwab *et al.* (2014), también mencionan que África comparte 5 genotipos con Asia, 5 con Europa, 4 con Norteamérica y 5 con Centro/Suramérica; Asia comparte 5 genotipos con Europa, 6 con Norteamérica y 8 con Centro/Suramérica; Europa comparte 6 genotipos con Norteamérica y 6 con Centro/Suramérica; y Norteamérica comparte 17 genotipos con Centro/Suramérica.

Actualmente, para los estudios epidemiológicos, es importante identificar los aislados individuales de *T. gondii* y rastrear la fuente de contaminación. Los métodos comúnmente utilizados para estos fines son el multilocus PCR-RFLP, microsatélite o tipificación MLST. La PCR-RFLP se basa en la capacidad de las endonucleasas de restricción para reconocer polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), digerir productos de la PCR y posteriormente, mostrar distintos patrones de bandas de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa (Sibley y Boothroyd, 1992; Howe y Sibley, 1995). Estos métodos han demostrado ser simples, sensibles, reproducibles y rentables, y se han aplicado a una variedad de muestras clínicas,

de animales y humanos (Bell y Ranford Cartwright, 2002; Contini *et al.*, 2005; Calderaro *et al.*, 2006; Bastien *et al.*, 2007).

Esta investigación tiene como finalidad detectar molecularmente el parásito *T. gondii* en muestras de tres especies de almejas de importancia comercial en Panamá. La detección del parásito se realizará mediante la prueba de PCR anidada utilizando como marcador molecular el *gen B1* del parásito y determinar mediante el PCR-RFLP, empleando el alelo SAG2, los linajes circulantes en los moluscos bivalvos del Golfo de Panamá analizados.

OBJETIVOS

9. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

9.1 Objetivo General

- Detectar molecularmente la presencia de *T. gondii* y verificar su frecuencia en tres especies de almejas (*Anadara tuberculosa*, *Leukoma asperrima* y *Donax* spp.) de importancia comercial en Panamá.

9.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar la técnica de PCR anidada para detectar molecularmente la presencia y verificar la frecuencia de *T. gondii* en tres especies de almejas de importancia comercial de Panamá.
- Caracterizar mediante el uso del marcador molecular SAG2, las diferentes linajes de *T. gondii* que están circulando en las tres especies de almejas de importancia comercial en Panamá.

10. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Ho: Existe una alta frecuencia y diversidad genética de *T. gondii* en muestras de tres especies de almejas de importancia comercial en Panamá.

Ha: No existe una alta frecuencia y diversidad genética de *T. gondii* en muestras de tres especies de almejas de importancia comercial de Panamá.

METODOLOGÍA

11. METODOLOGÍA

11.1. Área de estudio y recolección de moluscos bivalvos

Los bivalvos utilizados en este estudio se adquirieron de recolectores artesanales en tres regiones del Golfo de Panamá, realizando tres muestreos al mes para cada especie, durante seis meses tres meses en época lluviosa (septiembre, octubre y noviembre de 2020) y tres meses en época seca (febrero, marzo y abril de 2021).

Se colectaron especímenes de *Donax spp.*, *Anadara tuberculosa* y *Leukoma asperima* en tres regiones con alta comercialización de este producto en el Golfo de Panamá, distribuidas de la siguiente manera:

- *Anadara tuberculosa*: se colectaron en la Bahía de Chame (8 ° 38'00.0 "N 79 ° 47'00.0" O), Distrito de Chame, Provincia de Panamá Oeste.
- *Leukoma asperima*: se colectaron en la Bahía de Bique (8 ° 52 '35 "N 79 ° 39' 38" O), Distrito de Arraiján, Provincia de Panamá Oeste.
- *Donax spp.*: se colectaron en Playa de Chinina (8 ° 58'59.88 " N, 79 ° 1'59.88 " O), Distrito de Chepo, Provincia de Panamá (Figura 10).

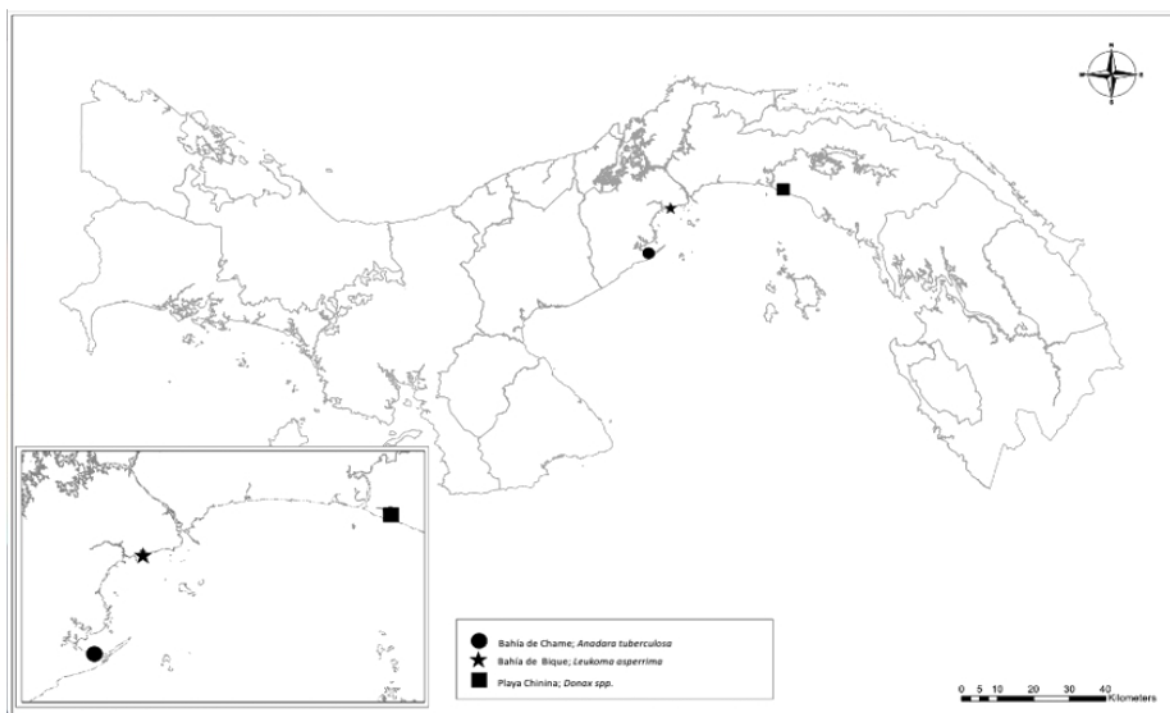


Figura 11 Sitios de recolección de muestras de moluscos bivalvos en el Golfo de Panamá.

Después de su adquisición, los especímenes se transportaron en cadena de frío al Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada, y Laboratorio de Microbiología de Aguas de la Universidad de Panamá para su procesamiento. En este laboratorio, las superficies externas de las conchas de los bivalvos se lavaron con agua destilada y los epibiontes se retiraron con la ayuda de instrumentos cortantes y cepillos.

11.2 Diseño Experimental

Los muestreos se llevaron a cabo durante el año 2020 y 2021, cinco muestras cada semana por especie, durante tres meses de la estación lluviosa de 2020 (septiembre, octubre y noviembre) y durante tres meses de la estación seca de 2021 (febrero, marzo y abril) (Tabla 3).

Tabla 3 Diseño Experimental para recolección de moluscos bivalvos.

Estación	Total Muestras/Estación	Meses	# Muestras de 100g/Colecta			Total muestras/mes
			Semana 1	Semana 2	Semana 3	
Estación Lluviosa	45	Octubre	5	5	5	15
		Noviembre	5	5	5	15
		Diciembre	5	5	5	15
Estación Seca	45	Febrero	5	5	5	15
		Marzo	5	5	5	15
		Abril	5	5	5	15
Total de muestras/ Año			30	30	30	90

11.3 Procesamiento de las muestras

Entre 1700 y 3000 individuos bivalvos-almejas se utilizaron en esta investigación. Los individuos ya lavados externamente fueron abiertos con un cuchillo estéril y se pesaron 100 g de tejidos internos y fluido intervalvar por especie de bivalvo,

colocándolos en envases de vidrio estériles previamente rotulados para cada especie, y este proceso se repitió 5 veces, obteniendo 5 sub-muestras semanales, es decir, 500 g de muestras para cada especie de bivalvo por mes de muestreo. Todo este procedimiento se manejó asépticamente en una cámara de flujo laminar.

Cada muestra de 100 g de tejidos internos y sus fluidos se mezclaron en proporción 1:1 con Buffer Fosfato [1.25 mL de KH_2PO_4 (1N NaOH en pH 7.2) + 5.0 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$], empleando un mezclador o licuadora en intervalos de 5 s para su homogenización (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2010).

Luego, a cada muestra se le adicionaron 10 mL de buffer fosfato-peptona estéril, para hacer la mezcla menos espesa y se filtró a través de tamices de 150 a 45 mm para eliminar los agregados grandes. Los homogeneizados obtenidos post filtración se mezclaron con Buffer Fosfato Salino y Éter Dietílico (en una proporción de 2:1) con la finalidad de eliminar la fracción lipídica de las muestras (Hohweyer *et al.*, 2013; Ligda *et al.*, 2019). Los sedimentos obtenidos luego de este procedimiento se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

11.4 Extracción y Cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN, se utilizaron aproximadamente 200 mg del sedimento del tejido homogeneizado de cada muestra y se empleó el kit comercial, QIAamp DNA Stool Minikit (Qiagen, Alemania) para la extracción, según las indicaciones del fabricante (Qiagen, 2017). El ADN obtenido fue eluido en 180 μL de solución de hidratación de ADN (Buffer ATE, QIAamp DNA Stool Minikit). Todas las muestras extraídas se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

El ADN extraído se cuantificó utilizando un BioSpec-nano (Corporación Shimadzu, Japón). Finalmente, se prepararon soluciones de trabajo de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para cada muestra, y para su posterior análisis molecular.

11.5 Detección por PCR anidada del marcador molecular Gen B1 de *T. gondii*

La detección del ADN del parásito se llevó a cabo mediante una PCR anidada para aumentar la especificidad y la sensibilidad de la técnica. Para ello, se utilizaron 2 pares de cebadores que amplifican una región del *gen B1* de *T. gondii*. Este gen tiene 35 repeticiones o copias dentro de la secuencia de ADN del parásito, por lo que se ha utilizado ampliamente para su detección y diagnóstico (Burg *et al.*, 1989).

El proceso de amplificación se llevó a cabo en 2 etapas. La primera etapa consistió en la amplificación de un fragmento de 286 pares de bases (pb) con los cebadores a una concentración de 10 μ M (Pelloux *et al.*, 1997) en una mezcla de 25 μ L [incluidos 12,5 μ L de Go Taq G2 Green Máster Mix (Promega, EE. UU.), 10 μ M de cada cebador externo, 1,0 μ L de ADN genómico y agua libre de nucleasas, hasta completar los 25 μ L]. Para el proceso de amplificación del ADN, la reacción se colocó a 95°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, 72°C durante 30 s y finalmente, 72°C durante 5 min.

En la segunda etapa se amplificó un fragmento de 115 pb de la secuencia que codifica el gen B1 con los cebadores internos a una concentración de 10 μ M (Hohlfeld *et al.*, 1994). Ambos procesos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, EEUU).

Se utilizó el ADN de la cepa RH (tipo I) de *T. gondii* como control positivo y se añadió agua libre de nucleasas a la mezcla como control reactivo o negativo, ambos incluidos en cada serie de PCR.

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis (Wide Mini-Sub cell GT, Bio-Rad, EEUU) en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio a 0.5 μ g/mL y se visualizaron en el fotodocumentador UltraLum (Omega 5058, California, EEUU).

11.6 Genotipificación de *T. gondii* utilizando el marcador molecular SAG2

El antígeno de superficie 2 (SAG2), es un antígeno inmunogénico que cubre los

aislamientos de *T. gondii* y una de las principales proteínas que se expresan en la superficie del complejo apical de los taquizoítos. El gen del antígeno de superficie 2 (SAG2) se ha utilizado ampliamente para genotipificar los aislamientos de *T. gondii*, utilizando el alelo 3' SAG2 y 5' SAG2 (Howe *et al.*, 1997; Su *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2010).

Las muestras positivas para el *gen B1* fueron utilizadas para el genotipado directo. Las concentraciones medias de ADN utilizadas en esta prueba oscilaron entre 7.0 ng y 110 ng. Para la PCR externa se utilizó un volumen total de 25 μ L, incluidos [12,5 μ L de Go Taq G2 Green Máster Mix (Promega, EEUU), 25 μ M de cada cebador externo, 1,5 μ L de ADN genómico y agua libre de nucleasa, hasta completar los 25 μ L]. Como control positivo se utilizó ADN genómico de la cepa RH (tipo I) y como control negativo se sustituyó el ADN genómico por agua. En la PCR anidada se utilizó una alícuota de 2.5 μ L del producto de la PCR externa, 12,5 μ L de Go Taq G2 Green Máster Mix (Promega, EEUU), el cebador interno (50 μ M) y agua libre de nucleasas. Ambos procesos de amplificación fueron conducidos en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, EEUU). El proceso de amplificación y la digestión enzimática se llevó a cabo con una metodología previamente descrita por Su *et al.* 2010, donde se realiza una digestión enzimática con Hha I y Mbo I, para que posteriormente los fragmentos obtenidos de esta digestión, fueron sometidos a electroforesis (Wide Mini-Sub cell GT, Bio-Rad, EEUU) en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio a 0.5 μ g/mL y se visualizaron en el fotodocumentador UltraLum (Omega 5058, California, EEUU) (Su *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007).

11.7 Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias de frecuencia fue establecida mediante la prueba de Chi-Cuadrado (X^2), realizada en el paquete estadístico Prisma GraphPad versión 6.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU), siendo significativos los valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

12. RESULTADOS

12.1. Detección de *T. gondii* en moluscos bivalvos utilizando el gen *B1* como marcador molecular

Se estudió una población total de 3939 individuos (1726 en la estación seca y 2213 en la estación lluviosa), de los cuales se recogieron muestras de 100 g de tejidos y fluidos internos o líquido intervalvar. Se determinó la presencia de *T. gondii* mediante el gen *B1*, y se observó una frecuencia de infección del parásito en la población estudiada de 13.33%. Cuando las especies de bivalvos se analizaron por separado, los porcentajes de positividad fueron los siguientes: *Anadara* sp. 5.56%, *Donax* sp. 4.44% y *Leukoma* sp. 3.33% (Figura 11).

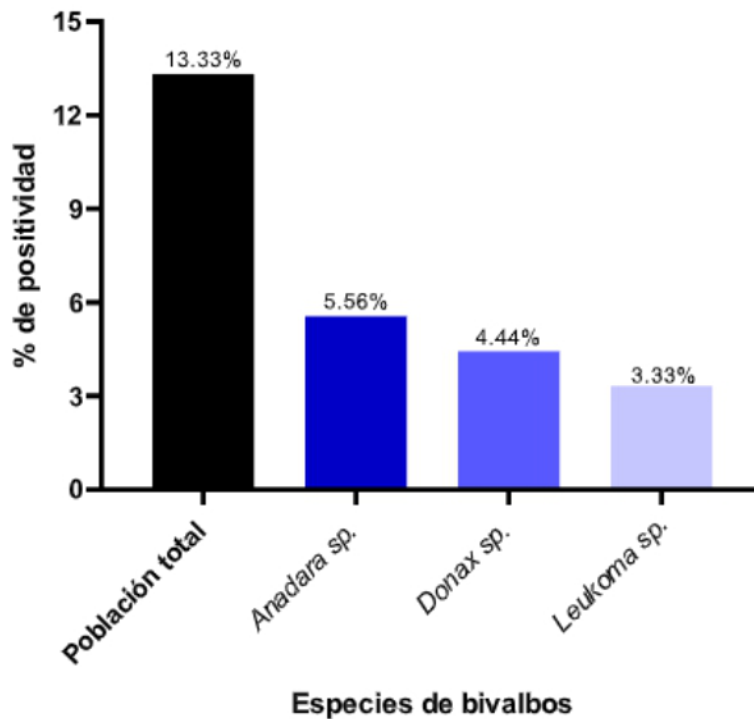


Figura 12 Porcentaje de positividad de *T. gondii* en los moluscos bivalvos.

11.2 Frecuencia de infección de *T. gondii* en tres especies de bivalvos colectados en diferentes estaciones del año

La frecuencia de infección de *T. gondii* fue evaluada en las especies de bivalvos

colectados en diferentes estaciones del año. Se utilizó el *gen B1* como marcador molecular y se observó una frecuencia de infección bastante homogénea entre las especies *Anadara tuberculosa*, *Leukoma asperima* y *Donax* spp. Durante las dos estaciones del año analizadas. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas al comparar la infección de *T. gondii* para cada especie de bivalvo por estación anual o mes de muestreo analizado ($\chi^2 = 0,3846$, $df = 2$, $p = 0,825$) (Figura 12).

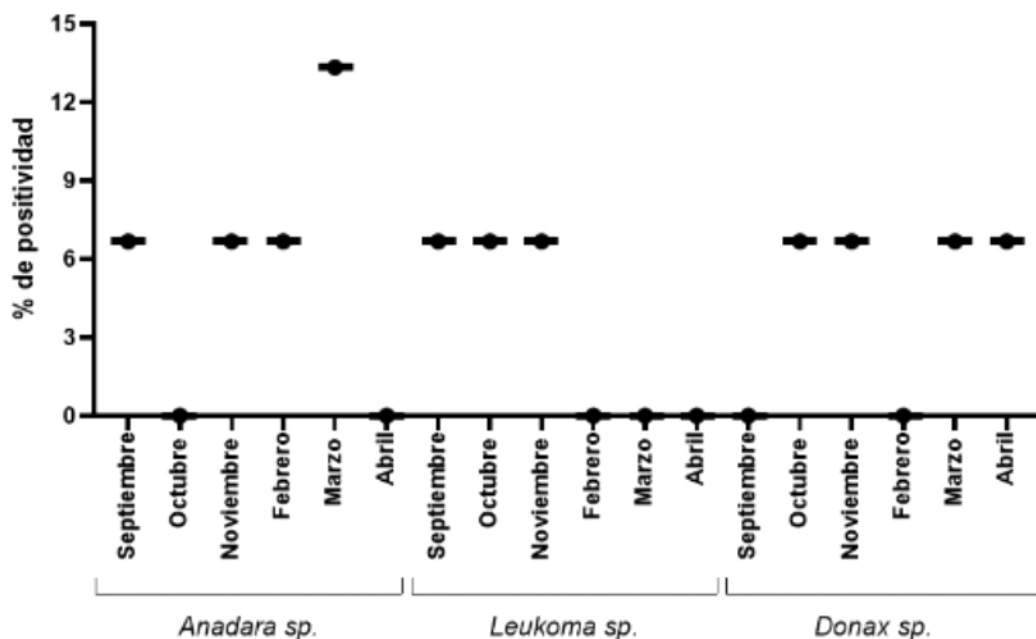


Figura 13 Frecuencia mensual de *T. gondii* en las tres especies de bivalvos marinos recolectadas en el Golfo de Panamá.

11.3 Determinación de los principales linajes de *T. gondii* mediante la técnica de PCR-RFLP

Las muestras de bivalvos que resultaron positivas utilizando el *gen B1*, fueron caracterizadas directamente utilizando el marcador molecular SAG2. Mediante PCR anidada, se llevó a cabo la amplificación de los alelos 3'-SAG2 y 5'-SAG3 (Figura 13). Posteriormente, se realizó el análisis de restricción con las enzimas Hha I y Mbo I. La genotipificación de los 3 grandes linajes de *T. gondii* fue exitosa en las muestras de moluscos bivalvos analizadas siendo el linaje II el más frecuente,

seguido del linaje III, presente sólo en una muestra (AF5) y las variantes I/II y II/III, que no se lograron definir dentro de las tres grandes linajes (Figura 14 y Tabla 4).

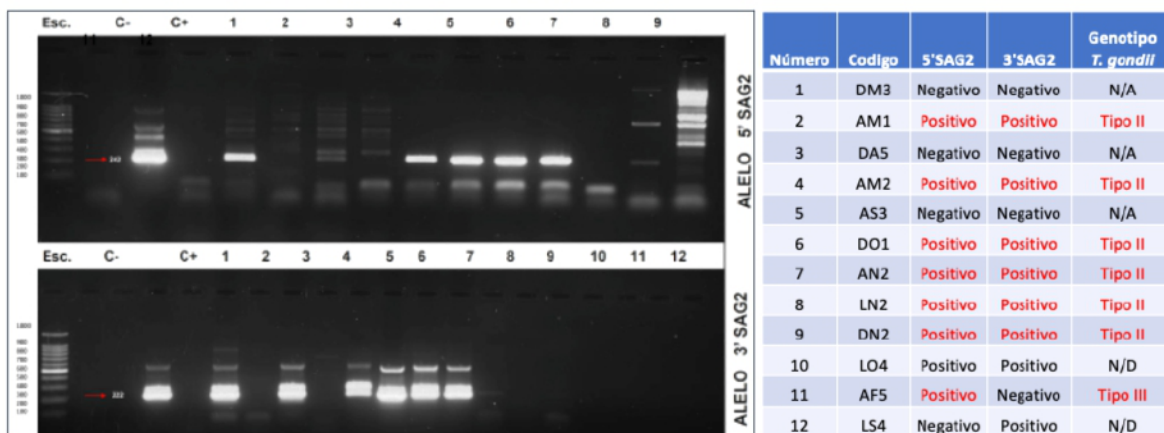


Figura 14 Determinación por PCR anidada del marcador molecular alelo 3' SAG2 y 5' SAG2 en muestras de moluscos bivalvos positivas para el *gen B1*.

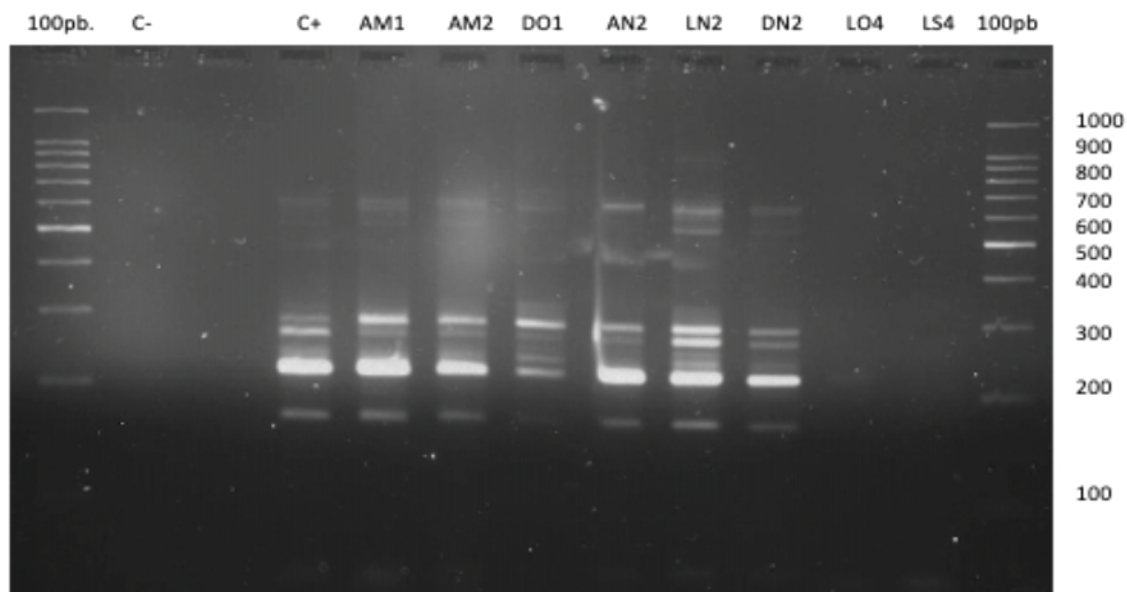


Figura 15 Productos de la digestión enzimática de Alelo 3' SAG2 con la enzima Hha I.

En las muestras se observa el patrón de restricción del tipo clonal II. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2: Control negativo; Carril 3: vacío, Carril 4: Control positivo; Carril 5 y 6: *Anadara* marzo; carril 7: *Donax* octubre; carril 8: *Anadara* noviembre, carril 9 *Leukoma* noviembre; Carril 10 *Donax* noviembre; carril 11 y 12 *Leukoma* octubre y septiembre, para estas últimas no se obtuvo una amplificación (N/A) para este marcador molecular.

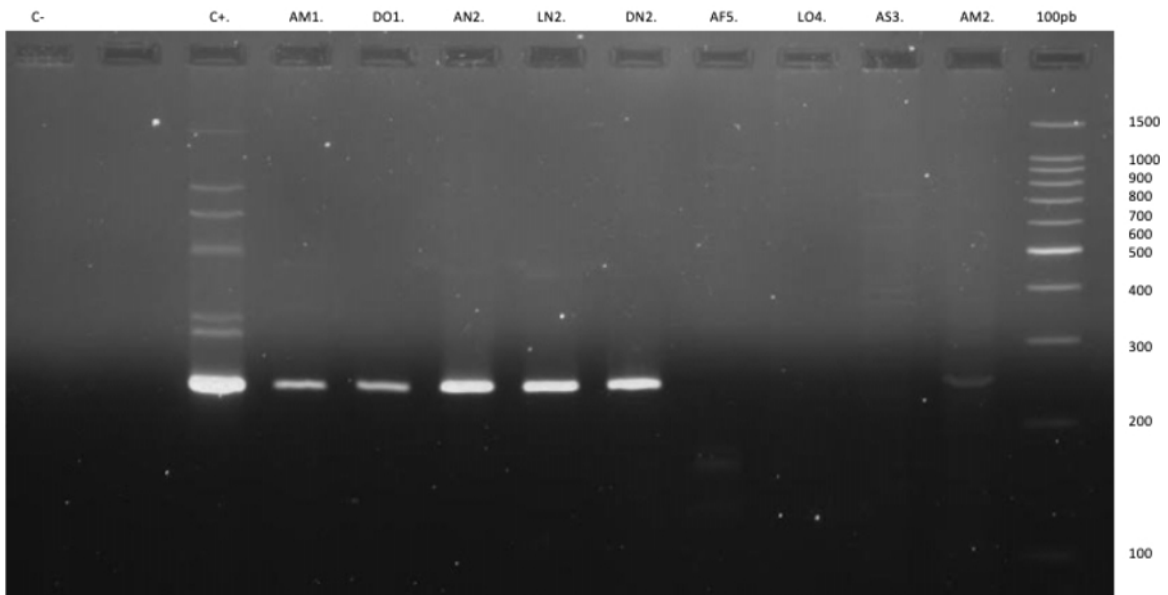


Figura 15 Productos de la digestión enzimática de Alelo 5' SAG2 con la enzima Mbo I.

En las muestras se observa el patrón de restricción del tipo clonal II, excepto en el carril 9 donde se reporta patrón de restricción del tipo clonal III.

Carril 1: Control negativo;; Carril 2: vacío; Carril 3: Control positivo; Carril 4 y 12: *Anadara* marzo; carril 5: *Donax* octubre; carril 6: *Anadara* noviembre, carril 7: *Leukoma* noviembre; Carril 8: *Donax* noviembre; carril 9: *Anadara* febrero; Carril 10: *Leukoma* octubre; Carril 11 y 12: *Anadara* septiembre y marzo y Carril 13: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabla 4 Genotipificación directa de *T. gondii* mediante el marcador molecular SAG2 en moluscos bivalvos recolectados en el Golfo de Panamá.

# Muestras (100 g/sample)	Muestras Positivas	Estación Lluviosa/Seca	Familia	Especie de Bivalvo	Nombre Común	Zona de Recolección	5' SAG2	Alelos	3' SAG2
30	3	3/0	Veneridae	<i>Leukoma asperima</i>	Almeja Blanca	Bahía Chame	N/A; N/A, I/II, I/II		N/A; N/A, II, II
30	5	2/3	Arcidae	<i>Anadara tuberculosa</i>	Concha Negra	Bahía Bique	N/A, I/II, I/II; I/II, III		N/A, II, II; N/A, II
30	4	2/2	Donacidae	<i>Donax</i> spp.	Almejitas	Playa Chinina	N/A; I/II, I/II		N/A; II, II
90	12								

N/A (No Amplificó para alelo SAG2)

DISCUSIÓN

13. DISCUSIÓN

La aplicación de la PCR ya sea en muestras de alimentos, clínicas o ambientales puede ser problemática debido a la presencia de una amplia gama de sustancias inhibitoras de la *Taq ADN polimerasa*. Los moluscos bivalvos acumulan diversos agentes (virus, bacterias, protozoos), sustancias orgánicas e inorgánicas (por ejemplo, metales pesados) del agua que filtran, además de poseer una amplia gama de enzimas, lípidos, polisacáridos, proteínas, etc., muchos identificados como inhibidores de la reacción de PCR (Rossen *et al.*, 1992; Wilson, 1997, Santoro *et al.*, 2020). Sin embargo, en este estudio, se empleó el protocolo desarrollado para la extracción de ADN de heces (QIAamp DNA Stool Minikit; Qiagen, Alemania), el cual posee un paso donde emplea el buffer inhibitex para la eliminación de inhibidores de la PCR, obteniendo buenos resultados, ya que la recuperación de ácidos nucleicos totales fue alta, alcanzando en nuestro estudio 99%, es decir, se obtuvo buena concentración de ADN de la mayoría de las muestras.

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de ADN de *T. gondii* en moluscos bivalvos en tres regiones geográficas del Golfo de Panamá y representa el primer reporte de *T. gondii* en moluscos bivalvos para nuestro país.

Los moluscos bivalvos, como las ostras, los mejillones, los berberechos y las almejas, pueden concentrar microorganismos patógenos como resultado de su forma de alimentación, ya que filtran grandes volúmenes de agua, pudiendo almacenar en sus tejidos formas de resistencia de microorganismos como bacterias, virus y protozoos (Trollope, 1984; Schets *et al.*, 2007; Tei *et al.*, 2016). Estudios anteriores indican que *T. gondii* puede esporular y permanecer viable en el agua de mar durante varios meses (Lindsay *et al.*, 2003) y algunos experimentos de laboratorio han demostrado que los moluscos bivalvos marinos pueden concentrar ooquistes de *T. gondii* y mantenerlos viables hasta por 85 luego de su ingestión por el molusco bivalvo (Lindsay *et al.*, 2004).

La tasa de positividad de *T. gondii* registrada en este estudio fue del 13.33%, la cual es considerada baja en comparación con las tasas reportadas en animales domésticos y/o silvestres terrestres estudiados hasta la fecha, que reportan tasas entre un 37.5 a 64% (Lindsay y Dubey, 2020; Hatam-Nahavandi, *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron concordantes con los resultados obtenidos por Esmerini *et al.* (2010) en Brasil y Santoro *et al.*, (2020) en Italia, donde reportan tasas de positividad de *T. gondii* en moluscos bivalvos entre 3.3% y 10.5%, respectivamente, aunque sus muestras no eran colectadas en ambientes naturales, sino en granjas de cultivo de moluscos, lo cual, es una diferencia muy importante al momento de establecer genotipos circulantes en regiones geográficas específicas.

La carga parasitaria detectada en este estudio es de gran importancia en salud pública, y aunque, la positividad del ADN de *T. gondii* no significa necesariamente que los ooquistes se encuentren viables en las almejas recolectadas en el Golfo de Panamá, es importante recordar que un sólo ooquiste vivo es infeccioso por vía oral para diferentes hospederos (aves, reptiles y mamíferos), incluyendo al hombre. Por lo cual, el consumo de moluscos bivalvos sin cocinar o ligeramente cocinados, pueden aumentar el riesgo de infección por *T. gondii* para cualquier hospedero; en los humanos, especialmente para las personas inmunocomprometidas y las mujeres embarazadas. Hasta la fecha, no se ha realizado ninguna evaluación para explorar la asociación entre los brotes de enfermedades parasitarias transmitidas por el consumo de mariscos y la toxoplasmosis. Sin embargo, muchos autores han indicado que el consumo de mariscos es un factor de riesgo para la adquisición de la toxoplasmosis (John *et al.* 2009; Chian *et al.* 2014).

En Panamá, se han notificado altos niveles de infección por *T. gondii* en varias especies de animales domésticos y de importancia agropecuaria, como los perros (25.7% - 32.23%), gatos (21.93% - 25%) (Fabrega *et al.*, 2020; Rengifo-Herrera *et al.*, 2017) y cerdos (32.1%) (Correa *et al.*, 2008), indicando que probablemente el medio terrestre en Panamá está muy contaminado por ooquistes de *T. gondii*, siendo una de las principales rutas de transmisión de este parásito. Estudios previos

realizados en nuestro país indican que la transmisión a través del carnivorismo no es común, debido al hábito de consumir las carnes bien cocidas, aunque es un estudio muy antiguo, es el único dirigido sobre rutas de transmisión de *T. gondii* en Panamá publicado hasta la fecha (Frenkel *et al.*, 1972). Por lo cual, se puede inferir, que la principal ruta de transmisión de *T. gondii* en Panamá es, a través, del agua, frutas y/o vegetales contaminados con ooquistes del parásito y en menor escala el consumo quistes tisulares presentes en hospederos intermediarios.

Además, hay que tener en cuenta la importancia de la Familia Felidae en esta transmisión, ya que como hospederos definitivos de *T. gondii*, son los únicos que liberan ooquistes al ambiente. Como los gatos domésticos (*Felis catus*) suelen estar ausentes en los entornos costeros estudiados, los gatos silvestres son la principal fuente de contaminación del suelo y el agua en estas regiones (Gilot-Fromont *et al.*, 2012). Se han descrito 39 especies de félidos, de las cuales 20 viven en zonas tropicales húmedas, incluyendo Panamá (IUCN SSC Groups CS, 1996; Johnson *et al.*, 2006). En Panamá, especies como *Felis concolor* (puma), *F. onca* (jaguar), *F. pardalis* (ocelote), *F. wiedii* (margay) y *F. yagouaroundi* (jaguarundi) (Mendez, 1970), han demostrado la capacidad de liberar ooquistes de *T. gondii* al ambiente, jugando un papel importante en la transmisión de este parásito en regiones geográficas no urbanas, como las áreas aledañas al Golfo de Panamá (Jewel *et al.*, 1972; Miller *et al.*, 1972; Patton *et al.*, 1982; Lukesova & Literak, 1998).

La distribución de los genotipos de *T. gondii* varía en las diferentes regiones geográficas del mundo (Lehmann *et al.*, 2006). En América del Norte y Europa, *T. gondii* es altamente clonal y consiste principalmente en tres linajes distintos (tipos I, II y III). Mientras que en Sudamérica, *T. gondii* es muy diverso con unos pocos linajes expandidos en la población. En China, se notificaron al menos siete genotipos y un linaje muy extendido de cerdos, gatos y humanos denominado Chinese 1 (Guang-wei *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009, 2013; Wang *et al.*, 2013). En América, se encontraron nuevos genotipos X y A en nutrias marinas (Sundar *et al.*, 2008). Sin embargo, en Panamá, no existían datos sobre los genotipos circundantes

o presentes en moluscos bivalvos, siendo éste el primer estudio que logra determinar tanto la presencia como los genotipos circundantes en las tres regiones estudiadas (Bahía Chame, Bahía de Bique y Playa Chinina) del Golfo de Panamá. Se deben realizar más estudios sobre el aislamiento y el genotipo de *T. gondii* en animales acuáticos en Panamá, para comprender mejor las posibles relaciones entre las infecciones de animales acuáticos marinos, terrestres y los seres humanos.

Por lo general, *T. gondii* está presente en los animales acuáticos procede del medio terrestre. Por lo tanto, todos los genotipos de *T. gondii* que se encuentran en los animales terrestres y en los seres humanos, podrían estar en los animales acuáticos (Thomas y Cole, 1996; Miller *et al.*, 2002a, 2002b; Kreuder *et al.*, 2003). Al no existir datos anteriores a esta investigación sobre los genotipos de *T. gondii* en moluscos marinos en Panamá, fue necesario utilizar un gen conservado con el objetivo de establecer el método de PCR que fuese capaz de detectar los tres grandes linajes (I, II y III) de *T. gondii* que se encuentran en los animales terrestres y en los seres humanos. La amplificación de secuencias de ADN de *T. gondii* en moluscos bivalvos contaminados de forma natural, demuestran la utilidad de estas técnicas para detectar y caracterizar estos parásitos, que están ampliamente distribuidos en los medios acuáticos (Gómez-Couso *et al.* 2004; Santoro *et al.*, 2020).

Adicionalmente, la genotipificación de las muestras positivas para el *gen B1*, utilizando el marcador molecular SAG2 descrito por Su *et al.* (2006), indican que el genotipo II es el más comúnmente circulante en las tres especies de moluscos bivalvos estudiadas y que se circunscriben a tres regiones específicas del Golfo de Panamá (Bahía Chame, Bahía Bique y Playa de Chinina), seguido del genotipo III que se presentó sólo en Bahía de Chame (*Anadara tuberculosa*) y variantes I/II presentes en las tres regiones. La comparación entre los genotipos del medio marino con los de los animales terrestres, podría aclarar las rutas y los mecanismos de transmisión de tierra a mar (Fayer *et al.*, 2004). En Panamá, no hay informes de

aislamiento de *T. gondii* en mamíferos marinos e incluso los datos serológicos son muy limitados, lo que dificulta establecer una relación entre estos factores.

En esta investigación, los moluscos marinos fueron procesados en grupos de acuerdo a la especie (100 g/especie) y no individualmente, debido a que la metodología para la detección de patógenos en esta matriz alimenticia así lo especifica (Canadian Shellfish Sanitation Program., 2010), adaptando esta metodología a la determinación de *T. gondii* en el medio marino panameño.

Los resultados de este estudio preliminar indican que las almejas de las especies *Anadara tuberculosa*, *Leukoma asperrima* y *Donax* spp., pueden filtrar y retener ooquistes de *T. gondii* presentes en el medio marino de las costas del Golfo de Panamá, por lo cual, la ingestión de estas almejas crudas o semicrudas podrían ser una potencial fuente de transmisión de *T. gondii* a los seres humanos y a otros mamíferos marinos que las consumen.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

14. CONCLUSIONES

- 1- Se registra por primera vez la presencia de ADN de *T. gondii* en las tres especies de moluscos bivalvos estudiados (*Anadara tuberculosa*, *Leukoma asperrima* y *Donax* spp.).
- 2- No existen diferencias en la presencia, ni frecuencia de *T. gondii* entre las tres especies de moluscos bivalvos estudiados, ni entre las estaciones del año (Seca y lluviosa) analizadas.
- 3- La presencia de ADN de *T. gondii* en las muestras de moluscos bivalvos no indica su viabilidad o grado de infectividad, por lo cual, no se puede inferir directamente su relación con la transmisión de este patógeno a nuevos hospederos, sin embargo, un sólo ooquiste puede iniciar esta transmisión en hospederos susceptibles, como las personas inmunodeprimidas o mujeres embarazadas.
- 4- Se necesitan más estudios tanto de la fauna terrestre aledaña a los sitios de muestreo (Bahía Chame, Bahía Bique y Playa Chinina), como de organismos marinos para poder determinar una relación entre la frecuencia de *T. gondii* en estos hospederos y los resultados obtenidos en este estudio.
- 5- El genotipo que mayormente circula entre las especies de moluscos bivalvos analizadas es el Tipo II, el cual, ha sido ampliamente reportado alrededor del mundo en humanos, animales domésticos y silvestres.

15. RECOMENDACIONES

- 1- Utilizar otros Marcadores Moleculares para la genotipificación de las muestras que no lograron amplificar para el Marcador Molecular SAG2, como el APICO SAG2.
- 2- Realizar estudios a la fauna marina de cada región y a felinos silvestres en regiones aledañas a los sitios de muestreo para poder establecer una relación entre la presencia, frecuencia y genotipos circundantes de *T. gondii*.
- 3- Realizar ensayos de inmunofluorescencia (IFI) para determinar viabilidad de ooquistes presentes en muestras de moluscos bivalvos y así establecer una relación directa entre el consumo de almejas y la transmisión *T. gondii* a sus consumidores.

- 4- En futuros estudios considerar el procesamiento de cada almeja de forma individual, como medio potencial de aumentar la sensibilidad de la detección de *T. gondii*.

BIBLIOGRAFÍA

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, A. A., Longcore, T., Barbieri, M., Dabritz, H., Hill, D., Klein, P. N., et al. (2019). The one health approach to Toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. *Ecohealth* 16, 378–390. doi: 10.1007/s10393-019-01405-7.
2. Ajzenberg, D., Banuls, A. L., Su, C., Dumetre, A., Demar, M., Carme, B. and Darde, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 34, 1185–1196.
3. Ajzenberg, D., Banuls, A. L., Tibayrenc, M. and Darde, M. L. (2002a). Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology* 32, 27–38.
4. Aksoy U, Marangi M, Papini R, Ozkoc S, Bayram Delibas S, Giangaspero a. (2014). Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM), *Food Microbiology* 44, 128 - 135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.012>
5. Alvarado-Esquivel, C., Torres-Berumen, J. L., Estrada-Martínez, S., Liesenfeld, O., & Mercado-Suarez, M. F. (2011). *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: a case-control study in a northern Mexican population. *Parasites & vectors*, 4(1), 75.
6. ARAP. (2012). Guía básica para el cultivo de moluscos, bivalvos del Pacífico panameño: conchuela, ostras y concha negra.
7. Arkush, K. D., Miller, M. A., Leutenegger, C. M., Gardner, I. A., Packham, A. E., Heckerth, A. R., ... Conrad, P. A. (2003). Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, 33, 1087–1097. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00181-4).

8. ASAE - Riesgos biológicos - Enfermedades transmitidas por los alimentos, actual. 2017. Disponible en: <http://www.asae.gov.pt>
9. Baldursson, S. and Karanis, P. (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks e an update 2004 e 2010. *Water Research*, 45, 6603 – 6614. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>.
10. Bell, A. and Ranford-Cartwright, L. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology* 18, 337–342.
11. Berdi3n, M. (2015). “Un par3sito intracelular: *Toxoplasma gondii*” (tesis de grado). Universidad Complutense de Madrid, Espa1a.
12. Bintsis, Thomas (2017). *Review Foodborne pathogens*. *AIMS Microbiology*, 3(3): 529-563. DOI: 10.3934/microbiol.2017.3.529
13. Boqvist S., S3derqvist K. and V3gsholm, I. 2018. Food safety challenges and One Health within Europe. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60:1 <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0355-3>.
14. Cabez3n, O., Garcia-Bocanegra, I., Molina-L3pez, R., Marco, I., Blanco, J. M., H3fle, U., Ob3n, E. (2011). Seropositivity and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild birds from Spain. *PLoS One*, 6(12), e29549.
15. Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Peruzzi, S., Zerbini, L., Bommezzadri, S., Dettori, G. and Chezzi, C. (2006). Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Bio Medica*, 77, 75–80.
16. Campos Machado, S. (2007). Determinaci3n de bacterias coliformes fecales en ejemplares de *Protothaca asperrima* en cuatro ecosistemas estuarinos de la zona oriental de El Salvador.
17. Checkley, W., Gilman, R.H., Epstein, L.D., Suarez, M., Diaz, J.F., Cabrera, L., Black, R.E. and Sterling, C.R. (1997) Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: Their acute effect on weight gain in Peruvian children. *American Journal of Epidemiology*, 45, 156– 163.

18. Chiang T-Y, Kuo M-C, Chen C-H, Yang J-Y, Kao C-F, et al. (2014) Risk Factors for Acute *Toxoplasma gondii* Diseases in Taiwan: A Population-Based Case- Control Study. PLoS ONE 9(3): e90880. doi: 10.1371/journal.pone.0090880.
19. Cody M. and Stretch, T. (2014) Food and water safety. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetic, 114, 1819 – 1829.
20. Coen LD, Brumbaugh RD, Bushek D, Grizzle R, Luckenbach MW, Posey MH, et al. (2007). Ecosystem services related to oyster restoration. Marine Ecology Progress Series, 341, 303–7.
21. Conrad, PA, Miller MA, Kreuder C, et al., 2005. Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment, International Journal for Parasitology 35, 1155–1168. doi:10.1016/j.ijpara.2005.07.002.
22. Contini, C., Seraceni, S., Cultrera, R., Incorvaia, C., Sebastiani, A. and Picot, S. (2005). Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. International Journal for Parasitology 35, 275–283.
23. Correa R, Cedeño I, Escobar C, Fuentes I. (2008) Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. Veterinary Parasitology, 153, 9-11. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.017.
24. Cubilla Ríos, L. (2016). Animales marinos de Pixvae. Journal of Chemical Information and Modeling, 53 (9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
25. Darde, M. L., Bouteille, B. and Pestre-Alexandre, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. Journal of Parasitology 78, 786–794.
26. Darrigran, G. (2013). Los moluscos bivalvos: Aportes para su enseñanza: teoría-métodos. Editorial Universidad de la Plata, Argentina. 83 pags.
27. Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. International Journal of food Microbiology, 103, 207 – 227.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.032

28. de Melo Ferreira, A., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., and Melo, M.N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 6, 22–31.
29. De Mone, C, HugHwana M, Feng Z, McClure, T, Greenwood S, Fung R, Kim, M. Scottweese J, Shapiro K. (2020) Application of next generation sequencing for detection of protozoan pathogens in shellfish. *Food and waterborne Parasitology*, 21, e00096. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00096>.
30. Dubey J. P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd ed. Maryland: CRC Press. 319 p.
31. Dubey JP, Jones JL (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology* 38:1257–1278
32. Dubey JP, Zarnke R, Thomas N, Wong S, Van Bonn W, Briggs M, et al. (2003) *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis* canis-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology* 116:275–296
33. Dubey, A. J. P., Dubey, J. P. (2011). Duration of Immunity to Shedding of *Toxoplasma gondii* Oocysts by Cats of *Toxoplasma gondii* to shedding duration of immunity oocysts by cats. *Society*, 81(3), 410–415.
34. Dubey, J. P. (2004). *Toxoplasmosis a waterborne zoonosis*. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 57-72.
35. Dubey, J. P. (2006). Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Veterinary Parasitology* 140: 69-75.
36. Dubey, J. P. and Beattie, C. P. (1988). *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
37. Dumbauld BR, Ruesink JL, Rumrill SS. (2009). The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: a review with

- application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture*, 290:196–223.
38. Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *The Lancet*, 353(9167), 1829-1833.
 39. Efstratiou A, Ongerth J, Karanis P. (2017) Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research*, 114 (1), 14 – 22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>.
 40. Elsheikha H. M. (2008). Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. *Public Health*; 122: 335-353.
 41. Esmerini P, Gennari S, Pena H. (2010) Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 170, 8–13. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.036.
 42. Fabrega L, Restrepo CM, Torres A, Smith D, Chan P, et al. (2020) Frequency of *Toxoplasma gondii* and risk factors associated with the infection in stray dogs and cats of Panama. *Microorganisms*, 8, 927; doi:10.3390/microorganisms8060927
 43. Fayer R, Dubey JP, Lindsay DS (2004) Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol* 20(11):531–536. DOI 10.1007/s12639-013-0349-7.
 44. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH (2014) Toxoplasmosis—a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE* 9:e90203
 45. Fuentes i Ferrer, M.V. and Barceló, ME. 2008. Parásitos en alimentos: un problema de salud pública. Universidad de Valencia. <https://www.researchgate.net/publication/258033306>.
 46. Getchell, R.G, D., Gosling, E., Grizel, H., Miahle, E., Chagot, D., & Jorgensen, C. B. (2016). Biología básica de los bivalvos: taxonomía, anatomía y ciclo vital. Cultivos de Bivalvos En Criadero. *Manual Práctico.*, 3: 19–30.

47. Ghozzi, K., Marangi, M., Papini, R., Lahmar, I., Challouf, R., Houas, N., et al., (2017). First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Marine Pollution Bulletin* 117, 197–202.
48. Giangaspero, A., Papini, R., Marangi, M., Koehler, A.V., Gasser, R.B., 2014. *Cryptosporidium parvum* genotype IIa and *Giardia duodenalis* assemblage A in *Mytilus galloprovincialis* on sale at local food markets. *International Journal of Food Microbiology* 171, 62–67.
49. Gilot-Fromont E, Lélou M, Dardé ML, Richomme C, et al., (2012). The Life Cycle of *Toxoplasma gondii* in the Natural Environment, Chapter 1. <http://dx.doi.org/10.5772/48233>.
50. Giraldo, R. M. L. (2008). Toxoplasmosis. *Medicina & Laboratorio*, 14(7–8), 359–375.
51. Gomez-Couso H, Freire-Santos F, Amar CFL, Grant KA, Williamson, K, Ares-Mazás ME, McLauchlin J. 2004. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 91 (3), 279 - 288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.003>.
52. González M. I., Rojas T. & Rubalcaba S. 2000. Microbiological quality of coastal waters in tropical climates. Habana Cuba.
53. Howe, D. K. and Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases* 172, 1561–1566.
54. Jewell ML, Frenkel JK, Johnson KM, Reed V, Ruiz A. (1972) Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21(5), 512- 517.
55. Jordán, L., & Gómez, J. (2006). Evaluación Biológica de *Anadara tuberculosa*, Golfo de Montijo, República de Panamá. *Tecnociencia*, 8(2), 191–205. http://www.up.ac.pa/ftp/2010/f_ciencias/tecnociencias/volumen82/Articulo13.pdf

56. Koh, W., Clode, P., Monis, P., Thompson, R.C.A., 2013. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasite Vectors* 6, 270.
57. Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., et al., 2018. Public health risks associated with food-borne parasites. *EFSA J.* 16 (12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5495>.
58. Kreuder, C., Miller, M.A., Jessup, D.A., Lowenstine, L.J., Harris, M.D., Ames, J.A., Carpenter, T.E., Conrad, P.A., Mazet, J.K., 2003. Recent patterns of mortality in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Journal of Wildlife Diseases* 39, 495–509.
59. Lehmann, T., Graham, D. H., Dahl, E. R., Bahia-Oliveira, L. M., Gennari, S. M. and Dubey, J. P. (2004). Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infection, Genetics and Evolution* 4, 107–114.
60. Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R., Dubey, J. P. (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11423-11428.
61. Leukesova d, Literak T. (1998) Shedding of *Toxoplasma gondii* by Felidae in zoos in the Czech Republic, *Veterinary Parasitology*, 74(1), 1-7.
62. Lindsay D.S., Dubey, J.P. 2020. Chapter 6 - Toxoplasmosis in wild and domestic animals. *Toxoplasma gondii: The Model apicomplexan – Perspectives and methods*, third edition, pgs 293 – 320.
63. Lindsay, D.S., Collins, M.V., Mitchell, S.M., Cole, R.A., Flick, G.J., Wetch, C.N., Lindquist, A., Dubey, J.P., (2003). Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50, 687–688 (Suppl).
64. Lindsay, D.S., Phelps, K.K., Smith, S.A., Flick, G., Sumner, S.S., Dubey, J.P., (2001). Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by

- eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 197S–198S (Suppl.).
65. Lindsay, D.S.; Collins, M.V.; Mitchell, S.M.; Wetch, C.N.; Rosypal, A.C.; Flick, G.J.; Zajac, A.M.; Lindquist, A.; Dubey, J.P. (2004). Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Parasitology*, 90, 1054–1057.
 66. López, I. E., Gustavo L., I., Gutiérrez, & Villalaz, J. (2003). Relación Del Desarrollo Gonadal De La Almeja Blanca (*Protothaca Asperrima*) (Pelecypoda: Veneridae) Con La Tasa De Consumo De Oxigen. *Tecnociencia*, 5: 87–96.
 67. López, I., Luna, I. G., Gutiérrez, A., & Villalaz, J. (2005). Ciclo Reproductivo De La Almeja Blanca *Protothaca Asperrima* (Pelecypoda: Veneridae) En Playa Bique, Arraijan. *Tecnociencia*, 7(1), 43–53.
 68. Mahalakshmi. (2010). Evaluation of Nested PCRs targeting the BI and SAG2 Genes for Detection of *Toxoplasma gondii* Genome in Aqueous Humor from HIV Positive *Toxoplasma* Retinochoroiditis Patients in a Tertiary Eye Hospital. *American Medical Journal*, 1(2), 157–163. <https://doi.org/10.3844/amjsp.2010.157.163>.
 69. Mangen, M.J., Bouwknegt, M., Friesema, I.H., Haagsma, J.A., Kortbeek, L.M., Tariq, L., Wilson, M., van Pelt, W., Havelaar, A.H., (2015). Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2011. *International Journal of food Microbiology*, 196, 84–93.
 70. Marquis ND, Bishop TJ, Record NR, Countway PD, Fernández Robledo JA. (2019). Molecular Epizootiology of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Maine (USA). *Pathogens*, 8(3): 125. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens8030125>. PMID:31412532.
 71. Massie, GN, Ware MW, Villegas EN, Black MW. (2010) Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. *Veterinary Parasitology*, 169, 296-303. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.002.

72. Martínez, J. C. & Vásquez Yeomans, R. (2014). Manual de buenas practicas para el cultivo de moluscos bivalvos. OIRSA-OSPESCA pp. 117.
73. Mazzillo, F. F., Shapiro, K., and Silver, M. W. (2013). A new pathogen transmission mechanism in the ocean: the case of sea otter exposure to the land parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 8: e82477. doi: 10.1371/journal.pone.008 2477.
74. Mendez, E. (1970) Los principals mamíferos silvestres de Panamá. Ciudad de Panamá, Laboratorio Conmemorativo Gorgas.
75. Miller, M.A., Gardner, I.A., Packham, A., Mazet, J.K., Hanni, K.D., Jessup, D., Estes, J., Jameson, R., Dodd, E., Barr, B.C., Lowenstine, L.J., Gulland, F.M., Conrad, P.A., 2002a. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for demonstration of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sea otter (*Enhydra lutris*). *Journal of Parasitology*, 88, 594 – 599.
76. Miller, M.A., Gardner, I.A., Kreuder, C., Paradies, D.M., Worcester, K.R., Jessup, D.A., Dodd, E., Harris, M.D., Ames, J.A., Packham, A.E., Conrad, P.A., 2002b. Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *International Journal for Parasitology*, 32, 997–1006.
77. Miller, M.A. et al., 2008. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff, and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*, doi: 10.1016/j.ijpara.2008.02.005.
78. Miller, M.A., Shapiro, K., Murray, M., Haulena, M.J., Raverty, S., (2018). Protozoan parasites of marine mammals. In: Gulland, Frances M.D., Dierauf, Leslie A., Whitman, K.L. (Eds.), *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. CRC Press, pp. 425–470.
79. Miller NL, Frenkel JK, Dubey Jp. (1972) Oral infection with *Toxoplasma* cyst and oocysts in felines, other mammals, and birds. *Journal of Parasitology*, 58(5), 928-937.

80. Montoya, J., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363(9425), 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16412-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16412-x).
81. Hatam-Nahavandi Kareem Rafael Calero-Bernal, Mohammad Taghi Rahimi, Abdol Sattar Pagheh, Mehdi Zarean, Asiyeh Dezhkam & Ehsan Ahmadpour (2021). *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as publichealth concerns: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 11:9509. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89031-8>
82. Nichols, G. 1999. Food-borne protozoa. *British Medical Bulletin* 1999, 55(4), 209-235.
83. Oliveira J., Cunha A., Castilho F., Romalde JL., Pereira MJ. (2011) Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives e A mini-review. *Food Control* 22, 805 – 816. doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.032
84. Ortega, Ynes (2006). *Food Parasites*. Springer, New York, NY 10013, USA, 285 pp.
85. Palos Ladeiro M, Bigot A, Aubert D, Hohweyer J, Favennec L, Villena I, et al. (2013). Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2): 778-789. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1189-1>. PMID:23001759.
86. Pappas, G., Roussos, N., Falagas, M.E., 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39, 1385–1394.
87. Paredes, C., & Cardoso, F. (2001). El género *Donax* en la costa peruana (Bivalvia: Tellinoidea). *Revista Peruana de Biología*, 8(2): 83–93. <https://doi.org/10.15381/rpb.v8i2.8363>.
88. Patton S, Rabinowitz A, Randolph S, Johnson SS. (1986) A coprological survey of parasites of wild neotropical Felidae, *J Parasitol*, 72(4), 517-520.

89. Petersen E., Dubey J. P. (2001). Biology of toxoplasmosis. In: Joynson DHM, Wreghitt TG (eds). *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. United Kingdom: Cambridge University Press. p 1-42.
90. Posada, J. M., Piedra, A., Ross, E., Días, J. M., Melo, G., Sánchez, N., Guerra, Z., & De León, M. (2014). Guía de Identificación: Invertebrados marinos de importancia comercial en la costa Pacífica de Panamá. 120 pgs.
91. Potasman, I., Paz, A., Odeh, M., (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 35, 921–928.
92. QIAGEN, (2017). Quick-Star Protocol QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit., Technical Support support.qiagen.com.
93. Raiden Grandía, G., Ángel Entrena, G., & Jeddú Cruz, H. (2013). Toxoplasmosis en *Felis catus*: Etiología, epidemiología y enfermedad. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 24(2), 131–149.
94. Recio, G. (2016). Bivalvos, Características y Clasificación. <https://invertebrados.paradais-sphynx.com/moluscos/bivalvos-caracteristicas-clasificacion>.
95. Rengifo-Herrera C, Pile E, García A, Pérez A, Pérez D, Nguyen FK, Guardia V, Mcleod R, Caballero Z. (2017) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pets from metropolitan regions of Panama. *Parasite*, 24, 9. DOI: 10.1051/parasite/2017009
96. Ribeiro LA, Santos LK, Brito PA Jr, Maciel BM, Silva AV, Albuquerque GR. (2015). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Brazilian oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Genetics and Molecular Research*, 14(2): 4658-4665. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.May.4.25>. PMID:25966240.
97. Robertson, L.J. (2007). The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 201–216.
98. Rodríguez, S. R. (2009). Diagnóstico del cultivo y extracción de moluscos en Centroamérica.

99. Salvatella Agrelo, R., 1996.- Enfermedades parasitarias en Uruguay sus Fundamentos y Consecuencias Sociales y Económicas. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, OPS/OMS, Montevideo, Uruguay, 80 pp.
100. Schets, F.M., van den Berg, H.H., Engels, G.B., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M., (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non- commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* 113, 189–194.
101. Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, London 359, 82–85.
102. Souza DSM, Ramos APD, Nunes FF, Moresco V, Taniguchi S, Guiguet Leal DA, et al. (2012). Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical and chemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 76(2): 153- 161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.018>. PMID:22036209.
103. Su, C., Zhang, X., & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, 36(7), 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>.
104. Sundar, N., Cole, R. A., Thomas, N. J., Majumdar, D., Dubey, J. P., Su, C. (2008) Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 151, 125 –132, doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.012.
105. Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. and Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217–1258.
106. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC; 2015). Available online: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/> (accessed on 18 August 2015).
107. Thierman, E. (1973). Toxoplasmosis. Monografía No.23. Colección de Monografías Biológicas, Universidad de Chile.

108. Thomas, N.J., Cole, R.A., 1996. The risk of disease and threats to the wild population. *Endangered Species Update, Conservation and Management of the Southern Sea Otter*. Special Issue 13, 23–27.
109. Toro-Montoya Al. (1995). Toxoplasmosis. *Medicina & Laboratorio*; 5: 129-141.
110. Trollope DR and Al-salihi SBS. (1984) Sewage-Derived bacteria monitored in a marine water column by means of captive mussels. *Marine Environmental Research*12, 311-322.
111. VanWormer, E., Carpenter, T.E., Singh, P., Shapiro, K., Wallender, W.W., Conrad, P.A., et al., (2016). Coastal development and precipitation drive pathogen flow from land to sea: evidence from a *Toxoplasma gondii* and felid host system. *Scientific Reports*, 6, 9.
112. Vejarano R., Siche R., Tesfaye W. (2017) Evaluation of biological contaminants in foods by hyperspectral imaging: A review, *International Journal of Food Properties*, 20:sup2, 1264-1297, DOI: 10.1080/10942912.2017.1338729
113. Villegas, E. (2014). Using bivalves as biosentinels to detect *Cryptosporidium spp.* and *Toxoplasma gondii* contamination in aquatic environments. In *Proceedings of the 89th Annual Meeting of the American Society of Parasitologists*, New Orleans, LA, USA, 24–27 July 2014; Volume 89, pp. 117–118.
114. Wang T, Tang Z, Li J, Li X, Wang X, Zhao Z. (2013) A potential association between *Toxoplasma gondii* infection and schizophrenia in mouse models. *Experimental Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.08.012>
115. Wainwright, Kathryn E. 2008. *Toxoplasma gondii* Oocysts in Water. UC San Diego Research Theses and Dissertations, University of California, Los Angeles
116. World Health Organization (WHO), (2008). Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases Second formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FFERG).

59

págs.

http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/burden_nov08/en. R

117. World Health Organization (WHO), (2015). Who estimates of the global burden of foodborne diseases, Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007 – 2015, 264 págs.
118. Zhang, M., Yang, Z., Wang, S., Tao, L.F., Xu, L.X., Yan, R.F., et al., 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. *Veterinary Parasitology* 200, 85–89.
119. Zhao GW, Shen B, Xie Q, XU LX, Yan RF, Song XK, Hassan IA, Li XR. (2012) Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in China based on circulating antigens and antibodies. *Veterinary Parasitology* 185, 72–77, doi:10.1016/j.vetpar.2011.10.031.
120. Zhao P, Zhang H, Lin RQ, Zhang DL, Song HQ, Su, Ch, Zhu XQ. (2009) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitology International*, 58, 193-195. doi:10.1016/j.parint.2009.01.006.