

Laura Herrero Querol

Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en el proceso integral de elaboración del jamón curado

Departamento

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es

Bayarri Fernandez, Susana
Gracia Salinas, María Jesús

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

TESIS DOCTORAL

Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en el proceso integral de elaboración del jamón curado

Memoria presentada por

LAURA HERRERO QUEROL

Para optar al Grado de Doctor por la
Universidad de Zaragoza

DIRECTORAS

Dra. Dña. Susana Bayarri Fernández

Dra. Dña. María Jesús Gracia Salinas

Zaragoza, Julio 2019



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación Mixto
Agroalimentario de Aragón
Universidad Zaragoza



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza

Dña. SUSANA BAYARRI FERNANDEZ, Profesora Titular del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, y Dña. M^a JESÚS GRACIA SALINAS, Profesora Titular del Área de Sanidad Animal del Departamento de Patología Animal en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN,

Que **Dña. LAURA HERRERO QUEROL** ha realizado bajo nuestra dirección la memoria de Tesis Doctoral con el título “**Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en el proceso integral de elaboración del jamón curado**”, cuyo contenido se corresponde con el Plan de Investigación aprobado por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos.

Por todo ello, como directoras de la Tesis Doctoral, informamos favorablemente sobre la misma, ya que cumple con todos los requisitos legales para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 11 de julio de 2019

Fdo.: Dra. Susana Bayarri Fernández

Fdo.: Dra. M^a Jesús Gracia Salinas



A mi familia, por todo

AGRADECIMIENTOS



Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado gracias a la financiación del proyecto “Evaluación y control del riesgo de Toxoplasma gondii en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de Listeria monocytogenes” (INNFACTO IPT-2012-0189060000, MINECO/FEDER) y del Grupo de Investigación de Referencia A06_17R “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria” (Gobierno de Aragón/FEDER 2014-2020 “Construyendo Europa desde Aragón”).

Gracias al Área de Nutrición y Bromatología y al Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, así como al Instituto Agroalimentario de Aragón (UNIZAR-CITA) por acogerme en sus laboratorios y ayudarme con todo lo que he necesitado para poder realizar este trabajo de investigación.

La realización de esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin el apoyo y colaboración de muchas personas. Por ello, quería agradecerles su ayuda y compañía durante todos estos años, y en especial:

A mis directoras de la Tesis Doctoral, la Dra. Susana Bayarri y la Dra. María Jesús Gracia, por haber confiado en mí y darme la oportunidad de haber realizado este trabajo. Gracias por haberme ayudado en todo lo que he necesitado durante todos estos años, y por todo el tiempo y esfuerzo que habéis dedicado a este proyecto. Gracias por todo el ánimo que me habéis dado en los momentos más duros y por celebrar juntas los éxitos que hemos conseguido.

Al Dr. Agustín Ariño, investigador principal del Grupo de Investigación de Referencia “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria”, por ser la persona que me dio la oportunidad de comenzar en el mundo de la investigación. Gracias por la confianza que has tenido en mí y por toda la ayuda que me has ofrecido a lo largo de este tiempo.

Al resto de profesores del Área de Nutrición y Bromatología y del Área de Sanidad Animal, por hacerme sentir como en casa. Ha sido un verdadero placer poder compartir mis días en el laboratorio con tan grandes personas. Gracias por toda la ayuda que me habéis prestado, por el buen ambiente que siempre me habéis ofrecido y por compartir conmigo todos vuestros conocimientos. A todos vosotros, gracias.

A Nieves Ortega, por toda la ayuda y colaboración que me has ofrecido. Gracias por ayudarme a preparar las largas jornadas de digestiones y a solucionar todos los imprevistos.

Al Dr. Nacho de Blas, por ser mi guía en el complicado mundo de la estadística. Gracias por tu disposición y paciencia.

Al Dr. Jose Miguel Marcen, por ayudarme en mis comienzos con la técnica IFI. Gracias por la paciencia y por el tiempo que has dedicado a que las cosas salieran bien.

A los profesionales de la empresa Grupo Jorge. A Javier Úbeda y a Carmen Matud por su gestión y coordinación para que todo el trabajo fuera adelante. A Fidel Aguilar, por su colaboración en todo lo que lo hemos necesitado y por cuidar tan bien de nuestros jamones. A Rafael Guillén por ayudarnos a realizar las tomas de muestras de sangre de los cerdos y por permitirnos acompañarte en las visitas a las granjas.

A los miembros de AlquizVetek, por su ayuda en el mundo de la biología molecular. Al Dr. Nabil Halaihel, por enseñarme todo lo que conozco sobre PCR, por tu buen humor y por los debates nocturnos sobre cebadores y pares de bases mientras esperábamos que acabara el termociclador. Al Dr. Héctor Fuertes, gracias por toda tu ayuda y por estar siempre con una sonrisa, eres una gran persona. A Urko Múzquiz, siempre te estaré agradecida por todo lo que me has ayudado tanto profesional como personalmente.

A los técnicos y responsables del Animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), con la Dra. Elena Tapia a la cabeza, por el asesoramiento y la ayuda que nos han ofrecido siempre para que nuestros ratones estuvieran en las mejores condiciones.

A los miembros de la Fundación Parque Científico Tecnológico Aula Dei (PCTAD), en especial a la Dra. Yoko Higaki y la Dra. Sara Remón, por ayudarnos a dar nuestros primeros pasos en el mundo de la biología molecular.

A Susana Morrás y a Anna Rodríguez, por compartir conmigo un tiempo en el laboratorio. Gracias por la ayuda que me ofrecisteis, por vuestra predisposición y por los buenos momentos que pasamos juntas. Los largos maratones de trabajos a vuestro lado se me hicieron un paseo muy agradable.

A mis compañeros del Área, por todo. Soy muy afortunada por las maravillosas personas que he tenido a mi lado durante todo este tiempo. Gracias a Miriam Labrador, a Natalia Monreal, a Paula

Nieto, a Noemí Bervis, a Héctor Calvo, y a todos los que habéis coincidido en algún momento conmigo por el laboratorio. Gracias por todo lo que hemos pasado juntos, por los ánimos que me habéis dado cuando más los necesitaba, por celebrar juntos los éxitos por todo lo alto, por nuestras conversaciones filosóficas mientras esperábamos que acabara alguna incubación, por los almuerzos para coger fuerzas para seguir... Me tendréis siempre ahí para lo que necesitéis.

A todos mis amigos de la Facultad, Beatriz Chueca, María Cermeño, Elisa Pérez y a todos los que os habéis cruzado en mi camino durante estos años y ya no os habéis separado de él. Doy gracias por las maravillosas personas que he tenido la suerte de conocer durante la realización de este trabajo. Me llevo muy buenos amigos que me han ayudado y apoyado para que todo me saliera bien. Muchas gracias a todos.

A mis amigas, por la paciencia y cariño que me habéis ofrecido todos estos años. Siento haber estado bastante desaparecida durante este último tiempo. Pronto recuperaré la libertad y os lo compensaré bonicas más.

A mis compañeras del Máster de Profesorado, por el apoyo y la fuerza que me habéis dado siempre. Aunque estuviera desbordada y corriendo de un lado para otro siempre habéis conseguido animarme y sacarme una sonrisa. Siempre seremos las Supernenas.

A mis compañeros del Centro de Formación Profesional, por preocuparos y animarme siempre. Da gusto el poder trabajar con personas como vosotros. Y a mis alumnos, gracias por preguntarme e interesaros por mis avances.

A mi familia y seres queridos, por todo el apoyo y cariño que me habéis dado a lo largo de este tiempo. En especial a mis padres, Matías y M^a Camen, por darme todo lo que tengo, por haber confiado en mí desde el principio y por ser mi apoyo siempre que lo he necesitado. Gracias a vosotros soy la persona que soy y he conseguido llegar hasta aquí. Siempre os estaré agradecida por todos los esfuerzos que habéis hecho para que creciera como persona, tuviera una buena formación y que mis sueños se cumplieran.

A mi gata Shiva, por acompañarme durante las largas jornadas de escritura dormidita al lado del ordenador.

A todos, gracias.

ÍNDICE GENERAL



ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
RESUMEN	1
SUMMARY	5
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	9
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
1- <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.1- Antecedentes históricos	14
1.2- Etiología de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.2.1- Estadios de <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.2.1.1- Taquizoito	15
1.2.1.2- Bradizoito	17
1.2.1.3- Esporozoito	18
1.2.2- Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
1.2.3- Caracterización de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
1.3- Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
2- <i>Toxoplasma gondii</i> en el hombre	25
2.1- Vías de transmisión	25
2.2- Seroprevalencia	26
2.3- Toxoplasmosis	28
3- <i>Toxoplasma gondii</i> en animales	30
3.1- Gato	30
3.2- Rumiantes, équidos, aves y especies cinegéticas	30
3.3- Cerdo	32
3.3.1- Fuentes de infección, sintomatología y respuesta inmune	32
3.3.2- Factores de riesgo en producción primaria	35
3.3.3- Seroprevalencia	39
3.3.4- <i>Toxoplasma gondii</i> en carne de cerdo	43
4- Influencia del procesado tecnológico de la carne en la viabilidad de <i>Toxoplasma gondii</i>	45

4.1- Efecto del tratamiento tecnológico del curado	47
4.1.1- <i>Toxoplasma gondii</i> en el jamón curado	50
5- Métodos de detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	53
5.1- Detección en animales vivos	53
5.2.- Detección en carne	56
III. MATERIAL Y MÉTODOS	65
1- Estudio de <i>Toxoplasma gondii</i> en producción primaria	67
1.1- Estudio de la seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en el ganado porcino	67
1.1.1- Muestreo de granjas y cerdos	67
1.1.2- Análisis serológico	69
1.1.2.1- Optimización de la técnica IFI: elección de la anti-inmunoglobulina	69
1.1.2.2- Protocolo de análisis	70
1.2- Estudio de factores de riesgo en granjas	72
1.2.1- Recogida de datos en granjas	72
1.2.2- Procesamiento de los datos	75
1.3- Análisis estadístico	76
2- Estudio de <i>Toxoplasma gondii</i> en tejidos frescos	77
2.1- Selección de cerdos y toma de muestras	77
2.2- Análisis de <i>Toxoplasma gondii</i> en tejidos frescos	78
2.2.1- Digestión péptica	80
2.2.2- Análisis de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante bioensayo en ratón	82
2.2.2.1- Uso y mantenimiento de los ratones de experimentación	82
2.2.2.2- Determinación de la presencia de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante bioensayo en ratón	84
2.2.2.3- Determinación de la viabilidad de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante bioensayo en ratón	85
2.2.3- Análisis de <i>Toxoplasma gondii</i> en el extracto de digestión mediante qPCR	92
2.3- Análisis estadístico	93
3- Estudio de <i>Toxoplasma gondii</i> en jamón curado	93

3.1- Proceso de curación de los jamones y toma de muestras	94
3.2- Análisis de <i>Toxoplasma gondii</i> en el jamón curado	97
3.2.1- Digestión péptica	97
3.2.2- Análisis de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante bioensayo en ratón	97
3.2.3- Análisis de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante qPCR	97
3.3- Análisis de la composición fisicoquímica de los jamones curados	97
3.4- Análisis estadístico	98
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
1- <i>Toxoplasma gondii</i> en producción primaria	100
1.1- Resultados	100
1.1.1- Seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> en porcino	100
1.1.2- Factores de riesgo asociados con <i>Toxoplasma gondii</i> en las explotaciones porcinas	101
1.2- Discusión	108
2- <i>Toxoplasma gondii</i> en tejidos frescos	113
2.1- Resultados	113
2.1.1- <i>T. gondii</i> en tejidos frescos	113
2.1.2- <i>T. gondii</i> en pernil vs. órganos diana	116
2.2- Discusión	120
3- Influencia del proceso tecnológico del curado en <i>Toxoplasma gondii</i>	125
3.1- Resultados	125
3.1.1- <i>T. gondii</i> en el jamón curado	125
3.1.2- Composición fisicoquímica de los jamones curados e influencia sobre <i>T. gondii</i>	128
3.2- Discusión	130
V. CONCLUSIONES	135
VI. CONCLUSIONS	139
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
VIII. REFERENCIAS DE LEGISLACIÓN	195
IX. ANEXOS	197

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en cerdo	40
Tabla 2: Prevalencia de <i>T. gondii</i> en carne de cerdo	44
Tabla 3: Concentración y pureza del DNA obtenidos con los tres kit comerciales	86
Tabla 4: Distribución de la toma de muestras de jamón curado	96
Tabla 5: Resultados de las encuestas epidemiológicas y número de animales seropositivos para cada variable	101
Tabla 6: Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de <i>T. gondii</i> en las granjas estudiadas	105
Tabla 7: Presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en tejidos frescos	114
Tabla 8: Presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en pernil y órganos diana	118
Tabla 9: <i>T. gondii</i> en pernils y jamones curados	126
Tabla 10: Parámetros fisicoquímicos de los jamones curados	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Taquizoitos	15
Figura 2: Estructura del taquizoito	16
Figura 3: Estructura de taquizoito y de bradizoito	17
Figura 4: Quiste tisular con bradizoitos en su interior	18
Figura 5: Ooquiste no esporulado y ooquiste esporulado	19
Figura 6: Fase sexual del ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	21
Figura 7: Mecanismo de invasión de los taquizoitos de <i>T. gondii</i> en las células hospedadoras	24
Figura 8: Quiste tisular en tejido cerebral y en tejido muscular esquelético	25
Figura 9: Prevalencia de <i>T. gondii</i> en el hombre	27
Figura 10: Cinética de anticuerpos en el cerdo	35
Figura 11: Cerdos con acceso a parques exteriores	37
Figura 12: Seroprevalencia mundial de <i>T. gondii</i> en cerdos	42
Figura 13: Seroprevalencia porcina en España	43
Figura 14: Fases de producción del jamón curado	49
Figura 15: Esquema del gráfico de amplificación mostrado por el software de un termociclador	62
Figura 16: Representación de la gráfica de amplificación mostrada por el software de un termociclador	63
Figura 17: Diseño experimental del estudio de <i>T. gondii</i>	66
Figura 18: Granjas porcinas en las que se tomaron muestras de sangre	67
Figura 19: Cuestionario de toma de muestras de sangre en las granjas	68
Figura 20: Procedimiento de análisis mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	69
Figura 21: Protocolo de análisis serológico mediante la técnica IFI	71
Figura 22: Resultados de la técnica IFI: resultado positivo y resultado negativo	72
Figura 23: Encuesta epidemiológica realizada en las 161 granjas del estudio	73
Figura 24: Formulario para introducir los datos epidemiológicos de las instalaciones	75
Figura 25: Formulario para introducir los datos referentes a cada toma de muestras	75

Figura 26: Formulario para introducir los datos de cada muestra de sangre	76
Figura 27: Selección de animales, toma de muestras y preparación de los tejidos frescos ..	78
Figura 28: Procedimiento de análisis de <i>T. gondii</i> en tejidos frescos porcinos	79
Figura 29: Fases del procedimiento de la digestión péptica en los tejidos porcinos frescos .	81
Figura 30: Procedimiento de análisis mediante bioensayo en ratón	82
Figura 31: Laboratorio de bioseguridad en las instalaciones del CIBA	83
Figura 32: Mantenimiento, inoculación y toma de muestras de los ratones	84
Figura 33: Curva de amplificación y curva de disociación con el cebador repetitivo de 529 bp	87
Figura 34: Curva de amplificación y curva de disociación con el cebador SAG	88
Figura 35: Curva de amplificación y curva de disociación con el cebador repetitivo de 529 bp y el SAG	88
Figura 36: Curva de amplificación y curva de disociación del gen de la β -actina	90
Figura 37: Procedimiento de análisis de una muestra mediante qPCR	91
Figura 38: Curva de amplificación de las diluciones del control positivo	91
Figura 39: Representación de la curva de calibrado obtenida de las diluciones del control positivo	92
Figura 40: Procedimiento de análisis de la presencia y viabilidad de <i>T. gondii</i> en el jamón curado	94
Figura 41: Proceso de curación de los jamones	96
Figura 42: Preparación de las muestras de los jamones curados	96
Figura 43: Distribución de los títulos serológicos porcinos positivos en las 60 granjas estudiadas	100
Figura 44: Distribución de los títulos serológicos de los 1.200 cerdos analizados	101
Figura 45: Factores de riesgo observados en las granjas	105

RESUMEN



Toxoplasma gondii es un protozoo de distribución mundial, que afecta a los félidos como hospedadores definitivos, y a los animales de sangre caliente, incluido el hombre, como hospedadores intermediarios. Se estima que entre el 25 % - 40 % de la población humana está infectada. La toxoplasmosis, normalmente cursa de forma leve o asintomática, pero en personas inmunocomprometidas y en mujeres embarazadas puede llegar a producir una enfermedad severa.

Dado su carácter omnívoro, los cerdos tienen una gran posibilidad de infectarse con *T. gondii*. Además, los quistes del parásito que se forman en sus tejidos pueden persistir durante varios años, siendo el consumo de carne cruda, poco cocinada o curada de esta especie una de las fuentes más importantes de infección en el hombre.

España es un país con una gran tradición en la elaboración y consumo de productos cárnicos curados. De los elaborados con carne de cerdo, el jamón curado es uno de los productos más representativo de la gastronomía española, siendo nuestro país el primer productor mundial de jamones y paletas. Por ello, los consumidores demandan jamones curados libres de *T. gondii* y esto ha llevado a las empresas del sector cárnico a la necesidad de obtener datos científicos sobre el efecto de los tratamientos tecnológicos que aplican en la viabilidad del parásito, y así, poder garantizar la seguridad alimentaria.

Por todo ello, los objetivos de esta Tesis Doctoral se han centrado en el estudio de *T. gondii* en el proceso integral de elaboración del jamón curado; en la producción primaria, en el matadero y en la industria de elaboración del jamón curado.

Se ha realizado un estudio de la seroprevalencia porcina en 161 granjas de la Comunidad Autónoma de Aragón. El número de muestras analizadas se ha calculado estadísticamente para conseguir datos representativos del total de los animales. Se han analizado 1.200 sueros porcinos mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), calculándose una seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo del 24,5 %.

Asimismo, se han estudiado los principales factores de riesgo presentes en las granjas que favorecen el contacto de los cerdos con *T. gondii*. Para ello se han realizado encuestas epidemiológicas en todas las instalaciones incluidas en el trabajo, así como visitas a las explotaciones para ver su estado. Tras su análisis estadístico se ha comprobado que los factores que tiene

influencia en la infección son la presencia de gatos dentro o fuera de las granjas, la presencia de otros animales como perros en el exterior de las instalaciones, el censo porcino, el incorrecto mantenimiento y el desorden de las instalaciones, y el no usar cebos para el control de roedores.

Del total de los animales analizados se han seleccionado 38 animales con diferentes títulos serológicos y 3 como controles negativos. Los animales se han sacrificado y uno de los perniles y los órganos diana (lengua y corazón) se han analizado en fresco para detectar al parásito en los tejidos porcinos. La presencia de *T. gondii* se ha evaluado mediante bioensayo en ratón y por qPCR, obteniéndose valores del 73,7 %. La viabilidad del parásito en tejidos porcinos frescos se ha comprobado detectando DNA de *T. gondii* en los cerebros de los ratones seropositivos. El parásito era viable en el 42,1 % de los tejidos analizados.

Con los resultados anteriores se ha comprobado que existe una relación estadísticamente significativa entre el título serológico del cerdo y la detección del parásito en sus tejidos. Se ha observado una mayor presencia del parásito en los tejidos de cerdos con títulos serológicos iguales o mayores a 1:80.

Asimismo, también se ha realizado un estudio estadístico para comparar los resultados obtenidos en cada uno de los tejidos porcinos (pernil y órganos diana). Se ha llegado a la conclusión que no hay diferencias entre los valores observados de presencia y viabilidad del parásito entre ambos tejidos. La constatación de que no existen diferencias significativas en estos resultados, existiendo concordancia entre ambas muestras, nos permite proponer como herramienta de control de materia prima la selección y análisis de órganos diana, de menor valor comercial que los perniles.

El pernil homólogo de cada uno de los cerdos se ha sometido al proceso de curación, dividiéndose en dos tiempos de curado (9 y 12 meses). Tras el procesado se ha realizado un estudio para evaluar la presencia y viabilidad de *T. gondii* en los jamones y así comprobar la eficacia del curado en la supervivencia del parásito. Se ha observado que este tratamiento tiene eficacia contra *T. gondii* pero no lo destruye totalmente, ya que se ha detectado presencia del parásito en 11 jamones y viabilidad en 4 de los mismos. Asimismo, se ha determinado que el tiempo de curado de 12 meses tiene mayor efecto frente al parásito que el tratamiento de 9 meses.

Por último, otro de los hitos que se han conseguido en este trabajo ha sido el estudio de los factores fisicoquímicos de los jamones para evaluar su influencia en la presencia y viabilidad del parásito en el producto final. Se ha determinado una relación estadística entre la concentración de grasa del jamón curado y la viabilidad del parásito.

Con los resultados obtenidos, se han propuesto medidas de gestión del riesgo de *T. gondii* en la industria de elaboración de jamón curado, como la aplicación de Buenas Prácticas de Higiene en granjas, la selección de cerdos seronegativos o con titulaciones que impliquen una baja probabilidad de encontrar el parásito en su carne, la realización del control de *T. gondii* en órganos diana con un menor valor comercial o el aumento del tiempo de curado del jamón.

SUMMARY



Toxoplasma gondii, is a worldwide-distributed *parasite*, that affects felids as definitive hosts, and warm-blooded animals, including humans, as intermediate hosts. It is estimated that 25 % - 40 % of the human population is infected. Toxoplasmosis, usually occurs as a mild or asymptomatic condition, but in immunocompromised people and pregnant women can produce a severe disease.

Because of their omnivorous character, pigs have a high chance of being infected with *T. gondii*. Additionally, parasitic cysts that are formed in their tissues may persist for several years. The consumption of raw, undercooked or cured meat of this species is one of the most important sources of infection.

Spain is a country with a long tradition in production and consumption of cured meat products. Cured ham is one of the most representative products of Spanish gastronomy, and our country is one of the major producers. Therefore, consumers demand *T. gondii* free cured hams. This situation has led the meat industry to obtain scientific data of the effect of technological treatments on *parasite* viability, and to ensure food security.

Therefore, the objectives of this Doctoral Thesis have focused on the study of *T. gondii* in the processing of cured ham in its entirety: primary production, slaughterhouse and the cured ham processing industry.

A study of swine seroprevalence has been conducted on 161 farms in the Autonomous Community of Aragon. A sample number has been statistically calculated to obtain representative data. 1,200 pig serums have been analysed using the immunofluorescence antibody test (IFAT), with a seroprevalence of 24.5 %.

The main risk factors present in farms that increase pig infection with *T. gondii* have also been studied. Epidemiological surveys have been conducted on all farms in the study and farm inspections have been carried out to assess their conditions. After statistical analysis, the factors that influence pig infection are the presence of cats in or around the farms, the presence of other animals, such as dogs, around the facilities, poor hygiene and maintenance of the farms, and a lack of baits rodent control.

Thirty-eight seropositive pigs with different titers, and 3 animals as negative controls, were selec-

ted. The selected pigs were slaughtered in a commercial slaughterhouse. One of the ham and the target organs (tongue and heart) have been analyzed in their raw state to detect the *parasite* in the porcine tissues. *T. gondii* presence (73.7 %) has been evaluated by mouse bioassay and qPCR. The *parasite* viability in raw porcine tissues has been demonstrated by detecting *T. gondii* DNA in the seropositive mouse brain. The *parasite* was viable in 42.1 % of the analyzed tissues.

The previous results have shown that there is a statistically significant relationship between the pig serological titer and the detection of the *parasite* in its tissues. A higher *parasite* presence has been observed in pig tissues with serological titers $\geq 1:80$.

Furthermore, statistical tests have been performed to compare the results obtained in each tissue (raw ham and target organs). It has been concluded that there are no differences between the observed presence and viability values between both tissues. There are no significant differences with these results. Therefore, we can propose the selection of the organs as a control tool, with a lower commercial value than the hams.

The other raw ham of each pig was cured with two curing times (9 and 12 months). Afterwards, a study was carried out to evaluate the presence and viability of *T. gondii* in hams and to verify the effectiveness of curing in the *parasite* survival. It has been observed that this treatment is effective against *T. gondii* but it does not destroy it completely. The *parasite* was detected in 11 of the hams and found to be viable in 4. Likewise, it has been determined that the curing time of 12 months has a greater effect against the *parasite* than the 9-month treatment.

Finally, another objective of this work was the study of the physicochemical parameters of hams to evaluate their influence on the presence and viability of the *parasite* in the final product. A statistical relationship between the fat concentration of the cured ham and *parasite* viability has been determined.

With the obtained results, risk management measures of *T. gondii* in cured ham industry have been proposed, such as the application of Good Hygiene Practices in farms, the selection of seronegative pigs or those with low titers that have a low probability of finding the parasite in its meat, the control of *T. gondii* in target organs with lower commercial value or the increase of ham curing time.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



Toxoplasma gondii es un protozoo de distribución mundial. El ciclo de vida de *T. gondii* incluye a los félidos como hospedadores definitivos y a los animales de sangre caliente (mamíferos y aves) como hospedadores intermediarios (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Dubey, 2010).

Toxoplasma gondii es, probablemente, el agente más frecuente de infección protozoaria en el hombre. Se estima que entre el 25 % - 40 % de la población está infectada, pero la prevalencia es muy variable según los países (Maenz et al., 2014). La toxoplasmosis, por lo general, cursa de forma leve o asintomática, pero en personas inmunocomprometidas puede llegar a producir una enfermedad severa. Además, en mujeres embarazadas seronegativas existe el riesgo de transmisión al feto con graves consecuencias (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Jones et al., 2009; Maenz et al., 2014).

De los principales patógenos reseñados como los agentes principales de enfermedades de transmisión alimentaria en Estados Unidos, *Toxoplasma gondii* se sitúa en segundo lugar, superado únicamente por *Salmonella* en cuanto al número de muertes anuales que provoca (Batz, Hoffmann y Morris, 2011; Scallan et al., 2012). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), los parásitos causan menos brotes que las bacterias y los virus en la Unión Europea, sin embargo, su impacto en los grupos poblacionales de riesgo es muy grave ya que puede provocar enfermedad severa, discapacidad e incluso la muerte (EFSA, 2007). Desde una perspectiva internacional, la FAO y la OMS sitúan a *Toxoplasma* en el cuarto puesto entre los parásitos transmitidos por los alimentos de mayor impacto mundial, tras *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis* (FAO/WHO, 2016).

Estudios epidemiológicos apuntan al consumo de carne de porcino cruda o poco cocinada, como una de las principales fuentes de infección por *Toxoplasma gondii* en el hombre (Dubey et al., 1996; García-Bocanegra et al., 2011; Juránková et al., 2014).

Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), España es la cuarta potencia productora de carne de porcino después de China, EE. UU. y Alemania. El porcino en nuestro país ocupa el primer lugar en cuanto a importancia económica en el sector agroalimentario, siendo Aragón la tercera Comunidad Autónoma en producción de carne de cerdo (MAPA, 2018).

La seroprevalencia mundial de *T. gondii* en cerdos oscila entre el 0,4 % y el 92,7 % (Foroutan et

al., 2019). En el caso de España, a nivel nacional sólo se ha realizado un estudio sobre este tema mostrando una alta variabilidad entre las diferentes Comunidades Autónomas (García-Bocanegra et al., 2010a).

El principal factor de riesgo que favorece el contacto con *T. gondii* en las granjas de cerdos es la presencia de gatos. Sin embargo, hay otros factores que contribuyen a la infección de los cerdos como la edad de los animales, el sistema de producción, el estado de mantenimiento de las granjas o la presencia de roedores (Kijlstra y Jongert, 2008; García-Bocanegra et al., 2010a; Gebremedhin et al., 2015; Opsteegh et al., 2016). El conocimiento de estos factores contribuye de forma importante al proceso de evaluación del riesgo, así como a la aplicación de medidas correctoras para su gestión en producción primaria. Con ello se podría disminuir la seroprevalencia porcina con el tiempo, llegando incluso a obtener “Granjas Libres de *Toxoplasma*”.

El parásito se localiza principalmente en el sistema nervioso central (cerebro), músculo esquelético (lengua o diafragma) y músculo cardíaco (EFSA, 2011; Opsteegh et al., 2016). Aunque *T. gondii* se transmite a través del consumo de carne, en la legislación de la Unión Europea no existen criterios para su detección en matadero (Cook et al., 2000; Berger et al., 2009; EFSA, 2018). Apenas hay información sobre la presencia del parásito en tejidos porcinos. Asimismo, existen muy pocos trabajos que relacionen la seroprevalencia de los animales con la detección de *T. gondii* en sus tejidos. Estos datos científicos son necesarios para contribuir al proceso de evaluación del riesgo del parásito en la industria cárnica (EFSA, 2007; Opsteegh et al., 2016).

Según la Asociación Nacional de Industrias de la Carne (ANICE), España es uno de los países con una gran tradición en la elaboración y consumo de productos cárnicos curados. De los elaborados con carne de cerdo, el jamón curado es, sin lugar a dudas, uno de los productos más emblemáticos de la gastronomía española, siendo nuestro país el primer productor mundial de jamones y paletas curados (ANICE, 2018). Cualquier tipo de riesgo sanitario, genera una respuesta inmediata y contundente por parte del consumidor, que trae como consecuencia el abandono del consumo de un producto determinado. Por ello, la demanda de los consumidores de alimentos libres de patógenos lleva a las empresas del sector cárnico a la necesidad de conocer datos científicos sobre el efecto de los tratamientos tecnológicos que aplican en la viabilidad del parásito, para poder garantizar la seguridad alimentaria (EFSA, 2011; Opsteegh et al., 2016; EFSA, 2017).

En este sentido, y a pesar de que estudios epidemiológicos apuntan al consumo de productos cárnicos curados como un factor de riesgo de adquirir toxoplasmosis durante el embarazo (Buffolano et al., 1996; Kapperud et al., 1996; Cook et al., 2000), a fecha actual, existen pocos estudios sobre el efecto del curado del jamón en la viabilidad de *Toxoplasma gondii* (Bayarri et al., 2010; Gomez-Samblas et al., 2016; Genchi et al., 2017).

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo dentro de las actividades del proyecto de investigación titulado “Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*” (INNPACTO IPT-2012-0189060000, MINECO/FEDER). Con respecto a *Toxoplasma gondii*, la finalidad del proyecto ha sido evaluar la eficacia del procesado del jamón curado en la inactivación del parásito, y contribuir a establecer las medidas preventivas y de control adecuadas en las distintas etapas del proceso de producción, desde la granja hasta el producto final, que pueden ser utilizadas por la empresa cárnica para poder ofrecer al consumidor un producto seguro y de calidad.

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en cerdos de la Comunidad Autónoma de Aragón.
2. Analizar los factores de riesgo asociados con *Toxoplasma gondii* en las explotaciones porcinas para conocer qué parámetros influyen en mayor medida.
3. Determinar la presencia y viabilidad de *Toxoplasma gondii* en carne fresca de cerdos previamente seleccionados.
4. Determinar la influencia del procesado tecnológico del curado en la viabilidad de *Toxoplasma gondii* en jamones curados.
5. Con los datos obtenidos en los objetivos anteriores, contribuir al proceso de evaluación del riesgo en las diferentes etapas del proceso integral de elaboración del jamón curado y aportar herramientas de control y medidas para su gestión, con el fin de reducir el riesgo de infección por *T. gondii*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1- *Toxoplasma gondii*

1.1- Antecedentes históricos

Toxoplasma gondii es un protozoo de distribución mundial incluido en el Phylum Apicomplexa. Produce la toxoplasmosis que es una de las infecciones parasitarias más comunes en el hombre. El parásito se descubrió en 1908 en un pequeño roedor africano (*Ctenodactylus gundi*) en el Instituto Pasteur de Túnez (Nicolle y Manceaux, 1908). En un primer momento pensaron que pertenecía al género *Leishmania* denominándolo *Leishmania gondii*. Sin embargo, tras determinar que poseía una morfología que no se correspondía con ninguna especie conocida, lo denominaron *Toxoplasma gondii*. Su nombre deriva de *toxoplasma*- arqueado, *plasma*- vida y del animal en el que se descubrió *gondii*- del gundi.

No fue hasta quince años más tarde cuando se observó por primera vez a *T. gondii* como patógeno para el hombre al descubrirse quistes en la retina de un niño con hidrocefalia (Janku, 1923). Sin embargo, la observación de que *T. gondii* puede producir toxoplasmosis congénita no se realizó hasta que se describió una meningo-encefalomielitis mortal en un recién nacido (Wolf y Cowen, 1937).

Hasta ese momento sólo se conocía la vía congénita como forma de transmisión. Sin embargo, en 1954 Weinman y Chandler apuntaron que la transmisión del parásito podría producirse también por el consumo de carne cruda o poco cocinada. Esta información marcaría el inicio de todos los estudios que se han realizado para la detección e inactivación del parásito en tejidos cárnicos aplicando diferentes tratamientos tecnológicos (Jacobs, Remington y Melton, 1960; Sommer et al., 1965). No fue hasta los años 70 cuando se descubrió el ciclo completo de *T. gondii* al identificarse la fase de reproducción sexual del parásito en el intestino de los gatos y la detección de los ooquistes en sus heces (Dubey, Miller y Frenkel, 1970a, b; Hutchison et al., 1970).

1.2- Etiología de *Toxoplasma gondii*

Aunque la clasificación taxonómica del parásito ha sufrido varios cambios a lo largo de su estudio, el criterio que prevalece en la actualidad es el seguido por Levine en 1973 y aceptado por Frenkel en 1977:

Reino	Protozoa
Phylum	Apicomplexa. Levine 1970
Clase	Sporozoa. Leukart 1879
Subclase	Coccidia. Leukart 1879
Orden	Eucoccidiida. Leger y Dubosq 1910
Suborden	Eimeriina. Leger 1911
Familia	Sarcocystidae. Poche 1913
Subfamilia	Toxoplasmatinae. Biocca 1956
Género	<i>Toxoplasma</i> . Nicolle y Manceaus 1909
Especie	<i>Toxoplasma gondii</i> . Nicolle y Manceaus 1909

1.2.1- Estadios de *Toxoplasma gondii*

T. gondii presenta tres estadios diferentes a lo largo de su ciclo biológico: taquizoito, bradizoito y esporozoito (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Dubey, 2010).

1.2.1.1- Taquizoito

El taquizoito (del griego *tachy* - rápido) es el estadio del parásito de multiplicación más rápida. Los taquizoitos son capaces de infectar cualquier célula nucleada y se relacionan con la fase aguda de la enfermedad (Figura 1).

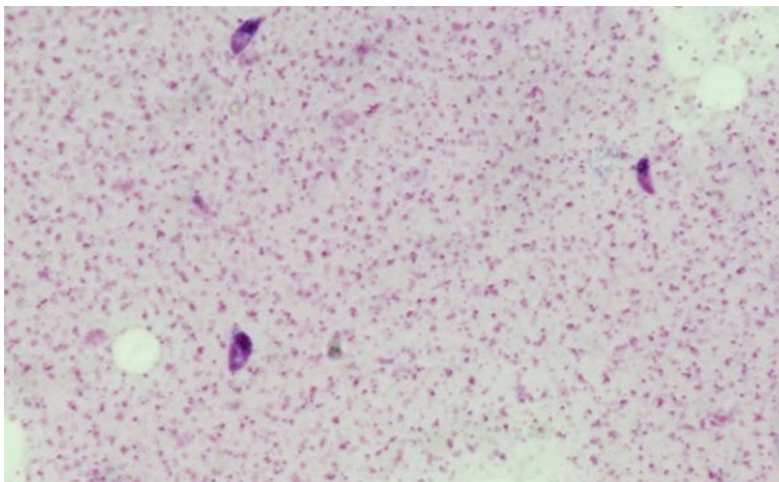


Figura 1: Taquizoitos (Fuente propia).

Presentan un tamaño de 6 - 12 μm de largo y 3 - 4 μm de ancho, con forma de media luna. La estructura del taquizoito (Figura 2) está formada por una membrana trilaminar y dos polos apicales en los extremos. La ultraestructura del parásito contiene un núcleo celular esférico con un

nucleolo en la parte media-posterior, mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas y aparato de Golgi. Asimismo, a lo largo de toda la superficie del taquizoito se extiende una red de microtúbulos que otorgan al parásito una consistencia sólida.

Una característica de todos los Apicomplexa es la presencia en el extremo anterior de un complejo apical. Éste está formado por varios anillos polares, un conoide, microtúbulos y orgánulos secretores denominados micronemas, roptrias y gránulos densos (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Dubey, 2010; Chen et al., 2017).

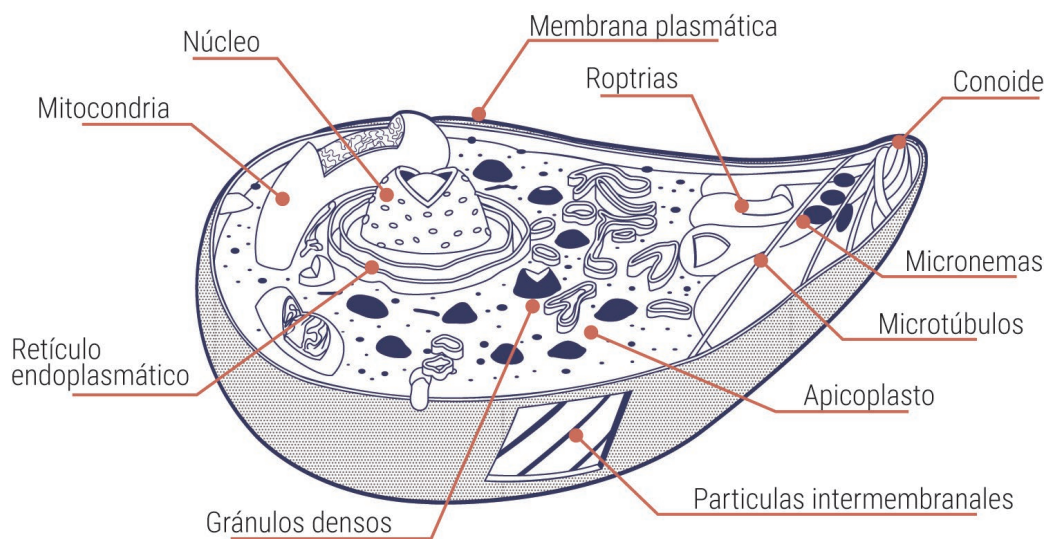


Figura 2: Estructura del taquizoito (Modificado de Muñiz y Mondragón, 2009).

El complejo apical es el encargado de la adhesión del parásito e invasión de células gracias a la unión del conoide a la superficie de la célula hospedadora. Este procedimiento está favorecido por las secreciones de los micronemas, de las roptrias y de los gránulos densos (Chiappino, Nichols y O'Connor, 1984; Ajioka et al., 2001; Muñiz y Mondragón, 2009).

Cuando entran en las células hospedadoras diferentes a las del epitelio intestinal, los taquizoitos forman una vacuola parasitaria y comienzan a dividirse en su interior por endodiogenia cada 5 - 9 horas. Finalmente, tras repetidos ciclos la acumulación de los parásitos provoca la lisis de la célula hospedadora, produciendo la liberación de los taquizoitos y diseminando la infección. Los taquizoitos pueden atravesar barreras tisulares como la hematoencefálica o la placentaria (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Hiepe, Lucius y Gottstein, 2006; Dubey, 2010).

Los taquizoitos son muy sensibles a las condiciones ambientales y no son capaces de sobrevivir

fuera del hospedador. Son sensibles a las enzimas proteolíticas y pueden destruirse durante la digestión gástrica, por lo que no se suelen transmitir por vía digestiva. Sin embargo, se ha comprobado en estudios *in vitro* que pueden sobrevivir hasta dos horas en soluciones pépsicas. Asimismo, los taquizoitos son sensibles a temperaturas moderadas-altas y a la desecación (Dubey y Beattie, 1988; Dubey, 1998, 2010; Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000).

1.2.1.2- Bradizoito

Los bradizoitos (del griego *bradys* - lento) son el estadio de replicación lenta del parásito. Se encuentran dentro de quistes tisulares y representan la forma crónica de la infección, aunque pueden reactivarse y pasar a taquizoito cuando se deteriora la inmunidad celular del hospedador.

Presentan un tamaño de 5 - 8,5 μm de largo y 1 - 3 μm de ancho, y tienen varias diferencias estructurales con los taquizoitos (Figura 3). Estas variaciones son la posición del núcleo en el extremo posterior, un mayor número de micronemas, que la cantidad de roptrias varía con la edad del parásito o que poseen gránulos de glucógeno que están ausentes en los taquizoitos (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Dubey, 2010).

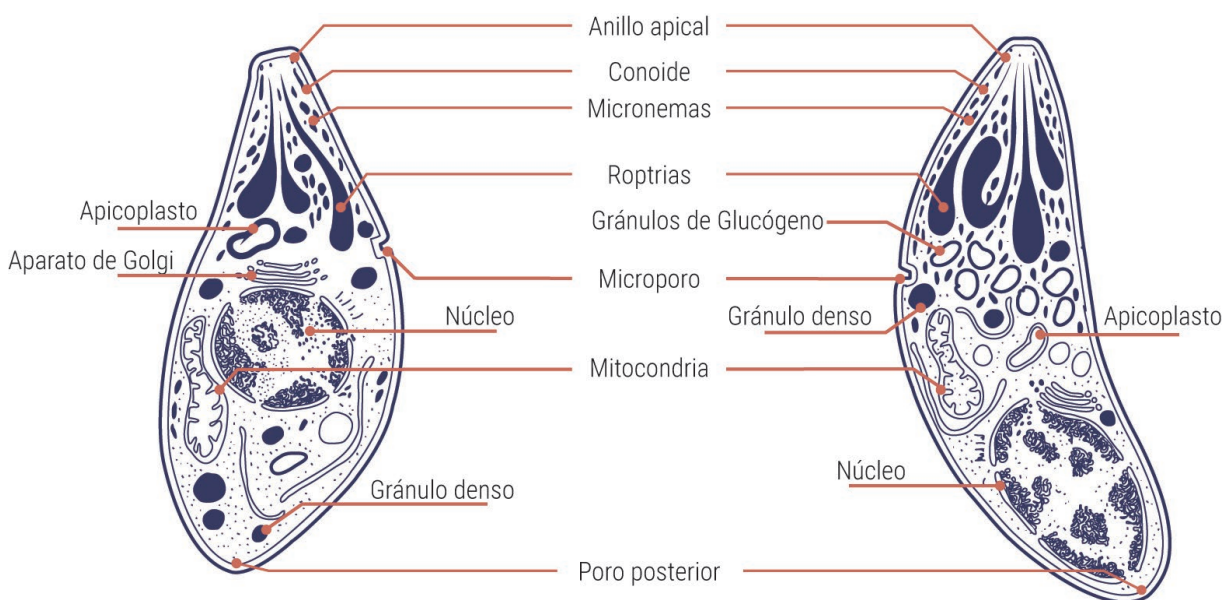


Figura 3: Estructura de taquizoito (izquierda) y de bradizoito (derecha) (Modificado de Dubey, Lindsay y Speer, 1998).

Los bradizoitos se multiplican por endodiogenia en las células del hospedador, persistiendo generalmente durante toda la vida del individuo. Una vez en el interior de las células hospedadoras

segregan componentes fibrilares que depositan a modo de capas formando una pared quística de 2 - 3 μm de grosor. Estos quistes tisulares protegen al parásito de los mecanismos inmunológicos y fisiológicos del hospedador. Presentan una forma ovalada con un diámetro de 200 - 500 μm en cuyo interior se pueden almacenar de dos hasta miles de bradizoitos dependiendo del momento de formación del quiste, de la célula hospedadora parasitada y de la cepa del parásito (Figura 4) (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Guo et al., 2015a). Los quistes tisulares de *T. gondii* tienen alta afinidad por los tejidos neuronales y musculares incluyendo el cerebro, los ojos y los músculos esquelético y cardíaco (Dubey, Lindsay y Speer, 1998, 2009; Juránková et al., 2014; Guo et al., 2015a).

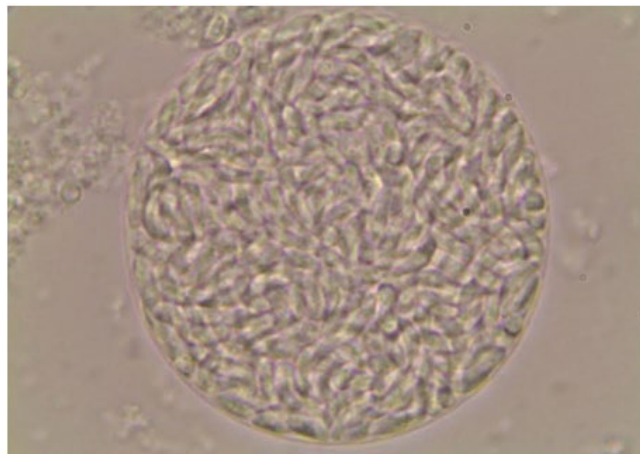


Figura 4: Quiste tisular con bradizoitos en su interior (Fuente propia).

Los quistes tisulares con bradizoitos en su interior son capaces de sobrevivir a la acción de los jugos gástricos durante el proceso de digestión. Igualmente, pueden soportar temperaturas de hasta 60 °C e incluso temperaturas de congelación durante varios días. Sin embargo, son sensibles a la desecación y la irradiación (Dubey et al., 1990; Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Dubey, 2010; Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000).

1.2.1.3- Esporozoito

Su nombre deriva de *sporo* - semilla y *zoion* - animal. Se encuentran en el interior de los ooquistes, y son el resultado del ciclo sexual que tiene lugar en las células del epitelio intestinal de los hospedadores definitivos (félidos).

Los ooquistes son las formas de resistencia que presentan un diámetro de 12 x 15 μm con forma redondeada y que se eliminan sin esporular mediante las heces de los félidos. Los ooquistes no

esporulados contienen un esporonte que está formado por citoplasma, gránulos de reserva y nucleoplasma. Los ooquistes no esporulados no son infectivos (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005).

La esporulación de los ooquistes se produce en el medio ambiente en un periodo de uno a cinco días dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad. Durante la esporulación, los ooquistes tienen forma de elipse y contienen en su interior dos esporoblastos de forma redondeada. Posteriormente, los esporoblastos se alargan y dan lugar a los esporoquistes. A continuación, cada esporoquiste formará cuatro esporozoitos (Figura 5) (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005).

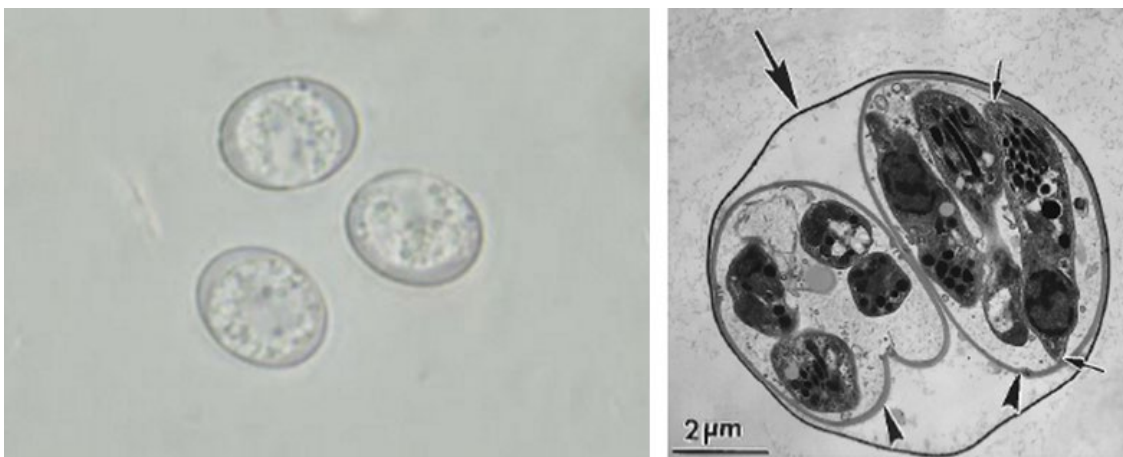


Figura 5: Ooquiste no esporulado (izquierda) y ooquiste esporulado (derecha) (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Weiss y Kim, 2013).

Los ooquistes son muy resistentes incluso en condiciones adversas de humedad, aireación y temperatura, pudiendo permanecer viables durante más de un año en el medio ambiente. Los ooquistes esporulados se destruyen con irradiación gamma de baja dosis y son muy sensibles a la desecación (Dubey, 1996; Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005).

1.2.2- Antígenos de *Toxoplasma gondii*

T. gondii presenta varios antígenos que resultarán de ayuda para su detección y diagnóstico, y a su vez cada estadio del parásito tiene unos antígenos específicos.

El antígeno más inmunodominante es el antígeno de superficie específico de taquizoito SAG1, al cual corresponde hasta el 5 % de la proteína total del taquizoito. El SAG1 tiene la característica de que no presenta reactividad cruzada con antígenos de otros microorganismos. Igualmente,

se han identificado otros antígenos de superficie como el SAG2 y SAG3 que son específicos de taquizoitos, y el SAG4 que lo es para bradizoitos. También existen otros antígenos de membrana específicos para bradizoitos como el BAG1 (Petersen y Dubey, 2001; Weiss y Kim, 2007).

Asimismo, durante la invasión de las células hospedadoras por el taquizoito se segregan sustancias que igualmente son antigénicas como las producidas por los micronemas (MIC1, MIC2 y MIC3), las roptrias (ROP1, ROP2, ROP3, ROP4, ROP5, ROP6, ROP7 y ROP8) y los gránulos densos (GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6 y GRA7) (Petersen y Dubey, 2001; Weiss y Kim, 2007; Silva-Gutierrez et al., 2018).

1.2.3- Caracterización de *Toxoplasma gondii*

La tipificación de *T. gondii* puede llevarse a cabo mediante varios métodos fenotípicos y genotípicos. La caracterización fenotípica puede realizarse teniendo en cuenta la patogenicidad del parásito en ratones de experimentación o mediante las isoenzimas que posea. En el caso de la caracterización genotípica puede clasificarse mediante cariotipos, mediante el polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción o mediante microsatélites (de Melo et al., 2004; Pena et al., 2008; Sibley et al., 2009).

La clasificación más empleada por los autores es la caracterización fenotípica relacionada con la virulencia producida en el ratón para describir los tipos de cepas de *T. gondii* (Verma et al., 2017). Esta tipificación ha sido muy bien caracterizada en este modelo animal y utiliza tres líneas clonales o tipos, llamados Tipo I, Tipo II y Tipo III (Sibley et al., 2002; de Melo et al., 2006; Dlugonska, 2008; Ingram et al., 2013; Weiss y Kim, 2013).

Las cepas de Tipo I son virulentas en ratón, teniendo una dosis letal del 100 % ($DL_{100} \geq 1$ taquizoito). Provocan una diseminación generalizada del parásito y conducen a la muerte rápida de los ratones infectados en 6 a 10 días post-inoculación. Estas cepas son relativamente raras en animales, pero están asociadas con la toxoplasmosis congénita humana y la toxoplasmosis ocular en pacientes inmunocomprometidos. A este tipo pertenecen las cepas RH, Aldrin o GT1 entre otras (Dubey y Frenkel, 1973; Dlugonska, 2008; Dubey, 2010; Ayi et al., 2016).

Las cepas de Tipo II son avirulentas para los ratones ($DL_{100} \geq 10^3$ taquizoitos), siendo la disemina-

ción del parásito menos extensa que en las de Tipo I. En esta categoría se encuentran entre el 70 % y el 90 % de las cepas que causan infecciones por *T. gondii* adquiridas. A este tipo pertenecen las cepas ME49, PTG o PRU (Barragan y Sibley, 2003; Ayi et al., 2016).

Las cepas de Tipo III, son avirulentas, pero generan la formación de quistes tisulares, lo que puede provocar un deterioro progresivo del animal (Velmurugan, Su y Dubey, 2009). Este tipo de cepas se ha aislado de animales salvajes y está presente en infecciones crónicas de animales y humanos. Algunos ejemplos de cepas de Tipo III son VEG, CTG o CEP (Barragan y Sibley, 2003; Dubey, 2010; Weiss y Kim, 2013;).

1.3- Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

T. gondii presenta un ciclo biológico heteroxeno ya que requiere más de una especie para completar su ciclo (Figura 6). El ciclo biológico se divide en dos fases: la fase de reproducción sexual que se produce únicamente en los hospedadores definitivos que son la familia Felidae, en especial los gatos; y la fase de reproducción asexual, en donde el hombre y otros mamíferos homeotermos además de las aves actúan como hospedadores intermediarios (Tenter, 2009; Cabezón, García-Bocanegra y Almería, 2012).

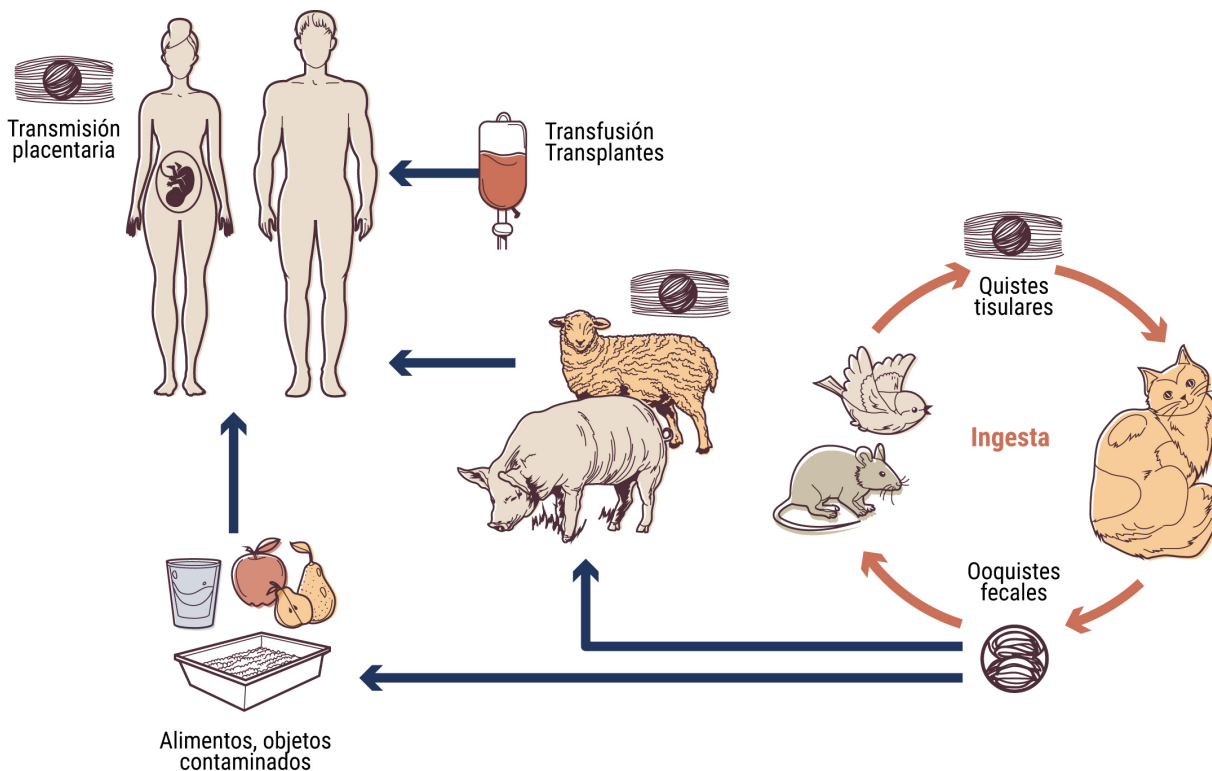


Figura 6: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* ©2019 Laura Herrero.

La fase de reproducción sexual se inicia cuando los gatos y otros felinos ingieren una presa infectada con quistes tisulares. Los bradizoitos contenidos en los quistes tisulares se liberan por acción de los jugos gástricos y penetran en los enterocitos, donde se desarrollan hasta cinco generaciones diferentes del parásito (denominadas esquizontes A, B, C, D y E). Los de tipo A son de pequeño tamaño y se forman al entrar en la célula hospedadora, dividiéndose de forma asexual por endodiogenia. Los de tipo B aparecen tras unas horas, tienen un núcleo central y se dividen por endodiogenia y endopoligenia. Los de tipo C son alargados y se dividen por merogonia. A continuación, los estadios tipo D aparecen tras unas 30 horas de la invasión celular multiplicándose por endopoligenia o merogonia. Finalmente, los de tipo E pueden formarse hasta 15 días después de la invasión celular y se dividen por merogonia.

A partir de los esquizontes de tipo D y E se pueden formar los merozoitos. A continuación, se produce el ciclo sexual en donde los merozoitos se diferencian en micro y macrogametocitos. Los microgametocitos dan lugar a 24 - 32 microgametos biflagelados que fecundarán a los macrogametocitos, para finalmente formar un cigoto que será rodeado por la estructura de resistencia llamada ooquiste. Cuando los ooquistes están listos, se produce la rotura de la célula hospedadora y el ooquiste es liberado a la luz intestinal (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Tenter, 2009).

Los ooquistes son excretados junto con las heces de los gatos, pero aún no tienen capacidad infectiva. Se requieren de uno a cinco días para que se produzca la esporulación de los ooquistes. La esporulación depende de las condiciones ambientales, ya que ésta no se produce si la temperatura es inferior a 4 °C o superior a 37 °C. Los gatos únicamente eliminan ooquistes durante dos o tres semanas, pudiendo llegar a excretar hasta 20 millones de ooquistes al día (Dubey et al., 1995b; Dawson et al., 2005; Jiang et al., 2012).

Tras la infección primaria los gatos generan inmunidad. Sin embargo, en gatos infectados experimentalmente, se ha observado que la inmunidad va disminuyendo a lo largo del tiempo. En relación a este hecho, hay estudios en los que se ha demostrado que procesos de inmunodepresión o la reinfección de los animales con el parásito, pueden producir que los gatos vuelvan a excretar ooquistes (Dubey, Thulliez y Powell, 1995a; Malmasi et al., 2009).

En el hospedador intermediario la infección se produce mayoritariamente al ingerir ooquistes

esporulados con esporozoitos o tejidos que contengan quistes tisulares con bradizoitos en su interior. A continuación, se liberan los esporozoitos contenidos en los ooquistes o los bradizoitos englobados en los quistes tisulares. Independientemente de la forma ingerida, se produce la diferenciación a taquizoitos, los cuales atraviesan el epitelio intestinal distribuyéndose por todo el organismo a través de macrófagos y linfocitos, o libres en el plasma invadiendo cualquier tipo de célula nucleada. En el caso de producirse una primoinfección en una hembra en gestación, los taquizoitos pueden atravesar la barrera placentaria y transmitirse al feto.

La invasión de la célula hospedadora comienza con la fase de acoplamiento del taquizoito colocándose en posición perpendicular a la célula, favorecido por las secreciones de los micronemas (Figura 7). Asimismo, estos compuestos activarán el sistema de proteínas actina-miosina del parásito para actuar de motor para la entrada en la célula. Posteriormente, las roptrias comienzan a segregarse un alto contenido de proteínas y lípidos que atravesarán parcialmente la membrana de la célula hospedadora.

Gracias a la acción conjunta de estos factores, el taquizoito consigue invadir la célula en tan solo unos segundos. Una vez el taquizoito entra en la célula se recubre de una membrana y se forma la llamada vacuola parasitaria. Este recubrimiento favorece la supervivencia del parásito al protegerlo de las agresiones de la célula hospedadora. Asimismo, esta vacuola tiene la capacidad de mediar en el control de la apoptosis de la célula, que se utiliza para luchar contra organismos extraños. El taquizoito inhibirá las señales que envía la célula para programar su apoptosis, así como la generación de proteasas para destruir la vacuola parasitaria, y con ello prolongar la supervivencia de ambos. Dentro de las vacuolas parasitarias los taquizoitos se multiplican repetidamente por endodiogenia.

Las sucesivas divisiones provocarán la ruptura de las células hospedadoras y con ello la liberación del parásito. Los taquizoitos libres buscan nuevas células que infectar dando lugar a la fase aguda de la infección, que provocará la formación de anticuerpos y la activación de células efectoras de la respuesta inmune (Tizard, 2002; Hill, Chirukandath y Dubey, 2005; Hiepe, Lucius y Gottstein, 2006; Tenter, 2009).

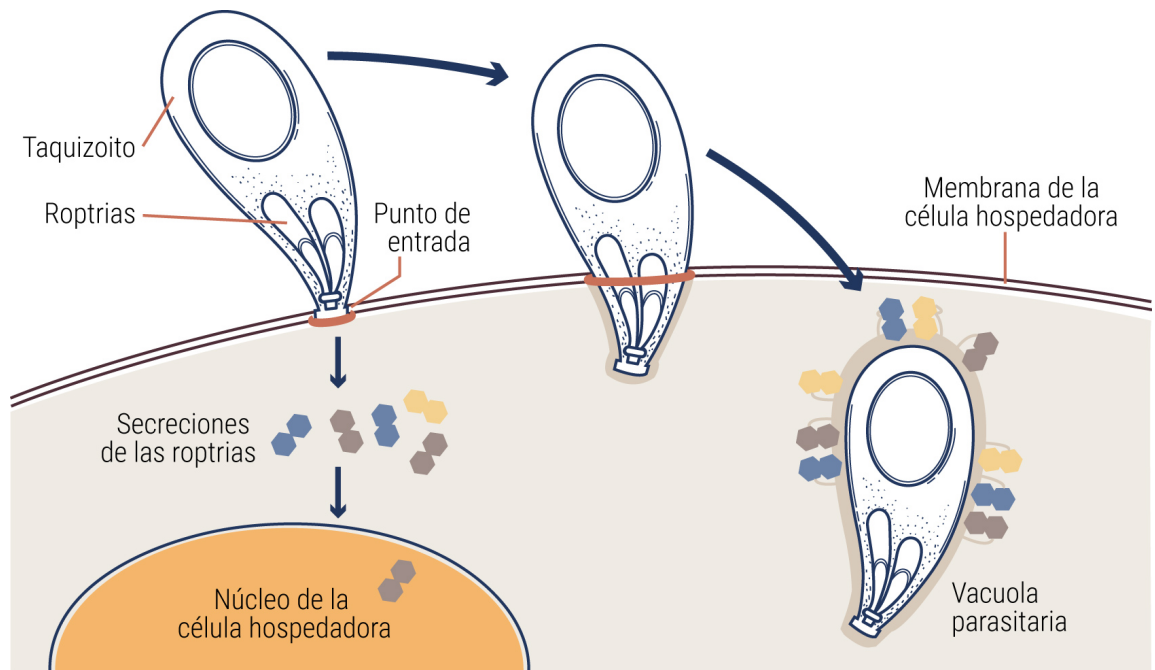


Figura 7: Mecanismo de invasión de los taquizoitos de *T. gondii* en las células hospedadoras (Modificado de Hunter y Sibley, 2012).

Cuando el hospedador adquiere inmunidad se produce la diferenciación de taquizoito a bradizoito. Los bradizoitos formarán los quistes tisulares para protegerse, donde se irán multiplicando de una forma lenta generando la infección crónica. En la mayoría de los animales los quistes tisulares se empiezan a formar durante la primera semana post-infección y pueden permanecer durante años sin causar ninguna reacción en el hospedador (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Tenter, 2009; Rani et al., 2019).

Los quistes tisulares de *T. gondii* se sitúan en órganos de los hospedadores con baja actividad inmunológica con el fin de aumentar su supervivencia (Figura 8). La localización en la que se encuentran principalmente los quistes tisulares son el tejido nervioso y tejidos musculares como el corazón, la lengua o el diafragma. El cerebro es el órgano que ofrece una mayor protección inmunológica a los quistes del parásito al no permitir el paso a los anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica. Asimismo, el cerebro al carecer de sistema linfático no permite que células como los macrófagos o linfocitos puedan acceder a los quistes (Wingstrand et al., 1997; Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Gamble, Dubey y Lambillotte, 2005; dos Santos et al., 2005; García et al., 2006a; Dubey y Jones, 2008; Bezerra et al., 2012; Dubey, 2012; Cademartori et al., 2014; Fernandes et al., 2015; Wang et al., 2016).

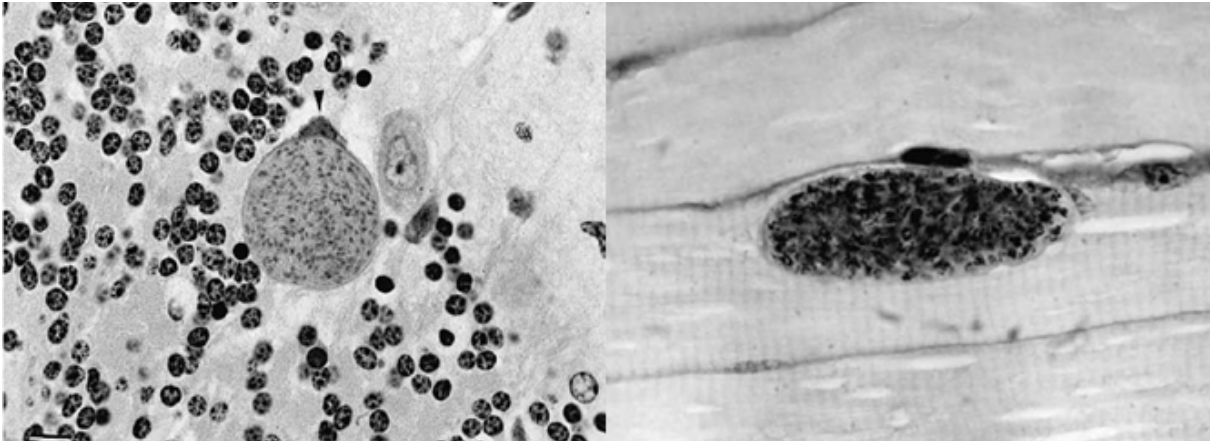


Figura 8: Quiste tisular en tejido cerebral (izquierda) y en tejido muscular esquelético (derecha) (Petersen y Dubey, 2001).

2- *Toxoplasma gondii* en el hombre

2.1- Vías de transmisión

La toxoplasmosis es una de las zoonosis parasitarias más extendidas en el mundo. La principal vía de transmisión del parásito a los hospedadores intermediarios se produce a través del consumo de carne cruda, poco cocinada o curada que contiene quistes con bradizoitos (Buffolano et al., 1996; Kapperud et al., 1996; Cook et al., 2000; EFSA, 2007; Jones et al., 2009; Foroutan et al., 2019).

Otra de las vías de transmisión es mediante la ingestión de ooquistes excretados junto a las heces de los gatos, que han esporulado en el medio ambiente y que contaminan suelos, alimentos y aguas (Palmero y Carballés, 2010; Jones y Dubey, 2012; Lass et al., 2012).

El estadio de taquizoito de *T. gondii* es el responsable de la adquisición de toxoplasmosis congénita al producirse el paso de taquizoitos de la madre al feto durante la fase aguda de una primoinfección con el parásito durante la gestación (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Palmero y Carballés, 2010; Vargas-Villavicencio, Besné-Mériday Correa, 2016; EFSA, 2108). En el año 2006 se creó el grupo EUROTOXO, grupo de estudio formado por 28 países cuya función es proporcionar un sistema de vigilancia y prevención frente a la toxoplasmosis congénita (EFSA, 2007, 2017).

La infección producida mediante la ingestión de taquizoitos es más complicada, ya que son sensibles al jugo gástrico y sobreviven con dificultad fuera del hospedador (EFSA, 2007; Hernández et al., 2012). Sin embargo, se han encontrado taquizoitos viables en la leche de varias especies,

siendo la leche de cabra sin pasteurizar la que ha producido un mayor número de casos de toxoplasmosis humana (Sacks, Roberto y Brooks, 1982; Tenter, 2009). Igualmente, el consumo de ostras crudas, almejas o mejillones puede ser un factor de riesgo para la infección por *T. gondii* al ser animales que se alimentan filtrando agua (Tenter, Heckerroth y Weiss, 2000; Jones et al., 2009; Dubey, 2010; Amairia et al. 2016; EFSA, 2018).

Finalmente, otra vía de infección es a través de transfusiones de sangre con taquizoitos o bien mediante el trasplante de órganos que contengan quistes tisulares del parásito (Pérez et al., 2011; Weiss y Kim, 2013; Villard et al., 2016; Alvarado-Esquivel et al., 2018).

En los seres humanos no se ha establecido una dosis infectiva de *T. gondii* (EFSA, 2018), por lo que extrapolando los resultados obtenidos en animales se ha señalado que la dosis infectiva sería de 10^4 parásitos, aunque variaría según la cepa de que se tratara (Warnekulasuriya, Johnson y Holliman, 1998; Vargas-Villavicencio, Besné-Mériday Correa, 2016). En este sentido autores como Opsteegh et al. (2011) y Guo et al. (2016, 2017) están desarrollando modelos de dosis-respuesta para predecir la probabilidad de infección en las personas por *T. gondii* debido al consumo de productos cárnicos infectados.

2.2- Seroprevalencia

Se estima que entre el 25 - 40 % de la población mundial está infectada, pero la prevalencia varía mucho de unos países a otros, e incluso dentro del propio país. La prevalencia de infección aumenta con la edad y no presenta variación entre sexos (Palmero y Carballés, 2010; Maenz et al., 2014).

En Europa la seroprevalencia se encuentra entre el 8 % en Suiza y el 57 % en Rumania (Breugelmans, Naessens y Foulon, 2004; Zufferey, di Mito y Auckenthaler, 2007; Masini et al., 2008; Olariu et al., 2008; Kaňková, Flegr y Calda, 2015; Burrells et al., 2016). Los datos del continente americano señalan prevalencias del 11 % en Norteamérica y del 7,2 % al 49 % en Centro y Sudamérica (Márquez y Etcheverry, 2003; Jones et al., 2007; Muñoz-Zanzi et al., 2010; da Silva, Vinaud y Castro, 2015a; Alvarado-Esquivel et al., 2016). En los países asiáticos también existe una gran variabilidad que puede ir del 10 % en China hasta el 70 % de Indonesia (Terazawa et al., 2003; Liu et al., 2009). Asimismo, podemos encontrar valores del 25 % al 51 % en países africanos (Simpore

et al., 2006; el Mansouri et al., 2007; Thiong'o et al., 2016), o del 23 % en Australia (Karunajeewa et al., 2001).

En el caso de la población española, algunos de los datos obtenidos de seroprevalencia fueron del 11,2 % en Alicante (Ramos et al., 2007), del 13 % al 25 % en Andalucía (Guerra y Fernández, 1995; Ribes et al., 1996; Sampedro et al., 2010), del 18 - 19 % en Madrid y Salamanca (Gutierrez-Zufiaurre et al., 2004; Santiago et al., 2012; López-Fabal y Gómez-Garcés, 2013), del 21 % en Albacete (Bartolomé et al., 2008), del 28 % en Barcelona (Muñoz et al., 2004) o hasta del 35 % en el País Vasco y Zaragoza (Rodríguez-Alarcón, 1997; Gil-Tomás et al., 2011). Sin embargo, en los últimos años se ha observado que los datos de seroprevalencia en España están aumentando debido al mayor número de personas procedentes de otros países en los que existe una mayor prevalencia del parásito (Gil-Tomás et al., 2011; Santiago et al., 2012; López-Fabal y Gómez-Garcés, 2013).

En la Figura 9, se puede observar que las zonas con menor seroprevalencia (< 20 %) en humanos son el sureste de Asia, América del Norte y el norte de Europa. Las tasas de infección con un valor medio (20 % - 40 %) se encuentran en el sur de Europa, países africanos como Nigeria o Sudán, Australia y Chile en Sudamérica. Las cifras más altas (>40 %) se encuentra en la mayor parte de América del Sur como Brasil o Argentina, algunos países africanos como Senegal o Tanzania e Indonesia (Maenz et al., 2014).

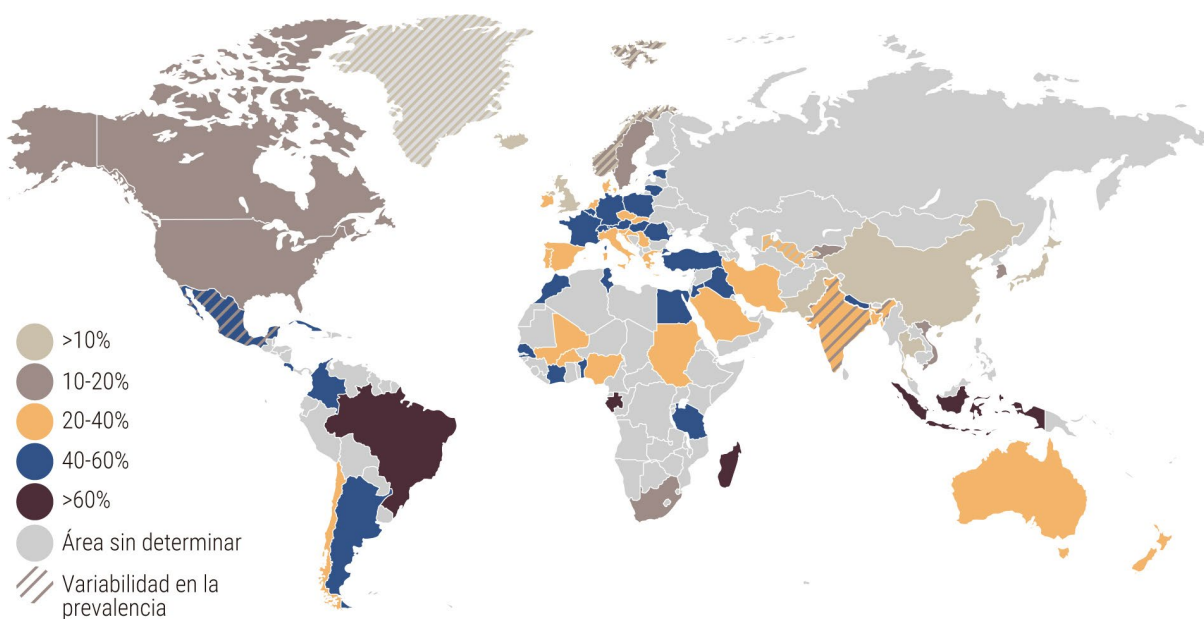


Figura 9: Prevalencia de *T. gondii* en el hombre (Modificado de Maenz et al., 2014).

2.3- Toxoplasmosis

La toxoplasmosis puede presentarse con diferentes cuadros clínicos en las personas en función, principalmente, del estado inmunológico en el que se encuentre el individuo.

- Toxoplasmosis en individuos inmunocompetentes que sufren una primoinfección con el parásito: presentan un cuadro asintomático o puede cursar de forma leve con fiebre, linfadenomegalia y malestar general (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Carme et al., 2002; Palmero y Carballés, 2010).

En los individuos inmunocompetentes el contacto con el parásito desencadena la respuesta inmunológica del organismo. Para protegerse de esta respuesta, *T. gondii* forma quistes en los tejidos del hospedador. Este fenómeno dará lugar a la fase de toxoplasmosis latente, la cual es normalmente asintomática para el hospedador. Sin embargo, en los últimos años, se han realizado cada vez más estudios que relacionan la presencia de *T. gondii* en estado latente en tejidos como el cerebro con enfermedades neurológicas y psiquiátricas. No se conoce todavía el modo de actuación exacto pero se cree que se produce por el impacto directo que causa el parásito en el cerebro por el enquistamiento en neuronas o células gliales, por mecanismos inmunomoduladores o por efectos sobre la neurotransmisión (Esshili et al., 2016). Se ha observado que la acción del parásito puede cambiar el comportamiento y la personalidad de las personas afectadas, e incluso en los casos más graves producir suicidios o la muerte directa (Fabiani, Pinto y Bruschi, 2013; Flegr, 2013). Se ha apuntado que la presencia de *T. gondii* puede elevar hasta en 2,5 veces el riesgo de que una persona padezca esquizofrenia (Torrey, Bartko y Yolken, 2012; Sutherland et al., 2015). También se ha observado una posible relación de *T. gondii* con la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer al producir un descenso de la producción de dopamina debido a la neurodegeneración provocada por el parásito, pero todavía no se han podido obtener datos concluyentes al respecto (Ramezani et al., 2016).

- Toxoplasmosis en individuos inmunodeprimidos: en personas que han sido sometidas a trasplantes, a tratamientos quimioterápicos o presenten el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, el parásito puede causar cuadros más severos. Normalmente aparece un cuadro febril de tipo séptico, con fiebre alta, escalofríos, sudoración, cefalea, astenia y anorexia. En los casos

más graves se pueden dar trastornos gastrointestinales, como dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea o constipación, así como erupciones cutáneas y manifestaciones pulmonares, miocárdicas, hepáticas y cerebrales (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Palmero y Carballés, 2010; Jones, Parise y Fiore, 2014).

En los individuos inmunodeprimidos también puede formar parte del cuadro clínico la toxoplasmosis ocular. Se manifiesta normalmente con disminución de la visión, enturbiamiento del humor vítreo y acúmulos de pigmento. En los casos más graves puede producirse desprendimiento de retina, con posibilidad de padecer glaucoma secundario, sinequias oculares o cataratas. En los casos de lesiones crónicas pueden producirse inflamaciones generalizadas mantenidas durante largos periodos de tiempo, pudiendo llegar a la pérdida progresiva de la visión o incluso a la ceguera (Jones, Parise y Fiore, 2014; Maenz et al., 2014; Yildiz et al., 2015).

- Toxoplasmosis congénita en mujeres embarazadas que no hubieran tenido un contacto previo con *T. gondii*: tiene lugar cuando se produce el paso del parásito al feto debido a que los taquizoitos pueden atravesar la placenta en la fase aguda de la infección. Pueden causar distintas alteraciones e incluso la muerte del feto dependiendo del momento de la gestación en el que se produce la infección. Aunque hay más posibilidades de infección en las últimas etapas de la gestación, cuanto más temprano sea el contagio durante el embarazo los daños serán más graves para los fetos. Pueden producirse abortos espontáneos, nacimientos prematuros o a término sin síntomas iniciales de toxoplasmosis. Los niños nacidos enfermos presentan un menor peso al nacer, neumonitis intersticial, miocarditis y hepatoesplenomegalia. Asimismo, pueden mostrar síntomas neurológicos como letargia y signos oculares como la retinocoroiditis. Si el daño cerebral es muy amplio padecen hidrocefalia, con secuelas muy frecuentes incluyendo retraso mental o psicomotriz, convulsiones y sordera (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Montoya y Remington, 2008; Palmero y Carballés, 2010).

La infección previa al embarazo provoca inmunidad en los embarazos posteriores siempre que no se reactive la enfermedad al producirse situaciones de inmunosupresión (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000).

3- *Toxoplasma gondii* en animales

3.1- Gato

Los felinos, y en especial el gato, tienen una gran importancia en la epidemiología de la infección por *T. gondii* al ser los únicos hospedadores definitivos del parásito.

Los gatos juegan un papel muy importante en la transmisión de *T. gondii*, ya que excretan ooquistes en sus heces y contaminan superficies, alimentos y aguas (Rochette, 2005). En los gatos la infección suele ser asintomática con excreción de ooquistes mediante las heces durante 2 - 3 semanas (Malmasi et al., 2009; Sævik et al., 2015; Cong et al., 2016a). Se han publicado datos de seroprevalencia en gatos que se sitúan entre el 1 % en Reino Unido y el 68,3 % en Estados Unidos (Dubey et al., 1995b; Gauss et al., 2003; Miró et al., 2004; de Craeye et al., 2008; Montoya et al., 2008; Györke et al., 2011; Jokelainen et al., 2012; Opsteegh et al., 2012; Spada et al., 2012; Wang et al., 2012a; Esteves et al., 2014; Paris et al., 2014; Jung et al., 2015; Li et al., 2015; Sævik et al., 2015; Cong et al., 2016a).

3.2- Rumiantes, équidos, aves y especies cinegéticas

T. gondii puede afectar a mamíferos y aves, pero la susceptibilidad de los huéspedes intermedios para la infección por el parásito varía según la especie, observándose una elevada prevalencia en animales de abasto y en especies cinegéticas. En el ganado, los quistes tisulares del parásito aparecen con mayor frecuencia en tejidos de cerdos, ovejas y cabras, y en menor medida en aves de corral, conejos y caballos (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Dubey, 2009).

El **ganado ovino** siempre se ha considerado como una de las especies más sensibles al parásito con seroprevalencias del 11,1 % al 33,6 % (Khamesipour et al., 2014; Ahmad et al., 2015; Correia et al., 2015; Hamilton et al., 2015; Izadyar et al., 2019). La seroprevalencia en estos animales va aumentando a lo largo de su vida y puede llegar a producir grandes pérdidas económicas (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Guo et al., 2015a). En esta especie, la presencia de *T. gondii* en carne varía entre el 3,6 % en Irlanda y el 61,6 % en Suiza (Ragozo et al., 2008; Berger-Schoch et al., 2011; da Silva et al., 2011; Asgari et al., 2011; Rahdar, Samarbaf-Zadeh y Arab, 2012; Hálová et al., 2013; Boughattas et al., 2014; Federle, 2015; Yildiz et al., 2015).

Al igual que en el ovino, el **ganado caprino** es muy susceptible a padecer toxoplasmosis observándose seroprevalencias del 12 % al 36,4 % (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Jittapalapong et al., 2005; Shrestha y Fahmy, 2005; García-Bocanegra et al., 2013; Lopes et al., 2013; Li et al., 2016; Maganga et al., 2016; Izadyar et al., 2019). La presencia del parásito en su carne se encuentra entre el 8,9 % en Irán y el 54,2 % en Japón (Ragozo et al., 2009; Asgari et al., 2011; Kyan et al., 2012; Amdouni et al., 2017; Rasti et al., 2017).

El **ganado bovino** presenta una gran resistencia a la infección por el parásito, por lo que presenta valores bajos de seroprevalencia del 0 % al 7,3 % (Tenter, Heckerroth y Weiss, 2000; Matsuo et al., 2014; Khamesipour et al., 2014; da Silva et al., 2015b; Rocha et al., 2016). Aunque la aparición de quistes tisulares es muy limitada, su detección en carne se sitúa entre el 0 % en EE. UU. y el 36,6 % en Colombia (Dubey et al., 2005; Berger-Schoch et al., 2011; Rahdar, Samarbaf-Zadeh y Arab, 2012; García-Bocanegra et al., 2013; Franco-Hernández et al., 2016).

La seroprevalencia en el **ganado equino** puede variar de forma muy significativa dependiendo de la edad de los animales y de las condiciones higiénicas de las explotaciones en las que estén estabulados, observándose seroprevalencias del 0 % al 39 % (Tassi, 2007; Kouam et al., 2010; Matsuo et al., 2014; Davoust et al., 2015; Papini et al., 2015; Paștiu et al., 2015; Wang et al., 2015; Cazarotto et al., 2016; Masatani et al., 2016; Ribeiro et al., 2016). En esta especie normalmente se detectan bajas prevalencias en tejidos (Tassi, 2007), variando entre el 0 % encontrada en Francia y el 20 % obtenida en Rumania (Aroussi et al., 2015; Paștiu et al., 2015).

Aunque las **aves** son naturalmente resistentes a la toxoplasmosis clínica, esta especie está considerada como una importante fuente de infección para el hombre. La seroprevalencia variará mucho (17 % al 90 %) dependiendo del tipo de producción, ya sean criados en granjas de producción, de instalaciones orgánicas o de pollos de corral (Zhao et al., 2012; Chumpolbanchorn et al., 2013; Hill y Dubey, 2013; Casartelli-Alves et al., 2014; Fernandes et al., 2016; Magalhães et al., 2016). La prevalencia del parásito en carne de aves se encuentra entre el 0 % en EE. UU. y el 55 % en Colombia (Dubey et al., 2005, 2006; Franco-Hernández et al., 2016).

Además de los animales criados exclusivamente para el consumo de su carne, existen numerosas **especies cinegéticas** que son hospedadores intermediarios de *T. gondii* como el jabalí (se-

roprevalencia del 14 % al 24 %) (Ranucci et al., 2013; Jokelainen, Velström y Lassen, 2015; Cale-ro-Bernal et al., 2015), el ciervo (del 11,3 % al 75,5 %) (Gauss et al., 2006; Dubey et al., 2014; Cong et al., 2016b) o la liebre (del 11,4 % al 53,8 %) (Gustafsson, Uggla y Järplid, 1997; Almeria et al., 2004; Jokelainen et al., 2011; Fernández-Aguilar et al., 2013). Aunque las personas no consuman frecuentemente la carne de estos animales, tienen una relevancia epidemiológica muy importante porque pueden actuar también como transportadores mecánicos de ooquistes, y transmitir la infección al estar en contacto con los animales de abasto.

3.3- Cerdo

El sector porcino es un integrante fundamental de la industria agroalimentaria española y un motor de la economía del país. Según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el porcino en España ocupa el primer lugar en importancia económica en el sector agroalimentario (MAPA, 2018). Las cifras ascienden hasta casi los 6.900 millones de euros, correspondientes al 36,8 % de la producción ganadera del país. Asimismo, hay que destacar que España ocupa la primera posición del censo porcino en Europa, con 30.138.000 animales que suponen el 20,1 % del total de la Unión Europea. Aragón es la Comunidad Autónoma que ocupa el primer puesto en cuanto a censo porcino con el 25,8 % (MAPA, 2018).

3.3.1- Fuentes de infección, sintomatología y respuesta inmune

Debido a su carácter omnívoro, los cerdos tienen una mayor probabilidad de adquirir la infección con *T. gondii* a través de alimentos o aguas que contengan ooquistes esporulados, mediante el consumo de quistes tisulares que contienen bradizoitos, bien por canibalismo, o por ingestión de otros hospedadores intermediarios como ratones y por vía congénita por el paso de taquizoitos a través de la placenta (García-Bocanegra et al., 2011; Balea et al., 2012; Juránková et al., 2014; de Berardinis et al., 2017).

La infección en los cerdos adultos sanos y con buenas condiciones físicas suele desarrollarse de forma subclínica o con síntomas no específicos que no permiten su diagnóstico durante la fase aguda. Los portadores, aparentemente sanos, con infecciones latentes, tendrán quistes en sus tejidos y se convertirán en portadores crónicos del parásito (Dubey y Jones, 2008).

Solamente en los casos más graves los cerdos pueden presentar sintomatología clínica que incluirá fiebre, tos, anorexia, apatía, falta de coordinación, temblores, neumonía, miocarditis, encefalitis, problemas oculares y diarrea, acompañados de una tasa de mortalidad que puede llegar hasta el 50 % en algunos casos (Dubey y Beattie, 1988). Además, pueden aparecer problemas reproductivos debidos a la transmisión congénita. La infección en cerdas reproductoras produce problemas como abortos, lechones momificados o autolíticos, mortinatos, nacimientos prematuros y muertes poco después del nacimiento (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Basso et al., 2017).

Los mecanismos de defensa del hospedador frente a *T. gondii* producen una rápida respuesta inmunológica en el individuo después de la infección. Esta respuesta se basa en una compleja combinación entre el sistema inmune innato y adquirido. Tras la infección, los taquizoitos de *T. gondii* invaden en primer lugar los enterocitos y las células de la lámina propia del intestino, mostrando un gran poder antigénico. Pasadas unas horas, los parásitos tras varias multiplicaciones rompen las células y se distribuyen a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, llegando hasta los ganglios linfáticos locales (Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003; Tizard, 2002; Hiepe, Lucius y Gottstein, 2006; Gómez-Lucía, Blanco y Doménech, 2007).

La respuesta del sistema inmune innata es la que asume principalmente el control del parásito en la fase aguda de la infección, encargándose del bloqueo de la replicación de los taquizoitos. Cuando se distribuyen a través de los vasos sanguíneos y linfáticos quedan expuestos a la acción de las proteínas del complemento, pudiendo sufrir la fagocitosis de macrófagos y de células dendríticas y liberarse citoquinas proinflamatorias. Esta situación a su vez, provocará la activación no específica de los macrófagos y las células *natural killers* (NK), promoviendo los mecanismos intracelulares para destruir los parásitos e inhibir su replicación (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998; Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003; Giraldo, 2008; Benson et al., 2009; Dupont, Christian y Hunter, 2012; Male et al., 2014).

Asimismo, se desarrolla la respuesta inmune celular, que es esencial para la protección a largo plazo. Esta respuesta es activada por antígenos del parásito de membrana y citoplasmáticos. Se caracteriza por la generación de linfocitos T, que son los encargados de la destrucción de las células infectadas por el parásito (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998; Hiepe, Lucius y Gottstein, 2006; Giraldo, 2008; Yarovinsky, 2014). Así se consigue el control de la replicación de los taquizoitos y

provoca que el parásito se proteja de esta respuesta mediante la formación de quistes tisulares, que permanecerán de forma latente generalmente durante toda la vida del animal. Estos quistes producen una continua estimulación de la respuesta inmune controlada por linfocitos T de memoria, que protegen al animal frente a nuevas infecciones por el parásito. La disminución de la respuesta de los linfocitos T en el animal, puede producir la reactivación de los quistes tisulares y la aparición de una nueva infección aguda (Martín-Hernández y García-Izquierdo, 2003; Hiepe, Lucius y Gottstein, 2006; Gómez-Lucía, Blanco y Doménech, 2007).

El sistema inmune humoral es otra de las barreras para la lucha contra el parásito en los individuos inmunocompetentes. La producción de anticuerpos por los linfocitos B favorece la fagocitosis y la activación del complemento, pero solo juegan un papel secundario en el control de la infección. Esta respuesta es muy rápida, elevándose los niveles de los diferentes tipos de inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgE e IgG) con diferentes perfiles cinéticos.

Cómo se observa en la Figura 10, en la primera semana post-infección la IgM e IgA aumentan hasta un máximo y disminuirán poco a poco a partir de la sexta semana hasta llegar a desaparecer. En el caso de la IgE alcanza un pico a los 2 meses y desaparecen rápidamente (Verhelst et al., 2011; Dard et al., 2016). A los 10 -17 días aparecerán las IgG, las cuales alcanzarán su máximo a los 2 - 3 meses y posteriormente irán disminuyendo lentamente durante gran parte de la vida del hospedador (Jungersen et al., 1999).

En el caso de los lechones descendientes de cerdas seropositivas, adquirirán de su madre anticuerpos frente a *T. gondii* (IgG, IgM e IgA) a través de la circulación sanguínea y de la leche durante el periodo de lactación protegiéndoles en sus primeras semanas de vida. Pasadas unas siete semanas los anticuerpos maternos que poseen los lechones desaparecen (García-Bocanegra et al., 2010b).

Asimismo, los anticuerpos pueden utilizarse para detectar la enfermedad y la fase de la infección en la que se encuentra el animal utilizando las técnicas de análisis serológico. Principalmente se utiliza la IgM para la detección de toxoplasmosis aguda y la IgG para diagnosticar la infección crónica.

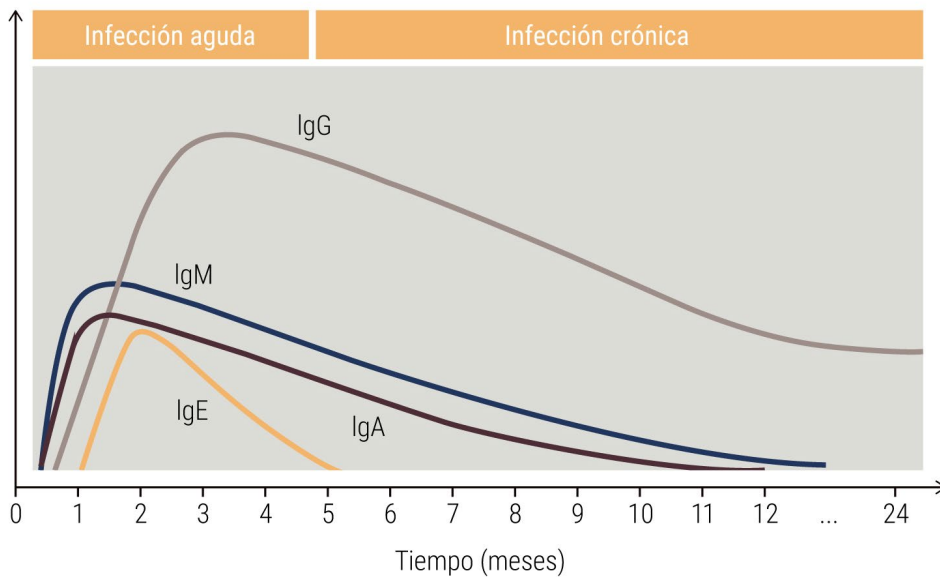


Figura 10: Cinética de anticuerpos en el cerdo (Modificado de Dard et al., 2016).

3.3.2- Factores de riesgo en producción primaria

Es esencial conocer los posibles factores de riesgo que favorecen la infección en los cerdos, para poder implementar medidas adecuadas de prevención y control en las granjas y así conseguir una disminución de la presencia de *T. gondii* (Opsteegh et al., 2016; Gazzonis et al., 2018).

Los factores de riesgo están relacionados con las condiciones de los propios animales como la edad o el estrés, con los parámetros de producción que se utilicen en las granjas, con las instalaciones y su mantenimiento, y con las medidas higiénicas y de bioseguridad que se sigan (Opsteegh et al., 2016).

Numerosos estudios han comprobado que la seroprevalencia porcina aumenta con la edad de los animales ya que aumenta el tiempo de exposición al parásito, alcanzando las cifras más altas en cerdas adultas de cría (Kijlstra y Jongert, 2008; Feitosa et al., 2014; de Sousa et al., 2014; Xu et al., 2015; Djokic et al., 2016; Jennes y Cox, 2017). Gacía-Bocanegra et al. (2010a) observaron diferencias significativas debidas a este factor entre la seroprevalencia de los cerdos de engorde (9,7 %) con respecto a las cerdas de cría (24,2 %). Otros estudios siguen la misma tendencia, como el realizado por Gebremedhin et al. (2015) en el que se observó una seroprevalencia del 26,5 % en animales menores de 12 meses mientras que el valor fue del 36,2 % en cerdos mayores de 12 meses. Igualmente, en el estudio de Grønbech et al. (2017) se indicó que las cerdas adultas presentaban más riesgo de contagio que los cerdos de engorde.

Además, episodios de estrés o enfermedad que pueden producir cuadros de inmunodepresión en los cerdos facilitará la infección por el parásito (Alvarado-Esquivel et al., 2014). Sin embargo, otros factores como el sexo, peso o conformación corporal no se han relacionado con un mayor riesgo de infección (Esteves et al., 2014).

El censo de animales de la explotación también constituye un factor de riesgo. Los cerdos en las granjas pequeñas tienen un mayor riesgo de infección que en las granjas de mayor tamaño debido a que los animales están más expuestos a las formas infectivas del parásito al tener normalmente un manejo menos tecnificado (Jennes y Cox, 2017). Ortega-Pacheco et al. (2013), observaron que en granjas con un número de cerdos menor o igual a 400 el riesgo era 27,9 veces superior que en instalaciones con un censo de animales mayor.

También se ha observado que el riesgo de infección en granjas de producción extensiva es estadísticamente mayor que en granjas de producción intensiva (Slany et al., 2016). En el primer sistema los animales son criados al aire libre o tienen disponibilidad de parques exteriores (Figura 11), pudiendo ingerir roedores y animales salvajes portadores u ooquistes esporulados del suelo, agua o pastos contaminados (van der Giessen et al., 2007; Dubey, 2010; García-Bocanegra et al., 2010a, 2010c; Veronesi et al., 2010; Dubey et al., 2012; Jones y Dubey, 2012; Guo et al., 2015b; Wallander et al., 2016). García-Bocanegra et al. (2010a) detectaron 9,7 veces más riesgo en animales con posibilidad de salida al exterior de las instalaciones que en aquellas en las que no salían. En un estudio realizado por van der Giessen et al. (2007) se determinó que el riesgo de detectar anticuerpos frente a *T. gondii* en animales en granjas de producción extensiva era 16 veces mayor que en las de manejo intensivo.

Este es un factor importante en el proceso de evaluación del riesgo, ya que últimamente se ha producido un aumento en la producción de cerdos de forma extensiva debido a las tendencias actuales de un mayor consumo de animales criados en granjas orgánicas.

Por otro lado, en las instalaciones con manejo intensivo, los animales están más hacinados y cuando se detecta una fuente de contaminación, el número de animales expuestos sería mayor lo que podría conllevar un aumento de la seroprevalencia (Hill y Dubey, 2002; van der Giessen et al., 2007; Bezerra et al., 2009; Lopes et al., 2013).



Figura 11: Cerdos con acceso a parques exteriores (García-Bocanegra et al., 2011).

Asimismo, evitar la presencia de otros animales como gatos, perros, roedores o pájaros tanto alrededor como dentro de las naves es importante. El principal factor de riesgo en relación al contacto con otros animales es el acceso de los gatos al interior de las instalaciones. Éstos son los hospedadores definitivos del parásito y por lo tanto son los únicos que pueden contaminar el ambiente con ooquistes (Ortega-Pacheco et al., 2011; Cenci-Goga et al., 2013; Guimarães et al., 2013; de Sousa et al., 2014). Se ha observado que la presencia de gatos puede producir un aumento del riesgo relativo de contacto de los cerdos con el parásito en más de once veces (García-Bocanegra et al., 2010a).

En el caso de los perros, se consideran como una posible forma de transporte mecánico de los ooquistes al mancharse con heces de gatos y transportar el parásito. Asimismo, en algunos estudios se ha observado que los perros pueden ingerir ooquistes esporulados del ambiente y que éstos consigan resistir el proceso de digestión (Lindsay et al., 1997; El-Beairy et al., 2013; Muñoz y Mayer, 2016).

Además, existen otros hospedadores intermediarios, como pájaros y ratones, que pueden transmitir la infección al ser ingeridos por los cerdos (Kijlstra et al., 2004). Por ello, es muy importante tener medidas de control de estos animales en las instalaciones (García-Bocanegra et al., 2010a; Piassa et al., 2010; Meerburg et al., 2012). En concreto, Kijlstra y Jongert (2008) realizaron un estudio en tres granjas de cerdos orgánicas en las que se habían detectado problemas relacionados con la presencia de roedores. Se llevó a cabo una campaña de control de roedores durante cuatro meses y se observó que la seroprevalencia de los cerdos de estas granjas disminuyó en gran medida, llegando a no detectarse ningún cerdo infectado en dos de ellas. Tras dos meses sin

realizar el control de roedores, la seroprevalencia porcina en las tres granjas aumentó de nuevo.

También el orden y mantenimiento de las instalaciones son condicionantes muy importantes para prevenir la infección de los cerdos con *T. gondii*. Factores como la integridad de las ventanas y puertas que ajusten correctamente son necesarios para impedir la entrada de pájaros u otros animales portadores al interior de las instalaciones. Asimismo, un buen orden de los materiales impedirá el asentamiento de hospedadores intermediarios del parásito como ratones, que podrían ser devorados por los cerdos y transmitirles el parásito (Veronesi et al., 2010; Tao et al., 2011).

El almacenamiento del alimento y la administración del pienso también pueden ser un factor de riesgo. Dependiendo de las condiciones de conservación, el alimento puede estar contaminado con heces de gatos que presenten ooquistes o con cadáveres de hospedadores intermedios, como ratones o pájaros (Mateus-Pinilla et al., 1999; Dubey et al., 1995b; Kijlstra y Jongert, 2008; Bezerra et al., 2009; Cenci-Goga et al., 2013; Ortega-Pacheco et al. 2013).

Igualmente, se deben de tener en cuenta la existencia o no de sistemas de calefacción en las instalaciones para el mantenimiento constante de la temperatura. En las granjas que tengan una temperatura cálida durante todo el año se puede producir una mayor esporulación de los ooquistes y supervivencia del parásito (Hernández et al., 2014; Foroutan et al., 2019).

La limpieza de las instalaciones es otro punto muy importante para el contacto de los cerdos con *T. gondii*. En las granjas podría existir contaminación ambiental con ooquistes excretados por gatos o que hayan sido introducidos accidentalmente en alguna superficie mediante las botas o utillaje desde el exterior (Jennes y Cox, 2017). Por ello, la mejor forma de limpiar las superficies de los corrales es utilizando agua a alta temperatura y limpiadores de presión asociados a una desinfección química (Villari et al., 2009; Veronesi et al., 2010).

Otro de los posibles factores de riesgo presentes en las granjas es la falta de vigilancia de animales muertos y el no realizar una retirada correcta de cadáveres de los corrales. En estos casos, los cerdos podrían tener acceso a los cadáveres de sus compañeros y mediante canibalismo consumir tejido con quistes tisulares del parásito. Gebremedhin et al. (2015), observaron que este factor estaba relacionado estadísticamente con la infección con *T. gondii*, observándose que en granjas sin posibilidad de acceso a cadáveres de cerdos la seroprevalencia porcina era del 25,7%,

mientras en los que los animales tenía la posibilidad de ingestión de estos tejidos aumentaba hasta el 40,7 %.

En los últimos años, se han realizado diversos estudios que han demostrado que la vacunación de los animales con una cepa inactiva o viva atenuada de *T. gondii* podría proteger de la infección frente al parásito. Kringel et al. (2004) y Burrells et al. (2015) observaron una reducción significativa de quistes en los tejidos porcinos tras la vacunación. Se ha comprobado que si se realiza la vacunación de los gatos la seroprevalencia porcina disminuía significativamente al reducirse la diseminación de ooquistes (Mateus-Pinilla et al., 1999; Innes et al., 2009; Verma y Khanna, 2013). Sin embargo, actualmente la única vacuna autorizada con una cepa viva y atenuada de *T. gondii* es para su uso en ovejas (de Berardinis et al., 2017). En el resto de especies este tipo de vacunas no está comercializada porque la toxoplasmosis no está considerada por parte de la industria un problema realmente importante para ellas. Además, la utilización de cepas vivas podría causar problemas de seguridad según el grado de atenuación, y posiblemente tendrían una vida útil muy corta (Li y Zhou, 2018; Innes et al., 2019). Para solucionar estos problemas, en la actualidad se están ensayando en modelos animales vacunas de fragmentos de ADN, ya que se ha observado que presentan ventajas como que son fáciles de producir, relativamente económicas, más eficientes, provocan una respuesta inmunitaria humoral y celular más fuertes, son estables al calor y más seguras (Ahmadpour et al., 2017; Liu et al., 2017; Li y Zhou, 2018).

El Reglamento (CE) nº 852/2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios, establece medidas para garantizar la higiene de los alimentos en todas las fases a lo largo del proceso de producción, desde la producción primaria hasta el consumidor final. La aplicación de buenas prácticas de higiene (BPHs) en la producción primaria conlleva una reducción del riesgo de *T. gondii*, ya que previenen los factores de riesgo y por lo tanto conducen a una disminución de la seroprevalencia porcina, garantizando así la protección de la salud pública.

3.3.3- Seroprevalencia

Existen numerosos de estudios que evalúan la seroprevalencia de *T. gondii* en el cerdo. Los resultados muestran una amplia variación en los valores obtenidos entre los países y entre regiones dentro de un mismo país (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Dubey, 2009). Estos datos dependen de factores como la edad de los animales, la zona geográfica, el sistema de producción o la técni-

ca de análisis serológico que se haya utilizado (Alvarado-Esquivel et al., 2014; Djokic et al., 2016; Foroutan et al., 2019).

En la Tabla 1, se presentan los estudios realizados a nivel mundial en los que se pueden ver que los valores obtenidos son muy heterogéneos, variando entre el 0 % y el 95,8 %. Las cifras obtenidas en los estudios europeos muestran valores que se sitúan entre el 0,5 % en Italia o Republica Checa y el 61 % en cerdo ibérico en España. En el caso del continente americano se han encontrado datos que varían entre el 0% de Brasil al 95,8 % de México. Los valores obtenidos en los países asiáticos varían entre el 2,3 % en Indonesia y el 70 % en China. En el caso de Africa, los estudios realizados han mostrado datos del 17,9 % en Burkina Faso al 45,2 % en Nigeria.

Tabla 1: Seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo.

País	Seroprevalencia (%)	Autor
Alemania	16,5 4,1	Damriyasa et al. (2004) de Buhr, Ludewig y Fehlhaber (2008)
Dinamarca	3,1	Grønbech et al. (2017)
Eslovaquia	2,1	Turčeková et al. (2013)
España	61,0 16,0 19,0 27,9	Sánchez-Murillo et al. (2004) García-Bocanegra et al. (2010a) García-Bocanegra et al. (2010c) Hernández et al. (2014)
Estonia	5,8	Santoro et al.(2017)
Francia	2,0	Roqueplo et al.(2011)
Holanda	3,0	Meerburg et al.(2006)
Inglaterra	2,0 3,6	Gamble, Brady y Dubey (1999) Limon et al. (2017)
Italia	16,3 16,1 2,1 0,5	Villari et al. (2009) Veronesi et al. (2010) Papini et al. (2010c) Gazzonis et al. (2014)
Letonia	4,2	Deksne y Kirjušina(2013)
Polonia	26,4	Sroka et al.(2008)
Portugal	15,6 9,8 7,1	de Sousa et al. (2006) Lopes et al. (2013) Esteves et al. (2014)

Tabla 1: Seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo (continuación).

República Checa	0,5 36,0	Vostalová et al.(2006) Bártová y Sedlák(2011)
Rumania	43,1 23,1	Balea et al. (2012) Paștiu et al. (2013)
Serbia	28,9 9,2	Klun et al. (2006) Klun et al. (2011)
Suiza	14,0	Berger-Schoch et al. (2011)
Canada	0,7	Poljak et al. (2008)
EE.UU	2,3 4,1 2,6 27,7	Dubey et al. (1995b) Gebreyes et al. (2008) Hill et al. (2010) Sandfoss et al. (2011)
Antillas	24,3	Sharma et al. (2015)
Argentina	37,8	Venturini, Bacigalupe y Venturini (2004)
Brasil	17,0 65,8 0,0 37,5 8,5 18,3 50,0 36,2 12,4 13,4 11,5 5,0 7,6 12,5 36,0 19,5 25,5 51,9	dos Santos et al. (2005) Bonna et al. (2006) Brandão et al. (2006) Cavalcante et al. (2006) de Moura et al. (2007) Bezerra et al. (2009) Freitas et al. (2009) de Azevedo et al. (2010) Flausino et al. (2010) Piassa et al. (2010) Frazão-Teixeira y Oliveira (2011) de Lima et al. (2011) Luciano et al. (2011) Fernandes et al. (2012) Cademartori et al. (2014) Feitosa et al. (2014) de Sousa et al. (2014) Magalhães et al. (2017)
Chile	8,8	Muñoz-Zanzi et al. (2012)
México	12,7 0,5 95,8 45,3	Alvarado-Esquivel et al. (2011) Alvarado-Esquivel et al. (2012) Ortega-Pacheco et al. (2013) Alvarado-Esquivel et al. (2014)
Panamá	59,5	Correa et al. (2008)
Perú	32,3 27,7	Suarez-Aranda et al. (2000) Saavedra y Ortega (2004)
San Cristóbal y Nieves	48,0	Hamilton et al. (2015)

Tabla 1: Seroprevalencia de *T. gondii* en cerdo (continuación).

China	16,9	Zou et al. (2009)
	27,0	Zhou et al. (2010)
	24,5	Tao et al. (2011)
	29,6	Du et al. (2012)
	12,0	Liu et al. (2012)
	30,6	Wu et al. (2012)
	4,6	Chang et al. (2013)
	70,0	Li et al. (2015)
	19,1	Xu et al. (2015)
	18,3	Zhang et al. (2018)
Indonesia	2,3	Tuda et al. (2017)
Japón	5,2	Matsuo et al. (2014)
Taiwán	10,1	Tsai et al. (2007)
Vietnam	23,0	Huong y Dubey (2007)
Burkina Faso	29,0	Bamba et al. (2016)
	17,9	Bamba et al. (2017)
Ghana	39,0	Arko-Mensah et al. (2000)
Nigeria	29,1	Onyiche y Ademola (2015)
	45,2	Ayinmode y Abiol (2016)
	40,0	Ishaku et al. (2018)
República de Benín	23,0	Tonouhewa et al. (2018)

En la Figura 12 se puede observar que la seroprevalencia porcina en los países europeos normalmente presenta cifras <30 %. En el resto de continentes la tendencia suele ser la aparición de valores entre el 30 % y el 45 %, y se detectan algunos estudios con datos de seroprevalencia >45 % en países como Argentina en Sudamérica o Tailandia en Asia (Foroutan et al., 2019).

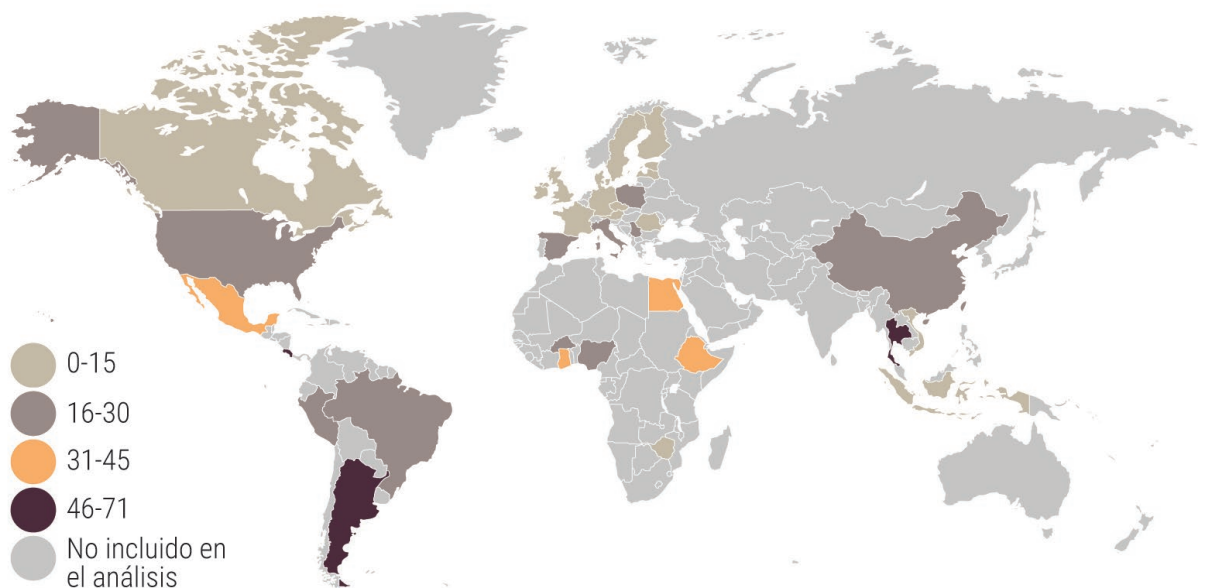


Figura 12: Seroprevalencia mundial de *T. gondii* en cerdos (Modificado de Foroutan et al., 2019).

En el caso de España, los datos que existen de seroprevalencia porcina son escasos. Solo se ha realizado un estudio a nivel nacional (García-Bocanegra et al., 2010a) y tres estudios regionales (Sánchez-Murillo et al., 2004; García-Bocanegra et al., 2010c; Hernández et al., 2014).

En el estudio de seroprevalencia porcina a nivel nacional, García-Bocanegra et al. (2010a) muestrearon granjas procedentes de las principales regiones productoras de porcino en España (Figura 13). Se obtuvo una seroprevalencia total del 16 % (10 % en animales de engorde y del 24 % en cerdas de cría). Por regiones, valores de seroprevalencia de <10 % se detectaron en Galicia y Murcia, valores entre el 10 % y el 20 % en Aragón, Castilla y León, Navarra, Castilla la Mancha y Andalucía, mientras que cifras >20 % se encontraron en Cataluña, Extremadura y la Comunidad Valenciana.

En relación a los estudios regionales realizados, Sánchez-Murillo et al. (2004) encontraron una seroprevalencia del 61 % en cerdos ibéricos en Extremadura. Posteriormente, en Cataluña se obtuvo una seroprevalencia del 19 % en cerdos de engorde y cerdas de cría (García-Bocanegra et al., 2010c). Asimismo, Hernández et al. (2014) obtuvieron un valor del 27,9 % en cerdo Ibérico de engorde en Andalucía.

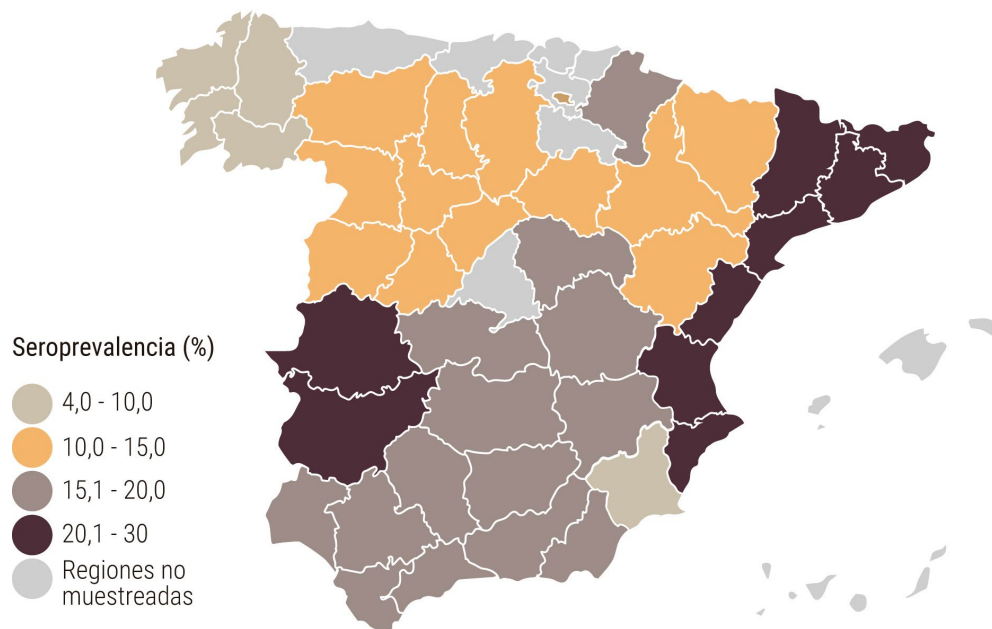


Figura 13: Seroprevalencia porcina en España (Modificado de García-Bocanegra et al., 2010a).

3.3.4- *Toxoplasma gondii* en carne de cerdo

Según datos del MAPA, España es la cuarta potencia productora de carne de cerdo a nivel mundial después de China, EE. UU. y Alemania. El porcino en nuestro país ocupa el primer lugar en cuanto

a importancia económica en el sector agroalimentario. El sector produce más de 3.850.000 toneladas de carne de cerdo con una facturación superior a los 20.000 millones de euros, obteniéndose más de 5.000 millones de euros a través de exportaciones a otros países. La Comunidad Autónoma de Aragón es la tercera región del país en producción de carne porcina con el 11,3 % del total (MAPA, 2018).

Los estudios realizados para evaluar la prevalencia del parásito en carne de cerdo (Tabla 2) señalan cifras muy dispares. A nivel europeo los valores se encuentran entre el 4,5 % de Portugal o el 13 % en Irlanda (de Sousa et al., 2006; Hálová et al., 2013) hasta alcanzar el 100 % en Eslovaquia (Turčeková et al. 2013). La prevalencia en carne observada en otros países del mundo señala principalmente valores bajos o medios como el 0,3 % en EE. UU. (Dubey et al., 2005), el 3,2 % en Canadá (Iqbal et al., 2018), el 8,2 % en China (Zhang et al., 2019) o el 14,2 % en Brasil (Frazão-Teixeira y de Oliveira, 2011). Sin embargo, también se han observado prevalencias altas (50 % - 65 %) en países como Brasil o Japón (Frazão-Teixeira et al., 2006; Zakimi et al., 2006; Belfort-Neto et al., 2007; Bezerra et al., 2012; Fernandes et al., 2012). En España, la información existente es muy escasa, conociéndose únicamente un estudio puntual realizado por Bayarri et al. (2012). En este trabajo se obtuvo una prevalencia del 8 % en muestras de carne fresca (lengua, costilla, magro y lomo) procedente de establecimientos localizados en la ciudad de Zaragoza.

Tabla 2: Prevalencia de *T. gondii* en carne de cerdo.

País	Prevalencia (%)	Autor
Eslovaquia	100,0	Turčeková et al. (2013)
España	8,0	Bayarri et al. (2012)
Irlanda	13,0	Hálová et al. (2013)
Italia	57,1 33,13	Bacci et al. (2015) Veronesi et al. (2017)
Portugal	4,5	de Sousa et al. (2006)
Reino Unido	38,0	Aspinall et al. (2002)
Serbia	72,7	Klun et al. (2011)
Suiza	23,3	Berger-Schoch et al. (2011)

Tabla 2: Prevalencia de *T. gondii* en carne de cerdo (continuación).

Brasil	25,0	dos Santos et al. (2005)
	27,1	da Silva et al. (2005)
	50,0	Frazão-Teixeira et al. (2006)
	34,0 - 66,0	Belfort-Neto et al. (2007)
	14,2	Frazão-Teixeira y de Oliveira (2011)
	55,0	Bezerra et al. (2012)
	55,2	Fernandes et al. (2012)
	47,2	Cademartori et al. (2014)
35,1	Feitosa et al. (2014)	
Canadá	3,2	Iqbal et al. (2018)
EE.UU.	0,3	Dubey et al. (2005)
	36,8	Dubey y Jones (2008)
	9,6	Velmurugan, Su y Dubey (2009)
México	2,1	Galván-Ramirez et al. (2010)
	5,3	Dzib-Paredes et al. (2016)
San Cristóbal y Nieves	3,2	Iqbal et al. (2018)
China	18,6	Wang et al. (2012b)
	13,56	Zhuo et al. (2015)
	8,2	Zhang et al. (2019)
Japón	56,4	Zakimi et al. (2006)

4- Influencia del procesado tecnológico de la carne en la viabilidad de *Toxoplasma gondii*

Los quistes tisulares de *T. gondii* presentes en la carne pueden ser susceptibles a diferentes tratamientos tecnológicos como el tratamiento térmico con calor, la congelación, la irradiación, las altas presiones o el curado. Se han realizado diversos estudios para conocer los diferentes parámetros y condiciones que influyen en la infectividad del parásito (Kijlstra y Jongert, 2008; 2009; Enemark, Johansen y Alban, 2015; Guo et al., 2015b; de Berardinis et al., 2017).

Jacobs, Remington y Melton, (1960) fueron los primeros en demostrar que la aplicación de **altas temperaturas** podía inactivar al parásito. Dubey et al. (1990) estimaron la curva de inhibición de los quistes tisulares en láminas de carne porcina tomando puntos de temperatura a 49, 52, 55, 58, 61, 64 y 67 °C, en diferentes tiempos de exposición al tratamiento (0,01, 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 96 minutos). Estos autores llegaron a la conclusión de que se produce la destrucción inmediata del parásito cuando la temperatura interna de la carne alcanza los 67 °C. Posteriormente, El-Nawawi, Tawfik y Shaapan, (2008) indicaron que en carne de ovejas infectadas el parásito se inactivaba

aplicando una temperatura de 60 °C durante 10 minutos. Sin embargo, según una encuesta realizada a consumidores de Estados Unidos, aproximadamente el 9 % de los consumidores cocina algunos tipos de carnes a una temperatura inferior a 48 °C, lo que podría no ser suficiente para inactivar a *T. gondii* (EcoSure, 2008). Por otro lado hay que tener en cuenta que el cocinado con microondas de carne infectada no garantiza la destrucción del parásito, ya que no consigue que el producto alcance en su interior la temperatura necesaria (Lundén y Ugglá, 1992; Lake, Hudson y Cressey, 2002). Las ondas electromagnéticas generadas por el microondas tienen mayor efecto sobre la superficie del alimento por lo que pueden crear puntos fríos y calientes (Knutson, Marth y Wagner, 1987).

La aplicación de **bajas temperaturas** también puede influir en la inactivación de *T. gondii*. Dubey (1974), observó que la congelación a temperaturas inferiores a -12 °C actúa negativamente sobre la viabilidad del parásito. Posteriormente, Hill et al. (2006a), observaron que los quistes del parásito en la carne porcina se inactivaban almacenando el producto entre -5 °C y 0 °C durante 7 días. Asimismo, en otros estudios se determinaron otras combinaciones de temperatura y tiempo, como los periodos de congelación de 2 días a -12 °C (Dubey, 1988) o de 3 días a -10 °C que conseguían inactivar el parásito (El-Nawawi, Tawfik y Shaapan, 2008). Según Guo et al. (2015b) sólo sería necesario un día a -15,7 °C para la inactivación. Igualmente, Neumayerová et al. (2014) comprobaron que la congelación de la carne a -20 °C durante 4 horas era eficaz para inactivar el parásito. Sin embargo, Kotula et al. (1991) realizaron un estudio de inactivación con diferentes cepas del parásito y observaron que algunas cepas permanecían viables hasta 11,2 días a -6,7 °C y hasta 22,4 días entre -3,9 °C y -1 °C, incluso hubo cepas, como la cepa Aldrin (tipo I), que mostraron resistencia a las bajas temperaturas. La temperatura de refrigeración no puede utilizarse para la destrucción de los quistes de *T. gondii*, ya que permanecen infectantes durante más tiempo del que la carne se mantiene apta para el consumo humano (Dubey, 1988; Beck y Pantchev, 2010). Dubey et al. (1990), observaron que los parásitos en los quistes tisulares podían sobrevivir más de 19 días manteniéndolos a 4 °C. De la misma forma, Hill et al. (2006a) observaron que la inactivación de los parásitos contenidos en los quistes tisulares conservados entre 3,8 °C y 6,1 °C, no se producía hasta los 14 días.

De la misma forma, varios estudios han demostrado que *T. gondii* se inactiva al someter la carne a tratamientos de **irradiación gamma** a dosis entre 0,4 kGy hasta 1,0 kGy. Sin embargo, hay que

señalar que la dosis de irradiación necesaria dependerá de la cepa de *T. gondii* que se trate y del tipo de rayos gamma que se utilice (Dubey et al., 2000; Aymerich, Picouet y Monfort, 2008). Según Chang-Cun et al. (1991, 1993) bastaría una dosis entre 0,55 - 0,6 kGy para la inactivación del parásito, y no sería necesario alcanzar dosis más altas para conseguir un alimento seguro. A pesar de conseguir la inactivación del parásito, los efectos adversos de la irradiación tienen un impacto importante en la aceptación del producto por parte del consumidor al provocar alteraciones en el color de la carne (Dubey y Thayer, 1994; Brewer et al., 2004). Además, es importante señalar que la utilización de este tratamiento para la conservación de la carne está prohibida en la Unión Europea.

Igualmente, la utilización de **altas presiones hidrostáticas** también puede ser un buen método para destruir el parásito. Aunque los alimentos pueden ser sometidos a presiones de entre 100 MPa a 900 MPa (Aymerich, Picouet y Monfort, 2008), estos parámetros deben ajustarse correctamente para no afectar las características organolépticas de la carne, ya que podría producirse la pérdida del color rojo característico de la carne y la modificación de la textura del producto (Cheftel y Culioli, 1997; Kijlstra y Jongert, 2008; Bajovic, Bolumar y Heinz, 2012). Con respecto a su eficacia frente a *T. gondii* se ha demostrado que presiones de 300 MPa durante 30 segundos serían efectivas en la inactivación del parásito (Lindsay et al., 2006; Franssen et al., 2019).

Finalmente, cabe destacar que el proceso tecnológico de **curado** puede influir en la inactivación de los quistes tisulares de *T. gondii*, mediante la acción sinérgica entre la concentración de sal, el tiempo de maduración y la temperatura de almacenamiento (Kijlstra y Jongert, 2008; Bayarri et al., 2010; Condolero et al., 2018; Hill et al., 2018).

4.1- Efecto del tratamiento tecnológico del curado

España es un país con una gran tradición en la elaboración y consumo de productos cárnicos curados. De los elaborados con carne de cerdo, el jamón curado es, sin lugar a dudas, uno de los productos más emblemáticos de la gastronomía española, siendo nuestro país el primer productor mundial de jamones y paletas (ANICE, 2018). Según ANICE, en 2017 se produjeron más de 45 millones de jamones curados en España. Este producto supone el 20,9 % del volumen de mercado de productos cárnicos en España, y es el producto que más se exporta. Cabe destacar que en el período 2016 - 2017 las exportaciones españolas siguieron creciendo hasta llegar a 45.900

toneladas. Los principales destinos europeos son Francia, Alemania, Italia, Portugal, Reino Unido, Suiza y Bélgica. Además de otros países no europeos como México, Estados Unidos, Japón, Australia, China y Chile (Cruz, 2016; ANICE, 2018).

Según el Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos, el jamón y la paleta curados son los productos elaborados con la extremidad posterior y anterior del cerdo, respectivamente, que se han sometido, con carácter general, a un proceso de salazón, acompañado eventualmente de adición de especias, condimentos y aditivos, lavado, reposo o postsalado y maduración y secado durante el tiempo suficiente para conferirle las características organolépticas propias.

Aunque la forma tradicional de elaboración del jamón curado está unida a lugares secos y fríos, en la actualidad el procesado de estos productos se realiza en secaderos industriales en dónde se controlan con exactitud todos los tiempos y temperaturas a lo largo del proceso. Las fases que se siguen para la producción del jamón curado son: preparación de los perniles, salazonado, postsalado, secado y maduración (Figura 14) (Marcos, 1991; Zumalacárregui, 1997; Arnau, 1998; Ventanas, 2001; Mingoarranz, 2006; Bello, 2008; Guo et al., 2015a).

Tras el **sacrificio y despiece**, se lleva a cabo un perfilado y sangrado de los perniles. El sangrado puede hacerse manualmente siguiendo la trayectoria de las arterias de la pieza, así como mecánicamente utilizando rodillos. A continuación, se almacenan en refrigeración para bajar la temperatura interna de la pieza y así evitar alteraciones microbianas (Ventanas, 2001; Mingoarranz, 2006; Bello, 2008; Guo et al., 2015a).

El siguiente paso es el **salado** de los perniles, para ello las piezas son frotadas superficialmente con una mezcla de sal y sales nitrificantes, y almacenadas en cámaras de salado entre capas de sal. Estas sales proporcionan el color rojo deseable en el producto e inhiben el crecimiento de microorganismos anaerobios para extender su vida útil (Pott et al., 2013; Guo et al., 2015b). Las cámaras de salado se mantienen entre 0 °C y 3 °C y una humedad relativa del 90 % al 95 % para facilitar la difusión de la sal al interior del pernil. El periodo de salado dependerá de cada pieza y del tipo de jamón, pudiendo permanecer aproximadamente de 0,65 a 2 días/kg (Mingoarranz, 2006; Bello, 2008; Guo et al., 2015a).

Cuando se acaba esta fase del procesado, se elimina la sal superficial de los perniles mediante su lavado y cepillado. A continuación, se realiza la etapa de **postsalado**, en la cual la sal se distribuye uniformemente por toda la pieza. Asimismo, se producirá la disminución de la actividad de agua (a_w) que favorecerá la estabilización microbiológica y enzimática del pernil. Esta etapa se llevará a cabo en cámaras entre 3 °C y 5 °C, aumentándola hasta los 12 °C a 15 °C al final de la etapa y con una humedad relativa en descenso del 85 % al 70 %. Esta fase suele durar de 1 a 2 meses (Ventanas, 2001; Mingoarranz, 2006; Bello, 2008).

La siguiente etapa es la de **secado**, en la que se estabiliza el color, continua la formación de compuestos responsables del sabor, del aroma y de la pérdida de peso del pernil, y se funde la grasa interna de la pieza. La temperatura ambiental de las cámaras en las que se realiza esta etapa aumenta de 15 °C a 18 °C hasta los 28 °C a 30 °C, y la humedad relativa desde el 60 % hasta el 80 %, manteniéndose en esta sala entre 90 y 110 días (Ventanas, 2001; Mingoarranz, 2006; Bello, 2008; Guo et al., 2015a).

Por último, en la fase de **maduración** se finaliza la deshidratación de la pieza y la producción de compuestos que proporcionan el aroma al producto. Durante esta fase la concentración de sal siempre aumenta debido a la pérdida de agua que está sufriendo el jamón (Guo et al., 2015b). La temperatura en esta fase puede disminuir levemente hasta alcanzar los 15 °C. La permanencia de las piezas en esta fase dependerá del tipo de producto elaborado (Mingoarranz, 2006; Bello, 2008).



Figura 14: Fases de producción del jamón curado (Consortio del Jamón Serrano Español, 2013).

Según el Real Decreto 474/2014, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos, la denominación del jamón curado está relacionada con el período mínimo de elaboración, establecido como el tiempo transcurrido entre la entrada del producto en salazón y su comercialización. Por ejemplo, pueden denominarse “bodega” los jamones que hayan tenido un periodo mínimo de 9 meses y las paletas con un mínimo de 5 meses, “reserva” los jamones de al menos 12 meses y las paletas un mínimo de 7 meses, y pueden designarse como “gran reserva” los jamones que tienen una elaboración mínima de 15 meses y las paletas un mínimo de 9 meses.

Asimismo, el Real Decreto 4/2014, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico, establece las denominaciones del jamón y paleta según la raza de los cerdos (100% ibérico, ibérico) y su alimentación (de bellota, de cebo de campo, de cebo). Esta norma establece que los jamones que pesen menos de 7 kg deberán tener un periodo de elaboración mínimo de 600 días, y las piezas de 7 kg o más tendrán un tiempo de elaboración mínimo de 730 días. En el caso de las paletas ibéricas, el período mínimo de elaboración deberá ser de 365 días independientemente del peso.

Los jamones curados pueden elaborarse dentro de unos estándares de calidad diferenciada como la Denominación de Origen Protegida (DOP), la Indicación Geográfica Protegida (IGP) o la Especialidad Tradicional Garantizada (ETG). Ejemplos de este tipo de productos serían el Jamón de Teruel (DOP) o el jamón Serrano (ETG). Estos productos están regulados por la normativa de la Unión Europea (UE), que garantiza el cumplimiento de unos requisitos de calidad adicionales a los exigidos para el resto de productos convencionales (ANICE, 2018; MAPA, 2018).

4.1.1- *Toxoplasma gondii* en el jamón curado

Se han realizado estudios epidemiológicos en los cuales se ha encontrado una relación entre el consumo de productos curados con la infección de *T. gondii* en el hombre. El primer trabajo al respecto lo realizaron Buffolano et al. (1996) en 3.765 mujeres que acababan de dar a luz en Nápoles. Se les tomó una muestra de sangre y se les realizó una encuesta epidemiológica. Se observó una relación estadísticamente significativa entre la detección de anticuerpos frente al parásito en las mujeres y el consumo de jamón curado en sus dietas. Asimismo, señalaron que el consumo de este tipo de producto por lo menos una vez al mes aumentaba el riesgo de infección en tres veces. Se confirmaron los mismos resultados en estudios posteriores como el de Kapperud et al.

(1996) que se realizó en 37.000 mujeres embarazadas en Noruega o el de Cook et al. (2000) en el que se estudió a 960 mujeres de varias ciudades europeas.

Otros estudios también apoyan que el proceso de curación podría ser insuficiente para destruir el parásito y que sólo disminuye el riesgo de infección desde un nivel alto a uno medio (Kapperud et al., 1996; Thaller, Tamaro y Pentimalli, 2011; Guo et al., 2015b). Se han detectado parásitos viables en muestras comerciales, observándose prevalencias del 1,5 % en 67 muestras de carne curada analizadas mediante PCR en Reino Unido por Warnekulasuriya, Johnson y Holliman, (1998) o del 4,8 % en 475 muestras de jamón curado estudiadas en formato de cuña y en preparaciones en lonchas en España mediante PCR y bioensayo en ratón por Gomez-Samblas et al. (2015). Sin embargo, Bayarri et al. (2012), mediante bioensayo en ratón, no detectaron el parásito en ninguna de las 25 muestras de jamón curado analizadas procedentes de comercios de la ciudad de Zaragoza.

La eficacia del proceso de curado se debe a la acción sinérgica entre el contenido de NaCl, el efecto de los nitratos y nitritos, el tiempo de curación, la a_w o el pH (Sommer, Romme y Levetzow, 1965; Work, 1968; Mie et al., 2008; Bayarri et al., 2010; Gomez-Samblas et al., 2016).

Para comprobar el efecto de las sales se han realizado diferentes estudios *in vitro*. Jacobs, Remington y Melton, (1960), en parásitos obtenidos de quistes tisulares de cerebros de ratas con infección crónica, determinaron que éstos se inactivaban al estar en contacto con una solución de NaCl entre el 0,1 % y el 2,1 % durante 24 horas. Sommer, Romme y Levetzow (1965) observaron que la inactivación del parásito se producía en una solución de NaCl al 6 %. Posteriormente, Dubey (1997) realizó un trabajo con parásitos obtenidos de cerebros de ratones infectados a los cuales les aplicó soluciones del 0,85 % al 6 % de NaCl a temperaturas de entre 4 °C y 20 °C. El parásito solo perdió la viabilidad en la concentración de NaCl del 6 % con independencia de la temperatura ensayada. Asimismo, Hill et al. (2004, 2006a) realizaron diferentes pruebas con combinaciones de sales como cloruro de sodio (1 % - 2 %), diacetato de sodio (0,1 % - 0,2 %), tripolifosfato de sodio (0,25 % - 0,5 %), lactato de potasio (1,4 % - 1,96 %) o lactato de sodio (1,4 % - 2,0 %). Observaron que el parásito se inactivó con un 2 % de cloruro sódico o un 1,4 % de lactato sódico a 4 °C después de 8 horas. Pott et al. (2013) observaron que aplicando concentraciones del 2,5 % al 3 % de sal, la inactivación se consiguió en un solo día, mientras que cuando utilizaron

una concentración del 2 % no se inactivaba hasta el octavo día. Sin embargo, en el estudio de Neumayerová et al. (2014), utilizaron una concentración del 2,5 % de sal, a 4 °C de temperatura y tomaron muestras a varios tiempos (2 horas y 7, 14, 21, 36 y 42 días), observando que la inactivación se produjo tras 14 días de tratamiento.

Son muy escasos los estudios sobre la influencia del proceso de curado del jamón en la viabilidad de *T. gondii*. Un estudio pionero fue el de Bayarri et al. (2010), en el que se seleccionaron 6 cerdos seropositivos para utilizar sus perniles en la elaboración de jamones curados. Tras el curado y análisis de las piezas señalaron que una concentración final del 3,9 % de NaCl, 25 mg/kg de nitratos y 3 mg/kg de nitritos era suficiente para la inactivación de los quistes de *T. gondii*. Asimismo, Gomez-Samblas et al. (2016) utilizaron 20 perniles y paletas procedente de cerdos sometidos a una infección experimental con *T. gondii* para determinar la influencia del curado en la inactivación del parásito. Las piezas fueron sometidas por lotes a varios tratamientos: congelado a -20 C° durante 3 días y después curado con sal marina; curado con sal marina y nitritos; curado con sal marina; y curado con sal marina durante 7 meses (perniles) o durante 5 meses (paletas) y congelado a -20 C° durante 3 días al finalizar el proceso (no se indican las concentraciones de la sal ni de los nitritos utilizadas). La combinación de la congelación y el salado con sal marina fue el tratamiento más eficaz para la inactivación de *T. gondii*, mientras que el que menor actividad mostró fue el salado con sal marina y nitritos.

Otro de los factores que participan en la inactivación del parásito durante el curado es el tiempo. Bayarri et al. (2010) demostraron que este parámetro tiene influencia en la inactivación de *T. gondii*. No se detectaron parásitos viables mediante bioensayo en ratón, y su posterior estudio por inmunofluorescencia, histología y PCR, en jamones curados durante 14 meses mientras que sí que se aislaron formas infectantes en jamones de 7 meses. Genchi et al. (2017), analizaron jamones que habían sido curados siguiendo las guías de elaboración del jamón de Parma (DOP), durante 12, 14 y 16 meses. Se observó la inactivación del parásito en todos los jamones procesados en los tres tiempos de curación. Sin embargo, Gomez-Samblas et al. (2016), en su estudio tomaron porciones de 100 g de cada pernil antes de comenzar el tratamiento de curado, y a los 1, 3, 5 y 7 meses del procesado para determinar la inactivación del parásito. Señalaron que en las piezas que habían sido procesadas durante 5 y 7 meses se había conseguido la pérdida de infectividad de *T. gondii*.

5- Métodos de detección de *Toxoplasma gondii*

5.1- Detección en animales vivos

Para la detección del parásito en animales vivos se emplean habitualmente las pruebas serológicas siendo una forma muy útil de estimar las tasas de infección (Berger-Schoch et al., 2011; Wallander et al., 2015; EFSA, 2017, 2018). Estas muestras pueden almacenarse en congelación durante años sin que se degrade su carga inmunológica, observándose que las inmunoglobulinas pueden medirse de forma fiable durante al menos seis años almacenándolas a -20 °C (Dard et al., 2017). Normalmente se detectan las inmunoglobulinas IgG e IgM, para discernir la fase de la infección en la que se encuentra.

Existen numerosas técnicas serológicas utilizadas en porcino para la detección de *T. gondii*. El principal problema de la mayoría de estas técnicas es la obtención del antígeno necesario. Normalmente se obtiene a través de inoculaciones intraperitoneales en animales de experimentación o mediante la producción de taquizoitos utilizando cultivos celulares. Actualmente existe la posibilidad de comprar las preparaciones ya realizadas (EFSA, 2007; Al-Adhami et al., 2016).

El desarrollo de los primeros métodos diagnósticos para la detección de *T. gondii* comenzó en la década de los cuarenta. Sabin y Feldman (1948) presentaron el Dye test o prueba de azul de metileno, una técnica serológica que detecta anticuerpos específicos frente al parásito en animales y hombre. Posteriormente, gracias a los datos descubiertos en la época aparecieron otras metodologías diagnósticas como la hemoaglutinación descrita por Jacobs y Lunde (1957) o la detección de anticuerpos mediante fluorescencia desarrollada por Goldman (1957). A continuación, se describen las técnicas serológicas más utilizadas en la actualidad para la detección de *T. gondii* en animales vivos:

La técnica de **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)** se basa en depositar el suero problema sobre un portaobjetos en el que previamente se ha fijado el antígeno (taquizoitos de *T. gondii* inactivados). La prueba detecta si existen IgM o IgG en la muestra problema. Tras añadir el suero animal, se somete a una incubación para que se forme el complejo antígeno-anticuerpo y se añade un conjugado específico de la especie que está formado por la anti-inmunoglobulina unida a un fluorocromo. La reacción se lee con un microscopio de fluorescencia y será positiva si se observa

fluorescencia verde en toda la periferia de los taquizoitos. Este color verde se debe al isotiocianato de fluoresceína que está asociado a la anti-IgG, que al incidirle la luz ultravioleta lo excita y emite luz fluorescente. La reacción es negativa si los taquizoitos se observan rojos o sólo tienen fluorescencia en uno de los extremos (Cortés y Mancera, 2009).

Es una técnica ampliamente utilizada debido a su sensibilidad y especificidad (Minho et al., 2004; Bajwa et al., 2014). García et al. (2006b), consideran a la técnica IFI como la prueba de oro para detectar *T. gondii* en cerdo. Asimismo, se ha observado que esta técnica consigue una detección de anticuerpos más temprana en animales infectados por el parásito (Pardini et al., 2012). Sin embargo, hay autores que han indicado como inconvenientes la necesidad de utilizar un microscopio de fluorescencia para la visualización de los resultados, así como una posible subjetividad en la lectura de los mismos (Minho et al., 2004; Huerta et al., 2006; EFSA, 2007; Casartelli-Alves et al., 2014; Dard et al., 2016).

La técnica de **aglutinación modificada (MAT)** es una técnica que se basa en enfrentar taquizoitos enteros inactivados, que actúan como antígeno, con el suero problema. La presencia de IgG e IgM en el suero provoca la aglutinación con el antígeno formándose un halo en la superficie. Si no existen anticuerpos no se produce aglutinación, por lo que se forma un sedimento en el fondo en forma de botón (Dubey, 2010).

El procedimiento es sencillo de realizar y no necesita equipamiento específico ni reactivos para cada especie (Bajwa et al., 2014; Casartelli-Alves et al., 2014; Dubey, Laurin y Kwook, 2016). Sin embargo, el procedimiento es bastante largo y los resultados se obtienen de forma visual, por ello se le atribuye subjetividad en su interpretación (EFSA, 2007; Sroka et al., 2008).

La técnica de **hemaglutinación indirecta (HAI)** está basada en la utilización de eritrocitos marcados con taquizoitos de *T. gondii* que se ponen en contacto con el suero problema del animal. La presencia de IgG e IgM frente al parásito provoca la hemaglutinación. Las ventajas de esta técnica para el análisis de *T. gondii* en suero de cerdos son la rapidez en la obtención de resultados y una fácil ejecución e interpretación de resultados (Suárez et al., 2002). Sin embargo, Huerta et al. (2006) indicaron que es una técnica menos específica que el resto, ya que produce reacciones cruzadas con otros parásitos y no detecta los anticuerpos en las etapas tempranas de la infección.

El **ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA)** es una técnica muy utilizada para la detección de IgM e IgG frente a *T. gondii*. La unión entre antígeno y anticuerpo provoca una reacción colorimétrica gracias a la acción de una enzima y un sustrato que se unirán de forma secundaria al complejo antígeno-anticuerpo (Gamble, Dubey y Lambillotte, 2005; Hill et al., 2006b). Esta técnica proporciona una elevada sensibilidad, especificidad y repetibilidad. Según Hill et al. (2006b) y Basso et al. (2013) es la técnica serológica más sensible y específica para el análisis de *T. gondii* en sueros porcinos. Se puede automatizar, lo que permite analizar grandes cantidades de muestras a la vez, lo que podría ser útil para el análisis rutinario en granjas o mataderos (EFSA, 2007). Sin embargo, hay que tener en cuenta que necesita kits de reactivos específicos para cada especie y que para leer los resultados de las muestras se necesita de un lector de absorbancias automático (Casartelli-Alves et al., 2014; Guo et al., 2015a).

El **Western blot** es un método inmunoenzimático que detecta IgG, IgM o IgA presentes en el suero del animal. Esta técnica implica la separación por electroforesis de proteínas de *T. gondii* en geles de poliacrilamida, con transferencia irreversible a un soporte sólido sobre el que se realiza una reacción inmunoenzimática que posteriormente es revelada utilizando un sustrato y un cromógeno (Sharma et al., 1983; Galván-Ramírez y Mondragón, 2017). Se trata de una técnica semicuantitativa, con una buena sensibilidad y especificidad (Basso et al., 2013). Sohn y Nam, (1999) destacan la especificidad de la técnica por su buena unión a los antígenos de la superficie de la membrana, de los gránulos densos y de las roptrias. Este hecho hace que esta técnica sea muy útil para el estudio de la estructura antigénica del parásito (Sroka et al., 2016).

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios no siempre pueden ser directamente comparados entre sí debido a las diferencias en los procedimientos utilizados para la detección de anticuerpos, a las diferentes cepas de *T. gondii* utilizadas como antígeno, y a los diferentes puntos de corte (Aroussi et al., 2015; Felin, Näreaho y Fredriksson-Ahomaa, 2017). El título de corte es aquella titulación que permite discernir entre un resultado positivo de uno negativo. En la bibliografía científica existen diversos puntos de corte utilizados por los diferentes autores, que por ejemplo para la técnica IFI oscilan entre títulos 1:16 y 1:64 (Veronesi et al. 2010; Feitosa et al. 2014; Ferreira et al., 2014; Magalhães et al., 2017). Por ello el panel científico de peligros biológicos de la EFSA en su estudio para la vigilancia y seguimiento de *T. gondii*, ya concluyó que es necesaria una mayor caracterización de los métodos de diagnóstico e identificación del parásito

en alimentos y animales para poder contrastar los resultados obtenidos entre las diferentes técnicas diagnósticas (EFSA, 2007). Asimismo, años después añaden que sigue faltando la estandarización de las técnicas y de las pruebas, y que los antígenos utilizados en estas pruebas no han sido oficialmente validados, por lo que no pueden compararse todavía los resultados obtenidos por diferentes técnicas (EFSA, 2011; Opsteegh et al., 2016).

Se han realizado algunos estudios comparativos entre los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas serológicas para la detección de *T. gondii* en muestras porcinas. Trabajos como los de Cavalcante et al. (2006) y Sroka et al. (2008) indican que la técnica IFI fue el método que obtuvo la mejor especificidad en la detección del parásito comparándola con las técnicas MAT o ELISA. Además, se observó que la técnica IFI presentaba mayor sensibilidad y especificidad que la técnica HAI (Huerta et al., 2006).

De la misma forma, este tipo de estudios también han servido para comprobar la capacidad de detección temprana de anticuerpos frente a *T. gondii* en sueros porcinos que presenta cada técnica. La técnica que detecta en primer lugar la respuesta inmunológica es la IFI tras 7 días post-infección, seguido del ELISA a los 14 días y finalmente el MAT a los 21 días (García et al., 2006b).

5.2.- Detección en carne

La EFSA considera a *T. gondii* como uno de los riesgos biológicos más relevantes en el contexto de la inspección de la carne de cerdo (EFSA, 2011). Sin embargo, en la actual legislación de la Unión Europea no está establecido ningún criterio para su detección en matadero (Kapperud et al., 1996; Baril et al., 1999; Cook et al., 2000; Berger et al., 2009; Blagojevic y Antic, 2014; EFSA, 2017).

El análisis de *T. gondii* en muestras de carne se basa en la utilización de métodos que detectan el parásito en el órgano o tejido analizado. Diversos autores señalan que puede encontrarse un quiste de *T. gondii* por cada 50 a 100 g de carne de un animal infectado (Rahdar, Samarbaf-Zadeh y Arab, 2012; Guo et al., 2015b), aunque Dubey, (2009), afirma que incluso se podría llegar a encontrar un quiste por cada 25 gramos de carne.

Según un informe de la EFSA, los principales tejidos en los que se detecta el parásito son el cerebro y el corazón seguidos por la lengua y el diafragma. Asimismo, se señala que pueden

encontrarse en el tejido muscular esquelético de muchos animales, y debido a que son partes comestibles de los animales pueden conllevar un peligro de infección para las personas. Otros órganos internos como el hígado, los pulmones o los riñones también pueden contener quistes de *T. gondii* (Opsteegh et al., 2016). Sharma et al. (2019) indicaron que a pesar de que el cerebro es el mejor tejido para la detección del parásito optaron por el muestreo del corazón en su estudio, ya que es un tejido en el que se detecta igualmente una gran carga parasitaria y es un lugar de muestreo más práctico que el cerebro.

Debido a la baja proporción de quistes en los diferentes tejidos se requieren procedimientos de concentración de las muestras. Por ello, algunas técnicas empleadas para la determinación de los quistes tisulares pueden requerir de una digestión péptica de las muestras previa a su análisis. Este procedimiento tiene como objetivo simular las condiciones fisiológicas de digestión de la carne fresca que se producen en el organismo de un animal vivo, incubando la muestra durante 1 hora a 37 °C con una mezcla de ácido clorhídrico, pepsina y cloruro de sodio. Este proceso provoca la rotura de la pared de los quistes tisulares de *T. gondii* y la liberación de los bradizoitos de su interior. Los bradizoitos pueden sobrevivir unas 3 horas en el extracto de digestión, por lo que se tiene que utilizar la muestra para su análisis antes de este tiempo. Asimismo, otra de las aplicaciones que ofrece esta técnica es conseguir concentrar la muestra y poder analizar una mayor cantidad total de tejido (Dubey, 1998; Bayarri et al. 2010). La cantidad de tejido utilizada en la digestión péptica suele ser de 50 g (de Sousa et al., 2006; Galván-Ramírez et al., 2010; Wang et al., 2012b; Turčeková et al., 2013; Cademartori et al., 2014; Hamilton et al., 2015), aunque algunos autores utilizan otras cantidades como 40 g o 200 g (Bezerra et al., 2012; Genchi et al., 2017). Asimismo, Rani et al. (2019), realizaron la digestión péptica de muestras de 5, 10 y 50 g de los mismos tejidos. Tras la realización de los análisis mediante bioensayo en ratón observaron que había una mayor detección del parásito en las muestras de 50 g con respecto a las de 5 y 10 g.

Las técnicas más utilizadas para la detección de *T. gondii* en muestras de carne se describen a continuación.

El **bioensayo** es el método de referencia o prueba de oro para la detección de formas viables de *T. gondii* en tejidos (EFSA, 2007; Liu et al., 2015; Riaz et al., 2016; Burrells et al., 2018). Esta técnica tiene gran relevancia por su alta sensibilidad para la detección del parásito y porque permite

demostrar la viabilidad de *T. gondii* en la matriz analizada (Jacobs, Remington y Melton, 1960; Casartelli-Alves et al., 2014; Burrells et al., 2015).

En esta técnica se realiza la inoculación de las muestras problema, generalmente sometidas a una digestión péptica previa, en animales de experimentación como ratones o gatos. Aunque suele ser más común el uso de ratones para la realización de los bioensayos debido a su menor coste de mantenimiento (García et al., 2006; EFSA, 2007; Klun et al., 2011; Opsteegh et al., 2016). Además otras ventajas que presenta el uso de ratones es su alta tasa de reproducción, que existen diferentes tipos de animales knock-outs y que hay una gran cantidad de reactivos inmunológicos para esta especie (Nasaré y Tedesco, 2017).

En los bioensayos, la ruta de administración de la muestra influye en el efecto del parásito en los animales (Guo et al., 2016). Normalmente el inóculo digerido se suele administrar por vía subcutánea o intraperitoneal a los ratones. En el caso de los gatos se les suele ofrecer tejidos sin digerir por vía oral. Asimismo, el volumen administrado o el número de animales utilizados varía entre los diversos estudios realizados en ambas especies (Halos et al., 2010; Bezerra et al., 2012; Cademartori et al., 2014; Burrells et al., 2015; Guo et al., 2016). Independientemente de la especie, los bradizoitos son unas cien veces más infecciosos inoculados por vía subcutánea que por vía oral debido a la pérdida de infectividad del parásito tras su paso por el sistema digestivo (Dubey et al. 2006; Opsteegh et al., 2016).

La mayoría de los estudios, como los realizados por Bayarri et al. (2010), Gomez-Samblas et al. (2016) o Wang et al. (2016), utilizan la vía intraperitoneal o subcutánea para la administración de las muestras a los ratones tras una digestión péptica. Sin embargo autores como Abdulmawjood et al. (2014) eligieron administrar tejido infectivo por vía oral para la ejecución de su ensayo. El volumen utilizado en cada ensayo por los diferentes autores varía entre 0,3 ml y 1,5 ml por ratón dependiendo de la vía de administración (Wingstrand et al., 1997; Feitosa et al., 2014; Fernandes et al., 2015; Genchi et al., 2017).

Asimismo es importante tener en cuenta el número de animales utilizado en el bioensayo. Para decidir este número se deben contar con factores como el principio de las 3R's regulado por el Real Decreto 1386/2018 o el éxito de detección que se espere conseguir. En los diferentes estudios realizados se han empleado de 1 a 11 ratones (Galván-Ramírez et al., 2010; Burrells et al.,

2015; Gómez-Samblas et al., 2016; Genchi et al., 2017).

Una vez administradas las muestras a los animales, la presencia del parásito se puede comprobar detectando taquizoitos en el líquido peritoneal de los animales a los 3 - 4 días post-inoculación o realizando análisis serológicos para detectar la respuesta inmune (Jongert et al., 2008). La viabilidad de las muestras problema puede ser detectada de los 42 a 60 días post-inoculación, observando el parásito en órganos diana como el cerebro y el corazón, y en la musculatura estriada de los animales de experimentación mediante técnicas histológicas o de biología molecular (Cademartori et al., 2014; Ferreira et al., 2014; Guo et al., 2015a; Verma et al., 2017).

La **histología** es una técnica que se basa en la búsqueda al microscopio de *T. gondii* en secciones histológicas de tejidos, generalmente teñidas con hematoxilina-eosina (EFSA, 2007). El diagnóstico histológico detecta quistes del parásito a partir de líquidos orgánicos, frotis o muestras de tejidos obtenidos por biopsia. Sin embargo, normalmente la visualización es difícil aunque las muestras estén bien conservadas (da Silva et al., 2010; Fritz et al., 2012).

Casartelli-Alves et al., (2014) indicaron que la histología es una buena técnica para la detección de *T. gondii* debido a su elevada especificidad. No obstante, la mayoría de los autores indican en sus trabajos que no consiguen encontrar el parásito mediante la observación microscópica (Mendonça et al., 2004; García et al., 2006b; Sarkari et al., 2014; Genchi et al., 2017)

El **cultivo celular** para el aislamiento de *T. gondii* se realiza poniendo en contacto la muestra problema con cultivos celulares preparados previamente con líneas celulares como VERO, MARC-145 o HeLa (Evans et al., 1999; Değirmenci et al., 2011; Chew et al., 2012; Chen et al., 2013; Genchi et al., 2017). Si el parásito está presente en la muestra y es viable, infectará las células del cultivo produciéndose la multiplicación de los taquizoitos. Este fenómeno se podrá observar con un microscopio invertido a partir de los 3 a 10 días (Değirmenci et al., 2011; da Costa-Silva et al., 2012; Waap et al., 2012; Nau et al., 2017; Verma et al., 2017).

Algunos autores utilizan los cultivos celulares como técnica alternativa a los bioensayos en animales de experimentación, debido a cuestiones éticas y por el menor coste de las infraestructuras necesarias para su mantenimiento (Değirmenci et al., 2011; da Costa-Silva et al., 2012). Sin embargo, el procedimiento implica una perfecta conservación de las muestras ya que se pueden

contaminar fácilmente, y es menos sensible que el bioensayo para la detección de la viabilidad del parásito (Zintl et al., 2009). Asimismo, requiere equipamiento y material específicos como campanas de bioseguridad clase II, incubadoras de 37 °C con suministro de CO₂ y líneas celulares susceptibles de ser infectadas por el parásito (Warnekulasuriya, Johnson y Holliman, 1998; EFSA, 2007; Chatterton, McDonagh y Ho-Yen, 2010; Galván-Ramírez y Mondragón, 2017).

Las técnicas moleculares, como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se basan en la detección y amplificación in vitro de fragmentos del genoma del parásito en las matrices problema (Palmero y Carballés, 2010). Estas técnicas son muy específicas para la detección del parásito, y pueden realizarse en sangre y en diferentes tejidos como corazón, lengua, pernil, cerebro o líquido cefalorraquídeo (Yu et al., 2013; Abdulmawjood et al., 2014; Gotteland et al., 2014; Gomez-Sambas et al., 2015).

La **PCR convencional** o PCR en punto final, se basa en la amplificación in vitro de secuencias específicas del DNA de *T. gondii*. Para la detección de estos fragmentos se requiere la extracción de los ácidos nucleicos presentes en la muestra analizada, seguido de varios ciclos de amplificación de los mismos. La presencia del DNA específico del parásito en la muestra se visualizará al final de todo el proceso tras someter el extracto a una electroforesis en gel. Si la muestra contiene DNA se observará una banda específica en el gel (Mendonça et al., 2004).

Para llevar a cabo la reacción de amplificación es necesaria una enzima DNA polimerasa que incorporará bases nitrogenadas (dNTP's) complementarias a la cadena molde de DNA, así como fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios (cebadores) a los extremos del fragmento a amplificar (Luque y Herraéz, 2001).

La PCR se desarrolla en tres fases que se repiten durante varios ciclos (Meyer, Allan y Beaman, 2000; Luque y Herraéz, 2001; Méndez-Álvarez y Pérez-Rotha, 2004):

- **Desnaturalización:** en esta fase se calienta la muestra a 95 °C para que se abran las cadenas de DNA.
- **Hibridación:** los cebadores se alinean con su secuencia complementaria al extremo 3' de las cadenas de DNA. A continuación, se produce la unión de la enzima DNA polimerasa en la zona de la cadena dónde se ha alineado el cebador. La temperatura necesaria para la

fase de hibridación oscila entre 50-60 °C.

- **Extensión:** en esta fase la enzima DNA polimerasa empieza su función catalítica agregando dNTP's para crear nuevas cadenas complementarias de DNA. La temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima es de 72 °C.

Para una adecuada detección del DNA de *T. gondii* es muy importante la elección de los cebadores que se van a utilizar en la reacción. Es necesario que las secuencias que se amplifican detecten específicamente al parásito y no se produzcan hibridaciones inespecíficas entre los cebadores y el DNA de la muestra. Los cebadores más utilizados para la detección de *T. gondii* son los que amplifican una región de 529 pares de bases (pb) y que está repetido 200 - 300 veces en el genoma del parásito; el fragmento B1 que está repetido 35 veces; y los que detectan las proteínas de membrana como SAG y BAG que tienen una copia (Homan et al., 2000; Meyer, Allan y Beaman, 2000; Lyons, McLeod y Roberts, 2002; Veronesi et al., 2017).

Tras la amplificación del DNA, se debe comprobar la pureza y calidad del mismo. Se puede realizar mediante el uso de un espectrofotómetro, un equipo que mide la absorbancia a diferentes longitudes de onda, relacionando la longitud de onda de 260 nm que corresponde la máxima absorbancia del DNA y la longitud de onda 280 nm que mide la máxima absorbancia de las proteínas. El ratio óptimo (260/280) tiene que situarse entre 1,9 y 2. Si los valores están fuera de ese rango indica que la extracción no ha sido correcta.

La **PCR en tiempo real cuantitativa** (qPCR) es una variante de la PCR convencional, que ofrece la posibilidad de cuantificar la concentración de DNA del parásito en la muestra analizada. Asimismo, muestra otras ventajas como una mayor sensibilidad, precisión y rapidez en la detección (Bajwa et al., 2014). Además, no necesita la manipulación de las muestras una vez amplificadas ni la utilización de geles (Edwards, Logan y Saunders, 2004).

La amplificación y cuantificación del DNA del parásito se realiza en un equipo llamado termociclador, que permite monitorizar en cada ciclo la aparición del ADN producido en la reacción mediante el uso de fluoróforos y nos indica la cantidad del patógeno que hay en la muestra analizada (Slany et al., 2016). Los fluoróforos liberan fluorescencia cada vez que se realiza una copia de DNA, que será proporcional a la cantidad de ADN generado. Los fluoróforos más utilizados para la de-

tección del parásito son SYBR Green y las sondas Taqman (Flori et al., 2002; Bellete et al., 2003; Edwards, Logan y Saunders, 2004; Contini et al., 2005; Ram et al., 2009; Aigner et al., 2010; Yu et al., 2013; Abdulmawjood et al., 2014; Travaillé et al., 2016). Las sondas Taqman presentan gran especificidad pero tienen baja sensibilidad y en algunas ocasiones no son capaces de detectar concentraciones de DNA bajas (Lemmon y Gardner, 2008). Por otro lado, el fluoróforo SYBR Green que presenta una mayor sensibilidad pero tiene una gran probabilidad de unirse inespecíficamente (Edwards, Logan y Saunders, 2004).

La amplificación del DNA se puede observar simultáneamente a la realización de la reacción a través del gráfico de amplificación en el software del termociclador (Figura 15). Este gráfico muestra la fluorescencia leída en el cada ciclo, estableciendo un valor de fluorescencia umbral que se representa con una recta horizontal (línea umbral). El punto de intersección de la curva de amplificación de una muestra con la recta umbral de fluorescencia se denomina Ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés). Cuantas más copias de las secuencias específicas del parásito tenga el DNA de la muestra antes se alcanzará este valor Ct, ya que será necesario un menor número de ciclos de replicación. Si se diera una eficacia del 100 % en la reacción, una muestra y su dilución 1/10 estaría separadas por 3,321 Ct.

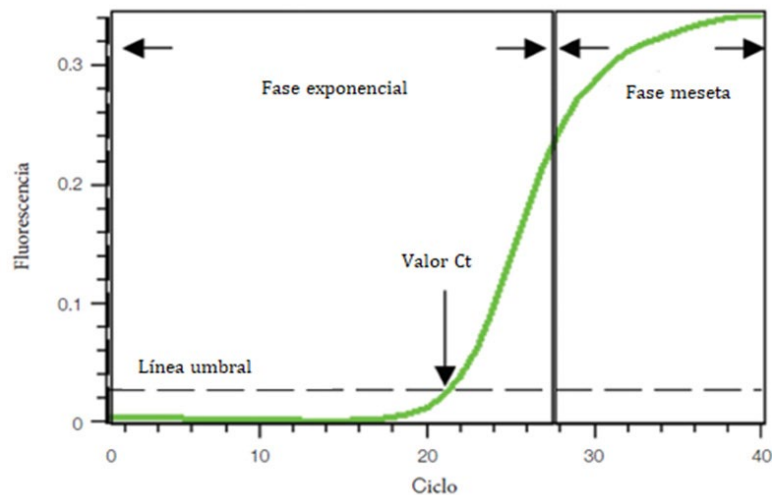


Figura 15: Esquema del gráfico de amplificación mostrado por el software de un termociclador (adaptado de <http://www.bio-rad.com/>).

La especificidad en la detección del DNA se confirma con la temperatura de disociación del producto final de amplificación. Para ello, se utiliza una curva de disociación al final del protocolo de reacción aumentando la temperatura progresivamente desde 60 °C a 95 °C en intervalos de 0,5 °C. La lectura de la fluorescencia durante este proceso permite analizar la temperatura de diso-

ciación (T_m) de los fragmentos de DNA en función de su tamaño y del contenido en nucleótidos citosina (C) y guanina (G). Este valor se observa en la gráfica de disociación, en la que se observarán tantos picos como productos se han producido en la reacción (Figura 16).

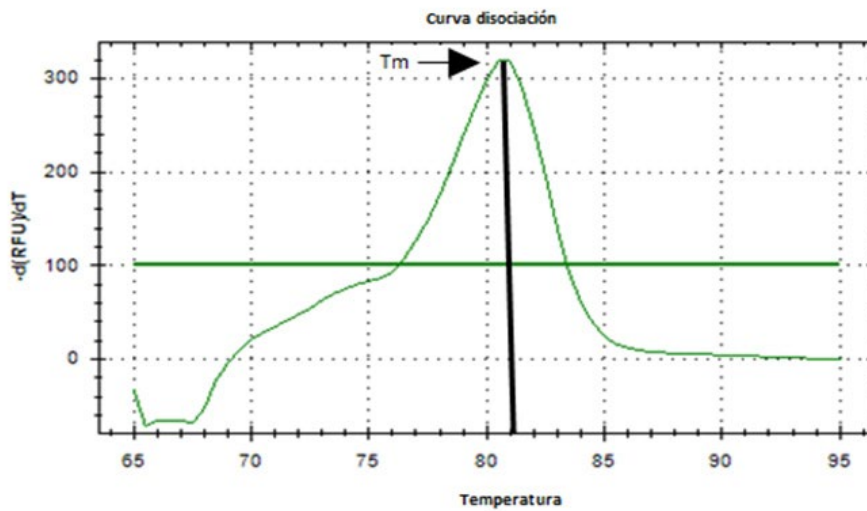


Figura 16: Representación de la gráfica de amplificación mostrada por el software de un termociclador.

En la mayoría de los estudios realizados por qPCR de *T. gondii* de tejidos porcinos no se indican los valores de Ct que se han obtenido en el análisis mostrando sólo si son positivos o negativos (Tsutsui et al., 2007; Berger-Schoch et al., 2011; Genchi et al., 2017; Hou et al., 2018). Sin embargo, en algunos estudios de tejidos porcinos infectados experimentalmente se señalaron valores de qPCR (Ct) de 26,14 a 38,51 en órganos diana y de 36,79 a 42,03 en pernil (Juránková et al., 2014). Asimismo, Algaba et al., (2018) encontraron valores de Ct entre 31,85 y 39,86 en muestras de cerdos también procedentes de infección experimental.

La principal desventaja de la técnica de qPCR es que sólo permite determinar la presencia del parásito por la detección del DNA del parásito, pero no se puede confirmar directamente la viabilidad de *T. gondii* en la muestra (Palmero y Carballés, 2010; Opsteegh et al., 2016). Por ello, en los últimos años algunos autores están poniendo a punto el análisis del RNA de *T. gondii* mediante Reverse Transcription-PCR (RT-PCR). Esta técnica utiliza una enzima transcriptasa inversa para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de las moléculas de RNA presentes en la muestra. Sin embargo, esta técnica presenta grandes inconvenientes como baja sensibilidad del método debido a la rápida degradación que sufre el ARN y a su rápida contaminación o a la dificultad de detectar quistes tisulares ya que necesita que el parásito este activo metabólicamente en el momento del análisis (Villegas et al., 2010; Travallé et al., 2016).

La infección con *T. gondii* el parásito estimula la respuesta inmune del cerdo, lo que podría inducir que el parásito se enquistara para sobrevivir. Por ello, se podría producir la presencia simultánea de anticuerpos frente al parásito y de quistes tisulares en el mismo cerdo. Estudios como los de la EFSA (2007), Dubey (2009) y de Opsteegh et al. (2016), corroboran estos hallazgos e indican que se podrían usar análisis de los sueros porcinos para obtener una aproximación de la presencia de quistes de *T. gondii* en los tejidos de los animales seropositivos. La detección de anticuerpos normalmente se realiza más rápido y se puede realizar en animales vivos, por lo que podría servir como indicador del estado de la carne de los animales (EFSA, 2007; Opsteegh et al., 2016). Algunos autores han relacionado la presencia y viabilidad del parásito en carne con el título serológico del animal del que procedían, llegando a concluir que el nivel de aislamiento aumenta con el título serológico del cerdo (Dubey, Thulliez y Powell, 1995b, Dubey et al., 2002; Dubey y Jones, 2008; Opsteegh et al., 2016; Gazzonis et al., 2018).

Sin embargo, no todos los estudios realizados coinciden con estos resultados. Se ha observado que en algunos casos el parásito se puede eliminar de los tejidos aunque sigan existiendo anticuerpos, que en animales seropositivos no se pueden aislar o que se detecta en animales seronegativos (Hejlíček y Literák, 1994; Omata et al., 1994; Gajadhar et al., 1998; de Sousa et al., 2006). Por ejemplo, Verhelst et al. (2011), realizaron una infección experimental en cerdos de engorde, no pudiéndose observar el parásito en los músculos gastrocnemio y longissimus dorsi en dos tercios de los animales a los 6 meses del estudio. Asimismo, tampoco se conocen las cargas parasitarias necesarias para que se produzca la seroconversión o para que los parásitos produzcan los quistes tisulares (Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005).

Existe la necesidad de obtener mayor información sobre esta relación. La obtención de datos más concluyentes nos ofrecería la oportunidad de detectar anticuerpos frente al parásito en vida. Esto nos permitiría poder destinar las canales a la elaboración de diferentes productos dependiendo de la presencia o ausencia de *T. gondii*.

III. MATERIAL Y MÉTODOS



La parte experimental de esta Tesis Doctoral comprende el estudio de *T. gondii* en el proceso integral de elaboración del jamón curado, desde la producción primaria hasta la industria de elaboración del producto final (Figura 17).

Se ha determinado la seroprevalencia de *T. gondii* en granjas de porcino de la Comunidad Autónoma de Aragón, y se han estudiado los factores de riesgo a través de encuestas epidemiológicas y visitas a las instalaciones, relacionando éstos con los resultados de seroprevalencia obtenidos. Asimismo, se han seleccionado cerdos con diferentes títulos serológicos, se han sacrificado y de cada animal se han tomado como muestras ambos perniles, y la lengua y el corazón (órganos diana). Uno de los perniles y los órganos diana de cada cerdo se ha analizado mediante bioensayo en ratón para estudiar la presencia y viabilidad de *T. gondii* en tejidos frescos. Los resultados obtenidos se han relacionado con los títulos serológicos porcinos y se ha hecho un estudio comparativo entre ambos tejidos (pernil vs. órganos diana).

Con la finalidad de conocer la influencia del proceso de curado, cada pernil homólogo se ha sometido a curación y se ha determinado la viabilidad de *T. gondii* en el jamón curado mediante bioensayo en ratón. Asimismo, se ha analizado la composición físicoquímica del producto final mediante el análisis del pH, NaCl, a_w , nitratos, nitritos, humedad y grasa, y se ha relacionado con los resultados obtenidos de viabilidad en jamón curado.

Con todos estos datos, se ha pretendido contribuir a la evaluación del riesgo de *Toxoplasma gondii* en las distintas etapas del proceso de elaboración del jamón curado (producción primaria, matadero y secadero) y se han propuesto herramientas para su control y gestión.

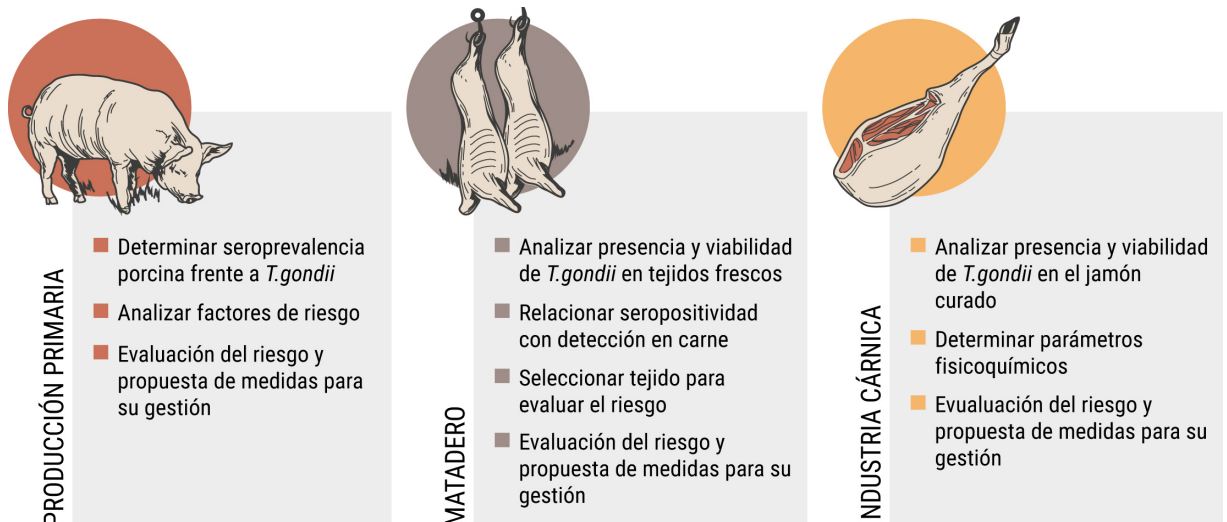


Figura 17: Diseño experimental del estudio de *T. gondii*.

1- Estudio de *Toxoplasma gondii* en producción primaria

1.1- Estudio de la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en el ganado porcino

1.1.1- Muestreo de granjas y cerdos

El estudio se realizó en 161 granjas de la Comunidad Autónoma de Aragón con un censo total de 313.787 animales pertenecientes a una empresa cárnica aragonesa. Las instalaciones tenían una media de 2.000 cerdos por granja, con un mínimo de 325 hasta un máximo de 6.000 animales. Todos los cerdos procedían del cruce genético entre hembras de raza Landrace con machos de raza Pietrain.

Las granjas estaban localizadas en las tres provincias de la Comunidad Autónoma de Aragón. En Huesca se estudiaron 83 granjas localizadas en 34 municipios, con un censo total de 183.157 cerdos. En Zaragoza, 62 granjas situadas en 23 municipios con un censo de 113.588 animales. Por último, en Teruel, 16 instalaciones ubicadas en 5 localidades con un censo de 17.042 cerdos.



Figura 18: Granjas porcinas en las que se tomaron muestras de sangre.

Empleando el programa estadístico WinEpi 2.0 (<http://www.winepi.net/winepi2/>) se estableció el porcentaje de granjas que podían presentar algún animal positivo estimando un nivel de confianza del 95 %, un error absoluto aceptado del 10 % y una proporción esperada del 50 % (al ser un

dato desconocido) (Vallejo et al., 2013). Se determinó que había que tomar muestras de sangre de 60 explotaciones sobre el total de las instalaciones (Figura 18).

Asimismo, utilizando el mismo programa estadístico, asumiendo un nivel de confianza del 95 %, un error del 5 % y una prevalencia mínima esperada del 16 %, se estableció el muestreo de 20 animales (50 % hembras y 50 % machos) en cada una de las 60 explotaciones, lo que supone un total de 1.200 animales. El dato de la prevalencia mínima esperada de *T. gondii* se obtuvo de estudios previos realizados en España (García-Bocanegra et al., 2010a).

El estudio se realizó en animales de 4 - 5 meses de edad, evitando de esta forma la posible presencia de anticuerpos maternos frente a *T. gondii*.

Para cada granja donde se realizó la toma de sangre se rellenó un cuestionario en el que se recogían los datos de la granja, fecha de la toma de las muestras, tipo de animal, número de muestras recogidas, edad de los animales y su procedencia (Figura 19). Asimismo, con el fin de mantener una adecuada trazabilidad, los cerdos sangrados en cada granja se marcaron con un crotal identificativo.

Proyecto INNPACTO IPT-2012-0189-060000

TOMA DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS SEROLÓGICO

Nombre y código de la granja: _____

Fecha de toma de muestras: _____

Nº muestras recogidas: Reproductoras/Madres _____ Transición _____ Engorde _____

Edad de los animales en el momento del sangrado: _____

Granja de procedencia de los lechones: _____

Observaciones: _____

Figura 19: Cuestionario de toma de muestras de sangre en las granjas.

Se recogieron aproximadamente 3 ml de sangre de cada cerdo mediante punción en la vena yugular, depositándola en tubos estériles Vacutainer® de 5 ml sin anticoagulante. Los tubos de sangre se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Universal 32 R, Hettich). Se trasvasó

el suero a viales Eppendorf de 1,5 ml y se descartó el resto de componentes de la sangre. Los sueros se identificaron con el código numérico de la instalación seguido de un número de orden del 1 al 20 correspondiente a cada cerdo. Posteriormente, se conservaron en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

1.1.2- Análisis serológico

El análisis de los sueros porcinos se realizó mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Figura 20). Esta técnica de análisis se basa en depositar el suero problema sobre los pocillos de un portaobjetos que contiene taquizoitos previamente fijados. En el caso de que las muestras sean positivas, las inmunoglobulinas G (IgG) presentes en los sueros porcinos se unirán al antígeno y se revelarán mediante anti-IgGs marcadas con isotiocianato de fluoresceína.

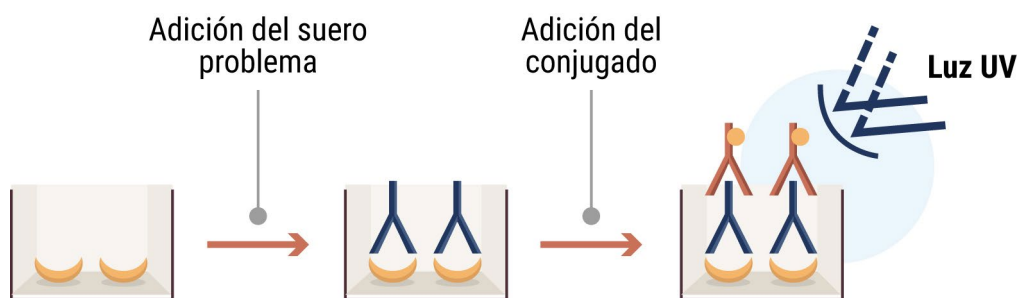


Figura 20: Procedimiento de análisis mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

1.1.2.1- Optimización de la técnica IFI: elección de la anti-inmunoglobulina

Se evaluaron dos anti-IgGs de dos casas comerciales: AbD serotec y VMRD. El objetivo fue elegir aquella que permitiera una visualización más nítida de los resultados, que tuviera un manejo más sencillo y que proporcionara resultados fiables.

En la puesta a punto se utilizó un suero porcino positivo con un título de 1:3.200 mediante MAT, cedido por el Dr. J. P. Dubey (United States Department of Agriculture) y la Dra. Sonia Almería (Universidad Autónoma de Barcelona). Asimismo, se emplearon controles negativos con un título $<1:20$ mediante IFI, disponibles de un proyecto anterior financiado por la Universidad de Zaragoza (UZ2006-CIE-04). De cada suero control se prepararon diluciones seriadas y se analizaron utilizando ambos preparados de anti-IgG siguiendo las especificaciones de cada casa comercial.

En el caso de la anti-IgG de la casa comercial AbD serotec, el fabricante sugería realizar diluciones entre 1:100 y 1:1.000 antes de la realización de la técnica IFI. Por ello se elaboraron las diluciones 1:100, 1:200, 1:500 y 1:1.000 de la anti-IgG en PBS a las que se añadió azul de Evans (bioMérieux) al 0,2 %. El azul de Evans es un reactivo que ayuda al diagnóstico, ya que favorece el visionado en rojo de los taquizoitos fijados de las muestras negativas en el microscopio de fluorescencia. La anti-IgG de la casa comercial VMRD no requiere de diluciones y puede ser utilizada directamente.

Con los dos tipos de anti-IgG se obtuvo el mismo título para el control positivo (1:2.560). En el análisis de los controles negativos con la anti-IgG de VMRD todos los controles negativos obtuvieron titulaciones de <1:20, mientras que la anti-IgG de AbD serotec reveló una mayor variabilidad en la respuesta.

Por consiguiente, para realizar los análisis de los sueros porcinos de este trabajo se escogió la anti-IgG de la casa comercial VMRD. Además, el tiempo de realización de esta técnica con este reactivo es menor, no es necesario realizar diluciones del conjugado, ni utilizar el reactivo azul de Evans, y pudimos comprobar que discrimina mejor las muestras al presentar una mayor nitidez.

Tras la elección de la anti-IgG de VMRD se procedió a reafirmar el punto de corte utilizado, determinando hasta qué dilución los sueros negativos no presentaban fluorescencia por posibles interferencias con los reactivos. Finalmente, se confirmó el punto de corte en 1:20, de manera que las muestras que presentaron fluorescencia en la dilución 1:20 o en diluciones superiores se consideraron positivas, mientras que las preparaciones que no presentaban fluorescencia en diluciones <1:20 se catalogaron como negativas frente a *T. gondii*.

1.1.2.2- Protocolo de análisis

Una vez optimizada la técnica IFI, se procedió al análisis de los sueros porcinos. Para ello se siguió el protocolo que se describe a continuación (Figura 21).

- Preparación de las diluciones de los sueros con el buffer de dilución con un 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) (VMRD).
- Distribución de 10 µl de cada una de las diluciones en cada pocillo de los portaobjetos previamente fijados con taquizoitos inactivados (Toxo-Spot®, bioMérieux).

- Incubación durante 30 minutos de los portaobjetos dentro de una cámara húmeda en oscuridad en una estufa Memmert a 37 °C.
- Lavado de los portaobjetos sumergiéndolos en una cubeta Coplin con FA Rinse Buffer a pH 9,0 (VMRD) en agitación (Agimatic-N, Selecta) durante 10 minutos. Tras desechar el tampón de la cubeta, realización de otro lavado idéntico al anterior.
- Adición de 10 µl de la anti-IgG porcina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (VMRD) sobre cada uno de los pocillos e incubación de nuevo a 37 °C durante 30 minutos.
- Lavado de los portaobjetos de la misma forma a la descrita en el lavado previo pero cubriendo la cubeta para impedir que la luz dañe el fluorocromo que lleva asociado la anti-IgG. Al finalizar, realización de un último lavado de 10 minutos con agua destilada con las mismas condiciones.
- Reparto de unas gotas del medio de montaje FA Mounting Fluid (VMRD) en los portaobjetos para la colocación de los cubreobjetos de 24 x 50 mm (Deltalab).
- Observación de las muestras en un microscopio de fluorescencia Eclipse 80i (NIKON) con un objetivo de 40x aplicando luz ultravioleta.

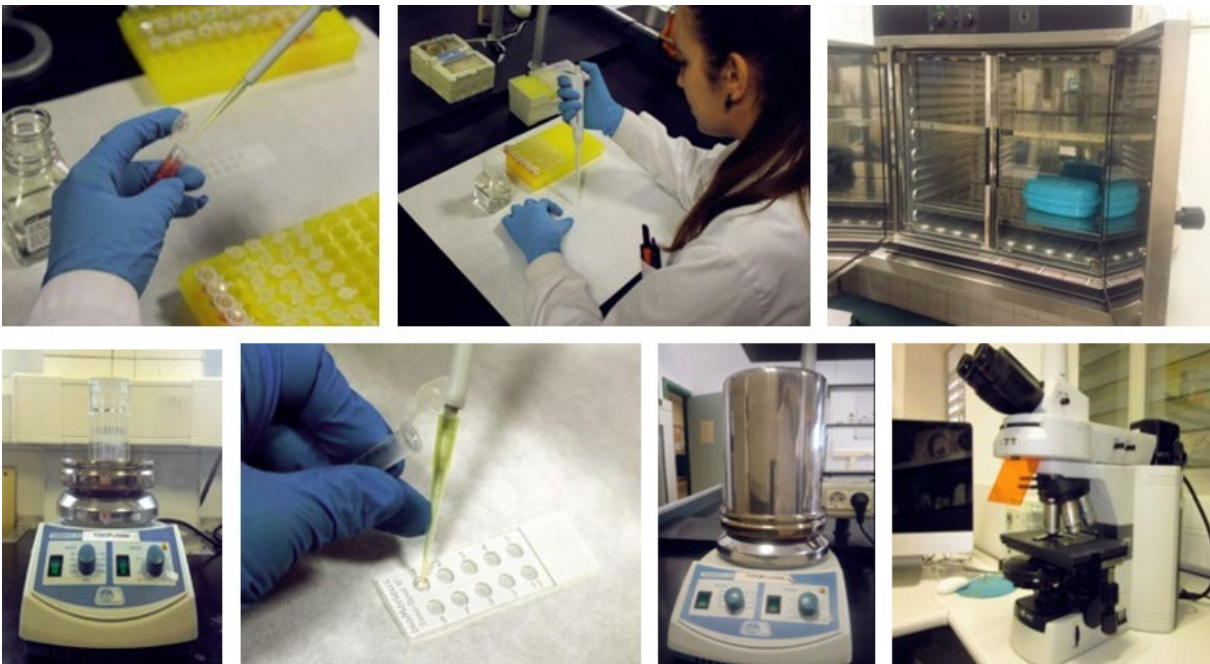


Figura 21: Protocolo de análisis serológico mediante la técnica IFI.

Se considera que una muestra es positiva cuando se observa fluorescencia verde a lo largo de toda la membrana de al menos el 80 % de los taquizoitos fijados en la superficie del pocillo del portaobjetos. Si los taquizoitos aparecen sin fluorescencia o solo con fluorescencia verde en parte de la periferia, el resultado es negativo (Figura 22).

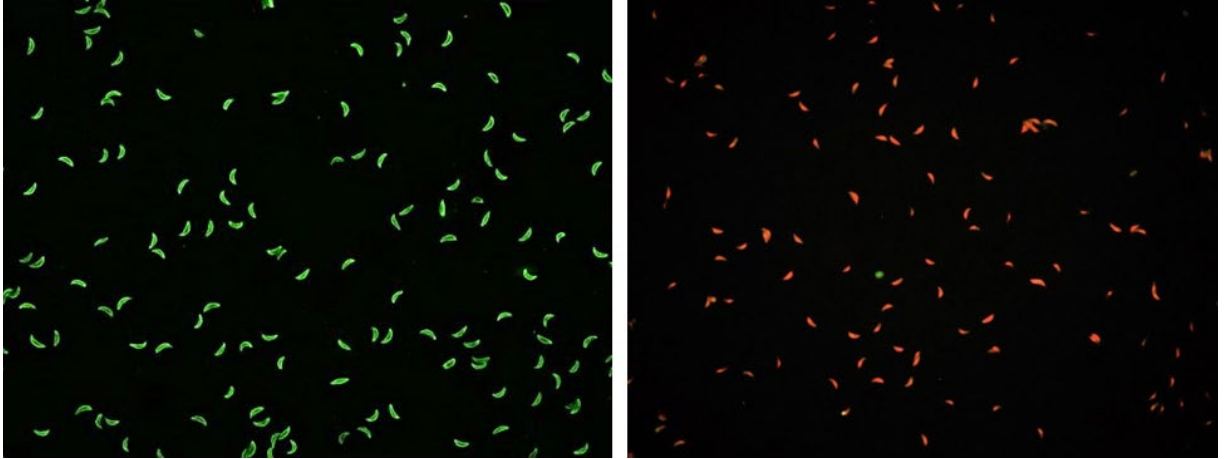


Figura 22: Resultados de la técnica IFI: resultado positivo (izquierda) y resultado negativo (derecha).

1.2- Estudio de factores de riesgo en granjas

1.2.1- Recogida de datos en granjas

Con el objetivo de determinar los factores de riesgo existentes en las granjas porcinas que pueden favorecer la infección por *T. gondii*, se realizaron encuestas epidemiológicas en las 161 instalaciones objeto de estudio. Las preguntas fueron contestadas por los granjeros o por el veterinario responsable de cada granja. Asimismo, se realizaron visitas a las explotaciones para comprobar el estado de las instalaciones.

En la Figura 23 se presenta el modelo de encuesta realizada, en la que se incluye la información general de la granja, los parámetros de producción, las características de las instalaciones y las medidas higiénicas y de bioseguridad utilizadas en ellas.

Proyecto INNPACTO IPT-2012-0189-060000

RECOGIDA DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DE FACTORES DE RIESGO

Nombre granja: _____

Localización _____

Distancia con la granja más cercana y nombre de la misma: _____

Sistema de producción:

- Ciclo cerrado
 Todo dentro-Todo fuera (TDTF)
 Producción continua

Número de plazas: Reproductoras/Madres _____ Transición _____ Engorde _____

Posibilidad de salir al exterior: Reproductoras/madres Transición Engorde

Tipo de suelo: Todo rejilla Enrejillado parcial

Existencia de casos de canibalismo en la granja: Sí No

Problemas sanitarios en madres observados en el último año (abortos, mortalidad perinatal): _____

Condiciones higiénicas de la granja:

- Conservación/mantenimiento de las naves, comederos, bebederos:

Bien Mal Regular

- Orden (referido a la presencia en las naves de utensilios, chatarra, sacos de hormigón, etc):

Bien Mal (especificar) _____

- Uso exclusivo de ropa y botas para la granja: Sí No

- Plan de Limpieza y Desinfección de instalaciones:

Uso de jabón: Sí No

Uso de agua caliente: Sí No

Desinfectante utilizado y frecuencia: _____

Días de secado de la nave: _____

- Presencia de maleza o vegetación en el perímetro de la explotación: Sí No

Figura 23: Encuesta epidemiológica realizada en las 161 granjas del estudio.



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza

Presencia de animales en la granja:

Alrededor de la granja:

Gatos Roedores Pájaros Otros (especificar) _____

Dentro de las naves:

Gatos Roedores Pájaros Otros (especificar) _____

Control de roedores:

Empresa externa: _____

De la propia granja: Cebos Trampas Gatos Otros sistemas Ninguno

Protecciones en las ventanas en buen estado (íntegras, sin roturas) para evitar la entrada de pájaros e insectos:

Sí No

Sistemas de control de mantenimiento de temperatura constante en la granja: Sí No

Temperatura aproximada en invierno _____

Temperatura aproximada en verano _____

Administración del pienso: Seco Húmedo

Origen de agua:

Red de distribución pública Pozo

De río, acequia (especificar origen) _____

Tratamiento del agua:

Sí Cloro líquido Cloro pastillas Peróxidos Otros (especificar)

No

Observaciones: _____

Figura 23: Encuesta epidemiológica realizada en las 161 granjas del estudio (continuación).

1.2.2- Procesamiento de los datos

Una vez cumplimentadas todas las encuestas, se creó una base de datos utilizando el programa informático Microsoft Office Access. Se diseñaron tres tipos de formularios para introducir todos los datos referentes a las granjas y a las muestras de sueros porcinos analizados en cada una de ellas. Se creó un primer formulario (Granjas) dónde se recogían todos los parámetros de los factores de riesgo estudiados en las 161 granjas (Figura 24).

Figura 24: Formulario para introducir los datos epidemiológicos de las instalaciones.

Un segundo formulario (Muestreo) para recoger los datos de las tomas de muestras de sangre de las granjas (Figura 25). El campo “Granja” de este formulario estaba conectado con el campo “Nombre de la granja” del primer formulario.

Figura 25: Formulario para introducir los datos referentes a cada toma de muestras.

Un tercer formulario (Muestra) para recoger los datos de cada una de las muestras analizadas (Figura 26). Cada muestra fue identificada con el código individualizado de cada animal para garantizar la trazabilidad a lo largo de todo el estudio. El campo “Muestreo” se conectó con los

datos introducidos en los campos “Nombre de la granja” y “Fecha del muestreo” de los dos formularios anteriores.

The image shows a web form titled "Muestra" with a blue header. In the top right corner of the header, there is an "ID" field with the text "(Nuevo)" next to it. Below the header, the form contains several input fields and dropdown menus:

- "Código de la muestra": A text input field.
- "Muestreo": A dropdown menu.
- "Tipo de muestra": A dropdown menu.
- "Sexo": A dropdown menu.
- "Fecha de análisis IFI": A text input field.
- "Resultado análisis IFI": A dropdown menu.

Figura 26: Formulario para introducir los datos de cada muestra de sangre.

1.3- Análisis estadístico

La prevalencia porcina frente a *T. gondii* se calculó a partir del número de resultados positivos con respecto al número total de cerdos examinados en cada una de las granjas. Posteriormente, para determinar la prevalencia global, los resultados de prevalencia individuales de cada instalación se ponderaron con los datos de los censos de cada una de ellas. Estos cálculos se realizaron utilizando el programa informático Microsoft Office Excel, y los límites inferior y superior se calcularon con un Intervalo de Confianza (IC) mediante el método de Score de Wilson (Wilson, 1927).

Las condiciones de las granjas y los resultados serológicos de los animales se analizaron estadísticamente mediante el programa informático IBM SPSS 19.0 para Windows, lo que nos permitió evaluar los factores de riesgo asociados con *T. gondii* en producción primaria.

Para determinar si las características de las granjas eran dependientes o independientes de la seropositividad de los animales de las granjas se comprobó si existía asociación entre las dos variables. Estas relaciones de dependencia se analizaron mediante los estadísticos de contraste Chi-cuadrado (X^2) y Razón de Verosimilitud (cuando la prueba de Chi-cuadrado no fue válida al observarse más de un 20 % de frecuencias esperadas inferiores a 5). Estos métodos estadísticos permitieron contrastar la hipótesis nula (H_0) que presupone que las dos variables que se estudian son independientes, comparando las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas. Ambos estadísticos se distribuyen e interpretan igual, por lo que se pueden aplicar los dos ya que se llega a la misma conclusión.

Para determinar la asociación entre una variable cuantitativa y una cualitativa dicotómica se procedió en primer lugar a determinar la normalidad de la variable cuantitativa usando las pruebas de Kolmogorvo-Smirnov o la prueba de Shapiro-Wilk (cuando el tamaño de muestra era inferior a 15). En el caso de que la variable siguiera una distribución normal se compararon las medias utilizando la prueba T de Student para muestras independientes, y cuando la hipótesis de normalidad fue rechazada, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney como alternativa no paramétrica.

En todos los análisis se asumió un error α con valor igual a 0,05, de forma que si el valor de p era menor que 0,05 se consideró que la hipótesis nula (H_0) no podía aceptarse, y por lo tanto se pudo decir que las variables analizadas eran dependientes entre ellas. En el caso que el valor de p fuera igual o superior a 0,05 la H_0 no se pudo rechazar, por lo que se asumió que las variables eran independientes y por lo tanto ese factor estudiado no aumentaba el riesgo de contacto con *T. gondii*.

2- Estudio de *Toxoplasma gondii* en tejidos frescos

2.1- Selección de cerdos y toma de muestras

Para la realización de este estudio se utilizaron animales de distintas titulaciones serológicas. Inicialmente la selección se realizó entre los 1.200 cerdos analizados en el estudio de seroprevalencia. Asimismo, y con el fin de conseguir un mayor número de animales con títulos altos, se analizaron 150 cerdos adicionales procedentes de las granjas en las que previamente se habían encontrado los títulos más elevados.

Así, el estudio se realizó en un total de 41 cerdos, de los cuales 3 tenían un título <1:20 (controles negativos), 5 con título 1:20, 9 de 1:40, 16 de 1:80 y 8 animales con una titulación de 1:160.

Los cerdos se sacrificaron en el matadero de la empresa cárnica con 6 - 7 meses de edad. Previamente, se les realizó un nuevo análisis serológico mediante IFI para confirmar la titulación. De cada cerdo se tomaron como muestras ambos perniles y dos órganos diana: el corazón y la lengua (Figura 27).

El día 0, se analizó uno de los perniles y los órganos diana de cada cerdo. Los perniles homólogos de cada animal, perfectamente identificados, se destinaron a curación para proceder a su análisis al final del proceso tecnológico (punto 3).

Una vez realizado el despiece y deshuesado de los perniles en el matadero, la preparación de las muestras se realizó en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Tras la eliminación de la piel y la grasa superficial, se trocearon los perniles y se picaron empleando una capoladora eléctrica, se homogeneizaron completamente y se envasaron al vacío (Figura 27).

En la preparación de los órganos diana se siguió el mismo procedimiento que para los perniles, envasándose al vacío por separado la lengua y el corazón. Previo a su análisis, las muestras de corazón y lengua se mezclaron a partes iguales.



Figura 27: Selección de animales, toma de muestras y preparación de los tejidos frescos.

2.2- Análisis de *Toxoplasma gondii* en tejidos frescos

Con el fin de determinar la presencia y viabilidad de *T. gondii* en tejidos frescos, los perniles y los órganos diana se sometieron previamente y por separado, a una digestión péptica.

Parte del extracto de digestión se analizó mediante bioensayo en ratón. La serología positiva en los ratones frente a *T. gondii* demostró la presencia del parásito en las muestras. Los cerebros de los ratones seropositivos se analizaron mediante qPCR. La detección del DNA de parásito en este órgano indicó viabilidad de *T. gondii* en las muestras analizadas.

El resto del extracto de digestión se analizó directamente mediante qPCR para determinar la

presencia del parásito en las muestras y completar los resultados obtenidos mediante bioensayo en ratón.

En la Figura 28 se muestra el esquema del procedimiento que se siguió para el análisis de *T. gondii* en los tejidos frescos porcinos.

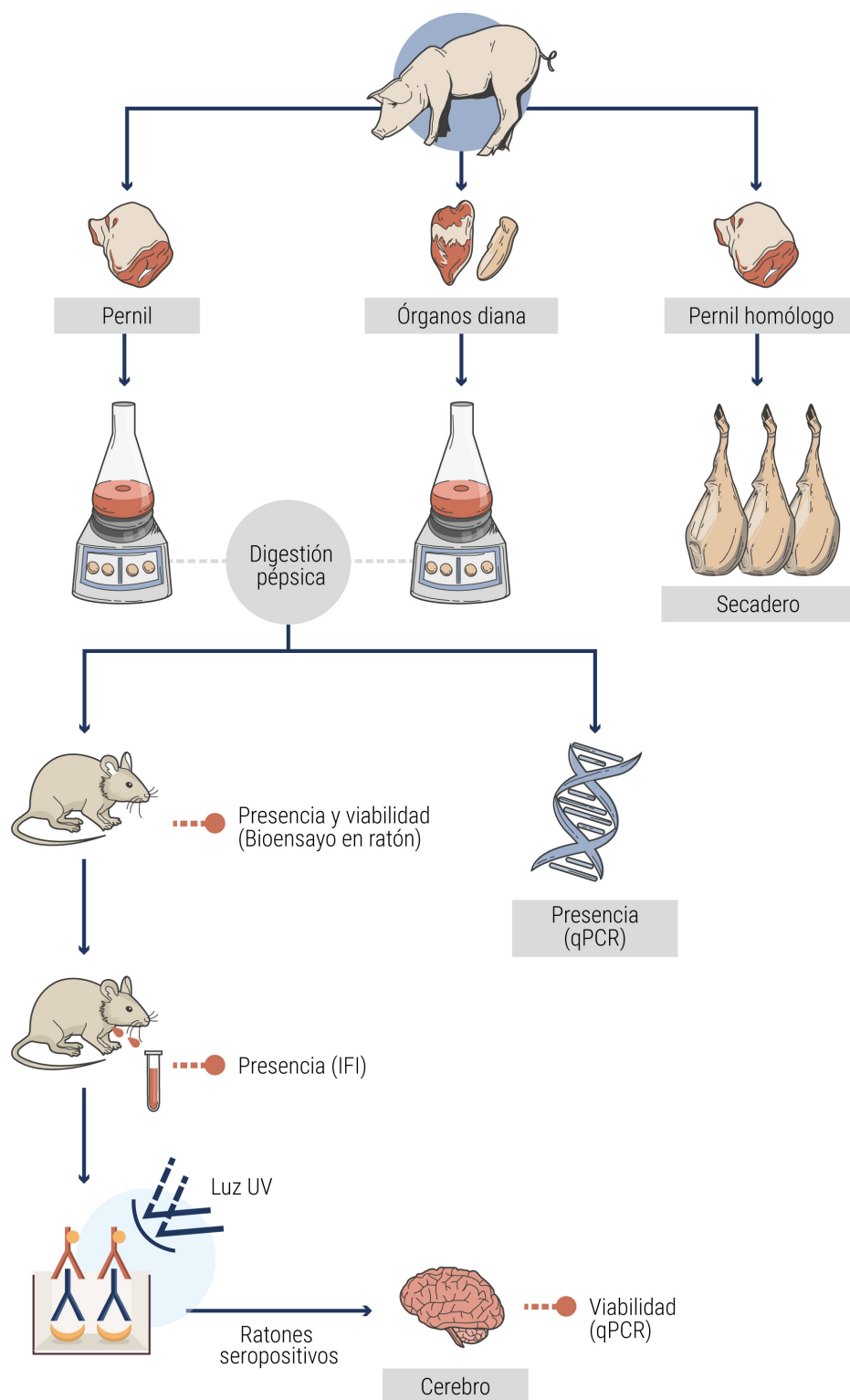


Figura 28: Procedimiento de análisis de *T. gondii* en tejidos frescos porcinos ©2019 Laura Herrero.

2.2.1- Digestión péptica

La digestión péptica de los tejidos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Dubey (1998) y modificado por Bayarri et al. (2010), que se describe a continuación (Figura 29):

- Pesado de 50 g de tejido (pernil u órganos diana) en un vaso de precipitados de 600 ml.
- Adición de 125 ml de solución salina al 0,85 % (Panreac) y homogeneización de la mezcla con una batidora durante 30 segundos.
- Lavado con 125 ml de la solución salina (Panreac) y transvase a un matraz Erlenmeyer de 1.000 ml.
- Adición de 250 ml de una solución péptica atemperada a 37 °C (pH ≈ 1), preparada con 5,2 g de pepsina con actividad 1:10.000 (Panreac), 10 g de cloruro sódico (Panreac), 14 ml de ácido clorhídrico al 25 % (Panreac) y agua destilada hasta completar los 1.000 ml.

El pH óptimo para la activación de la pepsina debe ser ≤ 2 , ya que a partir de un pH >3 pierde su efecto proteolítico. Por ese motivo, una vez mezcladas las muestras con la solución péptica, se controló el pH de la solución final para comprobar que estuviera en el rango de pH correcto. En el caso de que el pH no fuera el adecuado se corrigió con una solución de HCl o NaOH (Panreac).

- Incubación del homogeneizado durante una hora a 37 °C en un hornillo con agitación (Agimatic-N, Selecta).
- Filtrado con un tamiz de 180 μm de poro (CISA) en un vaso de precipitados de 600 ml.
- Centrifugación a 2.800 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Consul 21, Orto Alresa).
- Tras descartar el sobrenadante, suspensión del sedimento con 20 ml de solución buffer fosfato a pH 7,2 (Panreac).
- Adición de 15 ml de solución reciente de bicarbonato sódico al 1,2 % a pH 8,3 (Sigma-Aldrich).

El bicarbonato sódico sirve para neutralizar la pepsina y alcalinizar la solución a valo-

res de pH cercanos a 6,5. Con ello se consigue detener la posible destrucción de los bradizoitos por el ácido y mantener la capacidad infectiva del parásito hasta el momento de su inoculación en los ratones de experimentación.

- Centrifugación de la mezcla a 2.800 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Rotofix 32, Hettich) y eliminación del sobrenadante.
- Suspensión del sedimento obtenido con 3 ml de una solución de antibiótico de 1.000 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich) y 100 µg/ml de estreptomina (Sigma-Aldrich).

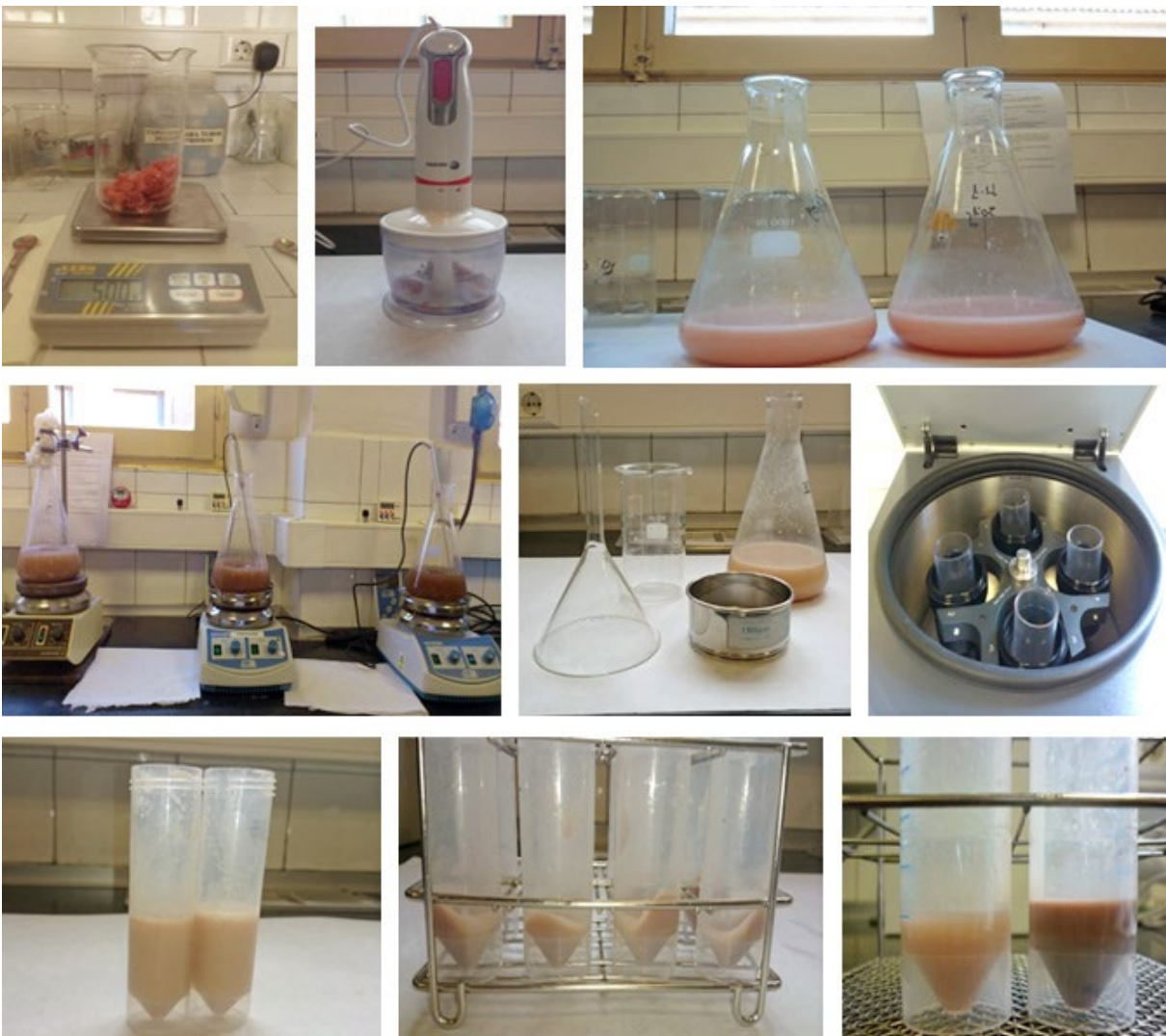


Figura 29: Fases del procedimiento de la digestión péptica en los tejidos porcinos frescos.

Para evitar la contaminación cruzada, se realizó el lavado del material utilizado entre muestra y muestra con jabón y agua caliente a una temperatura superior a 82 °C, y un posterior aclarado de los instrumentos con agua destilada.

El proceso de digestión de cada muestra se realizó por quintuplicado, analizándose de esta forma 250 g de tejido de cada uno de los perniles y órganos diana. Se realizaron un total de 410 digestiones pépsicas de los tejidos frescos.

2.2.2- Análisis de *Toxoplasma gondii* mediante bioensayo en ratón

Para determinar la presencia y viabilidad del parásito en las muestras de tejidos frescos porcinos, el extracto de digestión se analizó mediante bioensayo en ratón. En la Figura 30 se presenta un esquema del procedimiento utilizado.

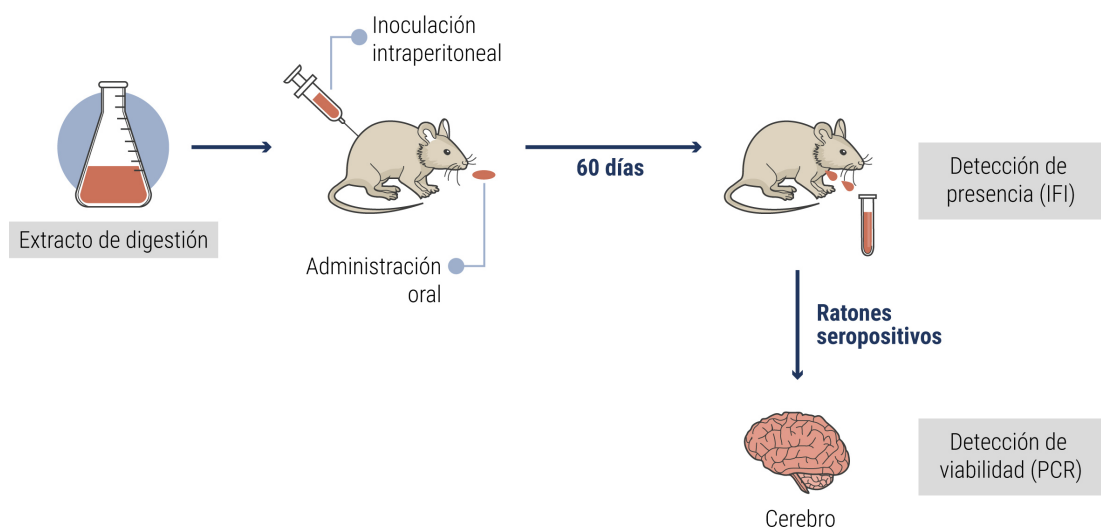


Figura 30: Procedimiento de análisis mediante bioensayo en ratón ©2019 Laura Herrero.

2.2.2.1- Uso y mantenimiento de los ratones de experimentación

Siguiendo el principio de las 3R's (Reemplazar, Reducir y Refinar), en base al Real Decreto 1386/2018 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, se diseñó el experimento utilizando el menor número de ratones posible que nos permitiera obtener un resultado fiable. No existe un protocolo consensuado de análisis para el estudio de *T. gondii* mediante bioensayo en ratón, por lo que el número de ratones utilizados en este trabajo se calculó en función del éxito que esperábamos en la infección experimental. Mediante el uso del programa estadístico WinEpi, se determinó que para conseguir un éxito mínimo de infección en ratón del 33 % se debían utilizar 8 ratones por muestra ya que en el caso de que una muestra fuera positiva, al menos uno de ellos daría una respuesta positiva con el 95 % de probabilidad.

Asimismo, siguiendo las indicaciones de la Orden ECC/566/2015, por la que se establecen los

requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación, se realizaron los cursos necesarios para obtener la categoría que permite llevar a cabo los diferentes procedimientos con los ratones.

En el estudio se emplearon ratones de laboratorio Swiss CD1 hembras, de 20 - 25 g, procedentes de la casa comercial Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales se recibieron con un certificado sanitario de la empresa suministradora que aseguraba que estaban libres de la enfermedad. Tras su recepción, los ratones tuvieron una semana de aclimatación en las instalaciones.

El mantenimiento de los animales de experimentación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA), respetando las condiciones marcadas por las normas de buenas prácticas de laboratorio en el cuidado de animales de experimentación (Real Decreto 1386/2018) (Figura 31). Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal (Informe favorable PI07/12) y por el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Zaragoza.

El alojamiento de los animales en la zona experimental se realizó en cubetas convencionales con filtro cobertor e individualmente ventiladas. El cambio de cubeta se realizó bajo cabina de flujo laminar (Bio II A, Telstar), utilizando material limpio y desinfectado para el alojamiento y mantenimiento de los animales. Asimismo, la viruta y el material de enriquecimiento se sometieron a un proceso de esterilización previo a su uso. La dieta fue tratada mediante irradiación ionizante, y se garantizaron los aportes necesarios de vitaminas, proteínas, fibra y grasa. Además, se realizó una vigilancia diaria de los animales para detectar la posible aparición de síntomas de enfermedad o signos de estrés, sufrimiento y angustia. Ante la aparición de estos problemas, los animales fueron sacrificados para evitar alargar su sufrimiento.

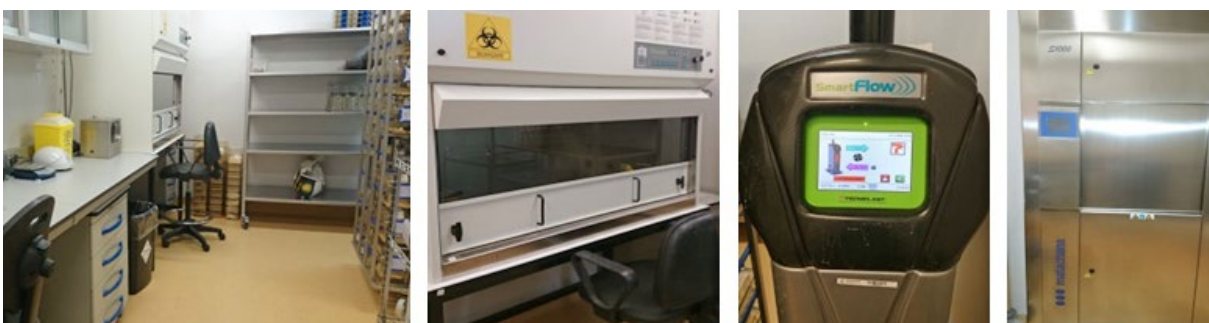


Figura 31: Laboratorio de bioseguridad en las instalaciones del CIBA.

2.2.2.2- Determinación de la presencia de *Toxoplasma gondii* mediante bioensayo en ratón

Los extractos procedentes de las digestiones pépsicas fueron inoculados en menos de 3 horas tras su procesado. De cada extracto obtenido se administró a cada ratón 0,5 ml por vía intraperitoneal y 0,1 ml por vía oral. Dado que la digestión se realizó por quintuplicado, las reinoculaciones a un mismo animal se realizaron con al menos 48 horas de diferencia para favorecer su recuperación. A cada animal se le asignó un código individual para su correcta identificación. Asimismo, se incluyó un lote de ratones control negativo, que sólo fue inoculado con la solución antibiótica.

Transcurridos 60 días de la última inoculación, se les extrajo sangre a los animales para el posterior análisis del suero por IFI. El sangrado de los ratones se llevó a cabo mediante punción de la vena mandibular con agujas estériles de 0,5 x 16 mm (Terumo), depositando la muestra en Eppendorfs de 1,5 ml.

Para la obtención de los sueros, las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Universal 32 R, Hettich) y el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf de 0,6 ml. Para seguir la correcta trazabilidad de las muestras, los sueros fueron rotulados con el código del ratón y de la muestra de la que procedía el extracto de digestión. Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

A continuación, se procedió al sacrificio de los animales introduciéndolos en una cámara con CO₂ situada dentro de una cabina de flujo laminar. Posteriormente, se extrajeron los cerebros de los animales utilizando material estéril para evitar contaminaciones cruzadas. Estos órganos se introdujeron en Eppendorfs de 5,0 ml, almacenándose a -20 °C para su posterior análisis por qPCR con el objetivo de determinar DNA de *T. gondii* y así confirmar la viabilidad del parásito (Figura 32).



Figura 32: Mantenimiento, inoculación y toma de muestras de los ratones.

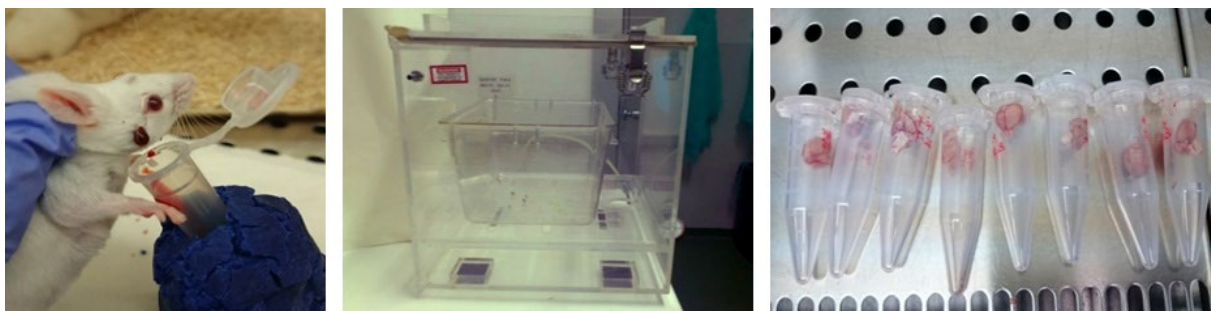


Figura 32: Mantenimiento, inoculación y toma de muestras de los ratones (continuación).

2.2.2.2.1- Análisis serológico mediante IFI

Antes de proceder al análisis serológico de los ratones mediante la técnica IFI, se ensayó una anti-IgG de ratón de la casa comercial DakoCytomation que había sido utilizada en un proyecto anterior del grupo de investigación (UZ2006-CIE-04). Se realizó la puesta a punto de la técnica para establecer el punto de corte y poder discriminar claramente las muestras positivas de las negativas. Para ello, se realizaron diluciones de sueros procedentes de dicho proyecto, estableciendo finalmente el punto de corte en un título de 1:10.

El protocolo de la técnica fue el mismo que el utilizado con los sueros porcinos (descrito en el punto 1.1.2.2), con las excepciones de que la dilución de los sueros y los lavados se realizaron con PBS a pH 7,2 (bioMérieux) y que se utilizó una anti-IgG específica de ratón. La anti-IgG de DakoCytomation se preparó a una dilución 1:10 en PBS a pH 7,2 (bioMérieux), añadiendo una gota de azul de Evans al 0,2 % (bioMérieux). Una vez homogenizada la solución, se prepararon alícuotas que fueron almacenadas en congelación a -20 °C hasta el momento de su utilización.

2.2.2.3- Determinación de la viabilidad de *Toxoplasma gondii* mediante bioensayo en ratón

Los cerebros de los ratones seropositivos se analizaron mediante qPCR para determinar la presencia de DNA de *T. gondii*, y así confirmar que el extracto previamente inoculado contenía parásitos viables.

Asimismo, se analizaron 20 cerebros de ratones seronegativos para confirmar la ausencia de DNA de *T. gondii* en sus cerebros.

2.2.2.3.1- Optimización de la extracción del DNA

Para seleccionar el kit de extracción de DNA se ensayaron tres kits comerciales: NucleoSpin®

Tissue de la casa comercial Macherey-Nagel, QIAamp® DNA Mini de la casa comercial Qiagen y UltraClean® BloodSpin DNA Isolation de la casa comercial Mobio. Todos ellos están comercializados para analizar DNA en muestras de tejidos, siendo el último de ellos especializado además para muestras de sangre. Los tres kits de extracción se ensayaron con los protocolos indicados por los fabricantes utilizando cuatro cerebros que procedían de los ratones con los títulos más altos. Una vez extraído el DNA con los diferentes kits se comprobó la pureza y la cantidad del mismo mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

Una vez comprobados los resultados obtenidos se seleccionó el kit UltraClean® BloodSpin DNA Isolation de Mobio, ya que ofreció los mejores resultados, dentro del rango óptimo de pureza (1,9 - 2), en la extracción con un protocolo más rápido y sencillo (Tabla 3).

Tabla 3: Concentración y pureza del DNA obtenidos con los tres kit comerciales.

Kit comercial	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
	[ng/μl]	Pureza	[ng/μl]	Pureza	[ng/μl]	Pureza	[ng/μl]	Pureza
NucleoSpin® Tissue	56,9	1,83	39,4	2,03	67,4	2,10	51,8	1,91
UltraClean® BloodSpin	65,4	1,89	45,1	1,91	80,4	1,95	46,5	1,94
QIAamp® DNA Mini	25,8	1,81	42,9	1,90	58,1	1,86	16,4	1,84

2.2.2.3.2- Optimización de la amplificación del DNA

La optimización consistió en la elección de los cebadores que detectaran específicamente a *T. gondii*. Se utilizaron como control positivo el DNA de diluciones seriadas de una muestra de taquizoitos congelados con concentración de 10^4 de la cepa ME49 (Grupo de Investigación Consolidado "Salud Veterinaria y Zoonosis" (SALUVET) de la Universidad Complutense de Madrid).

Para llevar a cabo la amplificación del DNA, inicialmente se utilizaron kits comerciales en los que el fluoróforo era una sonda Taqman. En primer lugar, se eligió el kit de amplificación Genesis Advanced® kit (Primer Design). Se trata de un kit comercial compuesto por agua libre de DNasa, un par de cebadores para la detección de las secuencias repetitivas de 529 bp (está repetido 300 veces en el genoma del parásito), una sonda Taqman, un control de extracción (β -actina) y un control interno de amplificación. Para completar los reactivos necesarios para la amplificación se utilizó una Mastermix Precision (Primer Design). Otro de los kits utilizados fue el LSI® Real Time-PCR (Life technologies), el cual incluye un par de cebadores B1 (están repetidos 35 veces

en el genoma del parásito), buffer, una sonda Taqman, un control de externo de amplificación y un control interno de amplificación. Sin embargo, tras realizar el protocolo de los dos kits ninguna de las muestras presentó amplificación para *T. gondii*, pero sí que lo hicieron para la β -actina y en el control positivo.

Se realizaron más pruebas con diferentes kits que incluían sonda Taqman, y con ninguna de ellas se observaron resultados positivos en las muestras problema. Por ello, se decidió continuar la optimización de la amplificación del DNA del parásito utilizando SYBR Green como fluoróforo, ya que posee una mayor sensibilidad.

El diseño de los cebadores para SYBR Green se realizó mediante la aplicación OligoPerfect™ Designer de ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-design-tools/oligoperfect.html>). De esta forma, se ensayaron varios pares de cebadores que detectaban diferentes fragmentos repetidos a lo largo del genoma del parásito. Una vez analizados, se descartaron algunos cebadores que producían productos inespecíficos, ya que en la curva de disociación aparecían productos con varios picos y a temperaturas diferentes.

El cebador que mostró mejores resultados para la detección del parásito fue el desarrollado para este estudio por la empresa AlquizVetek S.L. y que permite la detección de una secuencia repetitiva de 529 bp. Una vez completada la amplificación del DNA de las muestras a estudiar, se observó que aparecían los resultados esperados para *T. gondii* en las curvas de amplificación y de disociación (Figura 33). Por ello, este cebador se consideró el más adecuado para la amplificación del DNA del parásito.

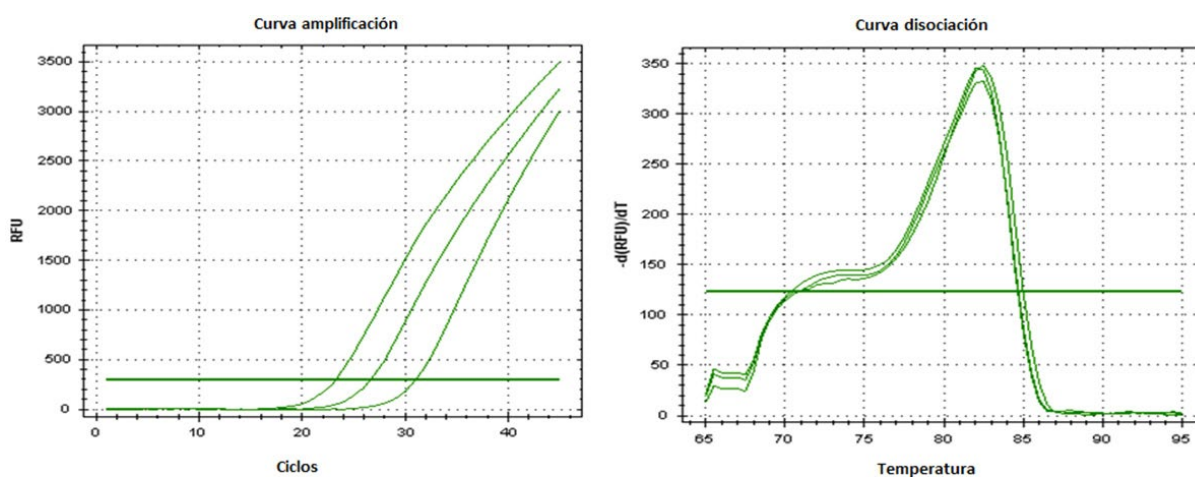


Figura 33: Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador repetitivo de 529 bp. (RFU: Unidades de Fluorescencia Relativas).

Asimismo, para confirmar la especificidad de los cebadores durante la amplificación se eligió el par de cebadores SAG (AlquizVetek S.L.). Este cebador detecta una proteína de membrana SAG del parásito que presenta una sola copia en su genoma. Tras la amplificación se observó que las curvas de amplificación y de disociación eran las esperadas en la detección de *T. gondii* (Figura 34).

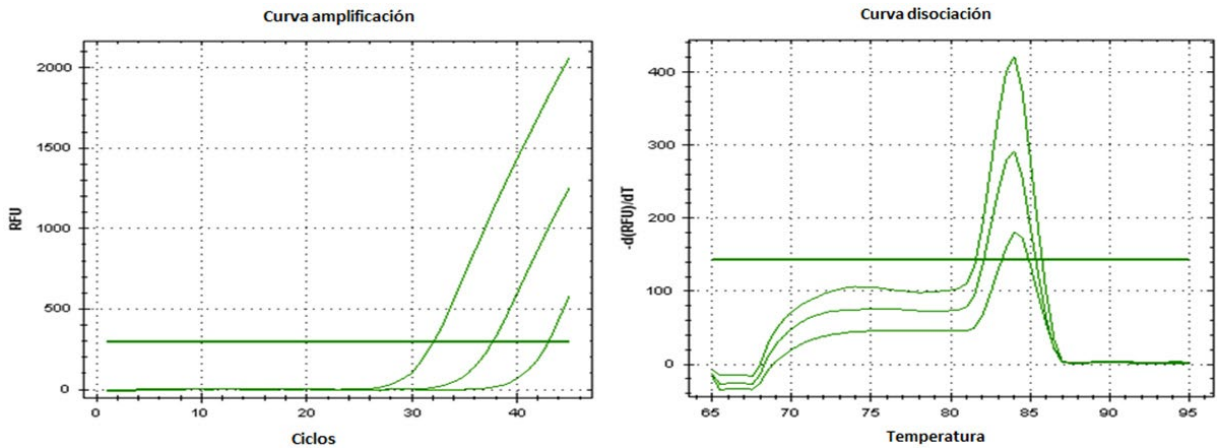


Figura 34: Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador SAG. (RFU: Unidades de Fluorescencia Relativas).

A la vista de estos resultados se determinó que los cebadores que se iban a utilizar para la detección del DNA de *T. gondii* en las muestras de este trabajo serían el repetitivo de 529 bp y el SAG. El primer cebador aparece aproximadamente unas 6 Ct antes que el cebador SAG debido a que posee un mayor número de copias en el genoma del parásito. Las temperaturas de disociación son 81°C para el cebador repetitivo de 529 bp y 85 °C para el cebador SAG (Figura 35).

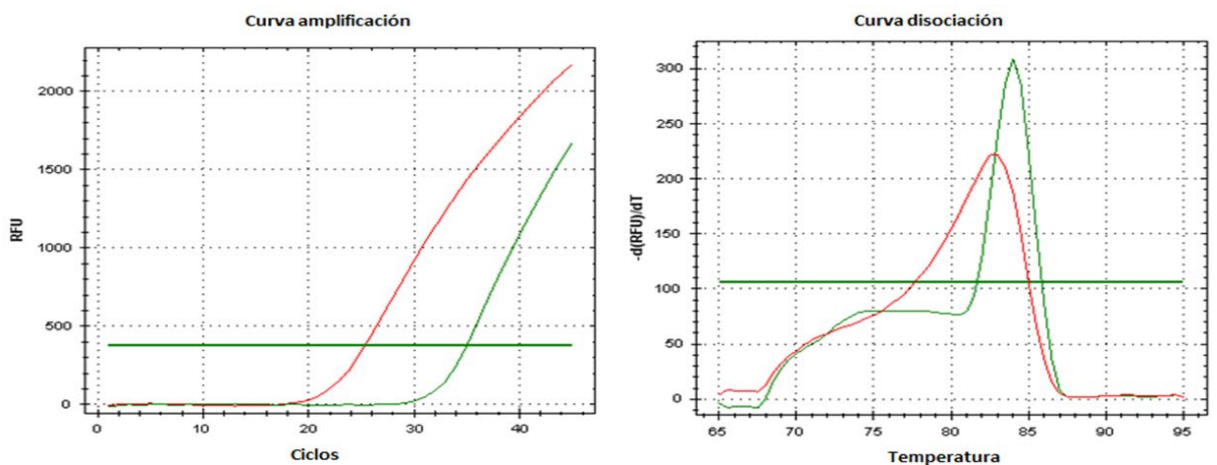


Figura 35: Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) con el cebador repetitivo de 529 bp (en rojo) y el SAG (en verde). (RFU: Unidades de Fluorescencia Relativas).

2.2.2.3.3- Protocolo de análisis de los cerebros mediante qPCR

Tras la optimización, las muestras de cerebro se analizaron por triplicado siguiendo el protocolo final de extracción del DNA del Kit UltraClean® BloodSpin DNA Isolation de Mobio, tal y como se describe a continuación (Figura 38):

- Pesado de 15 mg de cada muestra en un Eppendorf de 1,5 ml y adición de 200 µl del reactivo B1 buffer de lisis (proporcionado por el kit) y 10 µl de Proteinasa K.
- Homogeneización de las muestras con un micropistilo con motor (Kimble) e incubación durante 30 minutos a 65 °C en un bloque calefactor (Life Technologies).
- Adición de 200 µl del reactivo B2 (proporcionado por el kit) y agitación de nuevo los Eppendorf en un agitador vórtex durante 15 segundos.
- Traspaso de todo el volumen de las suspensiones a otros Eppendorf con una columna con membrana (proporcionado por el kit). Centrifugación durante 1 minuto a 13.000 g (Centrifuga 5418, Eppendorf).
- Desacople de las columnas de los Eppendorf y eliminación del líquido que había en ellos. A continuación, colocación de nuevo de las columnas en los tubos y realización de los lavados de la columna. Para ello, adición de 500 µl del reactivo B3 (proporcionado por el kit) y centrifugación durante 30 segundos a 13.000 g. Descarte del líquido de los Eppendorf.
- Rellenado con 500 µl del reactivo B4 (proporcionado por el kit) y centrifugación durante 30 segundos a 13.000 g.
- Eliminación del líquido, y adición de 100 µl del reactivo B4 y centrifugación los Eppendorf durante 1 minuto a 13.000 g.
- Traspaso de las columnas a otros Eppendorf previamente atemperados a 65 °C en un bloque calefactor y adición de 200 µl de reactivo B5 atemperado (proporcionado por el kit).
- Incubación de los Eppendorf durante 1 minuto a 65 °C en el bloque calefactor. Centrifugación durante 1 minuto a 13.000 g y finalmente retirado de las columnas de los tubos.

Tras el proceso de extracción del DNA se procedió a analizar la pureza y la concentración obtenidas con el espectrofotómetro NanoDrop® 2000, observándose en todas las muestras valores incluidos en el rango óptimo (1,9 y 2). Además, como comprobación paralela de la extracción del DNA, se evaluó la cantidad presente del gen de la β -actina por qPCR en cada una de las muestras, ya que este valor se utilizó como control interno (CI) de la extracción. Se observó que las curvas de amplificación y las temperaturas a las que aparecían los productos en la curva de disociación fueron muy similares entre sí (Figura 36). Los valores de los ciclos (Ct) del gen de la β -actina tuvieron un media de 24,01 y una desviación estándar de 0,18.

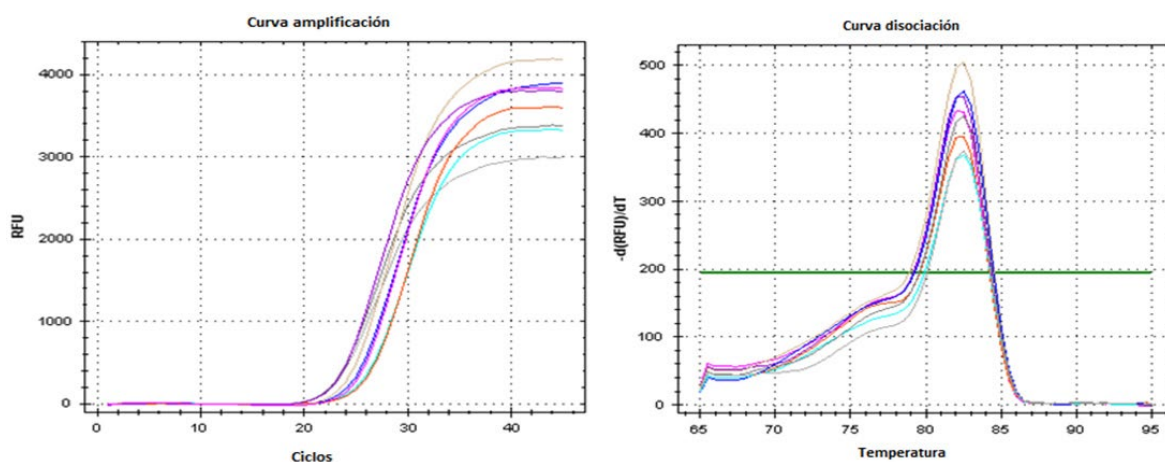


Figura 36: Curva de amplificación (izquierda) y curva de disociación (derecha) del gen de la β -actina. (RFU: Unidades de Fluorescencia Relativas).

Posteriormente, para la realización de la amplificación de las muestras por qPCR se utilizó un termociclador CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System de Bio-Rad con placas de 96 pocillos (Figura 37).

En la preparación de las reacciones se pusieron en cada pocillo de la placa 10 μ l de agua libre de nucleasas, 10 μ l de Mastermix de Promega (Taq DNA polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$, buffers para la reacción, SYBR Green) y 0,4 μ l de cada uno de los cebadores del par. Finalmente, se añadieron 2,25 μ l del DNA de las muestras en la mitad de los pocillos de la placa y en la otra mitad se realizó una dilución 1/10 de cada una de las muestras. Además, en cada placa se añadió un pocillo como control positivo y otro como negativo.

El programa del termociclador que se utilizó consistió en una etapa inicial de 94 °C durante 4 minutos, a continuación 44 ciclos de 55 °C durante 5 segundos, 79 °C durante 5 segundos y 94 °C durante 4 segundos. El programa terminó con una curva de disociación que fue desde los 60 °C a

94 °C con incrementos de 0,5 °C.

Dado que la detección del DNA del parásito utilizando el cebador repetitivo de 529 bp es mucho más sensible, se determinó que los valores de Ct de las muestras serían los obtenidos con este cebador. El cebador SAG fue utilizado como confirmación de la positividad de la muestra. Por ello, para considerar una muestra positiva fue imprescindible que lo fuera con ambos cebadores a la vez.



Figura 37: Procedimiento de análisis de una muestra mediante qPCR.

2.2.2.3.4- Cuantificación de las muestras

Para realizar la cuantificación de las muestras en qPCR se realizaron rectas patrón de muestra de cerebro a la que se le añadieron diluciones seriadas 1/10 de taquizoitos ME49 de *T. gondii* (SALUVET, Universidad Complutense de Madrid). En la Figura 38, se puede observar la curva de cuantificación de cada una de las diluciones con unos valores de Ct inversamente proporcionales a la concentración de DNA inicial.

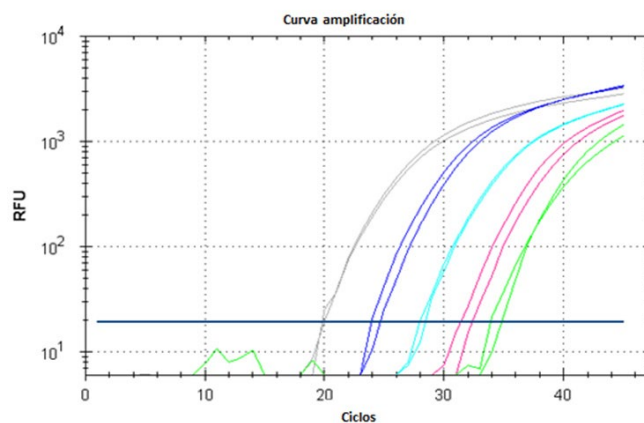


Figura 38: Curva de amplificación de las diluciones del control positivo. (RFU: Unidades de Fluorescencia Relativas).

Al representar la curva de calibrado de los resultados obtenidos (Figura 39), se obtuvo una eficiencia del 99,7 %, calculada a través de la pendiente de la recta. En este caso la eficacia de la pendiente fue de 3,329, obteniéndose un resultado muy cercano al óptimo (3,321). La medida de la bondad del ajuste realizado en la curva se determinó con el coeficiente de determinación, que fue $R^2 = 0,992$. Asimismo el dato de intersección de la curva en el eje Y fue a un ciclo de 38,76, por lo que se consideró que a partir de un ciclo 38 las muestras eran negativas.

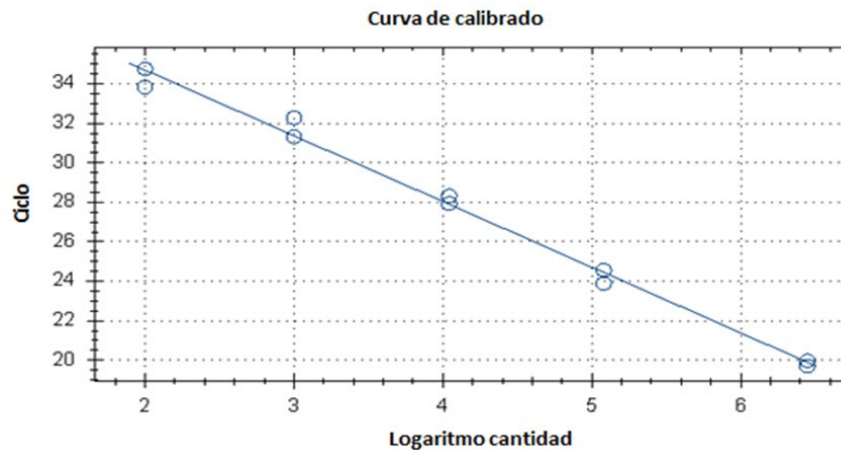


Figura 39: Representación de la curva de calibrado obtenida de las diluciones del control positivo.

Una vez obtenidos los Ct de todas las muestras analizadas, se ajustaron con los ciclos obtenidos de actina de cada una de ellas. El valor de la Ct ajustado se obtuvo al aplicar el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_T$) siguiendo el procedimiento descrito por Livak y Schmittgen, (2001). Con ello se consiguió normalizar los pequeños errores de pesado que se pudieran haber cometido en la preparación con los valores de Ct obtenidos con el cebador del gen de la β -actina.

Para el cálculo de las cargas parasitarias de *T. gondii* presentes en las muestras se utilizó un software cedido por AlquizVetek S.L. En este programa informático se introdujo la ecuación de la recta de calibrado, así como los valores de Ct obtenidos en cada una de las muestras. El programa mostraba la correspondencia en concentración de *T. gondii* expresada en parásitos/gramo.

2.2.3- Análisis de *Toxoplasma gondii* en el extracto de digestión mediante qPCR

Parte de los extractos de digestión también fueron analizados mediante qPCR para confirmar la presencia de *T. gondii* en los tejidos frescos porcinos.

El protocolo de análisis fue el mismo que el utilizado para las muestras de cerebros de ratón

(punto 2.2.3.2.3), con la excepción de que la extracción del DNA se realizó a partir de 100 µl del extracto con 100 µl de buffer de lisis.

2.3- Análisis estadístico

Mediante el programa informático Microsoft Office Excel se analizaron los datos de presencia y viabilidad del parásito en los tejidos frescos porcinos. Estos resultados se relacionaron con las titulaciones de los cerdos mediante el programa estadístico IBM SPSS 19.0 para Windows. Se empleó el test de contraste Chi-cuadrado (X^2) o la Razón de Verosimilitud cuando el test de Chi-cuadrado no fue válido. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Para determinar el tejido que permite evaluar mejor el riesgo (pernil vs. órganos diana), se compararon los resultados obtenidos por bioensayo en ratón (presencia) entre ambos tejidos mediante los test estadísticos utilizados previamente en el programa estadístico WinEpi 2.0.

3- Estudio de *Toxoplasma gondii* en jamón curado

Con la finalidad de estudiar la influencia del proceso tecnológico de curado en *T. gondii* y sus implicaciones en la seguridad alimentaria, uno de los pernils de cada cerdo del estudio se sometió a curación en un secadero industrial. Tras el tiempo de curación de 9 y 12 meses, los jamones se cortaron y picaron para someterlos a un proceso de digestión péptica.

Al igual que para los tejidos frescos, parte del extracto de digestión se analizó mediante bioensayo en ratón para poder confirmar la presencia y viabilidad de *T. gondii*. Trascurridos 60 días post-inoculación se analizó el suero de los ratones para detectar la presencia del parásito mediante la técnica IFI. Asimismo, los cerebros de los ratones seropositivos se analizaron mediante qPCR para confirmar la viabilidad.

Para completar los resultados de presencia obtenidos mediante bioensayo en ratón, se analizó el resto del extracto de digestión directamente mediante qPCR.

En la Figura 40 se muestra la metodología de análisis utilizada para determinar la presencia y la viabilidad de *T. gondii* en el jamón curado.

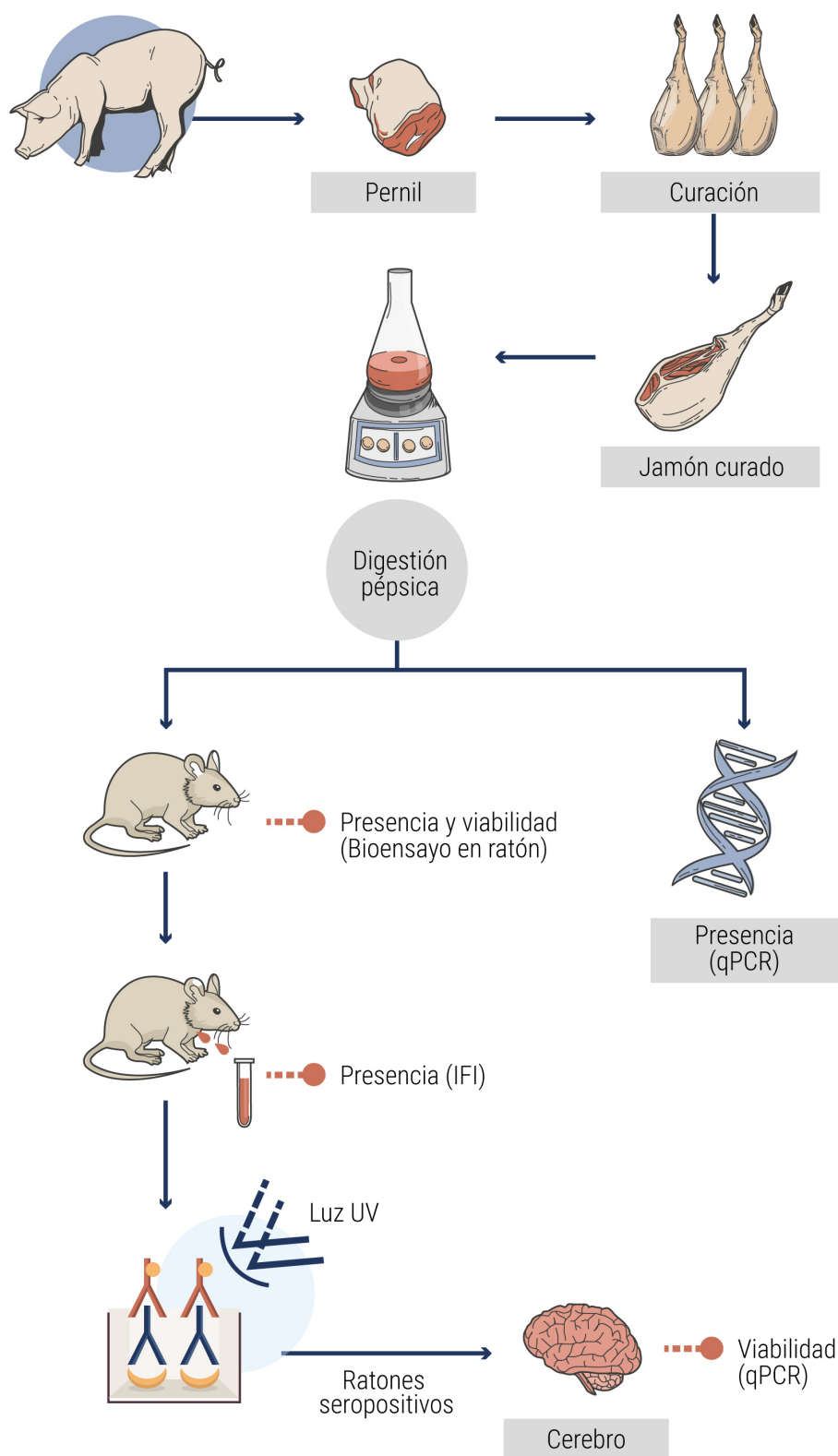


Figura 40: Procedimiento de análisis de la presencia y viabilidad de *T. gondii* en el jamón curado ©2019 Laura Herrero.

3.1- Proceso de curación de los jamones y toma de muestras

Los perniles homólogos de cada cerdo se sometieron al proceso de curado en el secadero de la

empresa cárnica. Desde el momento de su entrada y con la finalidad de asegurar la trazabilidad, los perniles fueron identificados con un chip que los relacionó con el cerdo de procedencia.

Posteriormente, se completó el acondicionamiento de las piezas y se terminó de desangrar. Se pesaron todos los perniles obteniéndose valores de entre 8,59 kg y 14,76 kg. Asimismo, los perniles se pesaron durante el procesado y al final del curado para controlar la merma de peso a lo largo de las fases del proceso de curación.

El proceso tecnológico de curado de los jamones incluyó las etapas de salado, post salado, secado y maduración (Figura 41).

Durante la fase de **salado**, los perniles se frotaron con una mezcla de sal curante comercial (10 g/kg de jamón) compuesta por nitrato de potasio (E-252), nitrito de sodio (E-250), ascorbato de sodio (E-301) y cloruro de sodio. Posteriormente, se almacenaron, colocandoles más sal en la zona superior de la pieza, en las cámaras de salazón con atmósfera controlada de 2,8 °C a 3,5 °C y con una humedad relativa del 85 % al 95 %. Cada pernil permaneció en esta cámara aproximadamente 2 días/kg de peso. Cuando cada pieza estuvo el tiempo suficiente se les retiró la sal que las cubría y se procedió a su lavado, formado/moldeado y pesado.

El **postsalado** se realizó con una humedad relativa del 75 % al 95 % y una temperatura creciente de 3 °C a 16 °C, siendo un requisito mínimo que los primeros 50 días permanecieran a 3 °C \pm 1 °C. La temperatura se fue subiendo gradualmente cada semana hasta los 90 días.

Al terminar la fase de postsalado se continuó con la de **secado**. Durante esta fase se realizaron los procesos de frotado y aplicación de manteca de forma manual. Este paso sirvió para evitar desecaciones que se pudieran producir en el periodo de secado artificial (encortezamiento) y para evitar la proliferación de ácaros en el producto. El tiempo mínimo de estancia aproximado en esta fase fue de 4 meses a una temperatura de 16 °C y con una humedad relativa del 65 %.

En último lugar, se realizó la **maduración** de las piezas almacenando los jamones en cámaras a temperaturas que se incrementaron de 16 °C a 28 °C paulatinamente y con una humedad relativa que fue en aumento del 65 % al 70 %. Los jamones permanecieron en esta fase hasta completar su periodo de curado (hasta los 9 o 12 meses).



Figura 41: Proceso de curación de los jamones.

Para el análisis de *T. gondii* en los jamones curados, se seleccionaron dos tiempos de curación: 9 y 12 meses. En la Tabla 4 se muestra la distribución de las muestras.

Tabla 4: Distribución de la toma de muestras de jamón curado.

Cerdos	Perniles	Jamones	
		9 meses de curación	12 meses de curación
Titulación <1:20	3	0	3
Titulación 1:20 a < 1:80	14	6	8
Titulación ≥1:80	24	15	9
Total muestras	41	21	20

Una vez finalizado el tiempo de curación, los jamones se pesaron, deshuesaron, descortezaron y se envasaron al vacío en el secadero. Posteriormente, los jamones se trasladaron a la Facultad de Veterinaria de Zaragoza para su análisis. El picado de las muestras se llevó a cabo en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, con el mismo procedimiento que fue utilizado para las muestras de tejidos frescos descrito anteriormente (Figura 42).



Figura 42: Preparación de las muestras de los jamones curados.



Figura 42: Preparación de las muestras de los jamones curados (continuación).

3.2- Análisis de *Toxoplasma gondii* en el jamón curado

3.2.1- Digestión péptica

Se llevó a cabo una digestión péptica de los jamones curados siguiendo el protocolo descrito en el punto 2.2.1. Se realizaron 5 digestiones de cada jamón curado con un total de 250 g de producto analizado. Se llevaron a cabo 205 digestiones pépticas de los jamones curados.

Parte del extracto de la digestión péptica se utilizó para la realización del bioensayo en ratón, y el resto para su análisis mediante qPCR.

3.2.2- Análisis de *Toxoplasma gondii* mediante bioensayo en ratón

La detección y la comprobación de la viabilidad del parásito en las muestras de jamón curado se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.2.2.

3.2.3- Análisis de *Toxoplasma gondii* mediante qPCR

La técnica de qPCR también se empleó para la detección de *T. gondii* en los extractos de digestión de los jamones curados. Para ello, se siguió el protocolo utilizado anteriormente en los tejidos frescos descrito en el punto 2.2.3.

3.3- Análisis de la composición fisicoquímica de los jamones curados

Al final de su periodo de curación se analizó la composición fisicoquímica de los jamones en el laboratorio de control de calidad del secadero.

Se analizó la cantidad de nitratos y nitritos aplicando los protocolos de las normas ISO 3091:1975 e ISO 2918:1975 respectivamente. El contenido de humedad se determinó según la norma ISO

1442:1997. Asimismo, el pH y la actividad del agua (a_w) se midieron según las normas ISO 2917:1999 e ISO 21807:2004. Finalmente, se determinó el contenido de cloruro de sodio de acuerdo con la ISO 1841-1:1996 y el contenido de grasa según la ISO 1444:1996.

3.4- Análisis estadístico

Los datos de presencia y viabilidad de *T. gondii* de los jamones curados se analizaron con el programa informático Microsoft Office Excel. Para conocer la significancia estadística de la influencia del tratamiento tecnológico sobre *T. gondii* se aplicó el test Chi-cuadrado o Razón de Verosimilitud cuando el test de Chi-cuadrado no fue válido entre los resultados obtenidos en los tejidos frescos y los jamones curados de cada animal. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Estos mismos test también se utilizaron para comprobar si había una relación estadísticamente significativa entre la presencia y viabilidad de *T. gondii* y los dos tiempo de curado (9 y 12 meses).

Igualmente, se comprobó si había una relación estadísticamente significativa entre los parámetros fisicoquímicos de los jamones curados y la presencia y viabilidad de *T. gondii*. Para ello, se estudió la asociación entre las variables dicotómicas cuantitativas y cualitativas para determinar la normalidad de la variable cuantitativa mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Shapiro-Wilk (cuando el tamaño de muestra fue inferior a 15). En el caso de que las variables mostraron una distribución normal se compararon usando la prueba T de Student para muestras independientes y cuando se rechazó la hipótesis de normalidad, se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



1- *Toxoplasma gondii* en producción primaria

1.1- Resultados

1.1.1- Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en porcino

Se detectaron animales seropositivos en el 96,7 % de las granjas estudiadas. En el 62,1 % de las instalaciones la seroprevalencia fue baja con menos de 5 cerdos seropositivos, en el 37,9 % de las granjas se detectaron entre 6 y 14 animales seropositivos y en ninguna de ellas se encontraron más de 15 cerdos seropositivos. Por provincias, en Huesca se encontraron animales seropositivos en el 94,2 % de las 34 granjas analizadas, en Zaragoza y Teruel se detectaron cerdos seropositivos en el 100 % de las instalaciones estudiadas, 22 y 4 granjas respectivamente.

En el 82,76 % de las granjas positivas los títulos serológicos de los cerdos fueron menores o iguales a 1:40, en el 17,24 % de las granjas se encontraron animales con títulos de 1:80, mientras que solo en el 6,89 % de las instalaciones se detectaron animales con títulos de 1:160. No se observó ningún animal con un título serológico superior a 1:160 (Figura 43).

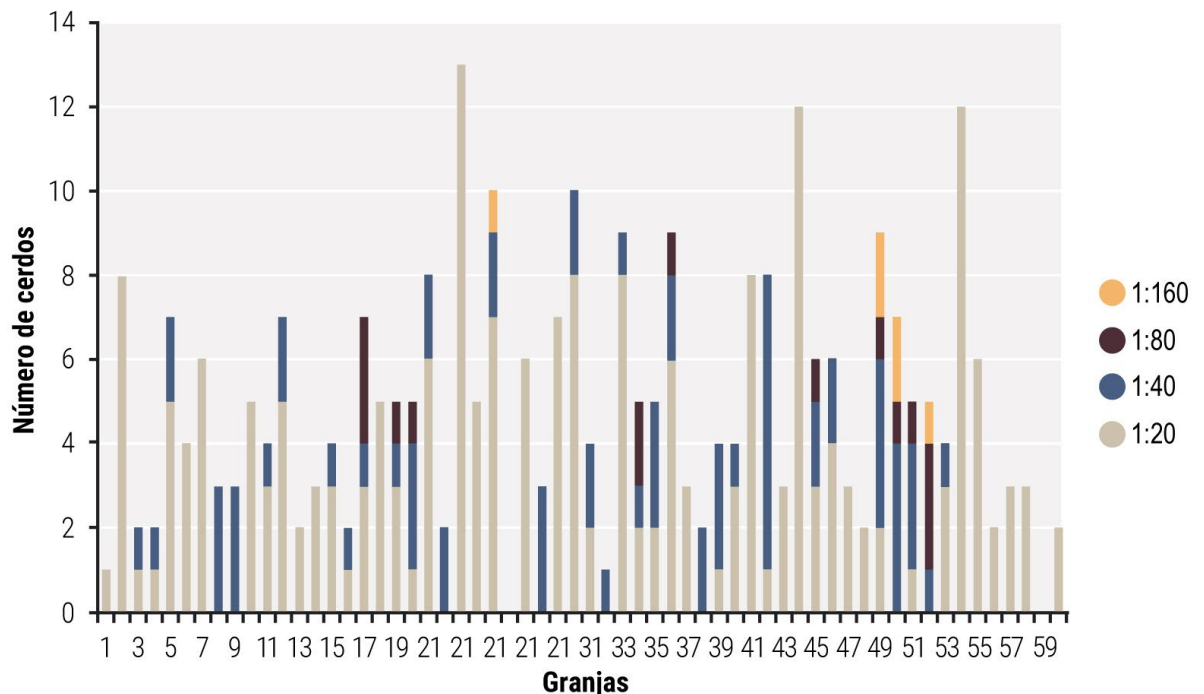


Figura 43: Distribución de los títulos serológicos porcinos positivos en las 60 granjas estudiadas.

De los 1.200 sueros porcinos analizados, 301 (25,08 %) fueron positivos ($\geq 1:20$). A partir de las prevalencias individuales de las granjas se calculó la prevalencia total, que fue del 24,5 % (IC 11,8 % - 45,4 %).

En general, los títulos serológicos de los cerdos fueron bajos. Se detectaron 899 animales seronegativos (<1:20) (74,91%), 209 cerdos con un título de 1:20 (17,42 %), 71 con un título de 1:40 (5,92 %), 15 con un título de 1:80 (1,25 %) y 6 animales con un título de 1:160 (0,5 %) (Figura 44).

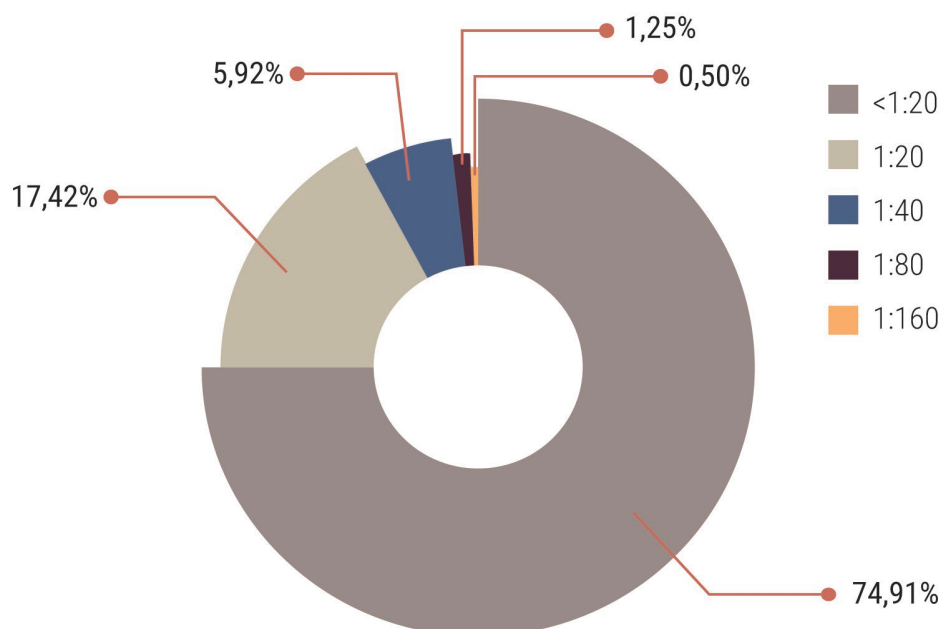


Figura 44: Distribución de los títulos serológicos de los 1.200 cerdos analizados.

1.1.2- Factores de riesgo asociados con *Toxoplasma gondii* en las explotaciones porcinas

En la Tabla 5 se presentan los datos para cada una de las variables analizadas en las encuestas epidemiológicas realizadas en las 161 granjas del estudio.

Tabla 5: Resultados de las encuestas epidemiológicas y número de animales seropositivos para cada variable.

Factor de riesgo	Variables	Nº de granjas	Nº animales seropositivos
Distancia a la granja más cercana (km)	1	130	261
	2	28	31
	3	3	9
Sistema de producción	Ciclo cerrado	16	25
	Todo dentro /Todo fuera	145	276
Número de plazas	<1000	26	70
	1000-2000	86	170
	>2000	49	61
Posibilidad de salida al exterior	No	130	269
	Sí	31	32

Tabla 5: Resultados de las encuestas epidemiológicas y número de animales seropositivos para cada variable (continuación).

Factor de riesgo	Variables	Nº de granjas	Nº animales seropositivos
Tipo de suelo	Enrejillado parcial Todo rejilla	161 0	301 0
Canibalismo	No Si	137 24	290 11
Conservación/ mantenimiento de la granja	Bueno Regular Malo	102 52 7	185 94 22
Orden de la granja	Bueno Regular Malo	134 1 26	220 4 77
Uso exclusivo de ropa y botas para la granja	No Si	56 105	109 192
Uso de jabón	No Si	152 9	297 4
Uso de agua caliente para limpiar	No Si	90 71	153 148
Desinfectante usado	Amonio cuaternario	161	301
Nº de días de secado	0-4 5-9 10-14 15-19	5 120 30 6	16 205 43 37
Maleza en el perímetro	No Si	49 112	41 260
Perros dentro de las instala- ciones	No Si	160 1	301 0
Gatos dentro de las instala- ciones	No Si	94 67	120 181
Roedores dentro de las instalaciones	No Si	93 68	180 121
Pájaros fuera de las instala- ciones	No Si	86 75	153 148
Otros animales fuera de las instalaciones	No Si	150 11	272 29
Control roedores	Empresa externa Cebos Gatos	12 125 24	31 225 45
Ventanas en buen estado	No Si	11 150	35 266

Tabla 5: Resultados de las encuestas epidemiológicas y número de animales seropositivos para cada variable (continuación).

Factor de riesgo	Variables	Nº de granjas	Nº animales seropositivos
Control de temperatura	No	79	141
	Si	82	160
Tipo de pienso	Húmedo	69	134
	Seco	92	167
Origen principal del agua	Pozo	45	83
	Río, acequia	74	145
	Red pública	42	73
Tratamiento del agua	Cloro pastillas	103	215
	Cloro líquido	25	33
	Peróxidos	2	13
	Ninguno	31	40

Las principales variables que presentaron las granjas se resumen a continuación:

- La mayor parte de las granjas se localizaban a 1 km de distancia de la instalación más cercana.
- El sistema de producción más utilizado fue Todo dentro/Todo fuera, en el que todos los animales tras su periodo de engorde salían de las granjas, lo que facilitaba la limpieza y desinfección de las instalaciones
- El número de plazas más frecuente fue de 1.000 y 2.000 animales, aunque los grupos de menos de 1.000 y más de 2.000 también tuvieron representación.
- En un número elevado de granjas los animales no tenían la posibilidad de salir a parques situados en el exterior.
- Todas las instalaciones estuvieron dotadas de enrejillado parcial en sus corrales.
- En la mayoría de las instalaciones no se detectaron casos de canibalismo entre los cerdos.
- La conservación, mantenimiento y orden de las granjas se realizaron correctamente en un gran número de las instalaciones. No obstante, existen bastantes casos en los que estos parámetros fueron regulares o malos.
- El uso exclusivo de ropa y botas en las granjas se practicaba aproximadamente en dos

tercios de ellas.

- Un gran número de instalaciones usaron jabón en la limpieza aunque sólo aproximadamente la mitad de ellas utilizaron agua caliente durante su aplicación y aclarado.
- En todos los casos se utilizó un desinfectante a base de amonio cuaternario.
- En la mayor parte de los casos se solía dejar un periodo de secado de una semana tras la aplicación del desinfectante.
- En la mayor parte de las granjas había maleza a su alrededor, favoreciendo la aparición de pequeños hospedadores intermediarios en sus proximidades.
- Respecto a la presencia de animales en las instalaciones, se indicó que casi en la mitad de ellas había gatos y roedores, en muy pocos casos pájaros y sólo en una de ellas tenían acceso los perros.
- En la mitad de las granjas había gatos, roedores y pájaros fuera de las mismas mientras que en pocas de ellas se encontraron perros. Asimismo, en algunas instalaciones convivían con otros animales como ovejas u ocas.
- La principal forma de controlar la presencia de roedores fue mediante la colocación de cebos para su captura.
- Las mallas en las ventanas para evitar la entrada de pájaros y otros animales estaban en buen estado en la mayor parte de las instalaciones.
- Aproximadamente en la mitad de las granjas se disponía de un sistema de control de la temperatura.
- En cuanto a la alimentación de los animales, las granjas estaban divididas entre las que ofrecían pienso de tipo seco y de tipo húmedo.
- El agua administrada a los animales procedía principalmente de un río o acequia y era tratada mediante cloro en pastillas.

En las visitas realizadas a las instalaciones, se confirmaron algunas condiciones que pudieron

influir en el contacto de los animales con el parásito, como la presencia de maleza y materiales apilados alrededor de las instalaciones, la presencia de animales, como gatos en el interior de las granjas, suciedad, disponibilidad de agua y comida para los animales domésticos o hacinamientos en los corrales (Figura 45).



Figura 45: Factores de riesgo observados en las granjas.

Los resultados del análisis de los factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *T. gondii* se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *T. gondii* en las granjas estudiadas.

Factor de riesgo	Variables	% positividad (IFI)	Valor de "p"
Distancia a la granja más cercana (km)	1	24,2	>0,05
	2	31,0	>0,05
	3	45,0	>0,05
Sistema de producción	Ciclo cerrado	20,0	>0,05
	Todo dentro /Todo fuera	25,1	>0,05
Número de plazas	<1000	27,9	0,010
	1000-2000	21,7	>0,05
	>2000	19,1	>0,05
Posibilidad de salida al exterior	No	22,4	>0,05
	Sí	18,8	>0,05
Tipo de suelo	Enrejillado parcial	25,1	ND
	Todo rejilla	0,0	

Tabla 6: Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *T. gondii* en las granjas estudiadas (continuación).

Factor de riesgo	Variables	% positividad (IFI)	Valor de "p"
Canibalismo	No	25,0	>0,05
	Si	27,5	>0,05
Conservación/ mantenimiento de la granja	Bueno	26,4	>0,05
	Regular	21,4	>0,05
	Malo	36,7	0,017
Orden de la granja	Bueno	23,4	>0,05
	Regular	20,0	>0,05
	Malo	32,1	0,019
Ropa de uso exclusivo	No	27,3	>0,05
	Si	24,0	>0,05
Uso de jabón	No	25,6	>0,05
	Si	10,0	0,025*
Uso de agua caliente para limpiar	No	24,7	>0,05
	Si	25,5	>0,05
Desinfectante usado	Amonio cuaternario	25,1	ND
Nº de días de secado	0-4	26,7	>0,05
	5-9	23,8	>0,05
	10-14	21,5	>0,05
	15-19	36,3	>0,05
Maleza en el perímetro	No	20,5	>0,05
	Si	26,0	>0,05
Animales dentro de las instalaciones	Perros	29,2	0,001
	Gatos	0,0	>0,05
	Ratones	25,2	>0,05
	Pájaros	23,3	>0,05
Animales alrededor de las instalaciones	Perros	33,7	0,003
	Gatos	28,0	0,001
	Ratones	26,1	>0,05
	Pájaros	15,0	>0,05
	Otros	36,3	0,008*
Control de roedores	Empresa externa	28,3	>0,05
	Cebos	23,4	0,009
	Gatos	28,1	>0,05
Ventanas en buen estado	No	25,0	>0,05
	Si	25,1	>0,05
Control de temperatura	No	26,1	>0,05
	Si	24,2	>0,05
Tipo de pienso	Húmedo	24,8	>0,05
	Seco	25,3	>0,05

Tabla 6: Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *T. gondii* en las granjas estudiadas (continuación).

Factor de riesgo	Variables	% positividad (IFI)	Valor de "p"
Origen principal del agua	Pozo	24,4	>0,05
	Río, acequia	25,9	>0,05
	Red pública	24,3	>0,05
Tratamiento del agua	Cloro pastillas	25,0	>0,05
	Cloro líquido	20,6	>0,05
	Peróxidos	32,5	>0,05
	Ninguno	28,6	>0,05

ND: No se puede determinar, es una constante

*Efecto Clúster

La presencia de gatos dentro o fuera de las granjas fue el principal factor de riesgo que incrementó la prevalencia de *T. gondii* ($p=0,001$). La presencia de otros animales como perros en el exterior de las instalaciones también se identificó como un factor de riesgo ($p=0,003$).

Igualmente, se observó que el número de animales en las granjas era una variable con influencia en la prevalencia, dado que aparecía una mayor presencia del parásito en las instalaciones con menor censo porcino ($p=0,010$).

Asimismo, también se evidenció que el mal mantenimiento y conservación ($p=0,017$) y el desorden de las instalaciones ($p=0,019$) constituían factores de riesgo.

Por último, se observó que el uso de cebos para el control de roedores dentro de las granjas disminuyó la prevalencia ($p=0,009$), ya que se encontró un menor porcentaje de animales seropositivos frente a *T. gondii* en las instalaciones que utilizaron este tipo de control para roedores.

En el procesado de los datos epidemiológicos de las granjas, algunos campos no se utilizaron al no aportar información relevante. Estos factores fueron el uso de suelo con enrejillado parcial y de desinfectantes de amonio cuaternario en el 100 % de las granjas, y la presencia de perros sólo en el interior de una de las instalaciones.

Asimismo, se observó que en algunas variables los datos se encontraban agrupados en un número de granjas muy reducido. Este "Efecto Clúster" se observó en las variables de uso de jabón para limpiar las instalaciones y en la presencia de otros animales como gallinas u ovejas en las granjas. Aunque su presencia tenía relación estadísticamente significativa ($p<0,05$) con una ma-

por presencia de *T. gondii*, al estar concentrados en muy pocas granjas los datos no se tuvieron en cuenta al no ser homogéneos ni representativos (Dohoo, Martin y Stryhn, 2003; Santoro et al., 2017).

1.2- Discusión

Los resultados del análisis de los sueros porcinos indicaron que la infección por *T. gondii* estaba muy extendida, ya que se detectaron animales seropositivos en casi la totalidad de las granjas estudiadas (96,7 %). Estos datos coinciden con estudios realizados por otros autores como da Silva et al. (2015b), en el que encontraron animales seropositivos en el 100 % de las granjas muestreadas en Brasil. Igualmente, otros estudios serológicos de revisión señalan una amplia distribución de *T. gondii* (Dubey, 2010; Guo et al., 2015a; Foroutan et al., 2019). En nuestro estudio también hemos observado resultados variables en la seroprevalencia de las distintas granjas, al igual que se había determinado en otros estudios anteriores (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Dubey y Jones, 2008; García-Bocanegra et al., 2010a). Aunque la infección por *T. gondii* está extendida, los títulos serológicos porcinos fueron bajos, ya que el 69,5 % de los animales seropositivos tuvieron un título de 1:20. Otros estudios han observado patrones similares en las titulaciones, como el realizado por Asgari et al. (2013) en el que se observó que el 86 % de los animales tuvieron un título de 1:20.

La seroprevalencia detectada en nuestro estudio (24,5 %) es similar a la hallada en otras regiones españolas como Cataluña (21,2 %), Extremadura (23,3 %) y Comunidad Valenciana (27,3 %) (García Bocanegra et al., 2010a), y similar a la de otros estudios realizados en Irlanda (23,1 %), en Antillas (24,3 %), en Brasil (25,5 %), en Polonia (26,4 %) o en Serbia (28,9 %) (Klun et al., 2006; Sroka et al., 2008; Hálová et al., 2013; de Sousa et al., 2014; Sharma et al., 2015). Valores más bajos de seroprevalencia se detectaron en otras regiones de España (0,5 % - 18,5 %) como Aragón (mismo territorio que en este trabajo), Galicia, Murcia y Castilla y León (García Bocanegra et al., 2010a), y en otros países como Italia (0,5 % - 2,1 %), Dinamarca (3,1 %), Inglaterra (3,6 %), Letonia (4,2 %), Estonia (5,8 %) o Portugal (7,1 % - 9,8 %) (Deksne y Kirjušina, 2013; Lopes et al., 2013; Esteves et al., 2014; Grønbech et al., 2017; Limon et al., 2017; Papini et al., 2017; Santoro et al., 2017; Gazzonis et al., 2018). Seroprevalencias más altas se han señalado en algunos países como Republica Checa (36 %), Rumania (43,1 %), Nigeria (45,2 %), Inglaterra (47,4 %), China (70 %) o México (95,8

%) (Gamble, Brady y Dubey, 1999; Bártoová y Sedlák, 2011; Balea et al., 2012; Ortega-Pacheco et al., 2013; Li et al., 2015; Ayinmode y Abiol, 2016).

La comparación de los resultados obtenidos con otros estudios serológicos es complicada debido a las diferentes pruebas serológicas que se utilizan y a los distintos títulos de corte que emplea cada autor (EFSA, 2007; Aroussi et al., 2015; Felin, Näreaho y Fredriksson-Ahomaa, 2017). Además, son muy escasos los estudios de validación de las técnicas y generalmente no se ofrecen datos de sensibilidad o especificidad de las pruebas serológicas (Aroussi et al., 2015). Una misma muestra analizada mediante varias técnicas serológicas pueden ofrecer resultados muy diferentes (García et al., 2008; Limon et al., 2017). Incluso los resultados obtenidos con una misma técnica serológica dependen de los títulos de corte utilizados por cada autor. Por ejemplo, en los estudios realizados con la técnica IFI, los puntos de corte establecidos pueden ser 1:16 (Veronesi et al., 2010; Magalhães et al., 2017), 1:20 (Correa et al., 2008), 1:25 (dos Santos et al., 2005), 1:50 (Pardini et al., 2012; Basso et al., 2013) o incluso 1:64 (Minho et al., 2004; Ferreira et al., 2014). Por ello, para poder comparar los resultados obtenidos en los distintos estudios serológicos, es necesario realizar una estandarización de los títulos de corte y de los antígenos utilizados en las diferentes técnicas serológicas (Dubey, 2009). Igualmente, en un estudio de la EFSA para la vigilancia de *T. gondii*, se concluyó que es necesaria una mayor descripción y caracterización de los métodos serológicos y de los antígenos utilizados en estas pruebas para poder contrastar los resultados obtenidos entre las diferentes técnicas diagnósticas (EFSA, 2007, 2011; Opsteegh et al., 2016).

La seroprevalencia porcina también puede variar según el tipo de manejo utilizado en las granjas (intensivo o extensivo), según la edad de los animales muestreados, o si se trata de cerdos de engorde o cerdas reproductoras (Dubey, 2009; Guo et al., 2015a; Samico-Fernandes et al., 2017; Gazzonis et al., 2018). La prevalencia de *T. gondii* suele ser mayor en cerdos adultos y criados al aire libre que en lechones y cerdos criados en granjas de producción intensiva, ya que tienen una mayor probabilidad de contacto con ooquistes infectivos u hospedadores intermediarios infectados (García-Bocanegra et al., 2010a; Dubey, 2010; Blagojevic y Antic, 2014; Basso et al., 2015). Asimismo, Grønbech et al. (2017) indicaron que las cerdas adultas de cría presentan 10,8 veces más riesgo de infección que los cerdos de engorde.

Los datos del presente estudio indican que los principales factores de riesgo en las granjas son la presencia de animales (gatos y perros), el tamaño de las granjas, las condiciones de mantenimiento y orden, y el control de roedores.

Los gatos son el principal factor implicado en el mantenimiento de la infección por *T. gondii* en las instalaciones a través de la eliminación de ooquistes y la contaminación del pienso y agua (Dubey y Beattie, 1988; Assadi-Rad, New y Patton, 1995; Mateus-Pinilla et al., 1999; Lehmann et al., 2003; García-Bocanegra et al., 2010a, 2010c; Du et al., 2012; de Sousa et al., 2014; Ichikawa-Seki et al., 2015; EFSA, 2017). Este hecho es de gran importancia debido a que la presencia de gatos puede aumentar el riesgo relativo de contacto con el parásito en las granjas en más de once veces (García-Bocanegra et al., 2010a). Los gatos pueden excretar hasta 20 millones de ooquistes al día durante una infección primaria y hasta 1 millón al día durante una infección secundaria, dependiendo de la edad del gato, la cepa del parásito, su estado nutricional y el número de quistes ingeridos (Dubey et al., 1995b; Dawson et al., 2005; Jiang et al., 2012). Además, los ooquistes pueden sobrevivir y permanecer infectantes en el suelo húmedo durante más de 18 meses (Du et al., 2012; Ortega-Pacheco et al., 2013). Tenter, Heckerroth y Weiss (2000) recomendaron que, con el fin de disminuir el riesgo de la infección por *T. gondii* en los cerdos se debería impedir la entrada de gatos en las granjas, y así evitar la contaminación de los alimentos y el agua. Algunos autores proponen aplicar un tratamiento térmico adicional del pienso a 70 °C, para inactivar los ooquistes presentes en el alimento, y mantenerlo totalmente aislado de gatos (Mateus-Pinilla et al., 1999; Kijlstra y Jongert, 2008). Además, se ha observado que realizando la vacunación de los gatos con una cepa viva atenuada de *T. gondii* se podría conseguir reducir hasta un 86,7 % la diseminación de los ooquistes (Mateus-Pinilla et al., 1999; Innes et al., 2009; Verma y Khanna, 2013).

La presencia de perros alrededor de las granjas también constituyó un factor de riesgo. La seropositividad de estos animales a menudo está relacionada con la presencia de gatos en las granjas (Arunvipas et al., 2013). El perro es un hospedador intermediario del parásito, y a su vez, puede servir como un medio de transporte mecánico para *T. gondii* (Schaes et al., 2005; Gebremedhin et al., 2015; Sharma et al., 2015). En este trabajo los factores que podrían tener mayor relevancia en el contacto con el parásito en el perro serían la convivencia de estos animales con otros hospedadores intermediarios al poder consumir carne infectada o por el transporte mecánico de ooquiste en su pelo.

La totalidad de las granjas de este estudio eran de manejo intensivo, lo que implica que la producción de estos cerdos en confinamiento se hacía en un espacio limitado y su alimentación era mediante pienso controlado. En este tipo de instalaciones porcinas la prevalencia suele ser más baja ya que este sistema de cría es más seguro (Dubey, 2009; Muraro et al., 2010; Piassa et al., 2010; Fernandes et al., 2012; Limon et al., 2017). En las granjas del presente estudio, aun siendo de producción intensiva, se ha observado un mayor riesgo de infección por *T. gondii* en aquellas de menor censo de animales, debido probablemente a la menor tecnificación de las mismas. Por otro lado, debido a una mayor concentración de animales criados en espacios reducidos, cuando se produce algún fallo y hay una fuente de contaminación, el número de animales expuestos es mayor, lo que lleva a un aumento de la seroprevalencia (Hill y Dubey, 2002; van der Giessen et al., 2007; Bezerra et al., 2009; Lopes et al., 2013; Slany et al., 2016). El tamaño del censo a menudo se correlaciona con el manejo, la gestión y el grado de tecnificación de la instalación, y diferentes estudios han mostrado una asociación entre estos parámetros y la seroprevalencia en cerdos frente a *T. gondii* (Dubey, 2009; Villari et al., 2009; Muraro et al., 2010; Piassa et al., 2010; Fernandes et al., 2012; Guo et al., 2015a; Jennes y Cox, 2017) y otras especies de ganado (Klun et al., 2006; Vesco et al., 2007; Gilot-Fromont et al., 2009), aunque García-Bocanegra et al. (2010a) no observaron este hecho. Las granjas con mayor censo, buenas prácticas de higiene, manejo intensivo y mejores infraestructuras pueden llevar a una reducción de la prevalencia frente a *T. gondii* en los animales (Villari et al., 2009; Ortega-Pacheco et al., 2013).

En relación a las condiciones de mantenimiento y orden, se ha observado una mayor exposición a *T. gondii* en granjas que presentaron una mala conservación de las instalaciones. Asimismo, Veronesi et al. (2010) señalaron la importancia de la limpieza de las instalaciones, e indicaron que la prevalencia se reduciría si se aplican simultáneamente productos químicos y métodos mecánicos de limpieza.

Por último, la seroprevalencia fue estadísticamente menor en las granjas que utilizaron cebos para el control de los roedores que en las instalaciones que se utilizó otro método de contención. Los roedores son reservorios del parásito (Dubey et al., 1995b; Weigel et al., 1995; Hejlíček, Literák y Nezval, 1997; Hill, Chirukandath y Dubey, 2005) y desempeñan un papel importante en la transmisión directa del parásito al ser ingeridos por los cerdos (Weigel et al., 1995; Kijlstra y Jongert, 2008; Villari et al., 2009). El uso de cebos como estrategia para el control de roedores unido a la

restricción de acceso de los gatos a las instalaciones se asocian con la disminución de la seroprevalencia en cerdos (Wang et al., 2002; Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010a; Hill et al., 2010).

El sistema APPCC (análisis de peligros y puntos de control crítico) requiere el establecimiento de medidas preventivas o de control (acciones o actividades que pueden usarse para eliminar, prevenir o reducir a niveles aceptables un peligro para la seguridad alimentaria). El APPCC requiere de algunos prerequisites como el plan de control de materias primas y homologación de proveedores, mediante los cuales se podrían llegar a conseguir cerdos seronegativos o con titulaciones que impliquen una baja probabilidad de encontrar el parásito en carne. Sin embargo, en la actualidad no es viable aplicar de forma general los principios del APPCC a la producción primaria. Asimismo, el Reglamento (CE) nº 852/2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios, establece las medidas de higiene que garantizan un elevado nivel de protección de los consumidores en relación con la seguridad alimentaria. Obliga a aplicar unas prácticas correctas de higiene en las explotaciones, como el correcto mantenimiento de las instalaciones, la restricción de la entrada de animales, o el seguimiento de un programa de control de plagas, todas ellas relacionadas con los factores de riesgo detectados en este estudio en las granjas.

En definitiva, aunque los títulos de los cerdos obtenidos en este estudio han sido bajos, la seroprevalencia detectada y la evaluación de los factores de riesgo confirman la importancia de controlar estos parámetros a fin de evitar la transmisión del parásito en las granjas. Por lo tanto, es muy importante ejercer un manejo intensivo de los animales, con un contacto mínimo con el exterior, restringir el acceso de los gatos dentro de las granjas, mejorar las condiciones de conservación y mantenimiento, y poner en práctica un sistema eficiente de control de roedores. La implementación de procedimientos de gestión específicos para reducir el riesgo de infección de los cerdos, que se basan en la aplicación de la normativa europea en materia de higiene, puede ayudar a prevenir la transmisión del parásito a los humanos a través del consumo de carne de cerdo. Por ello, es esencial llevar a cabo un programa de prevención y vigilancia para detectar granjas de alto riesgo e implementar procedimientos de gestión apropiados para minimizar la infección. De este modo se podrían conseguir granjas con una prevalencia muy baja frente al parásito o incluso "Granjas Libres de *T. gondii*" que proporcionarían materia prima más segura para la elaboración de jamón curado.

2- *Toxoplasma gondii* en tejidos frescos

2.1- Resultados

2.1.1- *T. gondii* en tejidos frescos

La presencia de *T. gondii* se confirmó en los tejidos de 28 de los 38 cerdos seropositivos analizados (73,7 %) (Tabla 7). Los tejidos positivos procedieron de 2 cerdos con un título de 1:20, 3 con un título de 1:40, 15 con un título de 1:80 y 8 con un título de 1:160. En los tejidos de los tres cerdos utilizados como controles negativos no se detectó el parásito. Con el bioensayo en ratón se detectó un mayor número de animales con *T. gondii* en sus tejidos que mediante la qPCR aplicada al extracto de la digestión (28 vs. 18). Los títulos serológicos de los ratones que presentaron respuesta serológica estuvieron comprendidos entre 1:10 y 1:320. Los valores de Ct obtenidos de los extractos mediante qPCR se encontraron entre 34,42 y 37,38, que correspondieron a unas cargas parasitarias de entre 16,7 y 127,3 parásitos/g.

El análisis estadístico de los resultados demostró que existía una relación estadísticamente significativa entre los títulos serológicos de los cerdos y la presencia del parásito en tejidos frescos ($p < 0,001$). Los cerdos con un título serológico mayor o igual a 1:80 tenían una mayor probabilidad estadística de contener parásitos en sus tejidos que los animales con títulos menores a 1:80 (95,8 % vs. 35,7 %).

Con respecto a la viabilidad de *T. gondii* en tejidos frescos, se detectaron parásitos viables en 16 cerdos, lo que representó el 42,1 % de los 38 animales analizados y el 57,1 % si solo se contabilizan los 28 animales en los que previamente se había detectado el parásito (Tabla 7).

En ninguno de los tejidos de los cerdos utilizados como controles negativos se detectaron parásitos viables. Las cargas parasitarias obtenidas de los cerebros de los ratones se situaban entre 12 y 327,3 parásitos/g, que correspondieron a valores de Ct de entre 33,06 y 37,83. Asimismo, el análisis estadístico de los resultados confirmó que había una relación estadísticamente significativa entre los títulos serológicos de los cerdos y la viabilidad del parásito en sus tejidos ($p = 0,003$). Los cerdos con un título serológico mayor o igual a 1:80 tienen una mayor probabilidad de contener parásitos viables en sus tejidos que los cerdos con títulos menores de 1:80 (62,5 % vs. 7,1 %).

Tabla 7: Presencia y viabilidad de *T. gondii* en tejidos frescos.

Cerdo	Presencia		Viabilidad ^c
	Bioensayo ^a	qPCR ^b	
Controles negativos			
1	0/16	0/2	0/0
2	0/16	0/2	0/0
3	0/16	0/2	0/0
Títulos 1:20 - 1:40			
4	3/16 (1:10 - 1:40)	1/2 34,5 ± 0,25 (118)	0/3
5	1/16 (1:10)	0/2	0/1
6	0/16	0/2	0/0
7	0/16	0/2	0/0
8	1/16 (1:80)	1/2 36,84 ± 0,12 (24,0)	0/1
9	4/16 (1:10 - 1:20)	0/2	2/4 35,26 ± 0,21 (71,3) 36,21 ± 0,47 (36,7)
10	0/16	0/2	0/0
11	0/16	0/2	0/0
12	1/16 (1:20)	0/2	0/0
13	0/16	0/2	0/0
14	0/16	0/2	0/0
15	0/16	0/2	0/0
16	0/16	0/2	0/0
17	0/16	0/2	0/0
Títulos 1:80 - 1:160			
18	11/16 (1:10 - 1:160)	0/2	3/11 36,33 ± 0,23 (33,9) 34,88 ± 0,66 (92,6) 35,75 ± 0,10 (50,6)
19	13/16 (1:10 - 1:320)	0/2	6/13 35,80 ± 0,34 (49,2) 35,92 ± 0,51 (45,3) 36,09 ± 0,19 (40,1) 34,76 ± 0,39 (100,7) 34,45 ± 0,53 (125,3)
20	11/16 (1:10 - 1:80)	1/2 37,38 ± 0,45 (16,7)	2/11 35,48 ± 0,62 (61,4) 36,92 ± 0,82 (22,6)
21	12/16 (1:10 - 1:320)	1/2 34,45 ± 0,26 (124,7)	1/12 37,11 ± 0,07 (19,3)
22	11/16 (1:10 - 1:20)	0/2	3/11 34,44 ± 0,48 (126) 35,53 ± 0,96 (58,6) 35,56 ± 0,18 (58,0)

Tabla 7: Presencia y viabilidad de *T. gondii* en tejidos frescos (continuación).

Cerdo	Presencia		Viabilidad ^c
	Bioensayo ^a	qPCR ^b	
Títulos 1:80 - 1:160			
23	6/16 (1:10 - 1:40)	0/2	4/6 33,44 ± 0,20 (250,7) 34,68 ± 0,46 (106) 34,05 ± 0,75 (165,5) 33,83 ± 0,13 (193)
24	13/16 (1:10 - 1:40)	1/2 36,29 ± 0,51 (34,7)	2/5 37,51 ± 0,64 (15) 36,56 ± 0,47 (29,3)
25	10/16 (1:10 - 1:40)	1/2 35,98 ± 0,23 (43,3)	3/10 35,90 ± 0,45 (45,9) 35,54 ± 0,34 (58,9) 37,29 ± 0,49 (17,3)
26	10/16 (1:10 - 1:20)	1/2 35,66 ± 0,71 (54)	5/10 34,5 ± 0,65 (120,7) 33,06 ± 0,09 (327,3) 34,55 ± 0,48 (116,6) 33,93 ± 0,42 (179,3) 34,36 ± 0,25 (132,6)
27	8/16 (1:10 - 1:20)	1/2 34,42 ± 0,37 (127,3)	2/8 36,72 ± 0,87 (25,9) 35,37 ± 0,33 (65,9)
28	5/16 (1:10 - 1:20)	1/2 35,92 ± 0,52 (45,3)	0/5
29	12/16 (1:10 - 1:40)	1/2 34,61 ± 0,14 (112)	3/12 34,33 ± 0,39 (136) 35,29 ± 0,52 (70) 36,17 ± 0,24 (37,9)
30	8/16 (1:10 - 1:20)	2/2 34,78 ± 0,22 (99,3) 37,05 ± 0,29 (20,7)	3/8 37,27 ± 0,63 (17,7) 35,12 ± 0,18 (78,7) 35,07 ± 0,79 (81,3)
31	9/16 (1:10 - 1:40)	2/2 36,27 ± 0,39 (35,3) 36,85 ± 0,56 (23,3)	2/9 36,35 ± 0,50 (33,5) 36,1 ± 0,70 (39,3)
32	12/16 (1:10 - 1:40)	1/2 35,28 ± 0,52 (70,1)	0/12
33	6/16 (1:10 - 1:20)	2/2 36,89 ± 0,40 (23) 37,13 ± 0,34 (19,3)	3/6 37,48 ± 0,43 (15,3) 36,66 ± 0,17 (27) 36,73 ± 0,36 (25,7)
34	2/16 (1:10 - 1:80)	0/2	1/2 37,83 ± 0,13 (12,0)
35	0/16	0/2	0/0
36	4/16 (1:10 - 1:80)	0/2	0/4
37	1/16 (1:20)	1/2 36 ± 0,64 (42,7)	0/1

Tabla 7: Presencia y viabilidad de *T. gondii* en tejidos frescos (continuación).

Cerdo	Presencia		Viabilidad ^c
	Bioensayo ^a	qPCR ^b	
Títulos 1:80 - 1:160			
38	1/16 (1:40)	1/2 36,76 ± 0,14 (25,2)	0/1
39	2/16 (1:40)	2/2 36,77 ± 0,35 (25) 35,25 ± 0,68 (72,0)	0/2
40	3/16 (1:10 - 1:80)	2/2 36,89 ± 0,40 (23) 36,36 ± 0,41 (33,3)	0/3
41	3/16 (1:10 - 1:20)	0/2	0/3
Total^d	28/38	18/38	16/38

^a Ratones seropositivos por IFI / Total de ratones inoculados. (Rango de títulos serológicos de los ratones)

^b Presencia mediante qPCR/número de tejidos analizados. Valores de Ct (parásitos / g).

^c Cerebro positivo mediante qPCR / Total de ratones seropositivos por IFI. Valores de Ct (parásitos / g).

^d Muestras positivas / Cerdos seropositivos totales.

2.1.2- *T. gondii* en pernil vs. órganos diana

Los resultados obtenidos tras el análisis de ambos tejidos por separado se presentan en la Tabla 8. En los pernils se detectó el parásito en 26 de los 38 cerdos analizados (68,4 %). Concretamente, en 1 pernil procedente de un cerdo con un título serológico de 1:20, 3 con titulación 1:40, en 16 pernils procedentes de cerdos con titulación 1:80 y en 6 pernils de cerdos con un título 1:160. No se detectó el parásito en los pernils de los cerdos controles negativos. El bioensayo en ratón detectó un mayor número de animales con *T. gondii* en sus pernils que la qPCR aplicada al extracto de la digestión (20 vs. 14). Los títulos de los ratones seropositivos se situaron entre 1:10 y 1:180. Los ciclos (Ct) obtenidos en los extractos mediante qPCR se situaron entre 34,45 y 36,89 que indicaron a una carga parasitaria de 23 a 124,7 parásitos/g. El análisis estadístico de los resultados demostró que existía una relación estadísticamente significativa entre los títulos serológicos de los cerdos y la presencia del parásito en el pernil ($p < 0,001$). Los cerdos con títulos serológicos mayores o iguales a 1:80 tenían una mayor probabilidad estadística de contener parásitos en sus pernils que los animales con títulos menores a 1:80 (91,7 % vs. 28,6 %).

En los órganos diana se detectó el parásito en 27 de los 38 cerdos analizados (71,1 %). Los órganos diana procedían de un cerdo de título 1:20, 3 con una titulación 1:40, 15 de 1:80 y 8 con un

título 1:160. En ninguno de los cerdos utilizados como control negativo se observó el parásito en sus órganos diana. El bioensayo en ratón detectó un mayor número de animales con *T. gondii* en sus órganos diana que la qPCR aplicada al extracto de la digestión (26 vs. 9). Los títulos de los ratones que tuvieron seroconversión se situaron entre 1:10 y 1:320. Los valores de Ct de la qPCR realizada a las muestras de órganos diana se situaron entre 35,25 y 37,38 lo que correspondió a una carga parasitaria de 6,76 a 72 parásitos/g. El análisis estadístico de los resultados demostró que existía una relación estadísticamente significativa entre los títulos serológicos de los cerdos y la presencia del parásito en los órganos diana ($p < 0,001$). Los cerdos con títulos serológicos mayores o iguales a 1:80 tenían una mayor probabilidad estadística de contener parásitos en sus órganos diana que los animales con títulos menores a 1:80 (95,8 % vs. 28,6 %).

Tras realizar el análisis comparativo de la presencia de *T. gondii* entre los dos tipos de tejidos (pernil vs. órganos diana), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los resultados obtenidos.

En relación a la viabilidad de *T. gondii* en los pernils se detectaron parásitos viables en 12, que representaron el 31,6 % de los 38 pernils analizados o el 46,2 % si solo se contabilizan los 26 en los que previamente se había detectado el parásito. Los parásitos viables se detectaron en 7 cerdos con un título serológico de 1:80 y 5 animales con un título de 1:160. Se obtuvieron resultados negativos en los cerdos utilizados como controles. Los valores de qPCR (Ct) obtenidos de los cerebros de los ratones inoculados se situaban entre 34,33 y 37,48, que supone unas cargas parasitarias de 15,3 a 136 parásitos/g. El análisis estadístico de los resultados confirmó que había una relación estadísticamente significativa entre los títulos serológicos de los cerdos y la presencia de parásitos viables en sus pernils ($p = 0,003$). Los cerdos con un título serológico mayor o igual a 1:80 tienen una mayor probabilidad de contener parásitos viables en sus pernils (50 %) que los cerdos con títulos menores de 1:80, en los que no se encontró ningún tejido con *T. gondii* viable.

En los órganos diana se detectaron parásitos viables en 11 cerdos, que supone el 29,0 % de los 38 cerdos analizados o el 40,7 % si solo se contabilizan los 27 animales en los que previamente se había detectado el parásito. Los órganos diana con parásitos viables procedían de un cerdo con un título serológico de 1:40, 7 cerdos con título 1:80 y 3 animales con título 1:160. Se obtuvieron resultados negativos en los cerdos utilizados como controles. Las cargas parasitarias obtenidas

en los cerebros de los ratones inoculados se situaban entre 16,7 y 72 parásitos/g, que se corresponden con valores de Ct de entre 35,25 y 37,38. El análisis estadístico de los resultados confirmó que había una relación estadísticamente significativa entre los títulos serológicos de los cerdos y la presencia de parásitos viables en sus órganos diana ($p < 0,001$). Los cerdos con un título serológico mayor o igual a 1:80 tienen una mayor probabilidad de contener parásitos viables en sus órganos diana que los cerdos con títulos menores de 1:80 (41,7 % vs. 7,1 %).

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis comparativo de la viabilidad de *T. gondii* observada entre pernils y órganos diana ($p > 0,05$).

Tabla 8: Presencia y viabilidad de *T. gondii* en pernil y órganos diana.

Cerdo	Pernil			Órganos diana		
	Presencia		Viabilidad ^c	Presencia		Viabilidad ^c
	Bioensayo ^a	qPCR ^b		Bioensayo ^a	qPCR ^b	
Controles negativos						
1	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
2	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
3	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
Títulos 1:20 - 1:40						
4	0/8	34,5 ± 0,25 (118)	0/0	3/8 (1:10 - 1:40)	-	0/3
5	1/8 (1:10)	-	0/1	0/8	-	0/0
6	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
7	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
8	1/8 (1:80)	-	0/1	0/8	36,84 ± 0,12 (24,0)	0/0
9	2/8 (1:10)	-	0/2	2/8 (1:20)	36,84 ± 0,12 (24,0)	2/2 35,26 ± 0,21(71,3) 36,21 ± 0,47 (36,7)
10	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
11	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
12	0/8	-	0/0	1/8 (1:20)	-	0/1
13	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
14	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
15	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
16	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
17	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0

Tabla 8: Presencia y viabilidad de *T. gondii* en pernil y órganos diana (continuación).

Cerdo	Pernil			Órganos diana		
	Presencia		Viabilidad ^c	Presencia		Viabilidad ^c
	Bioensayo ^a	qPCR ^b		Bioensayo ^a	qPCR ^b	
Títulos 1:80 - 1:160						
18	5/8 (1:10)	-	0/5	6/8 (1:10 - 1:160)	-	3/6 36,33 ± 0,23 (33,9) 34,88 ± 0,66 (92,6) 35,75 ± 0,10 (50,6)
19	7/8 (1:10)	-	3/7 35,80 ± 0,34 (49,2) 35,92 ± 0,51 (45,3) 36,09 ± 0,19 (40,1)	6/8 (1:10 - 1:320)	-	3/6 34,76 ± 0,39 (100,7) 34,45 ± 0,53 (125,3) 34,88 ± 0,72 (93,3)
20	4/8 (1:10)	-	2/4 35,48 ± 0,62 (61,4) 36,92 ± 0,82 (22,6)	7/8 (1:10 - 1:80)	37,38 ± 0,45 (16,7)	0/7
21	4/8 (1:10)	34,45 ± 0,26 (124,7)	0/4	8/8 (1:10 - 1:320)	-	1/8 37,11 ± 0,07 (19,3)
22	3/8 (1:10)	-	1/3 34,44 ± 0,48 (126)	8/8 (1:10 - 1:20)	-	2/8 35,53 ± 0,96 (58,6) 35,56 ± 0,18 (58,0)
23	5/8 (1:10)	-	4/5 33,44 ± 0,20 (250,7) 34,68 ± 0,46 (106) 34,05 ± 0,75 (165,5) 33,83 ± 0,13 (193)	1/8 (1:10 - 1:40)	-	0/1
24	4/8 (1:10)	34,45 ± 0,26 (124,7)	0/4	8/8 (1:10 - 1:320)	-	1/8 37,11 ± 0,07 (19,3)
25	4/8 (1:10 - 1:20)	-	2/4 35,90 ± 0,45 (45,9) 35,54 ± 0,34 (58,9)	6/8 (1:10 - 1:40)	35,98 ± 0,23 (43,3)	1/6 37,29 ± 0,49 (17,3)
26	5/8 (1:10 - 1:20)	35,66 ± 0,71 (54)	1/5 34,5 ± 0,65 (120,7)	5/8 (1:10 - 1:20)	-	4/5 33,06 ± 0,09 (327,3) 34,55 ± 0,48 (116,6) 33,93 ± 0,42 (179,3) 34,36 ± 0,25 (132,6)
27	4/8 (1:10)	34,42 ± 0,37 (127,3)	1/4 36,72 ± 0,87 (25,9)	4/8 (1:10 - 1:20)	-	1/4 35,37 ± 0,33 (65,9)
28	2/8 (1:10 - 1:20)	35,92 ± 0,52 (45,3)	0/2	3/8 (1:10 - 1:20)	-	0/3
29	6/8 (1:10 - 1:20)	34,61 ± 0,14 (112)	3/6 34,33 ± 0,39 (136) 35,29 ± 0,52 (70) 36,17 ± 0,24 (37,9)	6/8 (1:10 - 1:40)	-	0/6
30	5/8 (1:10)	34,78 ± 0,22 (99,3)	3/5 37,27 ± 0,63 (17,7) 35,12 ± 0,18 (78,7) 35,07 ± 0,79 (81,3)	3/8 (1:10 - 1:20)	37,05 ± 0,29 (20,7)	0/3

Tabla 8: Presencia y viabilidad de *T. gondii* en pernil y órganos diana (continuación).

Cerdo	Pernil			Órganos diana		
	Presencia		Viabilidad ^c	Presencia		Viabilidad ^c
	Bioensayo ^a	qPCR ^b		Bioensayo ^a	qPCR ^b	
Títulos 1:80 - 1:160						
31	5/8 (1:10 - 1:20)	36,27 ± 0,39 (35,3)	1/5 36,35 ± 0,50 (33,5)	4/8 (1:10 - 1:40)	36,85 ± 0,56 (23,3)	1/4 36,1 ± 0,70 (39,3)
32	6/8 (1:10)	35,28 ± 0,52 (70,1)	0/6	6/8 (1:10 - 1:40)	-	0/6
33	3/8 (1:10 - 1:20)	36,89 ± 0,40 (23)	3/3 37,48 ± 0,43 (15,3) 36,66 ± 0,17 (27) 36,73 ± 0,36 (25,7)	3/8 (1:10 - 1:20)	37,13 ± 0,34 (19,3)	0/3
34	0/8	-	0/0	2/8 (1:10 - 1:80)	-	1/2 37,83 ± 0,13 (12,0)
35	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0
36	1/8	-	0/1	3/8 (1:10 - 1:80)	-	0/3
37	0/8	36 ± 0,64 (42,7)	0/0	1/8 (1:20)	-	0/1
38	0/8	36,76 ± 0,14 (25,2)	0/0	1/8 (1:40)	-	0/1
39	0/8	36,77 ± 0,35 (25)	0/0	2/8 (1:40)	35,25 ± 0,68 (72,0)	0/2
40	0/8	36,89 ± 0,40 (23)	0/0	3/8 (1:10 - 1:80)	36,36 ± 0,41 (33,3)	0/3
41	1/8 (1:10)	-	0/1	2/8 (1:10 - 1:20)	-	0/2
Total^d		26/38	12/38		27/38	11/38

^a Ratones seropositivos por IFI / Total de ratones inoculados. (Rango de títulos serológicos de los ratones)

^b Presencia mediante qPCR/número de tejidos analizados. Valores de Ct (parásitos / g).

^c Cerebro positivo mediante qPCR / Total de ratones seropositivos por IFI. Valores de Ct (parásitos / g).

^d Muestras positivas / Cerdos seropositivos totales.

2.2- Discusión

La carne de cerdo está considerada como una de las fuentes de infección de *T. gondii* más importantes para el hombre (Tenter, Heckeroth y Weiss, 2000; Dubey et al., 2002; Dubey, 2009). En el presente estudio, se detectó *T. gondii* en tejidos del 73,7 % de los cerdos analizados y se confirmó su viabilidad en el 42,1 % de los mismos. Todos los cerdos en los que se detectó el parásito eran seropositivos y se observó que tanto la presencia del parásito como su viabilidad aumentaban a

medida que lo hacía el título de anticuerpos de los cerdos.

Este estudio es el primero en España que analiza la presencia y viabilidad de *T. gondii* en tejidos frescos porcinos. Solo se conoce un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación en carne de cerdo obtenida de tiendas de la ciudad de Zaragoza, en el que se determinó una prevalencia del 8 % y una viabilidad del 0 %, aunque en este caso se desconocían los títulos serológicos de los cerdos (Bayarri et al., 2012).

Se han detectado parásitos viables en tejidos frescos de cerdos en otros países de Europa en los que se observaron prevalencias que variaron desde el 0,4 % de Austria (Edelhofer, 1994) hasta el 38% de Reino Unido (Aspinall et al., 2002). En otros estudios realizados en América del Sur la viabilidad del parásito se situó entre el 12,8 % y el 55,0 % (Omata et al., 1994; Bezerra et al., 2012), y entre el 51,5 % y el 98 % en cerdos en los EE. UU. (Dubey et al., 1995b, 2012).

El alto porcentaje de viabilidad de *T. gondii* detectado en nuestro estudio (42,1 %) en comparación con otros estudios, puede deberse a que se utilizaron solo cerdos seropositivos. El análisis a partir de tejidos procedentes de cerdos seropositivos aumenta la probabilidad de detectar formas viables del parásito (Dubey, 2009). Nuestro resultado es similar al de otros estudios realizados a partir de tejidos frescos de cerdos seropositivos en los que se ha detectado una viabilidad del parásito del 36,8 % en EE. UU. (Dubey y Jones, 2008), en Portugal del 40,5 % (de Sousa et al., 2006) o en Brasil del 47,2 % (Cademartori et al., 2014). Sin embargo, es superior al realizado en Brasil del 25 % por dos Santos et al. (2005).

La discrepancia entre los datos obtenidos en presencia (73,7 %) y viabilidad (42,1 %) en nuestro estudio se puede deber a que tanto la serología de los ratones como los datos obtenidos a partir del análisis molecular de los extractos detectaron las formas viables así como no viables de *T. gondii*, lo que podría suponer una sobreestimación de la infección. En este sentido el bioensayo en ratón detectó mejor la presencia del parásito que la técnica de qPCR, no en vano es considerada la prueba de oro. Los métodos moleculares generalmente se consideran menos sensibles que el bioensayo en ratón, ya que utilizan una cantidad de tejido significativamente menor para el análisis (Schaes et al., 2018). Estas variaciones en los resultados de presencia y viabilidad pudieron deberse a que las muestras de tejido de cerdos infectados utilizados contenían parásitos no viables (Dubey et al., 1995a). Asimismo, la digestión péptica de los tejidos es otro factor

que podría influir en esta variación de resultados, ya que podría reducir la viabilidad de *T. gondii* (Dubey et al., 1995b; Mendonça et al., 2004; Dubey, 2010). Igualmente, aunque *T. gondii* se detecta principalmente en el cerebro (Dubey, 2009; Burrells et al., 2015), en algunas cepas como la GT-1 el parásito tiene predilección por el pulmón y puede detectarse en esa localización de forma más fácil que en el cerebro (Dubey, 2009; Dubey, 2010; Burrells et al., 2015).

Los títulos serológicos obtenidos en los ratones de los bioensayos fueron bajos (1:10 - 1:320), similares a los obtenidos por otros autores en sus estudios como Papini et al. (2017). Al igual que los resultados serológicos, los valores obtenidos por qPCR a partir de los extractos de la digestión y de los cerebros indican una carga parasitaria baja en los tejidos analizados (valores de Ct 34,42 - 37,38 correspondientes a un valor medio de <69,44 parásitos/gramo de tejido). A pesar de que se hayan obtenido cargas parasitarias bajas, la detección de parásitos viables en las diferentes muestras, representan un riesgo real para los consumidores (Dubey, 2010). La transmisión de *T. gondii* también está asociado con los hábitos de los consumidores, ya que según una encuesta de 2007 en EE. UU., aproximadamente el 9 % de los consumidores cocinaron carne de cerdo a una temperatura inferior a 48 °C (EcoSure, 2008), lo que pudo no ser suficiente para inactivar los quistes de *T. gondii*. Según algunos autores, los parásitos se inactivan con temperaturas de 61 °C o superiores aplicándolas durante un mínimo de 3,6 minutos (Dubey et al., 1990; Gamble, 1997; El-Nawawi, Tawfik y Shaapan, 2008). En cualquier caso es imprescindible que el consumidor reciba información adecuada y aplique medidas tecnológicas complementarias para eliminar el parásito, como el cocinado o el congelado.

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue comparar los resultados de los títulos serológicos porcinos con la presencia y viabilidad de *T. gondii* en sus tejidos. Aunque se han realizado varios estudios serológicos en cerdos en España (García-Bocanegra et al., 2010a, c), ninguno hasta la fecha había relacionado los títulos serológicos con la presencia y viabilidad del parásito en la carne. En general, la seropositividad es un buen indicador de la presencia y viabilidad del parásito en los tejidos (Dubey et al., 1995b, 2002; Dubey and Jones, 2008) y algunos autores afirman que el nivel de detección aumenta con el título de anticuerpos en el cerdo (Dubey et al., 1995b). Asimismo, teniendo en cuenta la ecología de la infección por *T. gondii* y la formación de quistes tisulares como una causa de la respuesta inmunológica, se podría presuponer que los animales seropositivos tendrán un mayor nivel de quistes tisulares (Dubey, 2009). Sin embargo, la presen-

cia de *T. gondii* en los distintos tejidos puede depender de la duración de la infección. Verhelst et al. (2011) observaron que se producía la eliminación del parásito en tejidos porcinos después de 6 meses de infección experimental. No obstante, en ocasiones el parásito no se aísla a pesar de usarse animales seropositivos (Gajadhar et al., 1998) y en otros casos el título serológico que sería indicativo de infección latente no siempre está asegurado ya que se han aislado parásitos viables de animales seronegativos (Hejlíček y Literák, 1994; Omata et al., 1994; Dubey et al., 1995b, 2002; de Sousa et al., 2006). En este sentido, Hill, Chirukandoth y Dubey (2005) sugirieron que la seroconversión puede ser independiente de la carga parasitaria y, en algunos estudios, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de los animales analizados y la detección del parásito en tejidos de ratones (dos Santos et al., 2005). En nuestro estudio, sí que se detectó una relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los títulos serológicos de cerdos y la presencia y viabilidad de *T. gondii* en los tejidos frescos. Siendo este trabajo por lo que sabemos, el primer estudio realizado en España en el que se correlacionan la seroprevalencia en los cerdos con la detección de *T. gondii* en tejidos frescos porcinos utilizando bioensayo en ratón para evaluar el riesgo de la infección. Hemos observado que hay mayor probabilidad de detectar formas viables de *T. gondii* en tejidos de cerdos con títulos mayores o iguales a 1:80. Este hecho podría utilizarse para identificar a los cerdos que presenten un mayor riesgo. Actualmente, la inspección de carne en el matadero no detecta la presencia de *T. gondii*, por lo que el análisis del título serológico de los animales podría usarse como una herramienta de control eficaz para la industria de productos cárnicos al utilizarse este valor (título \geq 1:80) como un límite crítico en el sistema APPCC de las empresas.

T. gondii tiene alta afinidad por los tejidos neuronales y musculares incluyendo el cerebro, los ojos y los músculos esqueléticos y cardíacos (Dubey et al., 1986, 1998b, 2009; Juránková et al., 2014; Guo et al., 2015b). Según un estudio de la EFSA, el cerebro y el corazón son los mejores órganos diana para detectar la presencia del parásito en las canales de los cerdos, seguidos de la lengua, el diafragma y el resto de musculatura estriada (Opsteegh et al., 2016).

Aunque existen pocos estudios que analicen la presencia del parásito en muestras de pernil, se observa en general, una baja detección de *T. gondii* incluso en los perniles procedentes de cerdos sometidos a una infección experimental (Juranková et al., 2014). La presencia del parásito en pernil obtenida en este estudio (68,4 %) es mucho más elevada que la obtenida por otros autores

que han utilizado pernils procedentes de cerdos de infección natural, como el 2,1 % obtenido en México (Galván-Ramírez et al., 2010), el 7,1 % detectado en China (Wang et al., 2012b), el 8,7 % de muestras procedentes de Brasil (Dias et al., 2005) o el 38 % de Reino Unido (Aspinall et al., 2002). En relación a los análisis de viabilidad (31,6 %), hay muy poca información respecto a este parámetro en muestras de pernil (Opsteegh et al., 2016). Alves et al. (2019) realizaron una infección experimental a tres cerdos de engorde y posteriormente realizaron bioensayos en ratón con diferentes músculos que componen el pernil (glúteo medio, bíceps femoral y semimembranoso). Encontraron parásitos viables en 1 de los 3 glúteos medios, en 2 de los 3 bíceps femorales y en ninguno de los músculos semimembranosos.

Respecto a la presencia del parásito en órganos diana, aunque fue elevada (71,1 %), algunos autores como Dubey et al. (2012) obtuvieron valores superiores al determinar la presencia del parásito en el 90,9 % de corazones procedentes de granjas de EE. UU. En el caso de estudios en los que se evaluó la viabilidad, algunos autores han obtenido valores muy similares a los obtenidos por nosotros, como el 25 % procedente de una mezcla de corazón, cerebro y lengua (dos Santos et al., 2005), o el 31,8 % analizado a partir de una mezcla de corazón, cerebro y lengua (Ferreira et al., 2014). Sin embargo, también se han publicado cifras más elevadas como el 38% de una mezcla de corazones y cerebros (Cademartori et al., 2014), el 45,4 % en muestras de corazones (Papini et al., 2017), el 50 % de muestras de cerebro (Frazão-Teixeira et al., 2006) o el 51,5 % en corazones de cerdos de granjas orgánicas (Dubey et al. 2012).

Existen pocos estudios que han comparado ambos tejidos (pernil y órganos diana). No hemos detectado diferencias estadísticamente significativas ni en la presencia (68,4 % vs. 71,1 %) ni en la viabilidad (31,6 % vs. 29,0 %) entre ambos tejidos. Papini et al. (2017) obtuvieron resultados similares entre la presencia del parásito en tejido muscular (54,5 %) y en corazones (45,4 %). Sin embargo, Verhelst et al. (2011), obtuvieron valores superiores de presencia y viabilidad en órganos diana que en pernils.

Por otra parte, aunque las cargas parasitarias han sido bajas, suponen un riesgo para el consumidor (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005; Guo et al., 2015a). En pernils, se han obtenido cargas parasitarias de 23 a 124,7 parásitos/g. Dzib-Paredes et al. (2016) estimaron unas cargas parasitarias menores a las nuestras, entre 0,456 y 5,580 parásitos/g. Asimismo,

Juránková et al. (2014) detectaron valores inferiores. En las muestras de órganos diana, nuestras cargas parasitarias se situaron entre 6,76 y 72 parásitos/g. Opsteegh et al. (2010) obtuvieron cargas parasitarias similares a las obtenidas por nosotros, 52 parásitos/g en corazones o 44 parásitos/g en lenguas, aunque en cerebro la carga parasitaria era muy superior (1.234 parásitos/g). Juránková et al. (2014) obtienen una carga parasitaria media muy inferior de 0,2 parásitos/g. Sin embargo, detectaron valores medios muy altos en muestras de cerebro de 553,7 parásitos/g. Por otro lado, Bamba et al. (2016) obtuvieron valores más altos en corazón a los obtenidos en nuestro estudio con cargas parasitarias de 64 a 128 parásitos/mg. En nuestro trabajo no se han utilizado las muestras de cerebro de los cerdos debido a la complicación en su extracción.

Bier et al., (2019) señalan que de los resultados obtenidos por los diversos autores no se puede realizar una correcta comparación debido a la falta de estandarización de las técnicas utilizadas y a la gran variabilidad en los métodos de detección molecular.

En el estudio comparativo del presente trabajo, se ha observado que no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia ni a la viabilidad de *T. gondii* entre el pernil y los órganos diana. En consecuencia, ambos tejidos pueden ser utilizados de forma similar para la detección del parásito en los tejidos frescos porcinos así como para determinar su viabilidad. Podría ser una buena opción utilizar los órganos diana para el análisis de *T. gondii* dentro de un sistema de vigilancia y monitorización ya que poseen un menor precio de mercado. El análisis de los órganos diana de los cerdos se podría utilizar como herramienta de control del parásito en los mataderos, principalmente en los animales cuyos tejidos estén destinados a la elaboración de productos curados.

3- Influencia del proceso tecnológico del curado en *Toxoplasma gondii*

3.1- Resultados

3.1.1- *T. gondii* en el jamón curado

Tras la realización del proceso tecnológico de curado, de los 26 perniles en los que se había confirmado la presencia de *T. gondii* en fresco, el parásito fue detectado en 11 jamones curados (42,3 %) (Tabla 9). El bioensayo en ratón detectó un mayor número de jamones con *T. gondii* que la qPCR aplicada al extracto de la digestión (7 vs. 5). Los títulos serológicos de los ratones que

presentaron respuesta serológica estuvieron comprendidos entre 1:10 y 1:20. Y los ciclos (Ct) de qPCR de los extractos se situaron entre 35,06 y 36,85 indicando a una carga parasitaria de 23,3 a 82 parásitos/g.

La viabilidad del parásito en los jamones se detectó en 4 de los 26 pernils con presencia del parásito en fresco (15,4 %) (Tabla 9). Las cargas parasitarias en los cerebros se situaron entre 42 y 153,3, correspondientes a valores de Ct entre 34,15 y 36,02. El proceso de curado fue eficaz sobre *T. gondii*, ya que se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en los datos de presencia y viabilidad entre los pernils y los jamones curados. En las piezas utilizadas como control negativo no se detectó el parásito.

En cuanto al tiempo de curación de los jamones (9 y 12 meses), la presencia de *T. gondii* es bastante similar en ambos tiempos de curado y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Se detectó el parásito en 6 de los 21 jamones curados durante 9 meses (28,6 %) y en 5 de los 17 jamones curados de 12 meses (29,4 %), excluyendo los controles negativos. En cuanto a la viabilidad, ésta fue mayor en los jamones con un tiempo de curación de 9 meses en comparación a los de 12 meses. Se confirmó la viabilidad de *T. gondii* en 3 de los 21 jamones curados a 9 meses (14,3 %) y en 1 de los 17 jamones con un periodo de curación de 12 meses (5,9%), excluyendo los controles negativos. En relación a las muestras en las que se había detectado previamente el parásito, éste permaneció viable en 3 de los 6 jamones positivos curados durante 9 meses y en uno de los 4 jamones curados durante 12 meses.

Tabla 9: *T. gondii* en pernils y jamones curados.

Cerdo	Pernil			Jamón curado			
	Presencia		Viabilidad ^c	Presencia		Viabilidad ^c	Meses de curación
	Bioensayo ^a	qPCR ^b		Bioensayo ^a	qPCR ^b		
Lote 1, Controles negativos (Títulos <1:20)							
1	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
2	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
3	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
Lote 2 (Títulos 1:20 a <1:80)							
4	0/8	34,5 ± 0,25 (118)	0/0	0/8	-	0/0	9
5	1/8	-	0/1	0/8	-	0/0	9
6	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	9
7	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	9
8	1/8	-	0/1	0/8	-	0/0	9
9	2/8	-	0/2	0/8	-	0/0	9

Tabla 9: *T. gondii* en pernils y jamones curados (continuación).

Cerdo	Pernil			Jamón curado			
	Presencia		Viabilidad ^c	Presencia		Viabilidad ^c	Meses de curación
	Bioensayo ^a	qPCR ^b		Bioensayo ^a	qPCR ^b		
10	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
11	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
12	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
13	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
14	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
15	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
16	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
17	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12

Lote 3 (Títulos $\geq 1:80$)

18	5/8	-	0/5	0/4	0/0	0/0	9
19	7/8	-	3/7 35,80 \pm 0,34 (49,2) 35,92 \pm 0,51 (45,3) 36,09 \pm 0,19 (40,1)	0/8	0/0	0/0	9
20	4/8	-	2/4 35,48 \pm 0,62(1)* (61,4) 36,92 \pm 0,82 (22,6)	1/8 (1:10)	-	1/1 34,52 \pm 0,12 (119,3)	9
21	5/8	34,45 \pm 0,26 (124,7)	0/4	0/8	35,12 \pm 0,35 (78,7)	0/0	9
22	3/8	-	1/3 34,44 \pm 0,48 (126)	2/8 (1:10 - 1:20)	36,54 \pm 0,32 (29,3)	2/2 35,02 \pm 0,64 (84) 34,34 \pm 0,21 (134,7)	9
23	6/8	-	4/6 33,44 \pm 0,20 (250,7) 34,68 \pm 0,46 (106) 34,05 \pm 0,75 (165,5) 33,83 \pm 0,13 (193)	0/8	35,61 \pm 0,29 (55,9)	0/0	9
24	5/8	-	1/5 37,51 \pm 0,64 (15)	0/8	-	0/0	9
25	4/8	-	2/4 35,90 \pm 0,45 (45,9) 35,54 \pm 0,34 (58,9)	1/8 (1:10)	-	1/1 34,15 \pm 0,41 (153,3)	9
26	5/8	35,66 \pm 0,71 (54)	1/5 34,5 \pm 0,65 (120,7)	0/8	-	0/0	9
27	4/8	34,42 \pm 0,37 (127,3)	1/4 36,72 \pm 0,87 (25,9)	0/8	-	0/0	9
28	2/8	35,92 \pm 0,52 (45,3)	0/2	0/8	-	0/0	9
29	6/8	34,61 \pm 0,14 (112)	3/6 34,33 \pm 0,39 (136) 35,29 \pm 0,52 (70) 36,17 \pm 0,24 (37,9)	0/8	-	0/0	9
30	8/8	34,78 \pm 0,22 (99,3)	3/8 37,27 \pm 0,63 (17,7) 35,12 \pm 0,18 (78,7) 35,07 \pm 0,79 (81,3)	0/8	-	0/0	9

Tabla 9: *T. gondii* en pernils y jamones curados (continuación).

Cerdo	Pernil			Jamón curado			
	Presencia		Viabilidad ^c	Presencia		Viabilidad ^c	Meses de curación
	Bioensayo ^a	qPCR ^b		Bioensayo ^a	qPCR ^b		
Lote 3 (Títulos ≥1:80)							
31	5/8	36,27 ± 0,39 (35,3)	1/5 36,35 ± 0,50 (33,5)	0/8	36,85 ± 0,84 (23,3)	0/0	9
32	6/8	36,85 ± 0,84 (23,3)	0/6	0/8	-	0/0	9
33	3/8	36,89 ± 0,40 (23)	3/3 37,48 ± 0,43 (15,3) 36,66 ± 0,17 (27) 36,73 ± 0,36 (25,7)	1/8 (1:20)	-	1/1 36,02 ± 0,17 (42)	12
34	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
35	0/8	-	0/0	0/8	-	0/0	12
36	1/8	-	0/1	2/8 (1:10 - 1:20)	-	0/2	12
37	0/8	36 ± 0,64 (42,7)	0/0	0/8	-	0/0	12
38	0/8	36,76 ± 0,14 (25,2)	0/0	1/8 (1:10)	-	0/1	12
39	0/8	36,77 ± 0,35(25)	0/0	1/8 (1:10)	-	0/1	12
40	0/8	36,89 ± 0,40 (23)	0/0	0/8	-	0/0	12
41	1/8	-	0/1	0/8	35,06 ± 0,48 (82)	0/0	12
Total^d		26/38	12/38		11/38	4/38	

^a Ratones seropositivos por IFI / Total de ratones inoculados.

^b Presencia mediante qPCR. Valores de Ct (parásitos / g).

^c Cerebro positivo mediante PCR / Total de ratones seropositivos por IFI. Valores de Ct (parásitos / g).

^d Muestras positivas / Cerdos seropositivos totales.

■ Sombreadas las muestras positivas de pernils y sus correspondientes jamones

3.1.2- Composición fisicoquímica de los jamones curados e influencia sobre *T. gondii*

El peso de los jamones curados se situó entre 5,1 y 10,4 kg, lo que supuso una merma de peso con respecto a los pernils en fresco del 26,8 % al 45,9 %. El valor medio de nitratos fue de 68,3 mg/kg (\pm 15,6 mg/kg) y el de los nitritos de 11,76 mg/kg (\pm 26,81 mg/kg). El valor medio de la humedad fue del 53,7 % (\pm 3,3 %), de la a_w de 0,92 (\pm 0,02), del pH de 5,8 (\pm 0,1), del contenido de NaCl del 3,1 % (\pm 0,5 %), y del porcentaje de grasa del 5,1 % (\pm 1,3 %). Los resultados de los parámetros fisicoquímicos se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Parámetros fisicoquímicos de los jamones curados.

Cerdo	Peso pernil (kg)	Peso jamón curado (kg)	Merma de peso (%)	Nitratos (mg/kg)	Nitritos (mg/kg)	Humedad (%)	a_w	pH	NaCl (%)	Grasa (%)	Meses curado
1	12,98	8,66	33,28	82	74	51,1	0,916	5,80	3,6	4,5	12
2	12,6	8,17	35,16	<50	90	53,2	0,894	5,90	3,7	4,7	12
3	13,16	8,42	36,02	<50	42,6	53,1	0,914	5,85	3,2	5,1	12
4	12,64	8,21	35,05	83	<6	58,0	0,933	5,90	2,5	5,1	9
5	10,57	6,44	39,07	81	<6	55,7	0,945	5,55	3,9	3,4	9
6	13,72	10,05	26,75	48	<6	59,2	0,939	5,80	2,4	5,9	9
7	11,62	7,84	32,53	70	<6	59,1	0,948	5,75	3,4	5,1	9
8	12,3	7,58	38,37	<50	58,6	55,4	0,889	5,85	2,8	4,5	12
9	14,76	10,14	31,30	53	53,8	55,2	0,909	5,95	2,7	5,7	12
10	13,66	8,96	34,41	<50	54,2	55,1	0,897	5,70	2,8	7,4	12
11	14,76	9,8	33,60	<50	79	53,3	0,898	5,80	3,1	5,0	12
12	12,76	8,24	35,42	<50	66	55,1	0,901	5,80	2,6	3,8	12
13	12,9	8,32	35,50	<50	73	54,6	0,902	6,00	2,5	3,9	12
14	12,07	7,05	41,59	74	34,6	50,3	0,893	5,65	3,0	7,3	12
15	14,24	7,83	45,01	<50	63	54,3	0,887	6,05	4,6	3,8	12
16	10,4	6,58	36,73	83	<6	53,0	0,937	5,75	2,9	3,2	9
17	12,2	7,18	41,15	73	<6	49,3	0,948	5,75	3,4	4,9	9
18	11,36	7,11	37,41	77	7,8	53,9	0,934	5,90	2,9	5,3	9
19	11,14	6,67	40,13	81	<6	54,2	0,926	5,95	3,0	5,3	9
20	12,72	7,83	38,44	74	<6	50,5	0,931	6,00	3,4	6,4	9
21	12,01	7,37	38,63	78	<6	53,9	0,940	5,75	2,9	5,2	9
22	12,13	7,72	36,36	82	<6	55,5	0,936	5,65	3,2	6,2	9
23	12,92	8,76	32,20	70	6,7	57,6	0,942	5,75	3,3	5,4	9
24	12,04	8,07	32,97	64	<6	58,6	0,942	5,75	2,7	3,6	9
25	8,59	5,23	39,12	108	<6	49,5	0,932	5,90	3,8	6,4	9
26	14,66	10,36	29,81	52	<6	55,9	0,942	5,80	2,2	5,3	9
27	11,93	8,10	32,10	79	<6	49,7	0,947	5,80	3,3	4,9	9
28	12,2	7,88	35,41	77	10,4	54,3	0,934	5,80	3,1	5,2	9
29	11,09	7,83	29,40	58	24	52,6	0,937	5,95	3,6	5,8	9
30	14,3	9,98	30,21	85	<6	48,5	0,948	5,75	2,3	4,3	9
31	12,86	9,0	30,02	91	<6	59,4	0,949	5,60	2,1	5,4	9
32	15,01	9,97	33,58	59	<6	59,9	0,950	5,75	2,5	3,3	9
33	12,76	8,35	34,56	<50	58,7	52,0	0,903	5,85	2,9	6,3	12
34	12,75	7,35	42,35	92	<6	49,1	0,920	5,80	4,0	4,2	12
35	9,49	5,13	45,94	74	<6	46,3	0,879	5,80	3,9	3,5	12
36	11,48	7,0	39,02	68	<6	54,3	0,918	5,95	3,3	3,8	12
37	12,89	8,46	34,37	69	<6	54,8	0,929	5,90	2,9	3,9	12
38	13,14	8,83	32,80	72	<6	50,2	0,882	5,95	3,1	8,5	12
39	12,05	7,89	34,52	86	<6	54,8	0,925	5,80	2,9	7,5	12
40	11,85	6,78	42,78	84	<6	47,4	0,903	5,90	3,8	3,3	12
41	12,5	8,14	34,88	97	<6	55,4	0,927	5,85	3,0	6	12

Sombreadas las muestras positivas de pernils y sus correspondientes jamones

El análisis estadístico de estos resultados no identificó ninguna variable con influencia significativa en la presencia y viabilidad de *T. gondii* en el jamón curado ($p > 0,05$). Sin embargo, sí que se observó una pérdida de viabilidad del parásito en los jamones curados con un menor contenido en grasa ($p = 0,039$).

3.2- Discusión

La inactivación de *T. gondii* durante el proceso de curado depende de la interacción sinérgica entre la concentración de sal, el tiempo de maduración y la temperatura de almacenamiento (Kijlstra y Jongert, 2008; Mie et al., 2008).

El objetivo principal de esta parte del estudio fue evaluar la eficacia del proceso tecnológico de curado en la inactivación de *T. gondii*. Hemos podido comprobar que la curación produjo un claro efecto en la inactivación del parásito, y se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en la presencia como en la viabilidad de *T. gondii* entre los perniles y los jamones curados. Sin embargo, el proceso de curado no inactivó completamente a *T. gondii* ya que éste se detectó en 11 de los 26 jamones y fue viable en 4 de ellos.

La viabilidad detectada en este trabajo (15,4 %) fue superior a los datos obtenidos previamente por otros autores que se situaban entre el 0 % y el 4,8 % (Warnekulasuriya, Johnson y Holliman, 1998; Bayarri et al., 2012; Gomez-Samblas et al., 2015). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron con muestras comerciales en los cuales no se conocían los títulos serológicos de los cerdos de los que provenían, mientras que todos los animales utilizados en nuestro trabajo eran seropositivos frente a *T. gondii*.

Existen limitaciones para comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores. Además del origen de los animales (infección natural o experimental), los procesos tecnológicos seguidos difieren en algunos pasos. En algunos casos, las piezas son congeladas antes o después del proceso de curación, y sometidas posteriormente a diferentes tiempos de curación. La toma de muestras en nuestro estudio se realizó picando el jamón completo, mientras que en otros casos el muestreo se llevó a cabo tomando pequeños fragmentos de las piezas a lo largo del periodo de estudio (Gomez-Samblas et al., 2016). Asimismo, en algunos trabajos utilizan jamones elaborados siguiendo las normas de algunas DOP, por lo que el proceso de elaboración es

diferente al utilizado en nuestras muestras (Genchi et al., 2017).

Hay muy pocos trabajos en los que se haya estudiado la influencia de proceso de curación en la viabilidad de *T. gondii* en jamones. Algunos estudios indican que la inactivación de *T. gondii* depende del tiempo de curación (Bayarri et al., 2010; Gomez-Samblas et al., 2016; Genchi et al., 2017). En nuestro estudio, hemos observado que la detección de parásitos viables fue mayor en los jamones curados durante 9 meses que en los que se habían procesado durante 12 meses. Genchi et al. (2017), analizaron jamones de Parma con tiempos de curación de 12, 14 y 16 meses, observándose la inactivación del parásito en los tres tiempos de curación. No obstante, hay que tener en cuenta que la elaboración de estos jamones es diferente a los de nuestro estudio, ya que se elaboran bajo las condiciones de su Denominación de Origen. Por otro lado, Gomez-Samblas et al. (2016), indicaron que se había conseguido la pérdida de infectividad de *T. gondii* en los jamones que habían sido procesados durante 5 y 7 meses. Sin embargo, en su estudio tomaron solo 100 g de cada pieza para la realización de los análisis, mientras que en nuestro trabajo se utilizó todo el jamón para tomar una muestra homogénea y representativa del producto. De todos modos, el riesgo de infección por *T. gondii* no solo depende de la viabilidad del parásito, sino también de la cantidad del parásito presente en el jamón curado. En Reino Unido, Warnekulasuriya, Johnson y Holliman, (1998) observaron en muestras de jamón curado concentraciones de *T. gondii* de 5×10^3 parásitos/g. Estos autores concluyeron que se trataba de una concentración suficiente del parásito para causar una infección por el consumo de una ración normal de jamón curado. Los niveles detectados en los jamones curados en nuestro trabajo tuvieron una carga muy inferior a la de este estudio, situándose entre 23,3 y 153,3 parásitos/g. En definitiva, en las condiciones en las que se ha desarrollado el estudio, se produce una reducción del riesgo pero no la completa eliminación, ya que existe la posibilidad de que los jamones curados durante períodos de 9 o 12 meses contengan parásitos viables. Nuestros resultados indican que, desde un punto de vista de seguridad alimentaria es mejor consumir jamón con períodos de curado de más de 12 meses. Además, según los resultados obtenidos por Bayarri et al. (2010), tiempos de curación más largos favorecen la pérdida de viabilidad de *T. gondii*.

Otro objetivo de este estudio fue evaluar si los parámetros fisicoquímicos como la a_w , el contenido de sal (NaCl, nitratos, nitritos), el pH y el contenido de grasa tenían influencia en la supervivencia de *T. gondii*. Cabe destacar, que éste ha sido el primer estudio en el que se ha realizado un amplio

análisis de los parámetros fisicoquímicos del jamón para evaluar su relación con la presencia y viabilidad del parásito en el jamón curado. Trabajos previos de otros autores sobre el efecto de factores fisicoquímicos sobre *T. gondii* carecían o proporcionaban una información limitada (a_w , pH y contenido de NaCl) sobre las características de estos productos cárnicos y su relación con la viabilidad de *T. gondii* en el jamón curado (Neumayerová et al., 2014; Gomez-Samblas et al., 2016; Genchi et al., 2017; Hill et al., 2018).

El aumento de la concentración de sal o de la temperatura de almacenamiento favorecen la inactivación del parásito (Kijlstra y Jongert, 2008; Mie et al., 2008). Sin embargo, se ha observado que el parásito puede sobrevivir al proceso de curación (Warnekulasuriya, Johnson y Holliman, 1998; Gomez-Samblas et al., 2015). Se ha comprobado que el salado no inactiva totalmente a *T. gondii*, ya que se detectaron parásitos viables (4,84 %) en jamones comerciales en un estudio realizado en España (Gomez-Samblas et al., 2015). Sin embargo, la falta de información disponible sobre la concentración de sales, períodos de curado y otros parámetros utilizados en la industria cárnica, así como la a_w y el pH de los productos, hacen que sea difícil evaluar su efecto sobre *T. gondii*.

Con respecto a las sales, el cloruro de sodio se utiliza en el proceso de curado por su efecto sobre el sabor, la a_w y la preservación del producto final. La concentración de sal aumenta en el jamón a lo largo de la maduración debido a la pérdida de agua. El nitrato de sodio y el nitrato de potasio inducen el desarrollo del color en los productos cárnicos y se usan cuando el secado es un proceso a largo plazo. Asimismo, los nitratos también reducen la actividad del agua. Para ser eficaz, la reducción de nitratos a nitritos se tiene que realizar bajo la influencia de enzimas bacterianas, y este proceso consume mucho tiempo. Los nitritos afectan al color y el sabor del producto, ayudando a su conservación (Guo et al., 2015b). Existe todavía poca información sobre el efecto de los nitratos y nitritos en la inactivación de *T. gondii*, pero éstos pueden por sí mismos o en combinación con otros factores, favorecer la reducción de *T. gondii* en el producto final (Mie et al., 2008). La pérdida de viabilidad de *T. gondii* durante el proceso de curado puede deberse a la deshidratación. La pérdida de peso del jamón durante el secado y el aumento en la concentración de cloruro de sodio y otros electrolitos puede influir en la viabilidad de los quistes del parásito (Dubey, 1997; Mie et al., 2008; Sommer et al., 1965; Work, 1968). Asimismo, la acumulación de peróxidos junto con los ácidos grasos libres y en combinación con su efecto detergente (Ventanas, 2001), pueden alterar la membrana de los quistes tisulares y a los bradizoitos en el jamón cura-

do dando como resultado la pérdida de viabilidad del parásito. La deshidratación, un ambiente seco y la acumulación de ácidos grasos libres presentan sus niveles más altos alrededor de los 14 - 15 meses de curación (Mie et al., 2008; Gomez-Samblas et al., 2015). Esto podría explicar la necesidad de someter los jamones a un tiempo de curación mayor de 12 meses para garantizar la inactivación de *T. gondii*.

Bayarri et al. (2010) evaluaron jamones curados elaborados de una forma tradicional e indicaron que una concentración final de sales de curado compuesta por el 3,9 % de NaCl, 25 mg / kg de nitrato y 3 mg / kg de nitrito asociada a un período de curado de 14 meses lograba la inactivación de *T. gondii*. Posteriormente, Gomez-Samblas et al. (2016) estudiaron diferentes tratamientos de curado del jamón junto al proceso de congelación y observaron que el parásito seguía viable después de 5 meses en las muestras con el menor contenido de NaCl y no sometidas a bajas temperaturas. Esta situación puede explicarse con el estudio de Barat et al. (2006), que determinaron que los jamones curados que había sido sometidos a congelación poseían una mayor absorción de sal que los jamones no congelados previamente, ya que la sal húmeda penetra en la pieza más rápido que la sal seca. Por otro lado, Neumayerová et al. (2014) analizaron carne de cabra envasada al vacío y concluyeron que una cantidad inicial de 2,5 % de nitrito de sodio era suficiente para inactivar a *T. gondii* en 14 días, siendo este tiempo mucho más corto que el tiempo de curado habitual. Estos autores también observaron que los siguientes parámetros fisicoquímicos son letales para el parásito: una a_w de $0,960 \pm 0,002$, un contenido en sal de $1,856 \% \pm 0,70 \%$ y un pH de $5,825 \pm 0,008$. Sin embargo, en nuestro estudio detectamos parásitos viables en el producto final con a_w menores (0,903 - 0,936), mayores concentraciones de sal (2,9 % - 3,8 %) y menores valores de pH (5,65 - 6,0). No se encontró relación entre la viabilidad de *T. gondii* y la a_w , el contenido de sal (NaCl, nitrato, nitrito) ni con el pH. Durante el proceso de curación, el pH generalmente disminuye, mientras que la deshidratación se logra manteniendo el producto a una temperatura y una humedad controlada. Es poco probable que la bajada del pH influya en gran medida en la viabilidad del parásito, ya que se ha observado que éste puede resistir a $\text{pH} < 1,0$ (Dubey, 1998). Supuestamente, el alto contenido de sal, el pH y la baja a_w de este producto no son totalmente efectivos frente a *T. gondii*. Cuando los jamones son salados en el secadero, la sal debe ser capaz de penetrar en la carne cruda de manera eficaz, dando como resultado una concentración homogénea letal para el parásito. Sin embargo, puede haber áreas donde las concentraciones de

las sales no se hayan distribuido uniformemente o sean incapaces de ejercer su efecto sobre el parásito al estar protegido por la pared del quiste. Una importante función de la pared del quiste es proteger los bradizoitos de condiciones ambientales severas como la deshidratación (Weiss y Kim, 2007). Además, la grasa puede proteger a los quistes tisulares de los efectos de la sal, y en este sentido, en el presente trabajo se encontró una asociación entre la pérdida de viabilidad de *T. gondii* y una menor concentración de grasa en los jamones. Hasta la fecha no se había publicado ningún estudio sobre este tema.

Una posible limitación de nuestro estudio fue que se utilizaron ambas extremidades traseras de los cerdos, una en fresco y su homóloga para estudiar el proceso de curado, pero no se pudo garantizar que ambas piezas fueran idénticas en cuanto a la carga de *T. gondii*. De hecho, la detección del parásito en una extremidad no garantizó su detección en la otra y la ausencia del parásito en el pernil no aseguró que el jamón curado homólogo estuviera libre del parásito. Esto es especialmente importante en estudios como el nuestro, en el que se han usado animales infectados de forma natural y, especialmente, cuando los niveles de parasitación de los tejidos son bajos.

En definitiva, se observó que el tiempo de curación tiene gran influencia en la supervivencia de los quistes de *T. gondii* en el jamón curado. En los jamones que se curan durante 12 meses se produce una importante reducción del riesgo del parásito, aunque no se consigue la eliminación completa. Por lo tanto, desde un punto de vista de salud pública, teniendo en cuentas las condiciones mostradas de este estudio, es más seguro consumir jamón curado procesado durante tiempos superiores a 12 meses. Además, salvo la grasa, no hubo ninguna variable fisicoquímica que tuviera una relación estadísticamente significativa con la presencia y viabilidad de *T. gondii* en el jamón curado. Por ello, se necesitaría continuar con la investigación en este campo para conseguir validar el uso combinado de sales y del tiempo de curado para que pueda utilizarse como medida preventiva en el sistema APPCC de la industria de elaboración del jamón curado. Asimismo, también se necesitaría desarrollar y estandarizar nuevas técnicas sensibles para detectar parásitos viables en productos curados, con el fin de evitar los procedimientos que requieran el uso de animales de experimentación.

V. CONCLUSIONES



Primera

La seroprevalencia de *Toxoplasma gondii*, en cerdo blanco en la Comunidad Autónoma Aragonesa ha sido del 24,5 % (con un punto de corte de 1:20 mediante IFI). La exposición al parásito en las instalaciones es generalizada y, aunque con alta variabilidad entre las granjas estudiadas, en la casi totalidad de las mismas se detectaron animales seropositivos (96,7 %). Sin embargo, aunque la infección por *Toxoplasma gondii* está extendida, los títulos serológicos porcinos son bajos.

Segunda

La mayor exposición del ganado porcino a *Toxoplasma gondii* está relacionada con pobres prácticas de manejo como son la presencia de gatos dentro o alrededor de las granjas, la presencia de perros alrededor de las instalaciones, la falta de orden y mantenimiento de las granjas, y el no utilizar cebos como sistema de control de roedores. Asimismo, el bajo número de animales en las granjas también supone un factor de riesgo. Por lo tanto, con vistas a reducir el riesgo de infección, la aplicación en las explotaciones de prácticas correctas de higiene puede ayudar a conseguir granjas con prevalencias muy bajas o incluso libres de *Toxoplasma gondii*.

Tercera

Aunque con cargas parasitarias bajas, un elevado número de animales seropositivos contienen quistes viables de *Toxoplasma gondii* en sus tejidos y por lo tanto representan un riesgo para los consumidores. Por ello, es imprescindible que el consumidor reciba información adecuada y aplique medidas tecnológicas apropiadas para eliminar el parásito.

Cuarta

Debido a la mayor probabilidad de detectar formas viables de *Toxoplasma gondii* en los tejidos de los cerdos con títulos serológicos mayores o iguales a 1:80, este título podría permitir discriminar aquellos animales de mayor riesgo. La actual legislación de la Unión Europea no establece criterios específicos para *Toxoplasma gondii* en el control oficial de carnes en matadero, por lo que este título serológico podría usarse como una herramienta de control eficaz para la industria de productos cárnicos y utilizarse como límite crítico en el sistema APPCC de las empresas.

Quinta

Este es el primer estudio en España que relaciona la serología porcina con la presencia y viabilidad de *Toxoplasma gondii* en carne, y responde al requerimiento de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria de obtener datos científicos al respecto.

Sexta

Tanto el pernil como los órganos diana pueden ser utilizados indistintamente para la detección de *Toxoplasma gondii* en los tejidos frescos porcinos, así como para determinar su viabilidad. Por ello, y con el fin de no depreciar el valor de los perniles, el análisis de los órganos diana porcinos se podría utilizar como herramienta de control en los mataderos, principalmente en los animales cuyos tejidos estén destinados a la elaboración de productos cárnicos curados.

Séptima

El proceso de curación, realizado en las condiciones de este estudio, influye en la viabilidad de *Toxoplasma gondii*, pero no inactiva completamente al parásito. Con ambos periodos de curación, 9 y 12 meses, se consigue una reducción pero no una eliminación del riesgo. Por ello, y desde un punto de vista de salud pública, no se recomienda el consumo de jamón curado que haya sido sometido a periodos de curación inferiores o iguales a los 12 meses.

Octava

El análisis de los parámetros fisicoquímicos de los jamones curados solo identifica el contenido en grasa como variable que influye de manera significativa en la viabilidad de *Toxoplasma gondii*, observándose una pérdida de viabilidad del parásito en los jamones con un contenido de grasa más bajo.

Novena

Se ha contribuido a evaluar el riesgo de *Toxoplasma gondii* en las distintas etapas del proceso integral de elaboración del jamón curado: producción primaria, matadero y secadero. Este estudio proporciona herramientas específicas que podrían integrarse en los sistemas de autocontrol basados en el APPCC implantados en los establecimientos del sector cárnico porcino para el

control de *Toxoplasma gondii*, incluyendo datos para el análisis de peligros, así como medidas de control.

Décima

Estos datos sientan la base para seguir trabajando en la búsqueda de más herramientas que refuercen los sistemas de autocontrol de la industria cárnica, enfocadas a métodos rápidos que permitan la toma de decisiones a la empresa para poder ofrecer al consumidor un producto seguro y de calidad.

VI. CONCLUSIONS



First

The seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, in white pigs in Aragón, was 24.5 % (with a cutoff of 1:20 by IFAT). Exposure to the parasite in the farms is widespread and, although there is high variability among the facilities studied, seropositive animals were detected in almost all of them (96.7 %). However, although *Toxoplasma gondii* infection is widespread, pig serological titers are low.

Second

High exposure of pigs to *Toxoplasma gondii* is related to poor management practices such as the presence of cats in or around farms, the presence of dogs around facilities, the lack of order and maintenance, and not using baits as a rodent control system. Moreover, a low number of animals in the farms is also a risk factor. Therefore, in order to reduce the risk of infection, the application of good hygienic practices can contribute to achieve a low prevalence or even *Toxoplasma gondii* free farms.

Third

Although with a low parasitic load, a high number of seropositive animals have viable *Toxoplasma gondii* cysts in their tissues and therefore they pose a risk to consumers. In order to eliminate the parasite, consumers must receive adequate information and appropriate technological measures must be applied.

Fourth

Due to a higher probability of detecting viable forms of *Toxoplasma gondii* in the tissues of pigs with serological titers higher or equal to 1:80, this titer could allow to discriminate those animals of higher risk. The current European Union legislation does not establish specific criteria for *Toxoplasma gondii* in the official meat control in slaughterhouses. Thus, this serological titer could be used as an effective control tool for the meat industry as well as a critical limit in the HACCP system.

Fifth

This is the first study in Spain that links pig serology with presence and viability of *Toxoplasma gondii* in meat, and it responds to the requirement of the European Food Safety Authority to obtain scientific data on this area.

Sixth

Raw hams and target organs can be used without differences to detect *Toxoplasma gondii* in fresh pig tissues, as well as to determine its viability. In order not to depreciate the value of the hams, the analysis of target organs could be used as a control tool in the slaughterhouses, mainly in animals whose tissues are destined to elaborate cured meat products.

Seventh

The curing process, carried out under this study conditions, influences the viability of *Toxoplasma gondii*, but does not completely inactivate the parasite. With both curing periods, 9 and 12 months, a reduction occurs but risk elimination is not achieved. Therefore, from a public health point of view, the use of cured ham with curing periods less than or equal to 12 months is not recommended.

Eighth

Physicochemical parameters of cured hams only indicated fat content as a variable with significant influence on the viability of *Toxoplasma gondii*. It was observed that this parameter produces a loss of parasite viability in hams with a lower fat content.

Ninth

This study has contributed to evaluate the risk of *Toxoplasma* in the different stages of the integral process of cured ham production: primary production, slaughterhouse and cured ham industry. This study provides specific tools that could be integrated into self-control systems based on the HACCP of the pig meat industry for the control of *Toxoplasma gondii*, including hazards analysis, as well as prevention measures.

Tenth

These data allow us to continue working in the search for more tools that help the self-control systems of the meat industry, focused on rapid methods that enable the industry to assure the good quality and safety of their products.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Abdulmawjood, A., Rosa, S., Taubert, A., Bauer, C., Failing, K., Zahner, H., y Bülte, M. (2014). "Investigation of persistence of infectious *Toxoplasma gondii* in raw sausages using in-house developed and validated real time-PCR". *Meat Science*, 97(4), pp. 542-547.

Ahmad, N., Iqbal, Z., Mukhtar, M., Mushtaq, M., Khan, K. M., y Qayyum, M. (2015). "Seroprevalence and Associated Risk Factors of Toxoplasmosis in Sheep and Goats in Pothwar Region, Northern Punjab, Pakistan". *Pakistan Journal of Zoology*, 47(1), pp. 161-167.

Ahmadpour, E., Sarvi, S., Hashemi Soteh, M. B., Sharif, M., Rahimi, M. T., Valadan, R., Tehrani, M., Khalilian, A., Montazeri, M., y Daryani, A. (2017). "Evaluation of the immune response in BALB/c mice induced by a novel DNA vaccine expressing GRA 14 against *Toxoplasma gondii*". *Parasite Immunology*, 39(4), pp. 1-8.

Aigner, C. P., Silva, A. V. D., Sandrini, F., Osório, P. D. S., Poiares, L., y Largura, A. (2010). "Real-time PCR-based quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of serologically positive outdoor chickens". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(7), pp. 935-937.

Al-Adhami, B. H., Simard, M., Hernández-Ortiz, A., Boireau, C., y Gajadhar, A. A. (2016). "Development and evaluation of a modified agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection using tachyzoites cultivated in cell culture". *Food and Waterborne Parasitology*, 2, pp. 15-21.

Algaba, I. G., Verhaegen, B., Jennes, M., Rahman, M., Coucke, W., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., y de Craeye, S. (2018). "Pork as a source of transmission of *Toxoplasma gondii* to humans: a parasite burden study in pig tissues after infection with different strains of *Toxoplasma gondii* as a function of time and different parasite stages". *International Journal for Parasitology*, 48(7), pp 555-560.

Almeria, S., Calvete, C., Pagés, A., Gauss, C., y Dubey, J. P. (2004). "Factors affecting the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain". *Veterinary Parasitology*, 123(3), pp. 265-270.

Alvarado-Esquivel, C., García-Machado, C., Alvarado-Esquivel, D., González-Salazar, A. M., Briones-Fraire, C., Vitela-Corrales, J., Villena, I., y Dubey, J. P. (2011). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico". *Journal of Parasitology*, 97(4), pp. 616-619.

Alvarado-Esquivel, C., Estrada-Malacón, M. A., Reyes-Hernández, S. O., Pérez-Ramírez, J. A., Trujillo-Lopez, J. I., Villena, I., y Dubey, J. P. (2012). "High prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs in

Oaxaca State, Mexico". *The Journal of Parasitology*, 98(6), pp. 1248-1250.

Alvarado-Esquivel C., Romero-Salas D., García-Vázquez Z., Crivelli-Diaz M., Barrientos-Morales M., Lopez-de-Buen L., y Dubey J. P. (2014a). "Seroprevalence and correlates of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Veracruz State, Mexico". *Tropical Animal Health and Production*, 46, pp. 705-709.

Alvarado-Esquivel, C., Sánchez-Anguiano, L. F., Hernández-Tinoco, J., Pulido-Montoya, R. A., Acosta-Rojas, G., Estrada-Martínez, S., Pérez-Álamos, A. R., Vaquera-Enriquez, R., Díaz-Herrera, A., Segura-Moreno, R., Guerrero-Carbajal, M. L., Liesenfeld, O., Beristain-García, I., y Guerrero-Carbajal, M. D. L. (2016). "Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in people applying for medical certificates". *European Journal of Microbiology and Immunology*, 6(2), pp. 1-9.

Alvarado-Esquivel, C., Sánchez-Anguiano, L. F., Hernández-Tinoco, J., Ramos-Nevarez, A., Estrada-Martínez, S., Cerrillo-Soto, S. M., Medina-Heredia, G. E., Guido-Arreola, C. A., Soto-Quintero, A. A., y Beristain-García, I. (2018). "Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion: a case-control seroprevalence study". *Journal of International Medical Research*, 46(4), pp. 1626-1633.

Alves, B. F., Oliveira, S., Soares, H. S., Pena, H. F. J., Conte-Junior, C. A., y Gennari, S. M. (2019). "Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from organs and Brazilian commercial meat cuts of experimentally infected pigs". *Parasitology Research*, pp. 1-5.

Amairia, S., Rouatbi, M., Rjeibi, M. R., Nouasri, H., Sassi, L., Mhadhbi, M., y Gharbi, M. (2016). "Molecular prevalence of *Toxoplasma gondii* DNA in goats' milk and seroprevalence in Northwest Tunisia". *Veterinary Medicine and Science*, 2, pp. 154-160.

Amdouni, Y., Rjeibi, M. R., Rouatbi, M., Amairia, S., Awadi, S., y Gharbi, M. (2017). "Molecular detection of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered ruminants (sheep, goats and cattle) in Northwest Tunisia". *Meat Science*, 133, pp. 180-184.

Arias, M. L., Chinchilla, M., Reyes, L., Sabah, J., y Guerrero, O. M. (1994). "Determination of *Toxoplasma gondii* in several organs of cattle by carbon immunoassay (CIA) testing". *Veterinary Parasitology*, 55(1-2), pp. 133-136.

Arko-Mensah, J., Bosompem, K. M., Canacoo, E. A., Wastling, J. M., y Akanmori, B. D. (2000). "The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana". *Acta Tropica*, 76(1), pp. 27-31.

- Arnau, J. (1998). Tecnología del jamón curado en distintos países. En: *El jamón curado: tecnología y análisis de consumo*: Simposio especial, 44th ICoMST. Madrid: Editorial Estrategias Alimentarias.
- Arunvipas, P., Jittapalpong, S., Inpankaew, T., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., y Maruyama, S. (2013). "Seroprevalence and risk factors influenced transmission of *Toxoplasma gondii* in dogs and cats in dairy farms in Western Thailand". *African Journal of Agricultural Research*, 8(7), pp. 591-595.
- Aroussi, A., Vignoles, P., Dalmay, F., Wimel, L., Dardé, M. L., Mercier, A., y Ajzenberg, D. (2015). "Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests". *Parasite*, 22, pp. 14-21.
- Asgari, Q., Sarnevesht, J., Kalantari, M., Sadat, S. J. A., Motazedian, M. H., y Sarkari, B. (2011). "Molecular survey of *Toxoplasma* infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran". *Tropical Animal Health and Production*, 43(2), pp. 389-392.
- Asgari, Q., Sarkari, B., Amerinia, M., Panahi, S., Mohammadpour, I., y Sarvestani, A. S. (2013). "Toxoplasma Infection in farm animals: a seroepidemiological survey in Fars province, south of Iran". *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(3), pp. 269-72.
- Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE). (2018) Memoria Actividades 2017. Disponible en: https://www.anice.es/memoria-actividades-anice/memoria-anice/memoria-de-actividades-de-anice-2017_18665_201_26063_0_1_in.html (Consultado: 12/12/2018)
- Aspinall T. V., Marlee D., Hyde J. E., y Sims P. F. G. (2002). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction- food for thought?". *International Journal for Parasitology*, 32, pp. 1193-1199.
- Assadi-Rad, A. M., New, J. C., y Patton, S. (1995). "Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee". *Veterinary Parasitology*, 57(4), pp. 289-297.
- Ayi, I., Kwofie, K. D., Blay, E. A., Osei, J. H. N., Frempong, K. K., Koku, R., Ghansah, A., Lartey M., Suzuki, T., Boakye, D.A., y Koram, K. A. (2016). "Clonal types of *Toxoplasma gondii* among immune compromised and immune competent individuals in Accra, Ghana". *Parasitology International*, 65(3), pp. 238-244.

- Ayinmode, A. B., y Abiola, J. O. (2016). "Investigating potential sources of toxoplasmosis for humans from slaughtered food animals in Ibadan, Nigeria". *Folia Veterinaria*, 60(2), pp. 34-40.
- Aymerich, T., Picouet, P. A., y Monfort, J. M. (2008). "Decontamination technologies for meat products". *Meat Science*, 78, pp. 114-129.
- de Azevedo, S. S. D., Pena, H. F. D. J., Alves, C. J., Guimarães Filho, A. A. D. M., Oliveira, R. M., Maksimov, P., Schares, G., y Gennari, S. M. (2010). "Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(2), pp. 80-84.
- Bacci C., Vismarra A., Mangia C., Bonardi S., Bruini I., Genchi M., Kramer L., y Brindani F. (2015). "Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods". *International Journal of Food Microbiology*, 202, pp. 54-56.
- Bajovic, B., Bolumar, T., y Heinz, V. (2012). "Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products". *Meat Science*, 92(3), pp. 280-289.
- Bajwa, A. A., Islam, S., Rashid, I., Ashraf, K., Akbar, H., y Shehzad, W. (2014). "Toxoplasmosis a global threat to all vertebrates: trends in diagnostic methods". *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(3), pp. 676-684.
- Balea A., Paștiu A. I., Györke A., Mircean V., y Cozma V. (2012). "The dynamics of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies (IgG) in small ruminants and pigs from Cluj County, Romania". *Scientia Parasitologicam*, 3(4), pp. 163-168.
- Bamba, S., Halos, L., Tarnagda, Z., Alanio, A., Macé, P., Moukoury, S., Sangaré, I., Guiguemdé, R., Costa, J. M., Bretagne, S. (2016). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology*, 230, 10-15.
- Bamba, S., Bazié, W. W., Lingani, M., Sourabié, Y., Sombié, I., Ndiaye, J. L., y Tarnagda, Z. E. (2017). "Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection among slaughtered pigs, cattle and goats for human consumption in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso". *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 9(8), pp. 106-110.
- Barat, J.M., Grau, R., Ibáñez, J.B., Pagán, M.J., Flores, M., Toldrá, F., y Fito, P., (2006). "Accelerated processing of dry-cured ham. Part I. Viability of the use of brine thawing / salting operation". *Meat Science*, 72, pp. 757-765.

- Baril, L., Ancelle, T., Goulet, V., Thulliez, P., Tirard-Fleury, V., y Carme, B. (1999). "Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France". *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31(3), pp. 305-309.
- Barragan, A., y Sibley, L. D. (2003). "Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers". *Trends in Microbiology*, 11(9), pp. 426-430.
- Bartolomé, J., Martínez, M., Moreno, L., Lorente, S., y Crespo, M. D. (2008). "Prevalence and incidence in Albacete, Spain, of *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. Differences between immigrant and non-immigrant (2001-2007)". *Revista Española de Salud Pública*, 82(3), pp. 333-342.
- Bártová, E., y Sedlák, K. (2011). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs in the Czech Republic". *Parasitology*, 138(11), pp. 1369-1371.
- Basso, W., Hartnack, S., Pardini, L., Maksimov, P., Koudela, B., Venturini, M. C., Schares, G., Sidler, X., Lewis, F., y Deplazes, P. (2013). "Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach". *International Journal for Parasitology*, 43(7), pp. 565-570.
- Basso, W., Handke, M., Sydler, T., Borel, N., Grimm, F., Sidler, X., y Deplazes, P. (2015). "Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms". *Parasitology International*, 64(2), pp. 157-160.
- Basso, W., Grimm, F., Ruetten, M., Djokic, V., Blaga, R., Sidler, X., y Deplazes, P. (2017). "Experimental *Toxoplasma gondii* infections in pigs: Humoral immune response, estimation of specific IgG avidity and the challenges of reproducing vertical transmission in sows". *Veterinary Parasitology*, 236, pp. 76-85.
- Batz, M. B., Hoffmann, S. A., y Morris, J. G. (2012). "Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation". *Journal of Food Protection*, 75(7), pp. 1278-1291.
- Bayarri, S., Gracia, M. J., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Barberá, M., y Herrera, A. (2010). "Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* in cured ham using bioassay: influence of technological processing and food safety implications". *Journal of Food Protection*, 73(12), pp. 2239-2243.
- Bayarri, S., Gracia, M. J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., y Herrera, A. (2012). "*Toxoplasma gondii* in com-

mercially available pork meat and cured ham: a contribution to risk assessment for consumers". *Journal of Food Protection*, 75(3), pp. 597-600.

Beck, W., y Pantchev, N. (2010). *Zoonosis parasitarias*. (Edición en español). Zaragoza: Editorial Servet.

Belfort-Neto, R., Nussenblatt, V., Rizzo, L., Muccioli, C., Silveira, C., Nussenblatt, R., Khan, A., Sibley, L. D., y Belfort-Jr, R. (2007). "High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil". *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(1), pp. 111-114.

Belleste, B., Flori, P., Hafid, J., Raberin, H., y Sung, R. T. M. (2003). "Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler®". *Journal of Microbiological Methods*, 55(1), pp. 213-219.

Bello, J. (2008). *Jamón curado: Aspectos científicos y tecnológicos*. España: Ediciones Díaz de Santos.

Benson, A., Pifer, R., Behrendt, C. L., Hooper, L. V., y Yarovinsky, F. (2009). "Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*". *Cell Host & Microbe*, 6(2), pp. 187-196.

Berger, F., Goulet, V., Le Strat, Y., y Desenclos, J. C. (2009). "Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003". *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 57(4), pp. 241-248.

Berger-Schoch, A. E., Bernet, D., Doherr, M. G., Gottstein, B., y Frey, C. F. (2011). "*Toxoplasma gondii* in Switzerland: a serosurvey based on meat juice analysis of slaughtered pigs, wild boar, sheep and cattle". *Zoonoses and Public Health*, 58(7), pp. 472-478.

de Berardinis, A., Paludi, D., Pennisi, L., y Vergara, A. (2017). "*Toxoplasma gondii*, a foodborne pathogen in the swine production chain from a European perspective". *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(11), pp. 637-648.

Bezerra, R. A., Paranhos, E. B., Del'Arco, A. E., y Albuquerque, G. R. (2009). "Detection anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in swines bred and abated in the Bahia State, Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(3), pp. 78-80.

Bezerra R. A., Carvalho F. S., Guimarães L. A., Rocha D. S., Silva F. L., Wenceslau A. A., y Albuquerque G. R. (2012). "Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs".

Parasitology Research, 110, pp. 509-514.

Bier, N. S., Schares, G., Johne, A., Martin, A., Nöckler, K., y Mayer-Scholl, A. (2019). "Performance of three molecular methods for detection of *Toxoplasma gondii* in pork". *Food and Waterborne Parasitology*, 12, pp. 1-8.

Blagojevic, B., y Antic, D. (2014). "Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses". *Food Control*, 36(1), pp. 174-182.

Bonna, I. C. F., Figueiredo, F. B., da Costa, T., Vicente, R. T., Santiago, C. A. D., Nicolau, J. L., das Neves, L. B., Millar, P. R., Sobreiro, L. G., y Amendoeira, M. R. R. (2006). "Epidemiological study of infection by *Toxoplasma gondii* in slaughterhouse swines and chickens from rural area in Rio de Janeiro". *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 13, pp. 186-189.

Boughattas, S., Ayari, K., Sa, T., Aoun, K., y Bouratbine, A. (2014). "Survey of the parasite *Toxoplasma gondii* in human consumed ovine meat in Tunis City". *PLoS One*, 9(1), pp. 1-5.

Brandão, G. P., Ferreira, A. M., Melo, M. N., y Vitor, R. W. (2006). "Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil". *Parasite*, 13, pp. 143-149.

Breugelmans, M., Naessens, A., y Foulon, W. (2004). "Prevention of toxoplasmosis during pregnancy—an epidemiologic survey over 22 consecutive years". *Journal of Perinatal Medicine*, 32(3), pp. 211-214.

Brewer, S. (2004). "Irradiation effects on meat color – a review". *Meat Science*, 68, pp. 1-17.

Buffolano, W., Gilbert, R.E., Holland, F.J., Fratta, D., Palumbo, F., y Ades, A.E. (1996). "Risk factors for recent *Toxoplasma* infection in pregnant women in Naples". *Epidemiology and Infection*, 116, pp. 347-351.

de Buhr, K., Ludewig, M., y Fehlhaber, K. (2008). "*Toxoplasma gondii*—seroprevalence: current results in German swine herds". *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 59, pp. 5-8.

Burrells, A., Benavides, J., Cantón, G., Garcia, J. L., Bartley, P. M., Nath, M., Thomson, J., Chianini, F., Innes, E.A., y Katzer, F. (2015). "Vaccination of pigs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii*—safer meat for human consumption". *Veterinary Research*, 46(1), pp. 47-58.

- Burrells, A., Opsteegh, M., Pollock, K. G., Alexander, C. L., Chatterton, J., Evans, R., Walker, R., McKenzie, C.A., Hill, D., Innes, E.A., y Katzer, F. (2016). "The prevalence and genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* from individuals in Scotland, 2006–2012". *Parasites & Vectors*, 9(1), pp. 1-12.
- Burrells, A., Taroda, A., Opsteegh, M., Schares, G., Benavides, J., Dam-Deisz, C., Bartley, P. M., Chianini, F., Villena, I., van der Giessen, J., Innes, E. A., y Katzer, F. (2018). "Detection and dissemination of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected calves, a single test does not tell the whole story". *Parasites & vectors*, 11(1), pp. 45.
- Cabezón, O., García-Bocanegra, I., Almería, S. (2012). "Estudio de seroprevalencia y factores de riesgo asociados a *Toxoplasma gondii* en porcino en España". *Avances en Tecnología Porcina*, 9(94), pp. 28-35.
- Cademartori, B. G., Santos, L. M., Oliveira, F. C., Quevedo, P., Oliveira, P.A., Ramos, T. S., Rocha, A. S., Ruas J. L., y Farias, N. A. (2014). "Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil". *Veterinary Parasitology*, 203, pp. 207-211.
- Calero-Bernal, R., Pérez-Martín, J. E., Reina, D., Serrano, F. J., Frontera, E., Fuentes, I., y Dubey, J. P. (2015). "Detection of zoonotic protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in wild boars from Spain". *Zoonoses and Public Health*, 63(5), pp. 346-350.
- Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A. M., Peneau, C., Neron, P., y Dardé, M. L. (2002). "Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana". *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), pp. 4037-4044.
- Casartelli-Alves, L., Boechat, V. C., Macedo-Couto, R., Ferreira, L. C., Nicolau, J. L., Neves, L. B., Millar, P. R., Vicente, R. T., Oliveira, R. V. C., Muniz, A. G., Bonna, I. C. F., Amendoeira, M. R. R., Silva, R. C., Langoni, H., Schubach, T. M. P., y Menezes, R. C. (2014). "Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens". *Veterinary Parasitology*, 204(3), pp. 346-351.
- Cavalcante, G. T., Aguiar, D. M., Chiebao, D., Dubey, J. P., Ruiz, V. L. A., Dias, R. A., Camargo, L. M. A., Labruna, M. B., y Gennari, S. M. (2006). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural Western Amazon, Brazil". *Journal of Parasitology*, 92(4), pp. 863-864.

- Cazarotto, C. J., Balzan, A., Grosskopf, R. K., Boito, J. P., Portella, L. P., Vogel, F. F., Favero, J. F., Cucco, D. C., Biazus, A. H., Machado, G., y da Silva, A. S. (2016). "Horses seropositive for *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora* spp.: Possible risk factors for infection in Brazil". *Microbial Pathogenesis*, 99, pp. 30-35.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) "Parasites - Toxoplasmosis (*Toxoplasma* infection)." Global Health – Division of Parasitic Diseases and Malaria, 17 Marzo 2015. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html> (Consultado 12 junio 2018).
- Cenci-Goga B.T., Ciampelli A., Sechi P., Veronesi F., Moretta I., Cambiotti V., y Thompson P.N. (2013). "Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy". *BMC Veterinary Research*, 9(1), pp. 1-8.
- Chang, Q. C., Zheng, X., Qiu, J. H., Wang, C. R., y Zhu, X. Q. (2013). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs in northeast China". *Journal of Parasitology*, 99(3), pp. 544-545.
- Chang-Cun, S., Xing-Zheng, Y., Li-Ying, S., Xiao-Xian, G., Jian-Zu, D., y Yun-Fen, D. (1991). "Studies on the use of cobalt-60 irradiation to control infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts". *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 22, pp 115-119.
- Chang-Cun, S., Xing-Zheng, Y., Li-Ying, S., Xiao-Xian, G., y Jiang-Zu, D. (1993). "The effect of cobalt-60 irradiation on the infectivity of *Toxoplasma gondii*". *International Journal for Parasitology*, 23(1), pp. 89-93.
- Chatterton, J. M., McDonagh, S., y Ho-Yen, D. O. (2010). "*Toxoplasma* tachyzoites from cell culture are more appropriate in some situations". *Journal of Clinical Pathology*, 63(5), pp. 438-440.
- Chen, J., Huang, S. Y., Zhou, D. H., Li, Z. Y., Petersen, E., Song, H. Q., y Zhu, X. Q. (2013). "DNA immunization with eukaryotic initiation factor-2 α of *Toxoplasma gondii* induces protective immunity against acute and chronic toxoplasmosis in mice". *Vaccine*, 31(52), pp. 6225-6231.
- Cheftel, J. C., y Culioli, J. (1997). "Effects of high pressure on meat: a review". *Meat Science*, 46(3), pp. 211-236.
- Chen, A. L., Moon, A. S., Bell, H. N., Huang, A. S., Vashisht, A. A., Toh, J. Y., Lin, H. L., Nadipuram, S. M., Kim, E. W., Choi, C. P., Wohlschlegel, J. A., y Bradley, P. J. (2017). "Novel insights into the composition and function of the *Toxoplasma* IMC sutures". *Cellular Microbiology*, 19(4), pp. 1-16.

- Chew, W. K., Wah, M. J., Ambu, S., y Segarra, I. (2012). "Toxoplasma gondii: determination of the onset of chronic infection in mice and the in vitro reactivation of brain cysts". *Experimental Parasitology*, 130(1), pp. 22-25.
- Chiappino, M. L., Nichols, B. A., y O'Connor, G. R. (1984). "Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion". *The Journal of Protozoology*, 31, pp. 288-292.
- Chumpolbanchorn, K., Lymbery, A. J., Pallant, L. J., Pan, S., Sukthana, Y., y Thompson, R. C. A. (2013). "A high prevalence of *Toxoplasma* in Australian chickens". *Veterinary Parasitology*, 196(1), pp. 209-211.
- Condoleo, R., Rinaldi, L., Sette, S., y Mezher, Z. (2018). "Risk assessment of human toxoplasmosis associated with the consumption of pork meat in Italy". *Risk Analysis*, 38(6), pp. 1202-1222.
- Cong, W., Meng, Q. F., Blaga, R., Villena, I., Zhu, X. Q., y Qian, A. D. (2016a). "*Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV) infections in stray and pet cats (*Felis catus*) in northwest China: co-infections and risk factors". *Parasitology Research*, 115(1), pp. 217-223.
- Cong, W., Qin, S. Y., Meng, Q. F., Zou, F. C., Qian, A. D., y Zhu, X. Q. (2016b). "Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in sika deer (*Cervus nippon*) in China". *Infection, Genetics and Evolution*, 39, pp. 9-11.
- Consortio del Jamón Serrano Español (2013). "Elaboración del Jamón Consortio Serrano". Disponible en: <https://consorcioserrano.es/jamon-consorcio-serrano/elaboracion/> (Consultado: 12/01/2019)
- Contini, C., Seraceni, S., Cultrera, R., Incorvaia, C., Sebastiani, A., y 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(3), pp. 275-283.
- Cook, A. J. C., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., y Semprini, A. E. (2000). "Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre casecontrol study". *The BMJ*, 321, pp. 142-147.

- Correa, R., Cedeño, I., Escobar, C., y Fuentes, I. (2008). "Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama". *Veterinary Parasitology*, 153, pp. 9-11.
- Correia, É. L. D. B., Feitosa, T. F., Santos, F. A. D., Azevedo, S. S. D., Pena, H. F. D. J., Gennari, S. M., Mota, R.A., y Alves, C. J. (2015). "Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in the State of Paraíba, Northeastern Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(3), pp. 383-386.
- Cortés, L. J., y Mancera, L. (2009). "Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*". *Infectio*, 13(2), pp. 76-82.
- da Costa-Silva, T. A., da Silva Meira, C., Frazzatti-Gallina, N., y Pereira-Chioccola, V. L. (2012). "*Toxoplasma gondii* antigens: Recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium". *Experimental Parasitology*, 130(4), pp. 463-469.
- de Craeye, S., Francart, A., Chabauty, J., De Vriendt, V., Van Gucht, S., Leroux, I., y Jongert, E. (2008). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Belgian house cats". *Veterinary Parasitology*, 157(1), pp. 128-132.
- Cruz, J. (2016). "Las exportaciones y los nuevos formatos impulsan la subida en la producción de jamón curado". *Eurocarne: La revista internacional del sector cárnico*, (246), pp. 76-86.
- Damriyasa, I. M., Bauer, C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter, A. M., Volmer, R., y Zahner, H. (2004). "Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis spp.* and *Neospora caninum* in sows". *Veterinary Parasitology*, 126(3), pp. 271-286.
- Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M. P., y Pelloux, H. (2016). "Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis". *Trends in Parasitology*, 32(6), pp. 492-506.
- Dard, C., Bailly, S., Drouet, T., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M. P., y Pelloux, H. (2017). "Long-term sera storage does not significantly modify the interpretation of toxoplasmosis serologies". *Journal of Microbiological Methods*, 134, pp. 38-45.
- Davoust, B., Mediannikov, O., Roqueplo, C., Perret, C., Demoncheaux, J. P., Sambou, M., Guillot, J., y Blaga, R. (2015). "Enquête de séroprévalence de la toxoplasmose animale au Sénégal". *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 108(1), pp. 73-77.

- Dawson, H. D., Beshah, E., Nishi, S., Solano-Aguilar, G., Morimoto, M., Zhao, A., Madden, K. B., Ledbetter, T. K., Dubey, J. P., Shea-Donohue, T., y Lunney, J. K. (2005). "Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*". *Infection and Immunity*, 73(2), pp. 1116-1128.
- Değirmenci, A., Döşkaya, M., Caner, A., Çiçek, C., Korkmaz, M., Gürüz, Y., y Üner, A. (2011). "*Toxoplasma gondii* RH Ankara: Production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method". *Experimental Parasitology*, 128(1), pp. 1-8.
- Deksne, G., y Kirjušina, M. (2013). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Latvia". *The Journal of Parasitology*, 99(1), pp. 44-47.
- Dias, R. A. F., Navarro, I. T., Ruffolo, B. B., Bugni, F. M., Castro, M. V. D., y Freire, R. L. (2005). "*Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(4), pp. 185-189.
- Djokic, V., Fablet, C., Blaga, R., Rose, N., Perret, C., Djurkovic-Djakovic, O., Boireau, P., y Durand, B. (2016). "Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds". *Parasites & Vectors*, 9(1), pp. 466-473.
- Dlugonska, H. (2008). "*Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2008, pp. 1-7.
- Dohoo, I. R., Martin, W., y Stryhn, H. E. (2003). *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown: University of Prince Edward Island.
- Du, F., Zhang, Q., Yu, Q., Hu, M., Zhou, Y., y Zhao, J. (2012). "Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms in central China". *Veterinary Parasitology*, 187(1), pp. 53-56.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., y Frenkel, J. K. (1970a). "The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces". *The Journal of Experimental Medicine*, 132, pp. 636-662.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., y Frenkel, J. K. (1970b). "Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*". *Journal of Parasitology*, 56, pp. 447-456.

- Dubey, J. P. y Frenkel, J. K. (1973). "Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts". *Journal of Parasitology*, 59, pp. 505-512.
- Dubey, J. P. (1974). "Effect of freezing on the infectivity of *Toxoplasma* cysts to cats". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 165(6), pp. 534-536.
- Dubey, J. P. (1985). "Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts". *American Journal of Veterinary Research*, 46(8), pp. 1753-1754.
- Dubey, J. P., y Beattie, C. P. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC Press.
- Dubey, J. P., Kotula, A. W., Sharar, A., Andrews, C. D., y Lindsay, D. S. (1990). "Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork". *The Journal of Parasitology*, 76(2), pp. 201-204.
- Dubey, J. P., y Thulliez, P. H. (1993). "Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts". *American Journal of Veterinary Research*, 54(2), pp. 270-273.
- Dubey, J. P., y Thayer, D. W. (1994). "Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions". *The Journal of Parasitology*, 80(5), pp. 764-767.
- Dubey, J. P., Thulliez, P., y Powell, E. C. (1995a). "*Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats". *The Journal of Parasitology*, 81(1), pp. 48-53.
- Dubey, J. P., Weigel, R. M., Siegel, A. M., Thulliez, P., Kitron, U. D., Mitchell, M. A., Mannelli, M., Mateus-Pinilla, N. E., Shen, S. K., Kwok, O. C. H., y Todd, K. S. (1995b). "Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois". *The Journal of Parasitology*, 81(5), pp. 723-729.
- Dubey, J. P., Lunney, J. K., Shen, S. K., Kwok, O. C. H., Ashford, D. A., y Thulliez, P. (1996). "Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs". *The Journal of Parasitology*, 82(3), pp. 438-443.
- Dubey, J. P. (1997). "Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85-6% NaCl solutions at 4-20 C". *The Journal of Parasitology*, 83(5), pp. 946-949.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., y Speer, C. A. (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts". *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), pp. 267-299.

- Dubey, J. P. (1998). "Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues". *Veterinary Parasitology*, 74(1), pp. 75-77.
- Dubey, J. P. (2000). *The scientific basis for prevention of Toxoplasma gondii infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures*. En: Ambroise-Thomas P., Petersen P.E. (eds). Congenital toxoplasmosis. Paris: Springer.
- Dubey, J. P., Gamble, H. R., Hill, D., Sreekumar, C., Romand, S., y Thulliez, P. (2002). "High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts". *Journal of Parasitology*, 88(6), pp. 1234-1238.
- Dubey, J. P., Hill, D. E., Jones, J. L., Hightower, A. W., Kirkland, E., Roberts, J. M., Marcet, P. L., Lehmann, T., Vianna, M. C. B., Miska, K., Sreekumar, C., Kwok, O. C. H., Shen, S. K., y Gamble, H. R. (2005). "Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers". *Journal of Parasitology*, 91(5), pp. 1082-1093.
- Dubey, J. P., Patitucci, A. N., Su, C., Sundar, N., Kwok, O. C. H., y Shen, S. K. (2006). "Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America". *Veterinary Parasitology*, 140(1), pp. 76-82.
- Dubey, J. P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G. V., Bandini, L. A., Kwok, O. C. H., Hill, R., y Su, C. (2007). "Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes". *Parasitology*, 134(11), pp. 1559-1565.
- Dubey, J. P., y Jones, J. L. (2008). "*Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States". *International Journal for Parasitology*, 38(11), pp. 1257-1278.
- Dubey, J. P. (2009). "Toxoplasmosis in pigs—the last 20 years". *Veterinary Parasitology*, 164(2), pp. 89-103.
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans* (Second edition). Boca Raton: CRC press.
- Dubey, J. P., Hill, D. E., Rozeboom, D. W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L. R., Kwok, O.C., y Su, C. (2012). "High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA". *Veterinary Parasitology*, 188(1), pp. 14-18.

- Dubey, J. P., Dennis, P. M., Verma, S. K., Choudhary, S., Ferreira, L. R., Oliveira, S., Kwoka, O. C. H., Butler, E., Carstensen, M., y Su, C. (2014). "Epidemiology of toxoplasmosis in white tailed deer (*Odocoileus virginianus*): Occurrence, congenital transmission, correlates of infection, isolation, and genetic characterization of *Toxoplasma gondii*". *Veterinary Parasitology*, 202(3), pp. 270-275.
- Dubey, J. P., Laurin, E., y Kwok, O. C. H. (2016). "Validation of the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens by using cat and mouse bioassay". *Parasitology*, 143(03), pp. 314-319.
- Dupont, C. D., Christian, D. A., y Hunter, C. A. (2012). "Immune response and immunopathology during toxoplasmosis". *In Seminars in Immunopathology*, 34(6), pp. 793-813.
- Dzib-Paredes, G. F., Rosado-Aguilar, J. A., Acosta-Viana, K. Y., Ortega-Pacheco, A., Hernández-Cortázar, I. B., Guzman-Marín, E., y Jiménez-Coello, M. (2016). "Seroprevalence and parasite load of *Toxoplasma gondii* in Mexican hairless pig (*Sus scrofa*) tissues from the Southeast of Mexico". *Veterinary Parasitology*, 229, pp. 45-49.
- EcoSure, (2008). "2007 U.S. Cold Temperature Evaluation Design and Study Summary". Disponible en: <https://www.foodrisk.org/files/EcoSure%202007%20Cold%20Temperature%20Report.pdf> (Consultado 09/03/2017).
- Edelhofer, R. (1994). "Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria-an evaluation of data from 1982 and 1992". *Parasitology Research*, 80(8), pp. 642-644.
- Edwards, K., Logan, J., y Saunders, N. (2004). *Real-time PCR: an essential guide*. London: Horizon Bioscience.
- El-Behairy, A. M., Choudhary, S., Ferreira, L. R., Kwok, O. C. H., Hilali, M., Su, C., y Dubey, J. P. (2013). "Genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates from stray dogs from Giza, Egypt". *Veterinary Parasitology*, 193(1), pp. 25-29.
- El-Nawawi, F.A., Tawfik, M.A., y Shaapan, R.M. (2008). "Methods for inactivation of *Toxoplasma gondii* cysts in meat and tissues of experimentally infected sheep". *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(5), pp. 687-690.

- Enemark, H. L., Johansen, M. V., y Alban, L. (2015). "Transmission dynamics of foodborne *parasites* in pork (pig and wild boar)". *Foodborne Parasites in the Food Supply Web*, pp. 259-292.
- Esshili, A., Thabet, S., Jemli, A., Trifa, F., Mechri, A., Zaafrane, F., Gaha, L., Juckel, G., Babba, H., y Jrad, B. B. H. (2016). "*Toxoplasma gondii* infection in schizophrenia and associated clinical features". *Psychiatry Research*, 245, pp. 327-332.
- Esteban-Redondo, Maley S.W., Thomson K., Nicoli S., Wright S., Buxton D. y Innes E.A. (1999). "Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection". *Veterinary Parasitology*, 86(1), pp. 155-157.
- Esteves, F., Aguiar, D., Rosado, J., Costa, M. L., de Sousa, B., Antunes, F., y Matos, O. (2014). "*Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal". *Veterinary Parasitology*, 200(1), pp. 8-12.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2007). "Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals". *The EFSA Journal*, 583, pp. 1-64.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2011). "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine)". *EFSA Journal*, 15(12), pp. 2351-2496.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2017). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016". *EFSA Journal*, 16(12), pp. 1-228.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2018). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017". *EFSA Journal*, 16(12), pp. 1-128.
- Evans, R., Chatterton, J. M. W., Ashburn, D., Joss, A. W. L., y Ho-Yen, D. O. (1999). "Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites". *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(12), pp. 879-884.
- Fabiani, S., Pinto, B., y Bruschi, F. (2013). "Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: can serological studies establish a clear relationship?". *Neurological Sciences*, 34(4), pp. 417-425.

- Federle, M. (2015). "Viabilidade de *Toxoplasma gondii* em carne ovina após tratamentos térmicos com diferentes temperaturas". *Archives of Veterinary Science*, 21(1), pp.60-70.
- Feitosa, T. F., Vilela V. L., de Melo, L. R., de Almeida, J. L., Souto, D. V., de Moraes, D. F., Athayde, A. C., Azevedo, S. S., y Pena, H. F. (2014). "*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil". *Veterinary Parasitology*, 202(3-4), pp. 305-309.
- Felin, E., Näreaho, A., y Fredriksson-Ahomaa, M. (2017). "Comparison of commercial ELISA tests for the detection of *Toxoplasma* antibodies in the meat juice of naturally infected pigs". *Veterinary Parasitology*, 238, pp. 30-34.
- Fernandes, M. A., Batista, G. I., Carlos, J. D. C. S., Gomes, I. M., Azevedo, K. M. L. D., Setúbal, S., de Oliveira, S. A., Velarde, L. G. C., y Cardoso, C. A. A. (2012). "*Toxoplasma gondii* antibody profile in HIV-1-infected and uninfected pregnant women and the impact on congenital toxoplasmosis diagnosis in Rio de Janeiro, Brazil". *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(2), pp. 170-174.
- Fernandes, E. F. T., Fernandes, M. F., Kim, P. C., de Albuquerque, P. P., de Souza, O. L., de S. Santos, A., de Moraes, E.P., de Moraes, E.G., y Mota, R. A. (2012). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil". *Journal of Parasitology*, 98(3), pp. 690-691.
- Fernandes, E. F. T., de Melo, R. P. B., Kim, P. D. C. P., de Almeida, J. C., de Barros, L. D., Garcia, J. L., da Silva, J. C. R., y Mota, A. R., (2015). "First report of genotype #65 of *Toxoplasma gondii* in pigs". *Parasitology Research*, 114(10), pp. 3927-3930.
- Fernandes, M. F., Cavalcanti, E. F. T. S. F., da Silva, J. G., Mota, A. R., de Souza, O. L., de Santos, A., de Albuquerque, P. P., de Lima, D. C. V., y Mota, R. A. (2016). "Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in backyard chicken breeding in Northeast, Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25, pp. 105-108.
- Fernández-Aguilar, X., Alzaga, V., Villanúa, D., Cabezón, O., García-Bocanegra, I., Dubey, J. P., y Almería, S. (2013). "Epidemiology and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the Iberian hare (*Lepus granatensis*)". *Veterinary Parasitology*, 196(1), pp. 194-198.

Ferreira, T., Vilela, V. L. R., de Melo, L. R. B., de Almeida, J. L., de Oliveira, D. V., de Morais, D. F., Rodrigues, A. C., Santos, S., y de Jesus, H. F. (2014). "*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil". *Veterinary Parasitology*, 202(3), pp. 305-309.

Flausino, W., De Jesus, V. L. T., Bezerra, R. A., Albuquerque, G. R., Jorge, J. L. B. P., Rodrigues, J. da S., Meireles, G. S., y Pereira, R. de C. G. (2010). "Ocurrence of antibodies Anti-*Toxoplasma gondii* in pigs in a commercial breeding in the State of Rio de Janeiro". *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 32(4), pp. 198-200.

Flegr, J. (2013). "How and why *Toxoplasma* makes us crazy". *Trends in Parasitology*, 29(4), pp. 156-163.

Flori, P., Hafid, J., Bourlet, T., Raberin, H., Genin, C., y Sung, R. T. M. (2002). "Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission". *Journal of Medical Microbiology*, 51(10), pp. 871-878.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). (2014). "*Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites*". Microbiological Risk Assessment Series No. 23. Rome.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). (2016). "*Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of foodborne parasites*". CAC/GL 88-2016.

Foroutan, M., Fakhri, Y., Riahi, S. M., Ebrahimpour, S., Namroodi, S., Taghipour, A., Spoting, A., Gamble, H. R., y Rostami, A. (2019). The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*, 260, pp. 42-52.

Franco-Hernandez, E. N., Acosta, A., Cortés-Vecino, J., y Gómez-Marín, J. E. (2016). "Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia". *Parasitology Research*, 115(2), pp. 691-695.

Franssen, F., Gerard, C., Cozma-Petruț, A., Vieira-Pinto, M., Jambrak, A. R., Rowan, N., Paulseng, P., Rozyc-kih, M., Tysnesi, K., Rodriguez-Lazaro, D., y Robertson, L. (2018). "Inactivation of *parasite* transmission stages: Efficacy of treatments on food of animal origin". *Trends in Food Science & Technology*, 83, pp. 114-128.

- Fração-Teixeira, E.D., de Oliveira, F.C., Pelissari-sant'ana, V.I., y Lopes, C.W. (2006). "Toxoplasma gondii em encéfalos de suínos comercializados no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 15(1), pp. 33-36.
- Fração-Teixeira, E., y de Oliveira, F. C. (2011). "Anti-Toxoplasma gondii antibodies in cattle and pigs in a highly endemic area for human toxoplasmosis in Brazil". *The Journal of Parasitology*, 97(1), pp. 44-47.
- Freitas, J. A., Oliveira, J. P., Ramos, O. S., y Ishizuka, M. M. (2009). "Frequência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em suínos abatidos sem inspeção em Belém". *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(5), pp. 1230-1232.
- Fritz, H., Barr, B., Packham, A., Melli, A., y Conrad, P. A. (2012). "Methods to produce and safely work with large numbers of Toxoplasma gondii oocysts and bradyzoite cysts". *Journal of Microbiological Methods*, 88(1), pp. 47-52.
- Gajadhar, A. A., Aramini, J. J., Tiffin, G., y Bisailon, J. R. (1998). "Prevalence of Toxoplasma gondii in Canadian market-age pigs". *The Journal of Parasitology*, 84(4), pp. 759-763.
- Galván-Ramirez, M. L., Madriz Elisondo, A. L., Rico Torres, C. P., Luna-Pastén, H., Rodríguez Pérez, L. R., Rincón-Sánchez, A. R., Franco, A.R., Salazar-Montes, R., y Correa, D. (2010). "Frequency of Toxoplasma gondii in pork meat in Ocotlán, Jalisco, Mexico". *Journal of Food Protection*, 73(6), pp. 1121-1123.
- Galván-Ramirez, M. L., y Mondragón-Flores, R. (2017). *Toxoplasmosis Humana*. (Primera edición) México: ECORFAN-México, S.C.
- Gamble, H. R. (1997). "Parasites associated with pork and pork products". *Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties*, 16, pp. 496-506.
- Gamble, H. R., Brady, R. C., y Dubey, J. P. (1999). "Prevalence of Toxoplasma gondii infection in domestic pigs in the New England states". *Veterinary Parasitology*, 82(2), pp. 129-136.
- Gamble, H. R., Dubey, J. P., y Lambillotte, D. N. (2005). "Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of Toxoplasma infection in the domestic pig". *Veterinary Parasitology*, 128(3), pp. 177-181.

García, J. L., Gennari, S. M., Machado, R. Z., y Navarro, I. T. (2006a). "Toxoplasma gondii: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs". *Experimental Parasitology*, 113(4), pp. 267-271.

García, J. L., Navarro, I. T., Vidotto, O., Gennari, S. M., Machado, R. Z., da Luz Pereira, A. B., y Sinhorini, I. L. (2006b). "Toxoplasma gondii: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs". *Experimental Parasitology*, 113(2), pp. 100-105.

García, J. L., Gennari, S. M., Navarro, I. T., Machado, R. Z., Headley, S. A., Vidotto, O., da Silva, J., Monteiro, F., y Igarashi, M. (2008). "Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-Toxoplasma gondii antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs". *Research in Veterinary Science*, 84(2), pp. 237-242.

García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J.P., Casal, J., Martín, G.E., Cabezón, O., Perea, A., y Almería, S. (2010a). "Seroprevalence and risk factors associated with Toxoplasma gondii in domestic pigs from Spain". *Parasitology International*, 59, pp. 421-426.

García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Sibila, M., Dubey, J. P., Cabezón, O., Martín, G., y Almería, S. (2010b). "Duration of maternally derived antibodies in Toxoplasma gondii naturally infected piglets". *Veterinary Parasitology*, 170(1), pp. 134-136.

García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Simon-Grifé, M., Cabezón, O., Casal, J., Allepuz, A., Napp, S., y Almería, S. (2010c). "Seroprevalence and risk factors associated with Toxoplasma gondii infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain". *Research in Veterinary Science*, 89(1), pp. 85-87.

García-Bocanegra, I., Anselmo, J., Almería, S. (2011). Situación actual de la toxoplasmosis porcina en España: revisión de recientes estudios seroepidemiológicos. *SUIS*, 77, 24-31.

García-Bocanegra, I., Cabezón, O., Arenas-Montes, A., Carbonero, A., Dubey, J. P., Perea, A., y Almería, S. (2012). "Seroprevalence of Toxoplasma gondii in equids from Southern Spain". *Parasitology International*, 61(3), pp. 421-424.

García-Bocanegra, I., Cabezón, O., Hernández, E., Martínez-Cruz, M. S., Martínez-Moreno, A., y Martínez-Moreno, J. (2013). "Toxoplasma gondii in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain". *The Journal of Parasitology*, 99(3), pp. 438-440.

- Gauss, C. B. L., Almeria, S., Ortuno, A., Garcia, F., y Dubey, J. P. (2003). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain". *Journal of Parasitology*, 89(5), pp. 1067-1068.
- Gauss, C. B. L., Dubey, J. P., Vidal, D., Cabezón, O., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Marco, I., Lavin, S., Gortazar, S., y Almería, S. (2006). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain". *Veterinary Parasitology*, 136(3), pp. 193-200.
- Gazzonis, A. L., Marangi, M., Villa, L., Ragona, M. E., Olivieri, E., Zanzani, S. A., Giangaspero, A., y Manfredi, M. T. (2018). "*Toxoplasma gondii* infection and biosecurity levels in fattening pigs and sows: serological and molecular epidemiology in the intensive pig industry (Lombardy, Northern Italy)". *Parasitology Research*, 117(2), pp. 539-546.
- Gebremedhin, E. Z., Kebeta, M. M., Asaye, M., Ashenafi, H., Di Marco, V., y Vitale, M. (2015). "First report on seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Central Ethiopia". *BMC Veterinary Research*, 11(1), pp. 59-68.
- Gebreyes, W. A., Bahnson, P. B., Funk, J. A., McKean, J., y Patchanee, P. (2008). "Seroprevalence of *Trichinella*, *Toxoplasma*, and *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional swine production systems". *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(2), pp. 199-203.
- Genchi, M., Vismarra, A., Mangia, C., Faccini, S., Vicari, N., Rigamonti, S., Prati, P., Marino, A. M., Kramer, L., y Fabbi, M. (2017). "Lack of viable parasites in cured 'Parma Ham' (PDO), following experimental *Toxoplasma gondii* infection of pigs". *Food Microbiology*, 66, pp. 157-164.
- Gil-Tomás, J., Cebollada-Sánchez, R., Benito-Ruesca, R., Garrido-Buenache, A., González-Domínguez, M., Gude-González, M. J., y Abad-Alejandre, P. (2011). "Toxoplasmosis in Aragon: prevalence in pregnant women (1998-2010)". *Libro de Resúmenes del XII Congreso Ibérico de Parasitología*. Zaragoza, España.
- Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Belkilani, S., Hermitte, P., Gibout, O., Geers, R., y Villena, I. (2009). "Landscape, herd management and within-herd seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in beef cattle herds from Champagne-Ardenne, France". *Veterinary Parasitology*, 161(1), pp. 36-40.
- Giraldo, M. (2008). "Toxoplasmosis". *Medicina & Laboratorio*, 14, pp. 359-375.
- Glor, S. B., Edelhofer, R., Grimm, F., Deplazes, P., y Basso, W. (2013). "Evaluation of a commercial ELISA kit

for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep". *Parasites & Vectors*, 6(1), pp. 85.

Goldman, M. (1957). "Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. The reaction in smear of peritoneal exudate". *The Journal of Experimental Medicine*, 105, pp. 549-556.

Gómez-Lucía, E., Blanco, M. M., y Doménech, A. (Coords.) (2007). *Manual de inmunología veterinaria*. Madrid: Editorial Pearson Educación, S.A.

Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J. C., Fuentes, M. V., y Osuna, A. (2015). "Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial "Serrano" ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques". *Food Microbiology*, 46, pp. 107-113.

Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J. C., Fuentes, M. V., y Osuna, A. (2016). "*Toxoplasma gondii* detection and viability assays in ham legs and shoulders from experimentally infected pigs". *Food Microbiology*, 58, pp. 112-120.

Gotteland, C., Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Pouille, M. L., Dupuis, E., Dardé, M. L., Forin-Wiart, M. A., Rabiloud, M., Riche, B., y Villena, I. (2014). "Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil in a rural area: Influence of cats and land use". *Veterinary Parasitology*, 205(3), pp. 629-637.

Grønbech, K., Vorlund-Kiær, M., Nielsen, H. V., Alban, L., y Johansen, M. V. (2017). "Sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in Danish pigs". *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, pp. 136-138.

Guerra, G. C., y Fernández, S. J. (1995). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women". *Atención primaria/Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria*, 16(3), pp. 151-153.

Guimarães, L. A., Bezerra, R. A., Rocha, D. D. S., y Albuquerque, G. R. (2013). "Prevalence and risk factors associated with anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in sheep from Bahia state, Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(2), pp. 220-224.

Guo, M., Dubey, J. P., Hill, D., Buchanan, R. L., Gamble, H., Jones, J. L., y Pradhan, A. K. (2015a). "Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption". *Journal of Food Protection*, 78(2), pp. 457-476.

Guo, M., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Lambertini, E., Ying, Y., Gamble, H.R., Jones, J.L., y Prad-

- han, A. K. (2015b). "Qualitative Assessment for *Toxoplasma gondii* Exposure Risk Associated with Meat Products in the United States". *Journal of Food Protection*, 78(12), pp. 2207-2219.
- Guo, M., Mishra, A., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Gamble, H. R., Jones, J. L., Du, X., y Pradhan, A. K. (2016). "Development of Dose-Response Models to Predict the Relationship for Human *Toxoplasma gondii* Infection Associated with Meat Consumption". *Risk Analysis*, 36(5), pp. 926-938.
- Guo, M., Lambertini, E., Buchanan, R. L., Dubey, J. P., Hill, D. E., Gamble, H. R., Jones, J. L., y Pradhan, A. K. (2017). "Quantifying the risk of human *Toxoplasma gondii* infection due to consumption of fresh pork in the United States". *Food Control*, 73, pp. 1210-1222.
- Gustafsson, K., Uggla, A., y Järplid, B. (1997). "*Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). I. Pathology". *Journal of Comparative Pathology*, 117(4), pp. 351-360.
- Gutierrez-Zufiaurre, N., Sanchez-Hernandez, J., Munoz, S., Marin, R., Delgado, N., Saenz, M. C., Muñoz-Bellido, J. L., y Garcia-Rodriguez, J. A. (2004). "Seroprevalence of antibodies against *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, rubella virus, hepatitis B and C virus, and HIV in pregnant women". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(9), pp. 512-516.
- Györke, A., Opsteegh, M., Mircean, V., Iovu, A., y Cozma, V. (2011). "*Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: Evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors". *Preventive Veterinary Medicine*, 102(4), pp. 321-328.
- Halos, L., Thébault, A., Aubert, D., Thomas, M., Perret, C., Geers, R., Alliota, A., Escotte-Binet, S., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Durand, B., Boireau, P., y Villena, I. (2010). "An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France". *International Journal for Parasitology*, 40(2), pp. 193-200.
- Hálová, D., Mulcahy, G., Rafter, P., Turčeková, L., Grant, T., y de Waal, T. (2013). "*Toxoplasma gondii* in Ireland: Seroprevalence and Novel Molecular Detection Method in Sheep, Pigs, Deer and Chickens". *Zoonoses and Public Health*, 60(2), pp. 168-173.
- Hamilton C. M., Kelly P. J., Bartley P. M., Burrells A., Porco A., Metzler D., Crouch K., Ketzis J. K., Innes E. A.,

y Katzer F. (2015). "Toxoplasma gondii in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies". *Parasites & Vectors*, 8, pp. 166-174.

Hejlíček, K., y Literák, I. (1994). "Prevalence of toxoplasmosis in rabbits in South Bohemia". *Acta Veterinaria Brn*, 63 (3-4), pp. 145 - 150.

Hejlíček, K., Literák, I., y Nezval, J. (1997). "Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic". *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3), 480-485.

Hernández, D. L., Gómez, J. H. D., de la Cruz, A. C., y Ramírez, J. C. M. (2012). "Antibióticos sistémicos para retinocoroiditis por toxoplasmosis. Revisión sistemática de la literatura". *Medicina UPB*, 31(2), pp. 170-180.

Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Tarradas, C., Luque, I., García-Valverde, R., Reguillo, L., y Astorga, R. J. (2014). "A serological Survey of *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spp.* in Iberian Fattening Pigs Reared in Free-Range Systems". *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(5), pp. 477-481.

Hiepe, T., Lucius, R., y Gottstein, B. (Ed.) (2006). *Parasitología general. Con principios de inmunología, diagnóstico y lucha antiparasitaria*. Zaragoza: Editorial Acribia, S. A.

Hill, D., y Dubey, J. P. (2002). "Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention". *Clinical Microbiology and Infection*, 8(10), pp. 634-640.

Hill, D. E., Sreekumar, C., Gamble, H. R., y Dubey, J. P. (2004). "Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin". *Journal of Food Protection*, 67(10), pp. 2230-2233.

Hill, D. E., Chirukandoth, S., y Dubey, J. P. (2005). "Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals". *Animal Health Research Reviews*, 6(01), pp. 41-61.

Hill, D. E., Benedetto, S. M. C., Coss, C., McCrary, J. L., Fournet, V. M., y Dubey, J. P. (2006a). "Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin". *Journal of Food Protection*, 69(8), pp. 1961-1965.

- Hill, D. E., Chirukandoth, S., Dubey, J. P., Lunney, J. K., y Gamble, H. R. (2006b). "Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine". *Veterinary Parasitology*, 141(1), pp. 9-17.
- Hill, D. E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H. R., y Dubey, J. P. (2010). "Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006)". *Zoonoses and Public Health*, 57(1), pp. 53-59.
- Hill, D. E., y Dubey, J. P. (2013). "*Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States". *International Journal for Parasitology*, 43(2), pp. 107-113.
- Hill, D. E., Luchansky, J., Porto-Fett, A., Gamble, H. R., Fournet, V. M., Hawkins-Cooper, D. S., Urban, J. F., Gajadhar, A. A., Holley, R., Juneja, V. K., y Dubey, J. P. (2018). "Rapid inactivation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites during formulation of dry cured ready-to-eat pork sausage". *Food and Waterborne Parasitology*, 12, pp. 1-6.
- Homan, W. L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., y Verschueren, H. (2000). "Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR". *International Journal for Parasitology*, 30(1), pp. 69-75.
- Hou, Z. F., Su, S. J., Liu, D. D., Jia, C. L., Zhao, Z. X., Ma, Y. F., Li, Q. Q., Xu, J. J., y Tao, J. P. (2018). "Prevalence, risk factors and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in sick pigs and stray cats in Jiangsu Province, eastern China". *Infection, Genetics and Evolution*, 60, pp. 17-25.
- Huerta, O., Chávez, V., Casas, A., Falcón, P., y Raymundo, T. (2006). "Concordancia entre las pruebas de hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta para determinar la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en ovinos". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17(2), pp. 178-183.
- Hunter, C. A., y Sibley, L. D. (2012). "Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors". *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), pp. 766-778.
- Huong, L. T. T., y Dubey, J. P. (2007). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from Vietnam". *Journal of Parasitology*, 93(4), pp. 951-952.
- Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., Siim, J. C., y Work, K. (1970). "Coccidian-like nature of *Toxoplasma gon-*

dii". *British Medical Journal*, 1(5689), pp. 142-144.

Ichikawa-Seki, M., Guswanto, A., Allamanda, P., Mariamah, E. S., Wibowo, P. E., Igarashi, I., y Nishikawa, Y. (2015). "Seroprevalence of antibody to TgGRA7 antigen of *Toxoplasma gondii* in livestock animals from Western Java, Indonesia". *Parasitology International*, 64(6), pp. 484-486.

Ingram, W. M., Goodrich, L. M., Robey, E. A., y Eisen, M. B. (2013). "Mice infected with low-virulence strains of *Toxoplasma gondii* lose their innate aversion to cat urine, even after extensive *parasite* clearance". *PloS One*, 8(9), pp. 1-6.

Innes, E. A., Bartley, P. M., Maley, S., Katzer, F., Buy ton, D. (2009). "Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), pp. 246-251.

International Organization for Standardization, 1975a. Meat and Meat Products. Determination of Nitrite Content (Reference Method). ISO 2918:1975. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 1975b. Meat and Meat Products. Determination of Nitrate Content (Reference Method). ISO 3091:1975. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 1996a. Meat and Meat Products. Determination of Chloride Content. Part 1: Volhard Method. ISO 1841-1:1996. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 1996b. Meat and Meat Products. Determination of Free Fat Content. ISO 1444:1996. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 1997. Meat and Meat Products. Determination of Moisture Content (Reference Method). ISO 1442:1997. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 1999. Meat and Meat Products. Measurement of PH (Reference Method). ISO 2917:1999. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Determination of Water Activity. ISO 21807:2004. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 2016. Microbiology of the Food Chain—Method Validation—Part 2: Protocol for the Validation of Alternative (Proprietary). Methods Against a Reference Method. ISO

16140-2: 2016. Geneva, Switzerland.

Iqbal, A., Janecko, N., Pollari, F., y Dixon, B. (2018). "Prevalence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* DNA in retail fresh meats in Canada". *Food and Waterborne Parasitology*, 13, pp. 1-9.

Ishaku, B. S., Abdullahi, M., Nalong, D., Jonah, R., y Mayowa, O. (2018). "Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in pigs, sheep and goats at slaughter in Jos municipal abattoir, Nigeria". *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 4(2), pp. 55-61.

Izadyar, N., Nikfarjam, B. A., Rastaghi, A. R. E., Alizadeh, S. A., Heydarian, P., y Saraei, M. (2019). "A serologic study on *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered sheep and goats in Qazvin Province, Iran". *Tropical Animal Health and Production*, pp. 1-5.

Jacobs, L. y Lunde, M. N. (1957). "A hemagglutination test for toxoplasmosis". *The Journal of Parasitology*, 43(3), pp. 308-314.

Jacobs, L., Remington, J. S., y Melton, M. L. (1960). "The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*". *Journal of Parasitology*, 46, pp. 11-21.

Janku, J. (1923). "Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolobomu zeluté skvrny v oku normálně velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitu v sítnici". *Časopis Lékařů českých*, pp. 39-43.

Jennes, M., y Cox, E. (2017). "Prevalence, genetic diversity, tissue distribution and risk factors contributing to *T. gondii* burden in domestic pigs". In *Toxoplasmosis. InTech*. pp. 21-34.

Jiang, W., Sullivan, A. M., Su, C., y Zhao, X. (2012). "An agent-based model for the transmission dynamics of *Toxoplasma gondii*". *Journal of Theoretical Biology*, 293, pp. 15-26.

Jittapalapong, S., Sangvaranond, A., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Khachaeram, W., Koizumi, S., y Maruyama, S. (2005). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand". *Veterinary Parasitology*, 127(1), pp. 17-22.

Jokelainen, P., Isomursu, M., Näreaho, A., y Oksanen, A. (2011). "Natural *Toxoplasma gondii* infections in European brown hares and mountain hares in Finland: proportional mortality rate, antibody prevalence, and genetic characterization". *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), pp. 154-163.

- Jokelainen, P., Simola, O., Rantanen, E., Näreaho, A., Lohi, H., y Sukura, A. (2012). "Feline toxoplasmosis in Finland cross-sectional epidemiological study and case series study". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(6), pp. 1115-1124.
- Jokelainen, P., Velström, K., y Lassen, B. (2015). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild boars hunted for human consumption in Estonia". *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), pp. 42-47.
- Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K., y Wilson, M. (2007). "*Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3), pp. 405-410.
- Jones, J. L., Dargelas, V., Roberts, J., Press, C., Remington, J. S., y Montoya, J. G. (2009). "Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States". *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), pp. 878-884.
- Jones, J. L., y Dubey, J. P. (2012). "Foodborne toxoplasmosis". *Clinical Infectious Diseases*, 55(6), p. 845-851.
- Jones, J. L., Parise, M. E., y Fiore, A. E. (2014). "Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(5), pp. 794-799.
- Jongert, E., Melkebeek, V., De Craeye, S., Dewit, J., Verhelst, D., y Cox, E. (2008). "An enhanced GRA1-GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs". *Vaccine*, 26(8), pp. 1025-1031.
- Jung, B. K., Lee, S. E., Lim, H., Cho, J., Kim, D. G., Song, H., Kim, M. J., Shin, E. H., y Chai, J. Y. (2015). "*Toxoplasma gondii* B1 gene detection in feces of stray cats around Seoul, Korea and genotype analysis of two laboratory-passaged isolates". *The Korean Journal of Parasitology*, 53(3), pp. 259-263.
- Jungersen, G., Jensen, L., Riber, U., Heegaard, P. M., Petersen, E., Poulsen, J. D., Bille-Hansen, V., y Lind, P. (1999). "Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs". *International Journal for Parasitology*, 29(8), pp. 1307-1319.
- Juránková, J., Opsteegh, M., Neumayerová, H., Kovařík, K., Frencová, A., Baláž, V., Volf, J., y Koudela, B. (2013). "Quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples of experimentally infected goats by magnetic capture and real-time PCR". *Veterinary Parasitology*, 193(1), pp. 95-99.
- Juránková, J., Basso, W., Neumayerová, H., Baláž, V., Jánová, E., Sidler, X., Deplazes, P., y Koudela, B.

(2014). "Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR". *Food Microbiology*, 38, pp. 167-170.

Kaňková, S., Flegr, J., y Calda, P. (2015). "The influence of latent toxoplasmosis on women's reproductive function: four cross-sectional studies". *Folia Parasitologica*, 62, pp. 41-47.

Kapperud, G., Jenum, P. A., Stray-Pedersen, B., Melby, K. K., Eskild, A., y Eng, J. (1996). "Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway". *American Journal of Epidemiology*, 144(4), pp. 405-412.

Karunajeewa, H., Siebert, D., Hammond, R., Garland, S., y Kelly, H. (2001). "Seroprevalence of varicella zoster virus, parvovirus B19 and *Toxoplasma gondii* in a Melbourne obstetric population: implications for management". *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 41(1), pp. 23-28.

Kasper, L. H., y Buzoni-Gatel, D. (1998). "Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis". *Parasitology Today*, 14(4), pp. 150-156.

Khamesipour, F., Doosti, A., Mobarakeh, H. I., y Komba, E. V. (2014). "*Toxoplasma gondii* in Cattle, Camels and Sheep in Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiary Provinces, Iran". *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(6), pp. 1-5.

Kijlstra, A., Eissen, O. A., Cornelissen, J., Munniksmá, K., Eijck, I., y Kortbeek, T. (2004). "*Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(9), pp. 3165-3169.

Kijlstra A., y Jongert E. (2008). "Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat". *International Journal for Parasitology*, 38(12), pp. 1359-1370.

Kijlstra A., y Jongert E. (2009). "*Toxoplasma*-safe meat: close to reality?". *Trends in Parasitology*, 25(1), pp. 18-22.

Klun, I., Djurković-Djaković, O., Katić-Radivojević, S., y Nikolić, A. (2006). "Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors". *Veterinary Parasitology*, 135(2), pp. 121-131.

Klun, I., Vujanić, M., Yera, H., Nikolić, A., Ivović, V., Bobić, B., Bradonjić, S., Dupouy-Camet, J., y Djurko-

vić-Djaković, O. (2011). "Toxoplasma gondii infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood". *Veterinary Research*, 42(1), pp. 1-6.

Knutson, K. M., Marth, E. H., y Wagner, M. K. (1987). "Microwave heating of food". *Food Science and Technology*, 20(3), pp. 101-110.

Kotula, A. W., Dubey, J. P., Sharar, A. K., Andrews, C. D., Shen, S. K., y Lindsay, D. S. (1991). "Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork". *Journal of Food Protection*, 54(9), pp. 687-690.

Kouam, M. K., Diakou, A., Kanzoura, V., Papadopoulos, E., Gajadhar, A. A., y Theodoropoulos, G. (2010). "A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors". *Veterinary Parasitology*, 170(1), pp. 170-175.

Kringel, H., Dubey, J. P., Beshah, E., Hecker, R., y Urban, J. F. (2004). "CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*". *Veterinary Parasitology*, 123(1), pp. 55-66.

Kyan, H., Taira, M., Yamamoto, A., Inaba, C., y Zakimi, S. (2012). "Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* genotypes from goats at an abattoir in Okinawa". *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 65(2), pp. 167-170.

Lake, R., Hudson, A., y Cressey, P. (2002). "Risk profile: *Toxoplasma gondii* in red meat and meat products. Institute of Environmental Science and Research Limited". *Report prepared as part of a New Zealand Food Safety Authority contract for scientific services*, pp. 1-43.

Lass, A., Pietkiewicz, H., Szostakowska, B., y Myjak, P. (2012). "The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples". *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(6), pp. 1101-1108.

Lehmann, T., Graham, D. H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J. L., Gamble, H. R., y Dubey, J. P. (2003). "Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm". *Infection, Genetics and Evolution*, 3(2), pp. 135-141.

Lemmon, G. H., y Gardner, S. N. (2008). "Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays". *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 7(1), pp. 18.

Li, Y., Nie, X., Peng, Q., Mu, X., Zhang, M., Tian, M., y Min, S. (2015). "Seroprevalence and genotype of *Toxo-*

- plasma gondii* in pigs, dogs and cats from Guizhou province, Southwest China". *Parasites & Vectors*, 8(1), pp. 214-218.
- Li, F., Wang, S. P., Wang, C. J., He, S. C., Wu, X., y Liu, G. H. (2016). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in goats in Hunan province, China". *Parasite*, 23, pp. 1-4.
- Li, Y., y Zhou, H. (2018). "Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*". *Expert Opinion on Biological Therapy*, 18(3), pp. 273-280.
- de Lima, V. Y., Langoni, H., Da Silva, A. V., Pezerico, S. B., De Castro, A. P. B., Da Silva, R. C., y Araújo, J. P. (2011). "*Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil". *Veterinary Parasitology*, 175(1), pp. 9-14.
- Limon, G., Beauvais, W., Dadios, N., Villena, I., Cockle, C., Blaga, R., y Guitian, J. (2017). "Cross-sectional study of *Toxoplasma gondii* infection in pig farms in England". *Foodborne pathogens and disease*, 14(5), pp. 269-281.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Butler, J. M., y Blagburn, B. L. (1997). "Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs". *Veterinary Parasitology*, 73(1), pp. 27-33.
- Lindsay, D. S., Collins, M. V., Holliman, D., Flick, G. J., y Dubey, J. P. (2006). "Effects of high pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork". *Journal of Parasitology*, 92(1), pp. 195-196.
- Liu, Q., Wei, F., Gao, S., Jiang, L., Lian, H., Yuan, B., Yuan, Z., Xia, Z., Liu, B., Xu, X., y Zhu, X. Q. (2009). "*Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(2), pp. 162-166.
- Liu, X., Liu, C., Liu, Y., Jin, H., Zhao, Y., Chen, J., Yang, M., y Liu, Q. (2012). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered pigs and cattle in Liaoning Province, northeastern China". *Journal of Parasitology*, 98(2), pp. 440-441.
- Liu, Q., Wang, Z. D., Huang, S. Y., y Zhu, X. Q. (2015). "Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*". *Parasites & vectors*, 8(1), pp. 292.
- Liu, Y., Cao, A., Li, Y., Li, X., Cong, H., He, S., y Zhou, H. (2017). "Immunization with a DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* Superoxide dismutase (TgSOD) induces partial immune protection against acute toxo-

plasmosis in BALB/c mice". *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1-8.

Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method". *Methods*, 25(4), pp. 402-408.

Lopes, A. P., Dubey, J. P., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Rodrigues, M., y Cardoso, L. (2013). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the north of Portugal for human consumption". *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), pp. 266-269.

López-Fabal, F., y Gómez-Garcés, J. L. (2013). "Marcadores serológicos de gestantes españolas e inmigrantes en un área del sur de Madrid durante el periodo 2007-2010". *Revista Española de Quimioterapia*, 26(2), pp. 108-111.

Luciano, D. M., Menezes, R. C., Ferreira, L. C., Nicolau, J. L., Neves, L. B. D., Luciano, R. M., Dahroug, M. A., y Amendoeira, M. R. R. (2011). "Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(4), pp. 351-353.

Lundén, A., y Uggla, A. (1992). "Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking". *International Journal of Food Microbiology*, 15(3-4), pp. 357-363.

Luque, J., y Herraiez, A. (2001). *Biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Madrid: Editorial Harcourt.

Lyons, R. E., McLeod, R., y Roberts, C. W. (2002). "*Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion". *Trends in Parasitology*, 18(5), pp. 198-201.

Maenz, M., Schlüter, D., Liesenfeld, O., Schares, G., Gross, U., y Pleyer, U. (2014). "Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease". *Progress in Retinal and Eye Research*, 39, pp. 77-106.

Magalhães, F. J. R., da Silva, J. G., Ribeiro-Andrade, M., Pinheiro, J. W., y Mota, R. A. (2016). "High prevalence of toxoplasmosis in free-range chicken of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil". *Acta Tropica*, 159, pp. 58-61.

Magalhães, F. J., Ribeiro-Andrade, M., Souza, F. M., Lima Filho, C. D., Biondo, A. W., Vidotto, O., Navarro, I. T., y Mota, R. A. (2017). "Seroprevalence and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* infection in cats, dogs, pigs and equines of the Fernando de Noronha Island, Brazil". *Parasitology International*, 66(2), pp. 43-46.

- Maganga, G. D., Abessolo, A. L., Okouyi, C. S. M., Labouba, I., Beyeme, A. M. M., Mavoungou, J. F., Agossou, E., Cossic, B., y Akue, J. P. (2016). "Seroprevalence and risk factors of two abortive diseases, toxoplasmosis and neosporosis, in small ruminants of the Mongo County, southern Gabon". *Small Ruminant Research*, 144, pp. 56-61.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., y Roitt, I.M. (2014). *Inmunología*. (Octava Edición) Barcelona: Elsevier S.L.
- Malmasi, A., Mosallanejad, B., Mohebal, M., Sharifian Fard, M., y Taheri, M. (2009). "Prevention of shedding and re-shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts in experimentally infected cats treated with oral clindamycin: A preliminary study". *Zoonoses and Public Health*, 56(2), pp. 102-104.
- el Mansouri, B., Rhajaoui, M., Sebti, F., Amarir, F., Laboudi, M., Bchitou, R., Hamad, M., y Lyagoubi, M. (2007). "Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in Rabat, Morocco". *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* (1990), 100(4), pp. 289-290.
- Marcos, D. (1991). *Tecnología del jamón curado español*. Madrid: Ediciones Alaya, S. L.
- Márquez, M. D. L. A., y Etcheverry, I. S. (2003). "Seroprevalencia de toxoplasmosis en mujeres embarazadas de la ciudad de La Plata". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 37(4), pp. 413-415.
- Martín-Hernández, I., y García-Izquierdo, S. (2003). "Toxoplasmosis en el hombre". *Bioquímica*, 28(3), pp. 19-27.
- Masatani, T., Takashima, Y., Takasu, M., Matsuu, A., y Amaya, T. (2016). "Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in domestic horses in Japan". *Parasitology International*, 65(2), pp. 146-150.
- Masini, L., Casarella, L., Grillo, R. L., Zannella, M. P., y Oliva, G. C. (2008). "Epidemiologic study on anti-*Toxoplasma gondii* antibodies prevalence in an obstetric population". *Italian Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 20(3), pp. 159-166.
- Mateus-Pinilla, N. E., Dubey, J. P., Choromanski, L., y Weigel, R. M. (1999). "A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine". *The Journal of Parasitology*, 85(5), pp. 855-860.
- Matsuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., y Nagamune, K. (2014). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan". *Parasitology International*, 63(4),

pp. 638-639.

Meerburg, B. G., Riel, J. V., Cornelissen, J. B., Kijlstra, A., y Mul, M. F. (2006). "Cats and goat whey associated with *Toxoplasma gondii* infection in pigs". *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, 6(3), pp. 266-274.

Meerburg, B. G., De Craeye, S., Dierick, K., y Kijlstra, A. (2012). "*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands". *Veterinary Parasitology*, 184(2), pp. 317-320.

de Melo, A., Vitor, R. W. A., Carneiro, A. C. A., Brandão, G. P., y Melo, M. N. (2004). "Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR)". *Infection, Genetics and Evolution*, 4(2), pp. 131-142.

de Melo, A., Vitor, R. W. A., Gazzinelli, R. T., y Melo, M. N. (2006). "Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP". *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1), pp. 22-31.

Méndez-Álvarez, S., y Pérez-Rotha, E. (2004). "La PCR múltiple en microbiología clínica". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3), 183-192.

Mendoça, A. O., Domingues, P. F., da Silva, A. V., Pezerico, S. B., y Langoni, H. (2004). "Detection of *Toxoplasma gondii* in swine sausages". *Parasitología Latinoamericana*, 59, pp. 42-45.

Meyer, D. J., Allan, J. E., y Beaman, M. H. (2000). "Distribution of parasite stages in tissues of *Toxoplasma gondii* infected SCID mice and human peripheral blood lymphocyte-transplanted SCID mice". *Parasite Immunology*, 22(11), pp. 567-579.

Mie, T., Pointon, A. M., Hamilton, D. R., y Kiermeier, A. (2008). "A qualitative assessment of *Toxoplasma gondii* risk in ready-to-eat smallgoods processing". *Journal of Food Protection*, 71(7), pp. 1442-1452.

Mingoarranz, F. J. (2006). *El proceso de secado natural del jamón ibérico. Estudio y modelización*. España: Editorial Abelia.

Minho, A. P., Freire, R. L., Vidotto, O., Gennari, S. M., Marana, E. M., Garcia, J. L., y Navarro, I. T. (2004). "Evaluation of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of anti-

bodies against *Toxoplasma gondii* in experimentally infected pigs". *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 24(4), pp. 199-202.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA). (2018). El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos en 2017. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicoscarnedecerdo2017comentarios_tcm30-379728.pdf (Consultado: 10/09/2018).

Miró, G., Montoya, A., Jiménez, S., Frisuelos, C., Mateo, M., y Fuentes, I. (2004). "Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain". *Veterinary Parasitology*, 126(3), pp. 249-255.

Montoya, J. G., y Remington, J. S. (2008). "Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy". *Clinical Infectious Diseases*, 47(4), pp. 554-566.

Montoya, A., Miró, G., Mateo, M., Ramírez, C., y Fuentes, I. (2008). "Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in Spain". *Journal of Parasitology*, 94(5), pp. 1044-1046.

de Moura, A. B., Osaki, S. C., Zulpo, D. L., y Marana, E. R. M. (2007). "Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16, pp. 54-56.

Munoz, J., y Mayer, D. G. (2016). "*Toxoplasma gondii* and *Giardia duodenalis* infections in domestic dogs in New York City public parks". *The Veterinary Journal*, 211, pp. 97-99.

Muñiz, S. y Mondragón, R. (2009). "*Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-Emergente". *Revista de Educación Bioquímica*, 28(2), pp. 52-58.

Muñoz, C., Guardià, C., Juncosa, T., Viñas, L., Sierra, M., Sanfeliu, I., Bosch, J., Dopico, E., Lite, J., Matas, L., y Juste, C. (2004). "Toxoplasmosis and pregnancy. Multicenter study of 16,362 pregnant women in Barcelona". *Medicina Clínica*, 123(1), pp. 12-16.

Muñoz-Zanzi, C. A., Fry, P., Lesina, B., y Hill, D. (2010). "Specific antibodies and source of infection". *Emerging Infectious*, 16(10), pp. 1591-1593.

Muñoz-Zanzi, C., Tamayo, R., Balboa, J., y Hill, D. (2012). "Detection of Oocyst-Associated Toxoplasmosis in Swine from Southern Chile". *Zoonoses and Public Health*, 59(6), pp. 389-392.

- Muraro, L. S., Caramori Júnior, J. G., Amendoeira, M. R. R., Pereira, J. A., Oliveira Filho, J. X. D., Vicente, R. T., Neves, L. B., Nicolau, J. L., Igarashi, M., y Moura, S. T. (2010). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum and Diamantino, Mato Grosso, Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(4), pp. 254-255.
- Nasaré, A. M., y Tedesco, R. C. (2017). "Experimental Models of Ocular Toxoplasmosis". *Toxoplasmosis*, Isin Akyar, IntechOpen. <https://www.intechopen.com/books/toxoplasmosis/experimental-models-of-ocular-toxoplasmosis> (Consultado: 07/12/2016).
- Nau, J., Eller, S. K., Wenning, J., Spekker-Bosker, K. H., Schrotten, H., Schwerk, C., Hotop, A., Groß, U., y Däubener, W. (2017). "Experimental porcine *Toxoplasma gondii* infection as a representative model for human toxoplasmosis". *Mediators of inflammation*, 2017, pp. 1-11.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Saláková, A., Gallas, L., Kovařík, K., y Koudela, B. (2014). "Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages". *Food Microbiology*, 39, pp. 47-52.
- Nicolle, C. y Manceaux, L. H. (1908). "On a Leishman body infection (or related organisms) of the gondi". *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*, 147, pp. 763-766.
- Olariu, T. R., Darabus, G. H., Cretu, O., Jurovits, O., Giura, E., Erdelean, V., Marincu, I., Iacobiciu, I., Petrescu, C., y Koreck, A. (2008). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies among women of childbearing age in Timis County". *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara*, 41, pp. 367-371.
- Omata, Y., Dilorenzo, C., Venturini, C., Venturini, L., Igarashi, I., Saito, A., y Suzuki, N. (1994). "Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite". *Veterinary Parasitology*, 51(3-4), pp. 205-210.
- Onyiche, T.E., y Ademola, I.O. (2015). "Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs in Ibadan, Nigeria". *Journal of Parasitic Diseases*, 39(2), pp. 309-314.
- Opsteegh, M., Langelaar, M., Sprong, H., Den Hartog, L., De Craeye, S., Bokken, G., Ajzenberg, D., Kijlstra, A., y van der Giessen, J. (2010). "Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR". *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), pp. 193-201.

- Opsteegh, M., Haveman, R., Swart, A. N., Mensink-Beerepoot, M. E., Hofhuis, A., Langelaar, M. F. M., y van der Giessen, J. W. B. (2012). "Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands". *Preventive Veterinary Medicine*, 104(3), pp. 317-326.
- Opsteegh, M., Maas, M., Schares, G., y van der Giessen, J. (2016). "Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01). An extensive literature review. Final report". *EFSA Supporting Publications*, 13(2), pp. 996.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K. Y., Guzman-Marin, E., Uitzil-Álvarez, B., Rodríguez-Buenfil, J. C., y Jimenez-Coello, M. (2011). "Infection dynamic of *Toxoplasma gondii* in two fattening pig farms exposed to high and low cat density in an endemic region". *Veterinary Parasitology*, 175(3), pp. 367-371.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E., Segura-Correa, J.C., Álvarez-Fleites, M., y Jiménez-Coello, M. (2013). "Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico". *BioMed Research International*, 2013, pp. 1-6.
- Palmero, M. L., y Carballés, V. (2010). *Enfermedades infecciosas felinas*. Zaragoza: Editorial Servet.
- Papini, R. A., Buzzzone, G., Nardoni, S., Rocchigiani, G., y Mancianti, F. (2015). "Seroprevalence and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Horses Slaughtered for Human Consumption in Italy". *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(8), pp. 657-661.
- Papini, R., Di Ciccio, P., Marangi, M., Ghidini, S., Zanardi, E., Vergara, A., Giangaspero, A., Nardoni, S., Rocchigiani, G., Mancianti, F., y Ianieri, A. (2017). "Occurrence of *Toxoplasma gondii* in carcasses of pigs reared in intensive systems in northern Italy". *Journal of Food Protection*, 80(3), pp. 515-522.
- Pardini, L., Maksimov, P., Herrmann, D. C., Bacigalupe, D., Rambeaud, M., Machuca, M., Moré, G., Basso, W., Schares, G., y Venturini, M. C. (2012). "Evaluation of an in-house TgSAG1 (P30) IgG ELISA for diagnosis of naturally acquired *Toxoplasma gondii* infection in pigs". *Veterinary Parasitology*, 189(2), pp. 204-210.
- Paris, J. K., Wills, S., Balzer, H. J., Shaw, D. J., y Gunn-Moore, D. A. (2014). "Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhea". *BMC Veterinary Research*, 10(1), pp. 13-23.
- Paștiu, A. I., Györke, A., Blaga, R., Mircean, V., Rosenthal, B. M., y Cozma, V. (2013). "In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar,

but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement". *Parasitology Research*, 112(6), pp. 2403-2407.

Paștiu, A. I., Györke, A., Kalmár, Z., Bolfă, P., Rosenthal, B. M., Oltean, M., Villena, i., Spinu, M., y Cozma, V. (2015). "Toxoplasma gondii in horse meat intended for human consumption in Romania". *Veterinary Parasitology*, 212(3), pp. 393-395.

Pena, H. F. J., Gennari, S. M., Dubey, J. P., y Su, C. (2008). "Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil". *International Journal for Parasitology*, 38(5), pp. 561-569.

Pérez, J. E., Villada Gómez, J. S., Naranjo Pérez, O. D., y Castaño, S. V. (2011). "Formas alternas de transmisión de *Toxoplasma gondii*". *Biosalud*, 10(2), pp. 123-137.

Petersen, E., Dubey, J.P., (2001). "Biology of toxoplasmosis". En: Joynson, D. H. M. y Wreghitt, T. G. (Ed.) *Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide*. USA: Cambridge University Press, pp. 1-42.

Piao, L. X., Aosai, F., Chen, M., Fang, H., Mun, H. S., Norose, K., y Yano, A. (2004). "A quantitative assay method of *Toxoplasma gondii* HSP70 mRNA by quantitative competitive-reverse transcriptase-PCR". *Parasitology International*, 53(1), pp. 49-58.

Piassa, F. R., de Araújo, J. B., da Rosa, R. C., Mattei, R. J., da Silva, R. C., Langoni, H., da y Silva. A. V. (2010). "Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non-certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(3), pp. 152-156.

Poljak, Z., Dewey, C. E., Friendship, R. M., Martin, S. W., Christensen, J., Ojkic, D., Wu, J., y Chow, E. (2008). "Pig and herd level prevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario finisher pigs in 2001, 2003, and 2004". *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(4), pp. 303-310.

Pott, S., Koethe, M., Bangoura, B., Zöller, B., Dauschies, A., Straubinger, R. K., Fehlhaber, K., y Ludewig, M. (2013). "Effects of pH, sodium chloride, and curing salt on the infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts". *Journal of Food Protection*, 76(6), pp. 1056-1061.

Ragozo, A. M. A., Yai, L. E. O., Oliveira, L. N., Dias, R. A., Dubey, J. P., y Gennari, S. M. (2008). "Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo state, Brazil". *Journal of Parasitology*, 94(6), pp. 1259-1263.

- Ragozo, A. M. A., Yai, L. E. O., Oliveira, L. N., Dias, R. A., Goncalves, H. C., Azevedo, S. S. D., Dubey, J. P., y Gennari, S. M. (2009). "Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil". *Journal of Parasitology*, 95(2), pp. 323-327.
- Rahdar, M., Samarbaf-Zadeh, A., y Arab, L. (2012). "Evaluating the prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat and meat products in Ahvaz by PCR method". *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(4), pp. 570-573.
- Ram, H., Rao, J. R., Tewari, A. K., y Banerjee, P. S. (2009). "A real-time PCR assay for sensitive detection of *Toxoplasma gondii*". *Journal of Veterinary Parasitology*, 23(2), pp. 111-114.
- Ramezani, M., Shojaii, M., Asadollahi, M., Karimialavijeh, E., y Gharagozli, K. (2016). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Iranian patients with idiopathic Parkinson's disease". *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 7(4), pp. 361-365.
- Ramos, J. M., Milla, A., Gutiérrez, F. y Rodríguez, J. C. (2007). "Seroprevalencia frente a *Toxoplasma gondii*, virus de la rubéola, virus de la hepatitis B, VIH y sífilis en gestantes extranjeras en Elche y comarca". *Medicina Clínica*, 129(17), pp. 677-679.
- Rani, S., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H., Sadler, M., Kwok, O. C. H., Pradhan, A. K., Hill, D.E., Urban, J.F., y Dubey, J. P. (2019). "*Toxoplasma gondii* tissue cyst formation and density of tissue cysts in shoulders of pigs 7 and 14 days after feeding infected mice tissues". *Veterinary Parasitology*, 269, 13-15.
- Ranucci, D., Veronesi, F., Moretti, A., Branciarri, R., Miraglia, D., Manfredi, M. T., y Fioretti, D. P. (2013). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) from Central Italy". *Parasite*, 20, pp. 1-4.
- Rasti, S., Marandi, N., Abdoli, A., Delavari, M., y Mousavi, S. G. A. (2018). "Serological and molecular detection of *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in Kashan, Central Iran". *Journal of Food Safety*, 38(2), 1-5.
- Ribeiro, M. J. M., Rosa, M. H. F., Bruhn, F. R. P., Garcia, A. D. M., Rocha, C. M. B. M. D., y Guimarães, A. M. (2016). "Seroepidemiology of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora spp.* among horses in the south of the state of Minas Gerais, Brazil". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(2), pp. 142-150.
- Riaz, F., Rashid, I., Akbar, H., Shehzad, W., Islam, S., Bajwa, A. A., Saeek, K., y Ashraf, K. (2016). "DNA amplification techniques for the detection of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in meat producing animals: A

narrative review article". *Iranian Journal of Parasitology*, 11(4), pp. 431.

Ribes, A., Herrera, J. M. S., Navarro, C. R., Martínez, A. S., Redondo, J. I. P., y Ríos, M. C. C. (1996). "Estudio serológico de las infecciones de transmisión vertical en las mujeres embarazadas controladas en tres centros de salud de Jaén". *Revista Española de Salud Pública*, 70(3), pp.313-318.

Rocha, J. B., Soares, V. E., Oliveira, M., Magalhães, C., Ferraudo, A. S., Cruz, B. C., Pires, V. F., Felippelli, G., Maciel, W. G., Gonçalves, W. A., da Costac, A. J., y Zanetti, W. D. (2016). "Spatial distribution and risk factors for *Toxoplasma gondii* seropositivity in cattle slaughtered for human consumption in Rondônia, North region, Brazil". *Veterinary Parasitology*, 226, pp. 145-149.

Rochette, F. (2005). *Los parásitos del gato y su control*. Barcelona: Veterinaria Estève, D. L.

Rodríguez-Alarcón, J. (1997). "Infección perinatal por *Toxoplasma*". *Boletín de la Sociedad Vasco-Navarra de Pediatría*, 31, pp. 17-21.

Roqueplo, C., Halos, L., Cabre, O., y Davoust, B. (2011). "*Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia". *Parasite*, 18(4), pp. 345-348.

Saavedra, G. M., y Ortega, Y. R. (2004). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in swine from slaughterhouses in Lima, Peru, and Georgia, USA". *Journal of Parasitology*, 90(4), pp. 902-904.

Sabin, A. B. y Feldman, H. A. (1948). "Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*)". *Science*, 108(2815), pp. 660-663.

Sacks, J. J., Roberto, R. R., y Brooks, N. F. (1982). "Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk". *Jama*, 248(14), pp. 1728-1732.

Sævik, B. K., Krøntveit, R. I., Eggen, K. P., Malmberg, N., Thoresen, S. I., y Prestrud, K. W. (2015). "*Toxoplasma gondii* seroprevalence in pet cats in Norway and risk factors for seropositivity". *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17(12), pp. 1049-1056.

Samico-Fernandes, E. F. T., Samico-Fernandes, M. F. T., de Albuquerque, P. P. F., de Almeida, J. C., de Souza, A., da Rocha, A., de Souza, O. L., y Mota, R. A. (2017). "*Toxoplasma gondii* in backyard pigs: Seroepidemiology and mouse bioassay". *Acta Parasitologica*, 62(2), pp. 466-470.

- Sampedro, A., Mazuelas, P., Rodríguez-Granger, J., Torres, E., Puertas, A., y Navarro, J. M. (2010). "Marcadores serológicos en gestantes inmigrantes y autóctonas en Granada". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), pp. 694-697.
- Sánchez-Murillo, J. M., Carretero, R. C., Sanchez, J. F., Manso, G. P., y Gómez-Nieves, J. M. (2004). "Sero-prevalencia de la toxoplasmosis porcina en animales sacrificados para consumo en la ciudad de Badajoz". *Avances en Tecnología Porcina*, 1(2), pp. 12-16.
- Sandfoss, M., DePerno, C., Patton, S., Flowers, J., y Kennedy-Stoskopf, S. (2011). "Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spp.* in feral pigs (*Sus scrofa*) of eastern North Carolina". *Journal of Wildlife Diseases*, 47(2), pp. 338-343.
- Santiago, B., Blázquez, D., López, G., Sainz, T., Muñoz, M., Alonso, T., y Moro, M. (2012). "Perfil serológico en gestantes extranjeras frente a VIH, VHB, VHC, virus de la rubéola, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, y *Trypanosoma cruzi*". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2), pp. 64-69.
- Santoro, A., Tagel, M., Must, K., Laine, M., Lassen, B., y Jokelainen, P. (2017). "*Toxoplasma gondii* seroprevalence in breeding pigs in Estonia". *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), pp. 1-8.
- dos Santos, C. B., Carvalho, Â. C., Ragozo, A. M., Soares, R. M., Amaku, M., Yai, L. E., Dubey, J.P, y Gennari, S. M. (2005). "First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil". *Veterinary Parasitology*, 131(3), pp. 207-211.
- Sarkari, B., Asgari, Q., Bagherian, N., Esfahani, S. A., Kalantari, M., Mohammadpour, I., Ashrafmansori, M., Amerinia, M., y Sarvestani, F. S. (2014). "Molecular and serological evaluation of *Toxoplasma gondii* infection in reared turkeys in Fars Province, Iran". *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(7), pp. 1-5.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S.L., Jones, J. L., y Griffin, P. M. (2011). "Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens". *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), pp. 1-9.
- Schares, G., Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A. O., Bauer, C., y Conraths, F. J., (2005). "Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany". *International Journal for Parasitology*, 35, pp. 1525-1537.

- Sharma, S. D., Mullenax, J., Araujo, F. G., Erlich, H. A., y Remington, J. S. (1983). "Western Blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies". *The Journal of Immunology*, 131(2), pp. 977-983.
- Sharma, R., Tiwari, K., Chikweto, A., DeAllie, C., y Bhaiyat, M.I. (2015). "Prevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Pigs in Grenada, West Indies". *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, pp. 138-141.
- Sharma, R., Parker, S., Al-Adhami, B., Bachand, N., y Jenkins, E. (2019). "Comparison of tissues (heart vs. brain) and serological tests (MAT, ELISA and IFAT) for detection of *Toxoplasma gondii* in naturally infected wolverines (*Gulo gulo*) from the Yukon, Canada". *Food and Waterborne Parasitology*, In Press.
- Shrestha, J. N. B. y Fahmy, M. H. (2005). "Breeding goats for meat production: a review 1. Genetic resources, management and breed evaluation". *Small Ruminant Research*, 58, pp. 93-106.
- Sibley, L. D., Mordue, D. G., Su, C., Robben, P. M., y Howe, D. K. (2002). "Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*". *Philosophical transactions-royal society of London series B. Biological Sciences*, 357, pp. 81-88.
- Sibley, L. D., Khan, A., Ajioka, J. W., y Rosenthal, B. M. (2009). "Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), pp. 2749-2761.
- da Silva, A.V., Pezerico, S.B., de Lima, V.Y., d'Arc Moretti, L., Pinheiro, J.P., Tanaka, E.M., Ribeiro, M.G., y Langoni, H. (2005). "Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs". *Veterinary Parasitology*, 127, pp. 23-27.
- da Silva, P. D. C., Shiraishi, C. S., da Silva, A. V., Gonçalves, G. F., Sant'Ana, D. D. M. G., y de Almeida, E. J. (2010). "*Toxoplasma gondii*: a morphometric analysis of the wall and epithelial cells of pigs intestine". *Experimental Parasitology*, 125(4), pp. 380-383.
- da Silva, R. C., Langoni, H., Su, C., y da Silva, A. V. (2011). "Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified". *Veterinary Parasitology*, 175(1), pp. 173-177.

da Silva, M. G., Vinaud, M. C., de y Castro, A. M. (2015a). "Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014". *PloS One*, 10(11), pp. 1-15.

da Silva, J. B., de Santana Castro, G. N., dos Santos, P. N., da Fonseca, A. H., da Silva Lima, D. H., dos Anjos Bomjardim, H., dos Santos Belo, A., de Oliveira Soares, S., y Barbosa, J. D. (2015b). "Detection of a high prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cattle in Northern and Midwestern Brazil". *Revista de Salud Animal*, 37(1), pp. 52-56.

Silva-Gutierrez, N., Bahsas Zaky, R., Bouchard, M., Teran Angel, G., Amoroso, A., Peterson, D. L., Salmen, S. (2018). "T-cell profiles elicited by *Toxoplasma gondii* in acutely/chronically infected humans". *Parasite Immunology*, 40(6), pp. e12532.

Simpore, J., Savadogo, A., Ilboudo, D., Nadambega, M. C., Esposito, M., Yara, J., Pignatelli, S., Pietra, V., y Musumeci, S. (2006). "*Toxoplasma gondii*, HCV, and HBV seroprevalence and co-infection among HIV-positive and-negative pregnant women in Burkina Faso". *Journal of Medical Virology*, 78(6), pp. 730-733.

Slany, M., Reslova, N., Babak, V., y Lorencova, A. (2016). "Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat from different production systems in the Czech Republic". *International Journal of Food Microbiology*, 238, pp. 252-255.

Sohn, W. M., y Nam, H. W. (1999). "Western blot analysis of stray cat sera against *Toxoplasma gondii* and the diagnostic availability of monoclonal antibodies in sandwich-ELISA". *The Korean Journal of Parasitology*, 37(4), pp. 249.

Sommer, R., Rommel, M., y Levetzow, R., (1965). "Die Überlebensdauer von *Toxoplasma* zysten in fleisch und fleishzubereitungen". *Fleischwirtschaft*, 5, pp. 454-457.

de Sousa, S., Ajzenberg, D., Canada, N., Freire, L., Correia, da Costa, J. M., Dardé, M. L., Thulliez, P., y Dubey, J. P. (2006). "Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal". *Veterinary Parasitology*, 135, pp. 133-136.

de Sousa, R. Á. D., Lemos, J. D. F., Farias, L. A., Lopes, C. D., y Santos, K. R. D. (2014). "Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pigs in southern Piauí". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), pp. 98-100.

- Spada, E., Proverbio, D., Della Pepa, A., Perego, R., Baggiani, L., DeGiorgi, G. B., Domenichini, g., Ferro, E., y Cremonesi, F. (2012). "Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data". *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(6), pp. 369-377.
- Sroka, J., T. Cencek, I. Ziomko, J. Karamon, J. y Zwolinski. (2008). "Preliminary assessment of ELISA, MAT, and LAT for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs". *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52, pp. 545-549.
- Sroka, J., Wójcik-Fatla, A., Zając, V., Sawczyn, A., Cisak, E., Karamon, J., Dutkiewicz, J., y Bojar, I. (2016). "Comparison of the efficiency of two commercial kits-ELFA and Western blot in estimating the phase of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women". *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(4), pp. 570-575.
- Suárez, A., Andrade Jr, H., Galisteo, A., y Miguel, O. (2002). "Concordancia de las pruebas de ELISA y hemaglutinación indirecta en el diagnóstico de la toxoplasmosis porcina". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 13(1), pp. 84-86.
- Suarez-Aranda, F., Galisteo, A. J., Hiramoto, R. M., Cardoso, R. P. A., Meireles, L. R., Miguel, O., y Andrade, H. F. (2000). "The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru". *Veterinary Parasitology*, 91(1), pp. 23-32.
- Sutterland, A. L., Fond, G., Kuin, A., Koeter, M. W. J., Lutter, R., Gool, T., Yolken, R., Szoke, A., Leboyer, M., y Haan, L. (2015). "Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis". *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 132(3), pp. 161-179.
- Tao, Q., Wang, Z., Feng, H., Fang, R., Nie, H., Hu, M., Zhou, Y., y Zhao, J. (2011). "Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on pig farms in central China". *The Journal of Parasitology*, 97(2), pp. 262-264.
- Tassi, P. (2007). "*Toxoplasma gondii* infection in horses. A review". *Parassitologia*, 49(1-2), pp. 7-15.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., y Weiss, L.M. (2000). "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans". *International Journal of Parasitology*, 30, pp. 1217-1258.

- Tenter, A.M. (2009). "Toxoplasma gondii in animals used for human consumption". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 104 (2), pp. 364-369.
- Terazawa, A., Muljono, R., Susanto, L., Margono, S., y Konishi, E. (2003). "High Toxoplasma antibody prevalence among inhabitants in Jakarta, Indonesia". *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 56(3), pp. 107-109.
- Thaller, R., Tammaro, F., y Pentimalli, H. (2011). "Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in central Italy". *Le Infezioni in Medicina*, 4, pp. 241-247.
- Thiong'o, S. K., Ichagichu, J. M., Ngotho, M., Aboge, G.O., Kagira, J. M., Karanja, S. M., y Maina, N. N. (2016). "Use of the nested polymerase chain reaction for detection of Toxoplasma gondii in slaughterhouse workers in Thika District, Kenya". *SAMJ: South African Medical Journal*, 106(4), pp. 417-419.
- Tizard, I. R. (2002). *Inmunología Veterinaria*. (Sexta Edición) México: Mc Graw Hill/ Interamericana de México.
- Tonouhewa, A. B. N., Akpo, Y., Sessou, P., Salanon, C., Aplogan, G. L., Assogba, M. N., Youssao, I. A. K., y Farougou, S. (2019). "Toxoplasma gondii infections in pigs from south Benin and assessment of breeders' knowledge about toxoplasmosis". *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, In press.
- Torrey, E. F., Bartko, J. J., y Yolken, R. H. (2012). "Toxoplasma gondii and other risk factors for schizophrenia: an update". *Schizophrenia bulletin*, 38(3), pp. 642-647.
- Travaillé, E., La Carbona, S., Gargala, G., Aubert, D., Guyot, K., Dumètre, A., Villena, I., y Houssin, M. (2016). "Development of a qRT-PCR method to assess the viability of Giardia intestinalis cysts, Cryptosporidium spp. and Toxoplasma gondii oocysts". *Food Control*, 59, pp. 359-365.
- Tsai, Y. J., Chung, W. C., Fei, A. C., Kaphle, K., Peng, S., y Wu, Y. L. (2007). "Seroprevalence of Toxoplasma gondii in pigs from slaughterhouses in Taiwan". *Journal of Parasitology*, 93(6), pp. 1540-1541.
- Tsutsui, V.S., Freire, R.L., Garcia, J. L., Gennari, S.M., Vieira, D.P., Marana, E.R.M., Prudêncio, L.B., y Navarro, I. T. (2007). "Detection of Toxoplasma gondii by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs". *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(1), pp. 30-34.
- Tuda, J., Adiani, S., Ichikawa-Seki, M., Umeda, K., y Nishikawa, Y. (2017). "Seroprevalence of Toxoplasma

gondii in humans and pigs in North Sulawesi, Indonesia". *Parasitology International*, 66(5), pp. 615-618.

Turčeková, L., Antolová, D., Reiterová, K., y Spišák, F. (2013). "Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs". *Acta Parasitologica*, 58(3), pp. 361-366.

Vallejo, A., Muniesa, A., Ferreira, C., y de Blas, I. (2013). "New method to estimate the sample size for calculation of a proportion assuming binomial distribution". *Research in Veterinary Science*, 95(2), pp. 405-409.

van der Giessen, J., Fonville, M., Bouwknecht, M., Langelaar, M. y Vollema, M. (2007). "Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands". *Veterinary Parasitology*, 148, pp. 371-374.

Vargas-Villavicencio, J. A., Besné-Mérida, A., y Correa, D. (2016). "Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review". *Veterinary Parasitology*, 223, pp. 195-204.

Velmurugan, G. V., Su, C., y Dubey, J. P. (2009). "Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States". *Journal of Parasitology*, 95(1), pp. 95-99.

Ventanas, J., (2001). *Tecnología del jamón Ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación del aroma y del sabor*. (Primera edición) España: Ediciones Mundi-Prensa.

Venturini, M. C., Bacigalupe, D., y Venturini, L. (2004). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sows from slaughterhouses and in pigs from an indoor and an outdoor farm in Argentina". *Veterinary Parasitology*, 124, pp. 161-165.

Verhelst, D., De Craeye, S., Dorny, P., Melkebeek, V., Goddeeris, B., Cox, E., y Jongert, E. (2011). "IFN- γ expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues are associated with an antibody response against GRA7 in experimentally infected pigs". *Veterinary Parasitology*, 179(1), pp. 14-21.

Veronesi, F., Ranucci, D., Branciarri, R., Miraglia, D., Mammoli, R., y Fioretti, D. P. (2010). "Seroprevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection on Finishing Swine Reared in the Umbria Region, Central Italy". *Zoonoses and Public Health*, 58, pp. 178-184.

Veronesi, F., Santoro, A., Milardi, G. L., Diaferia, M., Branciarri, R., Miraglia, D., Cioffi, A., Gabrielli, S., y Ranucci, D. (2017). "Comparison of PCR assays targeting the multi-copy targets B1 gene and 529 bp repetitive

element for detection of *Toxoplasma gondii* in swine muscle". *Food Microbiology*, 63, pp. 213-216.

Verma, R., y Khanna, P. (2013). "Development of *Toxoplasma gondii* vaccine. A global challenge". *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(2), pp. 291-293.

Verma, S. K., Sweeny, A. R., Lovallo, M. J., Calero-Bernal, R., Kwok, O. C., Jiang, T., Su, C., Grigg, M. E., y Dubey, J. P. (2017). "Seroprevalence, isolation and co-infection of multiple *Toxoplasma gondii* strains in individual bobcats (*Lynx rufus*) from Mississippi, USA". *International Journal for Parasitology*, 47(5), pp. 297-303.

Vesco, G., Buffolano, W., La Chiusa, S., Mancuso, G., Caracappa, S., Chianca, A., Villari, S., Currò, V., Liga, F., y Petersen, E. (2007). "*Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy". *Veterinary Parasitology*, 146(1), pp. 3-8.

Villard, O., Cimon, B., L'Ollivier, C., Fricker-Hidalgo, H., Godineau, N., Houze, S., Paris, L., Pelloux, H., Villena, I., y Candolfi, E. (2016). "Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(1), pp. 22-33.

Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., y Buffolano, W. (2009). "Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy". *Veterinary Parasitology*, 161(1), pp. 1-8.

Villegas, E. N., Augustine, S. A., Villegas, L. F., Ware, M. W., See, M. J., Lindquist, H. A., Schaefer, F. W., y Dubey, J. P. (2010). "Using quantitative reverse transcriptase PCR and cell culture plaque assays to determine resistance of *Toxoplasma gondii* oocysts to chemical sanitizers". *Journal of Microbiological Methods*, 81(3), pp. 219-225.

Vostalová, E., Literák, I., Pavlásek, I., Sedlák, K. (2000). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* in finishing pigs in a large-scale farm in the Czech Republic". *Acta Veterinaria Brno*, 69(3), pp. 209-212.

Waap, H., Cardoso, R., Leitão, A., Nunes, T., Vilares, A., Gargaté, M. J., Meireles, J., Cortes, H., y Ângelo, H. (2012). "In vitro isolation and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats and pigeons in Lisbon, Portugal". *Veterinary Parasitology*, 187(3), pp. 542-547.

Wallander, C., Frössling, J., Vågsholm, I., Uggla, A., y Lunden, A. (2015). "*Toxoplasma gondii* seroprevalence in wild boars (*Sus scrofa*) in Sweden and evaluation of ELISA test performance". *Epidemiology and Infection*, 143(09), pp. 1913-1921.

- Wallander, C., Frössling, J., Dórea, F. C., Uggla, A., Vågsholm, I., y Lundén, A. (2016). "Pasture is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs". *Veterinary Parasitology*, 224, pp. 27-32.
- Wang, C. H., Diderrich, V., Kliebenstein, J., Patton, S., Zimmerman, J., Hallam, A., Bush, E., Faulkner, C., y McCord, R. (2002). "*Toxoplasma gondii* levels in swine operations: differences due to technology choice and impact on costs of production". *Food Control*, 13(2), pp. 103-106.
- Wang, Q., Jiang, W., Chen, Y. J., Liu, C. Y., Shi, J. L., y Li, X. T. (2012a). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies, circulating antigens and DNA in stray cats in Shanghai, China". *Parasites & Vectors*, 5(1), pp. 190-195.
- Wang, H., Wang, T., Luo, Q., Huo, X., Wang, L., Liu, T., Xu, X., Wang, Y., Lu, F., Lun, Z., Yu, L., y Shen, J. (2012b). "Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China". *International Journal of Food Microbiology*, 157, pp. 393-397.
- Wang, J. L., Zhou, D. H., Chen, J., Liu, G. X., Pu, W. B., Liu, T. Y., Qin, S. Y., Yin, M. Y., y Zhu, X. Q. (2015). "The prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses in Changji Hui Autonomous Prefecture, Xinjiang, northwestern China". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(3), pp. 298-302.
- Wang, D., Liu, Y., Jiang, T., Zhang, G., Yuan, G., He, J., Su, C., y Yang, N. (2016). "Seroprevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs intended for human consumption in Liaoning province, northeastern China". *Parasites & Vectors*, 9(1), pp. 1-5.
- Warnekulasuriya, M. R., Johnson, J. D., y Holliman, R. E. (1998). "Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats". *International Journal of Food Microbiology*, 45, pp. 211-215.
- Weigel, R. M., Dubey, J. P., Siegel, A. M., Kitron, U. D., Mannelli, A., Mitchell, M. A., Mateus-Pinilla, N. E., Thulliez, P., Shenm S. K., Kwok, O. C. H., y Todd, K. S. (1995). "Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois". *The Journal of Parasitology*, 81, pp. 736-741.
- Weinman, D. y Chandler, A. H. (1954). "Toxoplasmosis in Swine and Rodents. Reciprocal Oral Infection and Potential Human Hazard". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87(1), pp. 211-216.
- Weiss, L. M., y Kim, K. (2007). *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan*. Perspectives and methods.

Reino Unido: Academic Press.

Weiss, L. M., y Kim, K. (2013). *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan*. Perspectives and methods. (Second Edition). Reino Unido: Academic Press.

Wilson, E. B. (1927). "Probable inference, the law of succession, and statistical inference". *Journal of the American Statistical Association*, 22(158), pp. 209-212.

Wingstrand, A., Lind, P., Haugegaard, J., Henriksen, S. A., Bille-Hansen, V., y Sørensen, V. (1997). "Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*". *Veterinary Parasitology*, 72(2), pp. 129-140.

Wolf, A. y Cowen, D. (1937). "Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (Encephalitozic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man". *Bulletin of the Neurological Institute of New York*, 6, pp. 306-335.

Work, K., (1968). "Resistance of *Toxoplasma gondii* encysted in pork". *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 73, pp. 85-92.

Wu, D., Lv, R., Sun, X., Shu, F., Zhou, Z., Nie, K., Duan, G., y Zou, F. (2012). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from slaughter pigs in Chongqing, China". *Tropical Animal Health and Production*, 44(4), pp. 685-687.

Xu, P., Cai, Y. N., Leng, X., Wang, J., Ma, W., Mu, G. D., Jiang, J., Liu, X. Y., Wang, Z. D., Zhao, Q., y Yang, G. L. (2015). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Jilin Province, Northeastern China". *Tropical Biomedicine*, 32(1), pp. 116-120.

Yarovinsky, F. (2014). "Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. Nature Reviews". *Immunology*, 14, pp. 109-121.

Yildiz, K., Pişkin, F. Ç., Ütük, A. E., y Gökpinar, S. (2015). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep meats purchased from retailstores in Central Anatolia, Turkey". *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(3), pp. 328-332.

Yu, H., Huang, B., Zhuo, X., Chen, X., y Du, A. (2013). "Evaluation of a real-time PCR assay based on the single-copy SAG1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii*". *Veterinary Parasitology*, 197(3), pp. 670-673.

- Zakimi, S., Hisako, K. Y. A. N., Oshiro, M., Sugimoto, C., y Fujisaki, K. (2006). "PCR-based discrimination of *Toxoplasma gondii* from pigs at an abattoir in Okinawa, Japan". *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(4), pp. 401-404.
- Zhang, X. X., Jiang, R. L., Zhang, N. Z., Wang, C. R., Tao, W. F., Xu, P., Mae, C. F., Houf, G., y Ni, H. B. (2018). "Molecular detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in free-ranging pigs in Northeastern China". *Infection, Genetics and Evolution*, 63, pp. 110-115.
- Zhang, Y., Mi, R., Huang, Y., Xia, L., Cai, Y., Jia, H., Zhanga, X., Yanga, H., Wanga, X., Han, X., y Chen, Z. (2019). "Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in pork in Shanghai, China". *Food Control*, 99, pp. 57-63.
- Zhao, G., Shen, B., Xie, Q., Xu, L. X., Yan, R. F., Song, X. K., Hassan, i. A., y Li, X. R. (2012). "Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in China based on circulating antigens and antibodies". *Veterinary Parasitology*, 185(2), pp. 72-77.
- Zhou, D. H., Liang, R., Yin, C. C., Zhao, F. R., Yuan, Z. G., Lin, R. Q., Song, H. Q., y Zhu, X. Q. (2010). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from southern China". *Journal of Parasitology*, 96(3), pp. 673-674.
- Zhuo, X., Huang, B., Luo, J., Yu, H., Yan, B., Yang, Y., y Du, A. (2015). "Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays based on ITS-1 for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in pork". *Veterinary Parasitology*, 208, pp. 246-249.
- Zintl, A., Halova, D., Mulcahy, G., O'Donovan, J., Markey, B., y DeWaal, T. (2009). "In vitro culture combined with quantitative TaqMan PCR for the assessment of *Toxoplasma gondii* tissue cyst viability". *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), pp. 167-172.
- Zou, F. C., Sun, X. T., Xie, Y. J., Li, B., Zhao, G. H., Duan, G., y Zhu, X. Q. (2009). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in southwestern China". *Parasitology International*, 58(3), pp. 306-307.
- Zufferey, J., Di Mito, C., y Auckenthaler, R. (2007). "P553 Evaluation of the new Vidia® toxoplasmosis IgG and IgM assays in women of childbearing age". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, pp. 124.
- Zumalacárregui, J. M. (1997). "Tecnología del jamón crudo-curado". *CYTA-Journal of Food*, 1(5), pp. 134-138.



VIII. REFERENCIAS DE LEGISLACIÓN



Legislación Comunitaria

Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 139/1, de 30 de abril de 2004.

Legislación Estatal

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, n. 34, de 8 de febrero de 2013.

Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico. *Boletín Oficial del Estado*, n. 10, de 11 de enero de 2014.

Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. *Boletín Oficial del Estado*, n. 147, de 18 de junio de 2014.

Real Decreto 1386/2018, de 19 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, n. 280, de 20 de noviembre de 2018.

Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, n. 78, de 1 de abril de 2015.

IX. ANEXOS





Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Research paper

Toxoplasma gondii: Pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat



Laura Herrero^a, María Jesús Gracia^b, Consuelo Pérez-Arquillué^a, Regina Lázaro^a,
Marta Herrera^a, Antonio Herrera^a, Susana Bayarri^{a,*}

^a Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2-(Universidad de Zaragoza-CITA), C/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

^b Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2-(Universidad de Zaragoza-CITA), C/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2016

Received in revised form 5 May 2016

Accepted 10 May 2016

Keywords:

Toxoplasma gondii

Pig seroprevalence

Risk factors

Pork meat

Safety control tool

HACCP

Cured meat products

ABSTRACT

This study was conducted on 161 fattening pig farms located in Aragón (Northeast Spain). Serum samples from 1200 pigs were tested for antibodies against *T. gondii* by indirect immunofluorescence assay (IFA). Antibodies to *T. gondii* ($\geq 1:20$) were detected in 301 pigs (24.52%). The seroprevalence observed in the present study indicates a widespread exposure to *T. gondii*, as seropositive pigs were found in 96.67% of the farms studied although low pig titers were determined. Risk factors associated with *T. gondii* seroprevalence were presence of cats in or around the farms, presence of dogs around the facilities, low number of animals in the farms, poor hygiene and bad maintenance of the farms. Finally, it was observed that where rodent baits were used, *Toxoplasma* prevalence was lower. Risk management measures including control of cats and rodents on the farms, among others, could help to reduce the observed prevalence levels. By mouse bioassay, *T. gondii* was detected in 73.7% and isolated from 42.1% of seropositive pigs and a significant relation between the titers of pigs and the presence and viability of *T. gondii* in the tissues was found. The detection of *T. gondii* is not possible by currently practiced meat inspection. Nevertheless, the increased probability of detecting viable forms of *T. gondii* in tissues of pigs with titers $\geq 1:80$ could be used as the cutoff for discriminating higher risk animals, and could be used as an effective control tool for the industry of cured meat products. In practical terms, we propose that this value could be used as a critical limit in the HACCP system.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is one of the most successful protozoan parasites in nature, being able to infect all warm-blooded animals including humans. In most adults, infection does not cause serious illness, but severe disease may occur in immunocompromised people. In pregnant women who become acutely infected, the parasite can also cause severe abnormality or death to the unborn child (Tenter et al., 2000; Hill et al., 2005; EFSA, 2011).

Although toxoplasmosis is conventionally associated with cats and kitty litter, it is estimated that 50% of cases are foodborne, and the USA CDC (Centers for Disease Control and Prevention) estimate that foodborne toxoplasmosis is surpassed only by *Salmonella* in the number of annual deaths it causes (Scallan et al., 2011). Further, from an international food safety perspective, *Toxoplasma* ranked

4th among foodborne parasites with the greatest global impact (FAO/WHO, 2014). Specifically, consumption of raw, undercooked or cured meat products containing tissue cysts is the major risk factor associated with human toxoplasmosis (Kapperud et al., 1996; Baril et al., 1999; Cook et al., 2000; Berger et al., 2009). Due to its omnivorous character, pigs have great possibilities of acquiring infection with *T. gondii*, being the consumption of pork meat one of the most important sources of infection (García-Bocanegra et al., 2011; Balea et al., 2012; Juránková et al., 2014).

The seroprevalence of *T. gondii* in pigs is highly variable among countries and regions within the same country, and is influenced by the production system. Studies in different countries indicate a seroprevalence from 0.4% to 90.4% (Dubey, 2009; Guo et al., 2015).

The risk of detecting antibodies to *Toxoplasma* in extensive production farm pigs is statistically higher than in industrial farm pigs, and prevalence varies dramatically among the classes of pigs surveyed (market pigs versus sows) (Tenter et al., 2000; Dubey and Jones, 2008; Dubey, 2009; Alvarado-Esquivel et al., 2011; Yu et al., 2011; Guo et al., 2015). Production system is an important factor in

* Corresponding author.

E-mail address: sbayarri@unizar.es (S. Bayarri).

the process of risk assessment, taking into account current trends in the consumption of meat from organic farms that produce their pigs in extensive, which could cause a resurgence of infection rates (van der Giessen et al., 2007; Dubey, 2010; García-Bocanegra et al., 2010a; Veronesi et al., 2011). Besides this, one of the most important risk factors that enables contact with the parasite in pig farms is the presence of cats (García-Bocanegra et al., 2010a,b; Ortega-Pacheco et al., 2011; Cenci-Goga et al., 2013). Other factors that contribute to infection of pigs are the age of the animals and the size of the census, the facilities of the farms and their maintenance, rodent control to avoid that they can be eaten by pigs, the possibility of contact with dead bodies, or a favorable temperature for oocysts sporulation (Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010b; Hill et al., 2010; Veronesi et al., 2011; Cenci-Goga et al., 2013; Hernández et al., 2014).

Seropositivity is, in general, a good indicator of the presence of the parasite in tissues (Dubey et al., 1995a, 2002; Dubey and Jones, 2008) and some authors report that the level of isolation increases with antibody titer in the pig (Dubey et al., 1995b). *T. gondii* shows high affinity for neural and muscular tissues (Dubey, 2009), and a worldwide prevalence in carcasses of pigs for human consumption, ranging from 0.4% to 92.7%, has been reported (Dubey, 2009; Guo et al., 2015). *Toxoplasma* cysts in pork can persist for a long time (EFSA, 2007). However, pork meat enters the food chain without a specific meat inspection to check *T. gondii* in the slaughterhouse (Dorny et al., 2009; Blagojevic and Antic, 2014), identified as one of the most relevant biological hazards in the context of meat inspection of swine (EFSA, 2011).

Spain is the fourth largest producer potency of pork after China, USA and Germany (MAGRAMA, 2014), and meat industry has focused the attention to produce meat that is wholesome, safe, and of high quality. Dry-cured ham is an important food in the Mediterranean area, and Spain is one of the main producers. This type of ham is widely consumed in Spain and exported to other countries, so the prevalence at farm level should be reduced to produce uncontaminated raw materials and elaborate safer hams. To ensure food safety throughout the food chain, preventive measures should be focused in primary production (e.g. surveillance and monitoring of animals), and post-harvest strategies at slaughter and during food processing. At farm level, risk reduction measures are based on herd health programs, closed breeding pyramids and GHP/GFP. The application of hazard analysis and critical control point (HACCP) principles to primary production is not yet generally feasible. However, guides to good practice should encourage the use of appropriate hygiene practices at farm level (EC, 2004; EFSA, 2011).

Considering its importance for the risk assessment process, the aim of this work is to know the prevalence of *T. gondii* antibodies in finishing swine raised in different farms of Aragón (Northeastern Spain), as well as to evaluate the risk factors for the transmission of the parasite at farm level for determining the best management practices to reduce the potential of infection in order to obtain "Toxoplasma Free Farms". Additionally, this study aims to determine the presence and viability of *T. gondii* in tissues of seropositive pigs, and to evaluate if serological titers could be useful to potentially identify contaminated pork meat destined to elaborate cured meat products.

2. Materials and methods

2.1. Sampling of farms and animals

The study was conducted on 161 fattening pig farms located in Aragón (Northeastern Spain). For sampling farms and animals within each farm the statistical program WinEpi (Working in Epi-



Fig. 1. Map of Aragón (NE Spain) showing the location of the studied farms.

demology) was used to ensure a 95% probability of detecting at least one positive animal for an expected seroprevalence of 16%, which is the prevalence obtained in previous studies in our laboratory and in the scientific literature in Spain. Based on these calculations, a total of 60 pig farms were studied (Fig. 1) and 20 pigs were sampled from each farm (50% males and 50% females, between 4 and 5 months of age). In total 1200 fattening pigs were analyzed. Specific identification of pigs was carried out for traceability of pig sera.

3. Study of seroprevalence of *T. gondii* in pigs

3.1. Serum sampling

Three milliliters of blood were obtained by puncture of the jugular vein into sterile 5 ml tubes (BD Vacutainer, no additive, BD, Franklin Lakes, NJ). The serum was obtained by blood centrifugation at 3500 rpm for 10 min (Hettich Universal, Germany), transferred to 1.5 ml eppendorf tubes and stored at -20°C until analyzed.

3.2. Serological examination

Pig sera were analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) to detect antibodies against *T. gondii*. Serum dilutions of 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, and 1:320 were prepared from each sample to be tested. A positive control (kindly provided by Dr. J.P. Dubey), and a contrasted negative control were included in each analysis. All prepared slides were examined with an Eclipse 80i fluorescence microscope (Eclipse 80i, Nikon instruments INC, Netherlands). A positive result was determined when clear whole-perimeter tachyzoite fluorescence was observed, and the cutoff for positivity was 1:20.

4. Assessment of risk factors in farms

Epidemiological data were collected from 161 farms through an on-farm interview of the farmer and/or the veterinary based on "closed-ended" questions, and also through visits to the farms. Data obtained were contrasted with pig serological results from the sampled farms. The following variables were included to provide information on exposure levels to potential risk factors:

- General data of the farm: identification, location and number of animals.

- Production parameters and behavior: sex of the animal, production system and cannibalism.
- Facilities: outdoor facilities and floor type (fully slatted, partially slatted).
- Conservation and maintenance of farms: use of exclusive clothing, use of hot water and soap to clean, presence of weeds around the farm, window status and temperature maintenance system.
- Presence of animals inside or outside the farm: cats, dogs, rodents, birds and others.
- Rodent control: baits, cats or specialized companies.
- Feeding conditions: feed administration (wet, dry), water source (river, irrigation ditch, or well) and water treatment.

5. Analysis of pig tissues for *T. gondii*

Forty one Pietrain x Landrace pigs were selected for this study: 3 animals with a titer <1:20, as negative controls, and 38 seropositive pigs, with different titers (5 with a titer 1:20, 9 with 1:40, 16 with 1:80 and 8 with 1:160). The selected pigs were slaughtered in a commercial slaughterhouse. Tissues selected for analysis were raw ham, heart and tongue. The pig hams were boneless, sliced into small pieces, and minced. Tongue and heart of each pig were also minced, and both organs were mixed at 50%. The minced tissues were completely homogenized, vacuum packaged and stored at refrigeration until analyzed. Specific identification of pig tissues with corresponding pig sera was carried out for traceability.

5.1. Mouse bioassay of tissues for *T. gondii*

A concentration bioassay technique with the acid pepsin digestion procedure was used to demonstrate viable bradyzoites of *T. gondii* in tissues, as previously described (Dubey, 1998; Bayarri et al., 2010). A 0.5 ml aliquot of digestion extract was inoculated intraperitoneally into each of eight 20–25 g CD1 Swiss female mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). All experiments included negative control mice, which were analyzed at the end of the process. Possible disease symptoms were monitored in inoculated mice and animals showing distress signs were euthanized as an animal welfare measure.

Blood samples were drawn from mice that survived 60 days after inoculation. Samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min (Hettich Universal, Germany). Sera were transferred to 0.5 ml eppendorf tubes and stored at -20°C until analysis. Subsequently mice were sacrificed in a CO_2 chamber and the brains of each animal were removed and introduced in a 5.0 ml eppendorf tube and stored at -20°C to assess the viability by PCR.

Mice were maintained at the *Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA)*, in Zaragoza (Spain) under conditions that complied with international rules of good laboratory practices in the care of experimental animals (Directive 2010/63/EU). All procedures were approved by the Ethics Advisory Commission for Animal Experimentation and by Biosecurity Commission of the University of Zaragoza (PI07/12).

5.1.1. IFA of mouse sera

To demonstrate the presence of the parasite, sera samples of mice were analyzed by IFA to detect antibodies against *T. gondii* with polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako-Cytomation). Serum from each mouse was diluted 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, and 1:320. A positive control serum provided by the Unit of Pathological Anatomy of the Department of Animal Health (Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza) and a checked negative control from previous studies in our laboratory were included in each test. Final preparations were examined with an Eclipse 80i fluorescence microscope (Eclipse 80i, Nikon instru-

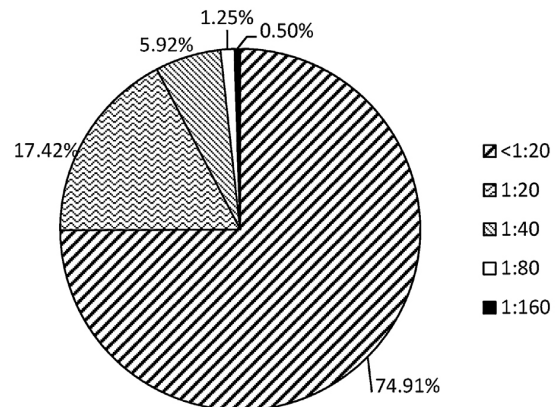


Fig. 2. Titers obtained in the serological analysis (IFA) of 1200 fattening pigs.

ments INC, Netherlands). Sera samples with a titer $\ge 1:10$ were considered positive.

5.1.2. Analysis of *T. gondii* DNA from mice brains

To assess the viability of the parasite, 15 mg brain samples of serologically positive mice were analyzed by real time-PCR. DNA extraction from each sample was performed using UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit Sample Catalog No. 12334-S (Mobio Laboratories, Inc.) according to the manufacturer's instructions. DNA amplification targeting specific sequence of 529 repeat element and SAG genes were performed. CFX Connect (Bio-Rad Laboratories) real time PCR instrument was used for the amplification and detection of *T. gondii*. The reactions volume was 20 μl and samples were run in triplicates. The procedure consisted of 7 min at 94°C for enzyme activation (hot start), and 40 cycles of denaturation at 94°C for 5 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 10 s. The program ended with a dissociation curve from 60 to 94°C with a 0.5°C increase interval. Each PCR run included a negative control, a positive control, and a separate reaction for Actin DNA copies as internal control (IC). A sample was considered positive if at least two of the triplicates were positives with a Ct lower than 35.

6. Statistical analysis

The estimated prevalence of antibodies against *T. gondii* was calculated from the ratio of positive results to the total number of pigs examined, with 95% confidence intervals.

Data about farm conditions and serological results were entered into a database created with the program Microsoft Access 2010. Serological results were compared with the variables studied in the farms to assess the factors associated with *T. gondii* in primary production using Pearson's Chi-square test (or Fisher's exact test when Pearson's Chi-square test was not valid).

Pearson's Chi-square test (or Likelihood Ratio test when Pearson's Chi-square test was not valid) was also used to establish a statistical relationship between the serological titer of pigs and the presence and viability of *T. gondii* cysts in tissues.

Statistical analysis was performed with IBM SPSS 19.0 for Windows. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

7. Results

Seropositive pigs (IFA 1:20 or higher) were found in the 96.67% of the evaluated farms, with a maximum of 13 positive animals in 65.0% of farms and a minimum of 1 positive pig in 5.0% of farms.

Table 1
Risk factors associated to *T. gondii* seroprevalence in the studied farms.

Risk Factor	Variables	% IFA positive	P value
Sex of the animals	Male	28.1	>0.05
	Female	24.6	>0.05
Number of animals	<1000	27.9	0.010
	1000–2000	21.7	>0.05
	>2000	19.1	>0.05
Production system	Closed	20.0	>0.05
	All in/All out	25.1	>0.05
Cannibalism	No	25.0	>0.05
	Yes	27.5	>0.05
Outdoor facilities	No	22.4	>0.05
	Yes	18.8	>0.05
Conservation of farms	Good	26.4	>0.05
	Regular	21.4	>0.05
	Bad	36.7	0.017
Maintenance of farms	Good	23.4	>0.05
	Regular	20.0	>0.05
	Bad	32.1	0.019
Use of exclusive clothing	No	27.3	>0.05
	Yes	24.0	>0.05
Weeds around the farm	No	20.5	>0.05
	Yes	26.0	>0.05
Window status	Good	25.0	>0.05
	Bad	25.1	>0.05
Temperature maintenance system	No	26.1	>0.05
	Yes	24.2	>0.05
Animals inside the farm	Cats	29.2	0.001
	Mice	25.2	>0.05
	Birds	23.3	>0.05
Animals out of the farm	Dogs	33.7	0.003
	Cats	28.0	0.001
	Mice	26.1	>0.05
Rodent control	Birds	15.0	>0.05
	Professional	28.3	>0.05
	Baits	23.4	0.009
Feed administration	Cats	28.1	>0.05
	Wet	24.8	>0.05
Water source	Dry	25.3	>0.05
	Well	24.4	>0.05
	River	25.9	>0.05
	Irrigation ditch	24.3	>0.05

Bold values mean statistical significance.

In the 82.76% of the positive farms, serological titers were $\leq 1:40$. Animals with a titer 1:80 were detected in the 17.24% of the positive farms, while animals with titers 1:160 were detected only in the 6.89% of the farms. No animals with a serological titer higher than 1:160 were found.

Antibodies against *T. gondii* were detected in 301 of 1200 pigs tested, and seroprevalence was calculated to be 24.52%. In general, low pig titers were determined, as shown in Fig. 2.

Risk factors associated to *T. gondii* seroprevalence in the studied farms are shown in Table 1. The presence of cats in or around the farms was the main factor that increases the prevalence of *T. gondii* ($p=0.001$). The presence of other animals, such as dogs, around the facilities was evidenced as another risk factor ($p=0.003$). Higher seroprevalence of *T. gondii* infection in pigs was significantly related to a low number of animals in the farms ($p=0.009$). Related to maintenance and conservation of the farms, poor hygiene ($P=0.017$) and bad maintenance of the farms ($p=0.019$) were risk factors with statistical significance. Finally, concerning the method of rodent control, it was observed that using baits ($p=0.009$) decreased the prevalence.

Presence and viability of *T. gondii* in tissues are shown in Table 2. *T. gondii* was detected in tissues of 28 of the 38 seropositive pigs (73.7%). No cysts were detected in tissues of seronegative pigs. Positive bioassays came from 2 pigs with a titer 1:20, 3 with a titer 1:40, 15 with a titer 1:80 and 8 with a titer 1:160. There was a significant dependence between the titers of pigs and the presence of *Toxoplasma* in tissues ($p < 0.001$). Pigs with a serological titer $\geq 1:80$ have

significant possibility to contain tissue cysts. In fact, the percentage of pigs with titers $\geq 1:80$ and tissue cysts was 95.8%.

Regarding viability of *T. gondii* in fresh tissues, real time-PCR positivity in mice brains showed viability of the parasite in 16 of the 38 pigs (42.1%) (57.1% of tissues in which the parasite was detected). There was also a significant dependence between the titers of pigs and the viability of the parasite ($p=0.003$). Pigs with a serological titer $\geq 1:80$ have a significant probability to host viable parasites in their tissues. Tissues of 62.5% of pigs with titers $\geq 1:80$ have viable parasites versus 7.1% of pigs with titers $< 1:80$ containing viable parasites in their tissues.

8. Discussion

The results of this study indicate that *T. gondii* infection is widespread, with up to 96.7% positive farms. However, in general, low titers of pig sera were determined, and wide variations in within-farm seroprevalence were observed, as it has been reported in previous studies (Tenter et al., 2000; Dubey and Jones, 2008; García-Bocanegra et al., 2010b). Similarly to us, surveys based on the presence of antibodies in blood sera have reported a worldwide distribution of *T. gondii* (Dubey, 2010; Guo et al., 2015). The 24.5% prevalence for *T. gondii* found in our study was similar to the prevalence found in others Spanish regions such as Catalonia (21.2%), Extremadura (23.3%), and Valencia Community (27.3%), and higher than data previously obtained in Aragón (10.1–15%) (García-Bocanegra et al., 2010b). Similar seroprevalences were also found in other European countries, such as Ireland (23.1%) and Serbia (28.9%) (Hálová et al., 2013; Klun et al., 2006). Nevertheless, a higher prevalence (43.1%) has been reported in recent studies carried out in Romania (Balea et al., 2012), and lower seroprevalences, from 4.2% to 18.5%, have been reported in Germany (Damriyasa et al., 2004), Italia (Veronesi et al., 2011), Latvia (Deksne and Kirjušina, 2013) and Portugal (Lopes et al., 2013; Esteves et al., 2014). A close comparison among studies is difficult due to the different serological tests used and the different cutoff values that not always are reported by authors. Besides, the lack of validation is shown in the literature by the use of different cutoffs for a single test, without any data on sensitivity, specificity, and agreement among tests (Aroussi et al., 2015).

Prevalence of *T. gondii* also varied depending on the type of management practices used in the farms, the number of animals tested, the age and type of the pigs tested (fattening vs. sows; indoor pigs vs. organic pigs) (Dubey, 2009; Guo et al., 2015). Prevalence of *T. gondii* infection in pigs are usually higher in older pigs and pigs reared outdoors than in piglets and pigs on factory farms, because they have a higher probability of contact with infective oocysts or infected intermediate hosts (García-Bocanegra et al., 2010b; Dubey, 2010; Blagojevic and Antic, 2014; Basso et al., 2015).

Data provided by the present study show that the main risk factors in farms were the presence of animals (cats and dogs), size of the farm, cleaning conditions and rodent control. The presence of cats in and out of the farm is shown as the most significant risk factor in this study in agreement with those previously reported (Assadi-Rad et al., 1995; Lehmann et al., 2003; García-Bocanegra et al., 2010a,b; Du et al., 2012; de Sousa et al., 2006). Cats are implicated in the maintenance of *T. gondii* infection in pig farms through oocyst elimination and contamination of feed and/or water (Dubey and Beattie, 1988; Mateus-Pinilla et al., 1999; Du et al., 2012; Ichikawa-Seki et al., 2015). It has even been demonstrated that the presence of cats could increase more than eleven times the relative risk of contact with the parasite (García-Bocanegra et al., 2010b). Besides, oocysts can survive and remain infective in damp soil for more than 18 months (Du et al., 2012; Ortega-Pacheco et al., 2013). In this sense, the seroprevalence of *T. gondii* decreased sig-

nificantly in pig farms where cats were vaccinated with a modified live vaccine to reduce oocyst shedding by cats (Mateus-Pinilla et al., 1999; Innes et al., 2009; Verma and Khanna, 2013). In order to decrease the risk of *T. gondii* infection in animals, Tenter et al. (2000) advised to avoid feed and water contamination due to contact with cats. Presence of dogs has also resulted in a significant risk factor. Seropositivity in dogs is often related to the presence of cats in the farms (Arunvipas et al., 2013). The dog is an intermediate host of the parasite, and can serve as a mechanical mean of transport to *T. gondii* (Sharma et al., 2015; Gebremedhin et al., 2015).

Pig farms of this study were all under intensive management, which involves the production of pigs for sale, raised on limited space, usually with confined animal feeding operations. In intensive pig farms, the prevalence is noticeably lower in many countries (Dubey, 2009; Muraro et al., 2010; Piassa et al., 2010; Fernandes et al., 2012) as a result of the safer animal husbandry systems used on commercial farms. However, a higher risk of infection of *T. gondii* was observed in small farms (<1000 pigs). Swine from small farms are at a greater risk for infection because they are more exposed to the infective forms of the parasite present in soil, water and various feeds (Bezerra et al., 2009). On the other hand, in the intensive farming systems, due to a higher concentration of animals raised in confinement spaces, when a failure occurs and a contamination source is present, the number of animals exposed is higher, leading to an increase in seroprevalence (Hill and Dubey, 2002; van der Giessen et al., 2007; Lopes et al., 2013). Herd size is often correlated to management and previous studies have shown an association of herd size and seroprevalence to *T. gondii* both in pigs (Villari et al., 2009) and other livestock species (Klun et al., 2006; Vesco et al., 2007; Gilot-Fromont et al., 2009), although García-Bocanegra et al. (2010b) did not observed this fact. Farms with larger population, good hygiene practices, intensive management and infrastructure can lead to a reduction of *T. gondii* prevalence (Villari et al., 2009; Ortega-Pacheco et al., 2013). In relation to cleaning conditions, higher exposure to *T. gondii* was related to bad farm conservation. Also, Veronesi et al. (2011) indicated the importance of cleaning the facilities, and stated that the prevalence would be reduced if a mechanical and chemical cleaning method were used simultaneously.

In the present study, seroprevalence of *T. gondii* was significantly lower in farms that used rodent baits. Rodents are reservoirs of *T. gondii* (Dubey et al., 1995c; Weigel et al., 1995; Hejlíček et al., 1997; Hill et al., 2005) and have been suggested to play an important role for direct transmission in pig farms due to consumption of infected rodents by pigs (Weigel et al., 1995; Kijlstra et al., 2008; Villari et al., 2009). The use of baits and restriction of cats as a strategy for rodent control was significantly associated with a reduced number of *Toxoplasma* seropositive pigs (Wang et al., 2002; Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010b; Hill et al., 2010). Therefore, in order to reduce the risk of *T. gondii* infection in pig farms, appropriate rodent control programs will have to be carried out (Hill et al., 2005; Villari et al., 2009; García-Bocanegra et al., 2010b).

A monitoring and surveillance program would be reasonable to find high-risk farms and implement appropriate management procedures to minimize the infection pressure. The implementation of specific management procedures to reduce the risk of infection of pigs can help to prevent the transmission of the pathogen to humans through pork consumption.

Pork products are considered to be an important source of *T. gondii* infection in humans (Tenter et al., 2000; Dubey et al., 2002; Dubey, 2009). In the present study, *T. gondii* was detected in 73.7% and isolated from 42.1% of seropositive pigs. All pigs in which the parasite is detected in tissues are seropositive and the level of isolation increased as the antibody titer in the pig did.

Although several serological studies have been performed in pigs in Spain (García-Bocanegra et al., 2010a,b), none of them have

Table 2

Pig serological titers and results of mice bioassays in tissues.

	Pig titer	<i>T. gondii</i> in pork tissues	
		Presence ^a	Viability ^b
Negative control	<1:20	0/16	0/0
	<1:20	0/16	0/0
	<1:20	0/16	0/0
Seropositive pigs	1:20	0/10 (6) [*]	0/0
	1:20	0/16	0/0
	1:20	3/16	0/0
	1:20	1/16	0/1
	1:20	0/16	0/0
	1:40	0/15 (1) [*]	0/0
	1:40	0/16	0/0
	1:40	0/16	0/0
	1:40	0/14 (2) [*]	0/0
	1:40	0/16	0/0
	1:40	0/14 (2) [*]	0/0
	1:40	1/16	0/1
	1:40	1/16	0/1
	1:40	4/14 (2) [*]	2/4
	1:80	3/16	0/3
	1:80	11/15	3/11
	1:80	13/15	7/13
	1:80	12/16	1/12
	1:80	11/15	2/11
	1:80	11/16	3/11
	1:80	12/16	4/12
	1:80	13/16	2/13
	1:80	10/15 (1) [*]	3/10
	1:80	2/10 (6) [*]	0/2
	1:80	0/16	0/0
	1:80	1/15 (1) [*]	0/1
1:80	4/16	0/4	
1:80	2/13 (3) [*]	0/2	
1:80	0/16	0/0	
1:80	6/16	4/6	
1:160	10/15 (1) [*]	5/10	
1:160	8/16	2/8	
1:160	5/14 (2) [*]	0/5	
1:160	12/15 (1) [*]	3/12	
1:160	11/15 (1) [*]	3/11	
1:160	9/16	1/16	
1:160	12/16	0/12	
1:160	3/16	1/3	

^{*}Number of dead mice during the bioassay.

^a Seropositive mice by IFA/Total of mice.

^b Positive mice brain by PCR/Total of seropositive mice by IFA.

related this data to the isolation of *T. gondii* in meat. On the other hand, a previous study performed by our research group on commercial pork meat in Spain revealed an isolation rate of 8%, but the seropositivity of pigs was unknown (Bayarri et al., 2012).

The isolation rate obtained in the present study was relatively high. Viable *T. gondii* organisms were isolated from tissues of pigs collected in other countries (Dubey, 2009; Guo et al., 2015). Some authors have found a prevalence of *T. gondii* in Europe in fresh meat that varies from 0.4% in Austria (Edelhofer, 1994) to 38% in UK (Aspinall et al., 2002). However, our rate is lower than the 51.5–98% isolation rate from pigs reported in the USA (Dubey et al., 1995b, 2012). In other studies conducted in South America, the isolation rates ranged from 12.8 to 55.0% (Omata et al., 1994; Bezerra et al., 2012). Anyway, parasitological surveys based on abattoir samples carried out in America do not provide a true assessment of risk to humans, because post slaughter treatment of meat (storage and other post-harvest treatments with salt) can affect the viability of tissue cysts (Hill et al., 2004).

The high rates of positivity observed in this study compared to those reported in previous studies may be due to the fact that we have used only seropositive animals. Selection of tissues by screen-

ing donor pigs for *T. gondii* antibodies before bioassay increased the efficiency of isolation versus bioassays of all tissues irrespective of antibody status of the donor pig (Dubey, 2009). Our results were similar to other studies on tissues from seropositive animals where the observed isolation rate of *T. gondii* from naturally infected pigs was 36.8% in USA (Dubey and Jones, 2008), 40.5% in Portugal (de Sousa et al., 2006) and 47.2% in Brazil (Cademartori et al., 2014), and higher than the 25% reported in Brazil by dos Santos et al. (2005), among others.

In the cases where the parasite has been detected by mouse seroconversion, it not always has been shown to be viable. These results can be due to the fact that the tissue samples of infected pigs used for this assay contained non-viable parasites (Dubey et al., 1995a). Additionally, the tissue digestion step of the bioassay may reduce *T. gondii* viability (Dubey et al., 1995b; Dubey, 2010). On the other hand, *T. gondii* can most likely be demonstrated in the brain (Dubey, 2009; Burrells et al., 2015). However, in some strains (e.g. the GT-1 strain), *T. gondii* persists in the lung for several weeks and can be evidenced there more easily than in the brain (Dubey, 2010). A bioassay is positive if at least one cyst is detected in the brain of any of the inoculated mice (Garcia et al., 2006; Klun et al., 2011); we performed PCR and the results showed a low parasite burden. In addition, bioassay results (titers in mice were low) suggested that pork tissues contain low levels of infective organisms. However, considering that failure to demonstrate *T. gondii* in mice does not prove lack of infection, antibodies to *T. gondii* should be sought in the sera of inoculated mice (Dubey, 2010). In any case, these data underscore the need for consumer education and further measures to prevent the consumption of these meats without pre-treatment (e.g., cooking, freezing or curing) to kill the parasite.

A main objective of this investigation was to compare antibody test results with isolation of viable *T. gondii* in tissues. Seropositivity in general is a good indicator of the presence and viability of the parasite in tissues (Dubey et al., 1995b, 2002; Dubey and Jones, 2008) and some authors mention that the level of isolation increases with antibody titer in the pig (Dubey et al., 1995b). However, sometimes the parasite was not isolated despite seropositive animals were used (Gajadhar et al., 1998). However, the antibody titer that should be considered indicative of latent infection in pigs is not always certain because viable *T. gondii* has been isolated from seronegative pigs (Hejlíček and Literak, 1994; Omata et al., 1994; Dubey et al., 1995b, 2002; de Sousa et al., 2006). In this regard, Hill et al. (2005) suggest that the antibody response may be independent of parasite burden and in some studies, no statistical association was found between the titers of the tested animals and isolation in mice (dos Santos et al., 2005). In our study, we found that there was a significant dependence between the titers of pigs and presence and viability of *T. gondii* in the tissues. As far as we know, this research is the first study carried out in Spain in which seroprevalence and isolation of *T. gondii* in tissues are correlated, using bioassay to assess the risk of infection. Due to the increased probability of detecting viable forms of *T. gondii* in tissues of pigs with titers $\geq 1:80$, this could be the cutoff for discriminating those higher risk animals. The detection of *T. gondii* is not possible by currently practiced meat inspection, but serological tests can be used to detect *T. gondii* antibodies in pig herds and can consequently be helpful to identify potentially contaminated pork, and could be used as an effective control tool for the industry of cured meat products.

9. Conclusions

Although pig titers determined in this study were very low, the widespread seroprevalence found and the subsequent assessment of risk factors confirms the importance of controlling environmental factors in order to avoid the transmission of the parasite in

pig farms. Consequently, it is very important to maintain intensive management production, with minimal contact with the outside, restricting cat access inside farms, improving hygiene facilities and implementing an efficient rodent control system. This should result in farms with a very low prevalence or even in “*T. gondii* Free Farms” that will provide safer raw material for the elaboration of cured ham.

Current meat inspection at slaughterhouse cannot detect the presence of *T. gondii*. Nevertheless, due to the increased probability of detecting viable forms of *T. gondii* in tissues of pigs with titers $\geq 1:80$, this serological titer could be the cutoff for discriminating those higher risk animals, and could be used as an effective control tool for the industry of cured meat products. In practical terms, we propose that this value could be used as a critical limit in the HACCP system.

Acknowledgements

This project has been cofinanced by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund (INNFACTO IPT-2012-0189-060000). The authors thank the Government of Aragón and the European Social Fund (Consolidated Research Group A01). Thanks are also given to Grupo Jorge, S.L.

References

- Alvarado-Esquivel, C., García-Machado, C., Alvarado-Esquivel, D., González-Salazar, A.M., Briones-Fraire, C., Vitela-Corralles, J., Villena, I., Dubey, J.P., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. *J. Parasitol.* 97 (4), 616–619.
- Aroussi, A., Vignoles, P., Dalmay, F., Wimmel, L., Dardé, M.L., Mercier Ajzenberg, D., 2015. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in horse meat from supermarkets in France and performance evaluation of two serological tests. *Parasite* 22, 14–21.
- Arunvipas, P., Jittapalpong, S., Inpankaew, T., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W., Maruyama, S., 2013. Seroprevalence and risk factors influenced transmission of *Toxoplasma gondii* in dogs and cats in dairy farms in western Thailand. *Afr. J. Agric. Res.* 8 (7), 591–595.
- Aspinall, T.V., Marlee, D., Hyde, J.E., Sims, P.F., 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction—food for thought? *Int. J. Parasitol.* 32 (9), 1193–1199.
- Assadi-Rad, A.M., New, J.C., Patton, S., 1995. Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee. *Vet. Parasitol.* 57 (4), 289–297.
- Balea, A., Paștiu, A.I., Györke, A., Mircean, V., Cozma, V., 2012. The dynamics of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies (IgG) in small ruminants and pigs from Cluj County, Romania. *Sci. Parasitol.* 13 (4), 163–168.
- Baril, L., Ancelle, T., Goulet, V., Thulliez, P., Tirard-Fleury, V., Carne, B., 1999. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand. J. Infect. Dis.* 31 (3), 305–309.
- Basso, W., Handke, M., Sydler, T., Borel, N., Grimm, F., Sidler, X., Deplazes, P., 2015. Involvement of *Toxoplasma gondii* in reproductive disorders in Swiss pig farms. *Parasitol. Int.* 64 (2), 157–160.
- Bayarri, S., Gracia, M.J., Lázaro, R., Barberán, M., Herrera, A., 2010. Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* in cured ham using bioassay: influence of technological processing and food safety implications. *J. Food Protect.* 73 (12), 2239–2243.
- Bayarri, S., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, A., 2012. *Toxoplasma gondii* in commercially available pork meat and cured ham: a contribution to risk assessment for consumers. *J. Food Protect.* 75 (3), 597–600.
- Berger, F., Goulet, V., Le Strat, Y., Desenclos, J.C., 2009. Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev. Epidemiol. Sante Publique.* 57 (4), 241–248.
- Bezerra, R.A., Paranhos, E.B., Del'Arco, A.E., Albuquerque, G.R., 2009. Detection anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in swines bred and abated in the Bahia State. *Brazil. Rev. Bras. Parasitol.* V. 18 (3), 78–80, in Portuguese, with English abstract.
- Bezerra, R.A., Carvalho, F.S., Guimarães, L.A., Rocha, D.S., Silva, F.L., Wenceslau, A.A., Albuquerque, G.R., 2012. Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. *Parasitol. Res.* 110 (2), 509–514.
- Blagojevic, B., Antic, D., 2014. Assessment of potential contribution of official meat inspection and abattoir process hygiene to biological safety assurance of final beef and pork carcasses. *Food Control* 36 (1), 174–182.
- Burrells, A., Benavides, J., Cantón, G., García, J.L., Bartley, P.M., Nath, M., Thomson, J., Chianini, F., Innes, E.A., Katzer, F., 2015. Vaccination of pigs with the S48 strain of *Toxoplasma gondii*—safer meat for human consumption. *Vet. Res.* 46 (1), 47–58.

- Cademartori, B.G., Santos, L.M.J.F., Oliveira, F.C., Quevedo, P., Oliveira, P.A., Ramos, T.S., Rocha, A.S., Ruas, J.L., Farias, N.A., 2014. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 203 (1), 207–211.
- Cenci-Goga, B.T., Ciampelli, A., Sechi, P., Veronesi, F., Moretta, I., Cambiotti, V., Thompson, P.N., 2013. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in Grosseto district, Tuscany, Italy. *Vet. Res.* 9 (1), 25–32.
- Cook, A.J.C., Holliman, R., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T., 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: european multicentre case-control study. *Commentary: congenital toxoplasmosis—further thought for food.* *BMJ* 321 (7254), 142–147.
- Damriyasa, I.M., Bauer, C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter, A.M., Volmer, R., Zahner, H., 2004. Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Vet. Parasitol.* 126 (3), 271–286.
- Deksne, G., Kirjušina, M., 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Latvia. *J. Parasitol.* 99 (1), 44–47.
- Directive 2010/63/EU, (22 September 2010). Directive of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, Official Journal of the European Union, L 276/33–79. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&rid=1> (accessed 21.12.15.).
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.* 163 (3), 196–206.
- Du, F., Zhang, Q., Yu, Q., Hu, M., Zhou, Y., Zhao, J., 2012. Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms in central China. *Vet. Parasitol.* 187 (1), 53–56.
- Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, pp. 220.
- Dubey, J.P., Jones, J.L., 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38 (11), 1257–1278.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P., Powell, E.C., 1995a. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am. J. Vet. Res.* 56 (8), 1030–1036.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Powell, E.C., 1995b. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J. Parasitol.* 81 (1), 48–53.
- Dubey, J.P., Weigel, R.M., Siegel, A.M., Thulliez, P., Kitron, U.D., Mitchell, M.A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N.E., Shen, S.K., Kwok, C.H., Todd, K.S., 1995c. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81 (5), 723–729.
- Dubey, J.P., Gamble, H.R., Hill, D., Sreekumar, C., Romand, S., Thulliez, P., 2002. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *J. Parasitol.* 88 (6), 1234–1238.
- Dubey, J.P., Hill, D.E., Rozeboom, D.W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Su, C., 2012. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Vet. Parasitol.* 188 (1), 14–18.
- Dubey, J.P., 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.* 74 (1), 75–77.
- Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in pigs—the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164 (2), 89–103.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans, second edition*. CRC Press, Boca Raton, pp. 336.
- EC No 852/2004, (30 April 2004). Regulation of the European Parliament and of the Council on the hygiene of foodstuffs, Official Journal of the European Union, L 139/1–54. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0852&rid=1&qid=1450722383637&from=EN> (Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004). (accessed 21.12.15.).
- European Food Safety Authority (EFSA), 2007. Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals. *EFSA J.* 5(3), 1–64.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine): EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ), EFSA panel on contaminants in the food chain (CONTAM), EFSA panel on animal health and welfare (AHAW). *EFSA J.* 9 (10), 2351–2549.
- Edelhofer, R., 1994. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria—an evaluation of data from 1982 and 1992. *Parasitol. Res.* 80 (8), 642–644.
- Esteves, F., Aguiar, D., Rosado, J., Costa, M.L., de Sousa, B., Antunes, F., Matos, O., 2014. *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from central and south of Portugal. *Vet. Parasitol.* 200 (1), 8–12.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO), 2014. Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites, Microbiological Risk Assessment Series No. 23, Rome.
- Fernandes, M.A., Batista, G.I., Carlos, J.D.C.S., Gomes, I.M., Azevedo, K.M.L.D., Setúbal, S., Artimos de Oliveira, S., Coca Velarde, L.G., Cardoso, C.A., 2012. *Toxoplasma gondii* antibody profile in HIV-1-infected and uninfected pregnant women and the impact on congenital toxoplasmosis diagnosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 16 (2), 170–174.
- Gajadhar, A.A., Aramini, J.J., Tiffin, G., Bisaiillon, J.R., 1998. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Canadian market-age pigs. *J. Parasitol.* 84 (4), 759–763.
- García-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Simon-Grifé, M., Cabezón, O., Casal, J., Allepuz, A., Napp, S., Almería, S., 2010a. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. *Res. Vet. Sci.* 89 (1), 85–87.
- García-Bocanegra, I., Simon-Grifé, M., Dubey, J.P., Casal, J., Martín, G.E., Cabezón, O., Perea, A., Almería, S., 2010b. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol. Int.* 59 (3), 421–426.
- García-Bocanegra, I., Anselmo, J., Almería, S., 2011. Situación actual de la toxoplasmosis porcina en España: revisión de recientes estudios seroepidemiológicos. *SUIS* 77, 24–31.
- García, J.L., Gennari, S.M., Machado, R.Z., Navarro, I.T., 2006. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113 (4), 267–271.
- Gebremedhin, E.Z., Kebeta, M.M., Asaye, M., Ashenafi, H., Di Marco, V., Vitale, M., 2015. First report on seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Central Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 11 (1), 59–68.
- Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Belkilani, S., Hermitte, P., Gibout, O., Geers, R., Villena, I., 2009. Landscape, herd management and within-herd seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in beef cattle herds from Champagne-Ardenne, France. *Vet. Parasitol.* 161 (1), 36–40.
- Guo, M., Dubey, J.P., Hill, D., Buchanan, R.L., Gamble, H., Jones, J.L., Pradhan, A.K., 2015. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *J. Food Protect.* 78 (2), 457–476.
- Hálová, D., Mulcahy, G., Rafter, P., Turčėková, L., Grant, T., de Waal, T., 2013. *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. *Zoonoses Public Health* 60 (2), 168–173.
- Hejlíček, K., Literak, I., 1994. Prevalence of toxoplasmosis in rabbits in South Bohemia. *Acta Vet. Brno.* 63 (3–4), 145–150.
- Hejlíček, K., Literak, I., Nezval, J., 1997. Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. *J. Wildlife Dis.* 33 (3), 480–485.
- Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Tarradas, C., Luque, I., García-Valverde, R., Reguillo, L., Astorga, R.J., 2014. A serological survey of *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. in Iberian fattening pigs reared in Free-Range systems. *transbound. Emerg. Dis.* 61 (5), 477–481.
- Hill, D., Dubey, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8 (10), 634–640.
- Hill, D.E., Sreekumar, C., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *J. Food Protect.* 67 (10), 2230–2233.
- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P., 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Health Res. Rev.* 6 (01), 41–61.
- Hill, D.E., Haley, C., Wagner, B., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2010. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the US swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). *Zoonoses Public Health* 57 (1), 53–59.
- Ichikawa-Seki, M., Guswanto, A., Allamanda, P., Mariamah, E.S., Wibowo, P.E., Igarashi, I., Nishikawa, Y., 2015. Seroprevalence of antibody to TgGRA7 antigen of *Toxoplasma gondii* in livestock animals from Western Java, Indonesia. *Parasitol. Int.* 64 (6), 484–486.
- Innes, E.A., Bartley, P.M., Maley, S., Katzer, F., Buxton, D., 2009. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 104 (2), 246–251.
- Juránková, J., Basso, W., Neumayerová, H., Baláž, V., Jánová, E., Sidler, X., Deplazes, P., Koudela, B., 2014. Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiol.* 38, 167–170.
- Kapperud, G., Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., Eskild, A., Eng, J., 1996. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy results of a prospective case-control study in Norway. *Am. J. Epidemiol.* 144 (4), 405–412.
- Kijlstra, A., Meerburg, B., Cornelissen, J., De Craeye, S., Vereijken, P., Jongert, E., 2008. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Vet. Parasitol.* 156 (3), 183–190.
- Klun, I., Djurković-Djaković, O., Katić-Radojević, S., Nikolić, A., 2006. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet. Parasitol.* 135 (2), 121–131.
- Klun, I., Vujančić, M., Yera, H., Nikolić, A., Ivović, V., Bobić, B., Bradonjić, S., Dupouy-Camet, J., Djurković-Djaković, O., 2011. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Vet. Res.* 42 (1), 17–22.
- Lehmann, T., Graham, D.H., Dahl, E., Sreekumar, C., Launer, F., Corn, J.L., Gamble, H.R., Dubey, J.P., 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect. Genet. Evol.* 3 (2), 135–141.
- Lopes, A.P., Dubey, J.P., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Rodrigues, M., Cardoso, L., 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Vet. Parasitol.* 193 (1), 266–269.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) Porcino, 2014. <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/default.aspx> (accessed 18.05.15.).
- Mateus-Pinilla, N.E., Dubey, J.P., Choromanski, L., Weigel, R.M., 1999. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *J. Parasitol.* 85 (5), 855–860.
- Muraro, L.S., Caramori, J.G., Amendoeira, M.R.R., Pereira, J.A., Oliveira Filho, J.X.D., Vicente, R.T., Neves, L.B., Nicolau, J.L., Igarashi, M., Moura, S.T., 2010.

- Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in nova mutum and diamantino, mato grosso, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. V.* 19 (4), 254–255.
- Omata, Y., Dilorenzo, C., Venturini, C., Venturini, L., Igarashi, I., Saito, A., Suzuki, N., 1994. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. *Vet. Parasitol.* 51 (3), 205–210.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E., Uitzil-Álvarez, B., Rodríguez-Buenfil, J.C., Jiménez-Coello, M., 2011. Infection dynamic of *Toxoplasma gondii* in two fattening pig farms exposed to high and low cat density in an endemic region. *Vet. Parasitol.* 175 (3), 367–371.
- Ortega-Pacheco, A., Acosta Viana, K.Y., Guzmán-Marín, E., Segura-Correa, J.C., Alvarez-Fleites, M., Jiménez-Coello, M., 2013. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–6.
- Piassa, F.R., de Araújo, J.B., da Rosa, R.C., Mattei, R.J., Costa da Silva, R., Langoni, H., da Silva, A.V., 2010. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non-certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 19 (3), 152–156.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1), 7–15.
- Sharma, R.N., Tiwari, K., Chikweto, A., DeAllie, C., Bhaiyat, M.I., 2015. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in pigs in Grenada, west Indies. *Open J. Vet. Med.* 5 (6), 138–141.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, I.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30 (12), 1217–1258.
- Verma, R., Khanna, P., 2013. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: a global challenge. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9 (2), 291–293.
- Veronesi, F., Ranucci, D., Branciari, R., Miraglia, D., Mammoli, R., Fioretti, D.P., 2011. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria Region, Central Italy. *Zoonoses Public Health* 58 (3), 178–184.
- Vesco, G., Buffalano, W., La Chiusa, S., Mancuso, G., Caracappa, S., Chianca, A., Villari, S., Currò, V., Liga, F., Petersen, E., 2007. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet. Parasitol.* 146 (1), 3–8.
- Villari, S., Vesco, G., Petersen, E., Crispo, A., Buffalano, W., 2009. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 161 (1), 1–8.
- Wang, C.H., Diderrich, V., Kliebenstein, J., Patton, S., Zimmerman, J., Hallam, A., Bush, E., Faulkner, C., McCord, R., 2002. *Toxoplasma gondii* levels in swine operations: differences due to technology choice and impact on costs of production. *Food Control* 13 (2), 103–106.
- Weigel, R.M., Dubey, J.P., Siegel, A.M., Kitron, U.D., Mannelli, A., Mitchell, M.A., Mateus-Pinilla, N.E., Thulliez, P., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Todd, K.S., 1995. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81 (5), 736–741.
- Yu, H.J., Zhang, Z., Liu, Z., Qu, D.F., Zhang, D.F., Zhang, H.L., Zhou, Q.J., Du, A.F., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pigs, in Zhejiang Province, China. *J. Parasitol.* 97 (4), 748–749.
- de Sousa, S., Ajzenberg, D., Canada, N., Freire, L., da Costa, J.C., Dardé, M.L., Thulliez, P., Dubey, J.P., 2006. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet. Parasitol.* 135 (2), 133–136.
- dos Santos, C.B.A., de Carvalho, Á.C., Ragozo, A.M., Soares, R.M., Amaku, M., Yai, L.E., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 131 (3), 207–211.
- van der Giessen, J., Fonville, M., Bouwknegt, M., Langelaar, M., Vollema, A., 2007. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* 148 (3), 371–374.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Toxoplasma gondii in raw and dry-cured ham: The influence of the curing process



Laura Herrero ^{a,1}, María Jesús Gracia ^{b,1}, Consuelo Pérez-Arquillué ^a, Regina Lázaro ^a, Antonio Herrera ^a, Susana Bayarri ^{a,*}

^a Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Spain

^b Departamento de Patología Animal, Instituto Agroalimentario de Aragón - IIA2 (Universidad de Zaragoza - CITA), Facultad de Veterinaria, 50013, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 November 2016

Received in revised form

16 February 2017

Accepted 28 February 2017

Available online 1 March 2017

Keywords:

Toxoplasma

Pork meat

Cured ham

Mouse bioassay

HACCP

ABSTRACT

The aim of this work was to analyze *Toxoplasma gondii* in raw hams by mouse bioassay and to evaluate the effect of curing on the viability of the parasite to assess the risk of infection from eating dry-cured ham. After a serology study of 1200 pigs in Aragón (Spain), forty-one naturally infected pigs with different serological titers against *T. gondii* were selected. Two cured periods (9 and 12 months) were evaluated as well as the influence of the physicochemical composition of hams on *T. gondii* survival. Although the parasite burden was low, a high number of seropositive pigs with *Toxoplasma* tissues cysts in raw hams were found (31.6%). Viability of *T. gondii* was influenced by the curing, with statistically significant differences between fresh and cured hams ($p < 0.001$). The viability was higher in hams cured for 9 months compared to those cured for 12 months. However, this period of curing resulted in the reduction but not in a complete elimination of the risk. Thus, from a public health point of view, under the conditions of this study it is safer to consume dry-cured ham with periods of curing higher than 12 months. Analysis of physicochemical results did not identify any variable with significant influence on the presence and viability of *T. gondii* in cured ham, but loss of viability of *T. gondii* was observed in hams with a lower fat content. Further research is required to validate combinations of salts concentration and time of curing that can be used as preventive measures in the HACCP system of dry-cured ham industry.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasmosis, caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, is one of the most common parasitic infections of man and other warm-blooded animals. It has been found worldwide and approximately one-third of humanity has been exposed to this parasite (Saadatnia and Golkar, 2012). In most adults it does not cause serious illness, but it can cause blindness and mental retardation in congenitally infected children and devastating disease in immunocompromised individuals (Weiss and Kiss, 2013). Sources of human infection with *T. gondii* are oocysts shed in faeces of infected felines and tissue cysts from infected meat animals. Raw and undercooked meat has thus been considered the main source of infection (Baril et al., 1999; Carme et al., 2002; Choi et al., 1997;

Lake et al., 2002; Ross et al., 2001). Pork is one of the major meat sources associated with human *T. gondii* infections and in a recent risk ranking report, the combination of *Toxoplasma* and pork ranked second among 10 pathogen-food combinations (Guo et al., 2015).

T. gondii has a high affinity for neural and muscular tissues. The parasite is located predominantly in the central nervous system (brain), skeletal muscle (tongue or diaphragm) and cardiac muscle (Dubey, 2010). In order to learn more about the role of meat as a source of human infection with *T. gondii*, it is important to have an indication on the prevalence of infectious tissue cysts (Opsteegh et al., 2016). In response to natural infection, most farm animals that are seropositive for *T. gondii* have been shown to harbor infectious parasites in their meat (Opsteegh et al., 2016; Tenter et al., 2000; Zia-Ali et al., 2007). Seropositivity in general is a good indicator of the presence of the parasite in tissues and some authors mention that the level of isolation increases with antibody titer in the pig (Dubey and Jones, 2008; Herrero et al., 2016; Opsteegh et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: sbayarri@unizar.es (S. Bayarri).

¹ Both authors have the consideration of first author.

2016).

Some studies have indicated that *T. gondii* tissue cysts in meat are susceptible to various physical procedures such as heat treatment, freezing, irradiation, high-pressure, acidity and enhancing solutions (Bayarri et al., 2010; Dubey et al., 1990; Mie et al., 2008). Technological process of curing with salt could also kill *T. gondii* tissue cysts, although the inactivation of these cysts depends of the synergistic interaction between salt concentration, maturation time, and temperature of storage (Kijlstra and Jongert, 2008). One of the first reports on the identification of cured meat as a source of *Toxoplasma* infection was conducted by Buffolano et al. (1996) who showed that *Toxoplasma* infection in pregnant women in Naples in the early 1990s was strongly associated with frequency of consumption of cured pork and raw meat; eating these foods at least once a month increased the risk threefold. Cook et al. (2000) also found an association between infection and consumption of cured meats. Buffolano et al. (1996) observed that the conditions in which some pork products are cured are not necessarily lethal to *T. gondii*. In fact, viable parasites were detected in one out of 67 (1.5%) cured meat samples investigated in the United Kingdom (Warnekulasuriya et al., 1998), and in 4.8% of samples in studies carried out in Spain (Gomez-Sambblas et al., 2015). In relation to the time of curing, studies carried out by Bayarri et al. (2010) indicated that it has influence on the inactivation of *T. gondii*, since no viable parasites were found in hams of 14 months vs hams of 7 months of curing. However, few studies have been conducted to examine the efficiency of the curing process on the inactivation of *T. gondii* and consequently, there is a need for a risk-based assessment of such products and to evaluate the risk posed by this product category.

Dry-cured ham is a product manufactured according to the following basic principles: curing with salt and nitrites and stabilization through decreased water activity. The whole process takes at least 7 months, although in some cases the hams may be aged for more than 1 year. It does not require heat treatment before consumption. Dry-cured ham is an important food in the Mediterranean area, and Spain is one of the major producers. It is a high-quality product with increasing economic relevance, widely consumed in Spain and exported to other countries. During the period 2014–2015 Spanish exports have grown by 131%, reaching 40.436 tons. The leading destinations in Europe are France, Germany, Italy, Portugal, Belgium and Switzerland. Significant non-European importers include Mexico, United States, Japan and China (Cruz, 2015).

Demands of consumers for pathogen-free meat products have led the meat industry to focus attention on food safety and on the necessity to produce wholesome, safe, and high quality meat, using the appropriate technological treatments. At the moment, the detection of *T. gondii* by currently practiced meat inspection is not possible, but serological screening could be used to detect *T. gondii*-infected meat (Herrero et al., 2016; Opsteegh et al., 2016). This tool, together with an effective control of technological process, could be used to reduce the final product risk.

The aim of this work was to determine the presence and

viability of *Toxoplasma gondii* in raw hams of selected pigs with different serological titers, and to evaluate the influence of processing of cured ham on the viability of the parasite to assess the risk of infection from eating this meat product. As previous studies lacked detailed information on meat product characteristics, another goal of this study was to determine physical and chemical parameters such as water activity, pH, content of salt (NaCl, nitrate, nitrite) and fat to evaluate their influence on *T. gondii* bradyzoites survival.

2. Materials and methods

2.1. Selection of naturally infected pigs

After a serological study of 1200 pigs from 60 swine farms in Aragón, northeast of Spain (Herrero et al., 2016), forty-one Pietrain x Landrace pigs (6–7 months old and 120 kg body weight) with different serological titers against *T. gondii* detected by Indirect Immunofluorescence assay (IFA) (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were selected for the study.

2.2. Selection and sampling of hams

Selected animals were distributed into three batches: three serum negative pigs (<1:20) (Batch I: negative control), 14 pigs with serological titer 1:20 to <1:80 (Batch II) and 24 seropositive pigs with titer \geq 1:80 (Batch III). Pigs were slaughtered in a commercial abattoir and both haunches were collected.

Forty-one haunches (one from each pig) were analyzed at day 0 and the other forty-one haunches were cured according to usual industry practices. After 9 months of curing, 21 hams were analyzed, and the 20 remaining hams continued the curing process until 12 months, when samples were also analyzed for viable forms of *Toxoplasma* (Table 1). The number of hams analyzed was greater when the possibility of risk was higher (haunches from pigs with high serological titers or a shorter cure time).

Boneless fresh hams were cut into small pieces, minced, vacuum packaged and stored in refrigeration until analysis.

2.3. Curing of the hams

The technological treatment of the hams was carried in a cured ham processing industry, and included different steps: salting, post-salting or resting-period, and drying and maturation. For salting, the fresh haunches (8.59–14.76 kg) were surface salted with a commercial mixture of 7% nitrates, 4% nitrites, sodium ascorbate, and sodium chloride (10 g/kg of ham). Then, hams were covered with sodium chloride, and conducted to a salt chamber at 2.8 to 3.5 °C and 85–95% relative humidity, in which remained a variable time depending on the weight of each ham (~2 days for each kilogram of ham).

Then, after cleansing the salt from the ham surface, the resting period began. Hams were kept for at least 90 days at 3 °C \pm 1 °C and 70–95% relative humidity. Temperature was gradually increasing up to 16 °C until the final 120 days. In this step the salt slowly and progressively diffuses internally, gradually drawing much of the original moisture from the ham.

During drying and maturation, for at least 110 days at 6–16 °C and 60–70% relative humidity, the hams continued to lose moisture under conditions of increased temperature and decreased relative humidity. Weight loss during drying was controlled. In this final step, the curing process is completed, and the ham slowly shores up its sensory properties before being marketed. In our study, the curing process lasted 9 or 12 months.

Sample preparation for analysis was performed as described in

Table 1
Sampling description.

	Haunches	Dry-cured hams	
	Day 0	9 months	12 months
Batch I	3	0	3
Negative Control (Titer <1:20)			
Batch II (Titer 1:20 to <1:80)	14	6	8
Batch III (Titer \geq 1:80)	24	15	9
Total	41	21	20

2.2.

2.4. Mouse bioassay of tissues for *T. gondii*

A concentration bioassay technique with an acid pepsin digestion procedure was used to demonstrate presence and viability of bradyzoites of *T. gondii* in fresh and dry-cured hams, as described previously (Bayarri et al., 2010; Dubey, 1998). A 0.5 ml aliquot of digestion extract was inoculated intraperitoneally into each of eight 20–25 g CD1 Swiss female mice per sample (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Digestion and inoculation were done in quintuplicate for each sample (250 g total). All experiments included negative control mice. An aliquot of the digestion extract (fresh and dry-cured ham) was stored at -20°C to posterior analysis by PCR to confirm the presence of *T. gondii* when serology in mouse was negative.

Mice were received with a health certificate showing that the animals were free from pathogens. They were maintained at the Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), in Zaragoza (Spain). The inoculation, maintenance and euthanasia of mice were performed under the standards of the Ethics Advisory Commission for Animal Experimentation and the Biosecurity Commission of the University of Zaragoza, as granted by Opinion No PI07/12. These guidelines are in accordance with the Protocol of International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Directive, 2010/63/EU).

2.4.1. IFA of mouse sera

Blood samples were drawn from mice that survived 60 days after inoculation. Sera samples of mice were analyzed by IFA to detect antibodies against *T. gondii* with polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins (DakoCytomation). Serum from each mouse was diluted 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, and 1:320. A positive and a negative control serum, from previous studies in our laboratory, were included in each test. Final preparations were examined with an Eclipse 80i fluorescence microscope (Eclipse 80i, Nikon instruments INC, Netherlands). Sera samples with a titer of $\geq 1:10$ were considered positive.

2.4.2. DNA extraction and identification of *T. gondii*

Analysis of *T. gondii* DNA from brains of serologically positive mice was performed by real time-PCR to determine viability of the parasite. When serology in mouse was negative to *T. gondii*, the digestion extracts of raw and cured ham were analyzed by PCR to confirm the presence of *T. gondii*. The number of positive samples by bioassay and/or the number of positive samples by PCR give us the number of total positive samples.

The DNA extraction was performed from 15 mg of brain or 100 μl of extracts of digestion, using UltraClean[®] Tissue & Cells DNA Isolation Kit Sample Catalog No. 12334-S (Mobio Laboratories, Inc.) according to the manufacturer's instructions. DNA amplification targeting specific sequence of 529 repeat element and SAG genes were performed. CFX Connect (Bio-Rad Laboratories) real time PCR instrument was used for the amplification and detection of *T. gondii*. The reaction volume was 20 μl and samples were run in triplicates. The protocol consisted of 7 min at 94°C for enzyme activation (Hot start), and 40 cycles of denaturation at 94°C for 5 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 10 s. The program ended with a dissociation curve from 60 to 94°C with a 0.5°C increase interval. Each PCR run included a negative control, a positive control, and a separate reaction for Actin DNA copies as internal control (IC). A sample was considered positive if at least two of the triplicates were positives with both markers. The Ct value used was indicated by the marker 529 repeat element (Ct must be lower than 38) and the marker SAG served to confirm the

result. Calibration curves were prepared using 15 mg of homogenate negative tissues spiked with a known number of tachyzoites (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 and 10^0). Subsequently, the samples were homogenized and processed with the commercial DNA extraction kit following the manufacturer's instructions in the same way as the rest of the samples. *T. gondii* parasites present in tissues were estimated using the formula obtained from the calibration curve and the Ct value obtained for each sample. The measure of the adjustment performed in the curve was determined with the coefficient of determination, which was $R^2 = 0.992$. An efficiency of 99.7% was obtained, calculated through the slope of the curve (3.329).

2.5. Determination of chemical and physical parameters of dry-cured hams

Loss of weight in the final product was monitored by gravimetry; nitrate and nitrite contents were analyzed according to ISO 3091:1975 and ISO 2918:1975 standards respectively; moisture content was determined according to ISO 1442:1997; pH and water activity (a_w) were measured according to ISO 2917:1999 and ISO 21807:2004 standards, respectively. Finally, sodium chloride content was determined according to ISO 1841-1:1996, and fat content according to ISO 1444:1996.

2.6. Statistical analysis

Serological results, presence and viability of *T. gondii* in fresh and cured ham were compared using Pearson's Chi-square test (or Likelihood Ratio test when Pearson's Chi-square test was not valid). This test was also used to establish a statistical relationship between results obtained in the different months of curing and the presence and viability of *T. gondii* cysts in tissues.

To determine the relationship between the physicochemical parameters of cured hams and the presence and viability of *T. gondii*, the following tests were used. Firstly the association between quantitative and qualitative dichotomous variables was studied to determine the normality of the quantitative variable by Kolmogorov-Smirnov test and Shapiro-Wilk test. In the case that the variables showed a normal distribution they were compared using the Student's *t*-test for independent samples, and when the normality assumption was declined, Mann-Whitney test as a nonparametric alternative was used.

Statistical analyses were performed with IBM SPSS 19.0 for Windows. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Presence of *T. gondii* of 68.4% (26 of 38) and viability of 31.6% (12 of 38) were determined in fresh hams from seropositive animals; all samples from the negative control animals were negative by bioassay in mice and real-time PCR (Table 2). Lower presence and viability of *T. gondii* (28.6% and 0% respectively) was found in hams from pigs with titers $< 1:80$ than in those hams from pigs with higher titers (91.7% and 50% respectively). The presence ($p < 0.001$) and viability ($p = 0.001$) of *T. gondii* in fresh hams were significantly associated with pigs whose serological titers were $\geq 1:80$. Pigs with a serologic titer $\geq 1:80$ have 3.21 times more probability of finding the parasite in the fresh ham. No information regarding the viability can be obtained because no pig with a serological titer lower than 1:80 showed viable parasites in their hams.

Real time PCR results (mouse brain and extracts) from raw hams of pigs naturally infected with *T. gondii* are presented in Table 2. Mean values equivalent to 69.44 (SD \pm 57.61) parasites per gram of

Table 2
T. gondii in raw ham and dry-cured ham (detection by mouse bioassay and PCR).

Pig titer	Raw ham			Dry-cured ham			Time of curing
	Presence		Viability ^c	Presence		Viability ^c	
	Bioassay ^a	PCR extract ^b		Bioassay ^a	PCR extract ^b		
Batch I							
Negative Control (Titer < 1:20)							
1	0/8	—	0/0	0/6	—	0/0	12
2	0/8	—	0/0	0/6	—	0/0	12
3	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
Batch II (Titer 1:20 to < 1:80)							
4	0/8	34.5 ± 0.25 (118)	0/0	0/8	—	0/0	9
5	1/8	—	0/1	0/8	—	0/0	9
6	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	9
7	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	9
8	1/8	—	0/1	0/8	—	0/0	9
9	2/7	—	0/2	0/8	—	0/0	9
10	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
11	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
12	0/7	—	0/0	0/8	—	0/0	12
13	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
14	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
15	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
16	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
17	0/7	—	0/0	0/8	—	0/0	12
Batch III (Titer ≥ 1:80)							
18	5/8	—	0/5	0/4	—	0/0	9
19	7/8	—	3/7	0/7	—	0/0	9
			35.80 ± 0.34 (49.2)				
			35.92 ± 0.51 (45.3)				
			36.09 ± 0.19 (40.1)				
20	4/8	—	2/4	1/8	—	1/1	9
			35.48 ± 0.62 (61.4)			34.52 (119.3)	
			36.92 ± 0.82 (22.6)				
21	4/8	—	0/4	0/6	35.12 ± 0.35 (78.7)	0/0	9
22	3/8	—	1/3	2/7	—	2/2	9
			34.44 ± 0.48 (126)			35.02 ± 0.64 (84)	
						34.34 ± 0.21 (134.7)	
23	6/8	—	4/6	0/8	35.61 ± 0.29 (55.9)	0/0	9
			33.44 ± 0.20 (250.7)				
			34.68 ± 0.46 (106)				
			34.05 ± 0.75 (165.5)				
			33.83 ± 0.13 (193)				
24	5/8	—	1/5	0/8	—	0/0	9
			37.51 ± 0.64 (15)				
25	4/8	—	2/4	1/8	—	1/1	9
			35.90 ± 0.45 (45.9)			34.15 ± 0.41 (153.3)	
			35.54 ± 0.34 (58.9)				
26	5/7	—	1/5	0/8	—	0/0	9
			34.5 ± 0.65 (120.7)				
27	4/8	—	1/4	0/8	—	0/0	9
			36.72 ± 0.87 (25.9)				
28	2/8	—	0/2	0/4	—	0/0	9
29	6/8	—	3/6	0/7	—	0/0	9
			34.33 ± 0.39 (136)				
			35.29 ± 0.52 (70)				
			36.17 ± 0.24 (37.9)				
30	8/8	—	3/8	0/7	—	0/0	9
			37.27 ± 0.63 (17.7)				
			35.12 ± 0.18 (78.7)				
			35.07 ± 0.79 (81.3)				
31	5/8	—	1/5	0/8	36.85 ± 0.84 (23.3)	0/0	9
			36.35 ± 0.50 (33.5)				
32	6/8	—	0/6	0/8	—	0/0	9
33	3/8	—	3/3	1/7	—	1/1	12
			37.48 ± 0.43 (15.3)			36.02 ± 0.17 (42)	
			36.66 ± 0.17 (27)				
			36.73 ± 0.36 (25.7)				
34	0/8	—	0/0	0/8	—	0/0	12
35	0/8	—	0/0	0/7	—	0/0	12
36	1/8	—	0/1	2/8	—	0/2	12
37	0/8	36 ± 0.64 (42.7)	0/0	0/7	—	0/0	12
38	0/8	36.76 ± 0.14 (25.2)	0/0	1/8	—	0/1	12
39	0/8	36.77 ± 0.35 (25)	0/0	1/8	—	0/1	12
40	0/8	36.89 ± 0.40 (23)	0/0	0/8	—	0/0	12
41	1/8	—	0/1	0/8	35.06 ± 0.48 (82)	0/0	12
Total^d	26/38		12/38	11/38		4/38	

Blank boxes: not analyzed (because the sample was positive by bioassay).

^a Seropositive mice by IFA/Total of mice.

^b Presence by PCR of extracts. Ct values (parasites/g).

^c Positive mice brain by PCR/Total of seropositive mice by IFA. Ct values (parasites/g).

^d Positive samples/total seropositive pigs.

tissues were detected. The lowest Ct value of 33.44 (corresponding to 250.7 parasites per gram) and the highest Ct value of 37.51 (corresponding to 15 parasites per gram) were detected in brain tissue of mouse inoculated with raw ham of pigs with a serological titer of 1:80.

After performing the technological process of curing, from the 26 fresh hams in which the presence of *T. gondii* was confirmed, the parasite was detected in 11 cured hams (42.3%) and showed viability in 4 (15.4%) of them. The curing process reduced the presence and viability of *T. gondii*, and statistically significant differences ($p < 0.001$) of both parameters between fresh and cured hams could be observed.

Regarding the curing time (9 months vs. 12 months), presence of *T. gondii* in cured ham is quite similar in both curing times. The parasite was detected in 6 of 21 (28.6%) 9 months cured hams and, excluding negative controls, in 5 of 17 (29.4%) 12 months cured hams. Concerning viability, it was higher in hams cured for 9 months compared to those cured for 12 months; the parasite was viable in 3 of 21 hams that had been cured for 9 months (14.3%) and, excluding negative controls, in one of 17 cured hams for 12 months (5.9%). In relation with the samples in which the parasite was detected, it was viable in 3 of the 6 positive hams cured for 9 months and only in one of the 4 positive cured hams cured for 12 months.

Real time PCR results (mouse brain and extracts) from cured hams are presented in Table 2. Median values (\pm SD) equivalent to 85.9 ± 40.63 parasites per gram of tissues were detected. The lowest Ct value of 34.15 (corresponding to 153.3 parasites per gram) and the highest Ct value of 36.85 (corresponding to 23.3 parasites per gram) were detected in brain tissue and extract of mouse, respectively.

The final mean composition (\pm SD) of dry-cured hams at the end of the curing process was $35.6 \pm 3.5\%$ moisture content, 0.92 ± 0.02 water activity (aw), $5.1 \pm 1.3\%$ fat, $3.1 \pm 0.5\%$ NaCl, 68.3 ± 15.6 mg/kg nitrate, 11.76 ± 26.81 mg/kg nitrite, and 5.8 ± 0.1 pH. Weights of dry-cured hams were 5.1–10.4 kg, and loss of weight in the final products was from 26.8 to 45.9% (Table 3). Analysis of these results did not identify any variable with significant influence on the presence and viability of *T. gondii* in cured ham ($p > 0.05$), but a loss of viability of *T. gondii* was observed in hams with a lower fat content ($p = 0.039$).

4. Discussion

T. gondii has high affinity for neural and muscular tissues including brain, eyes, and skeletal and cardiac muscles (Dubey et al., 1986, 1998b; Dubey, 2009; Guo et al., 2015; Juránková et al., 2014). Muscular tissue is of interest due to its use in small goods production (Kijlstra and Jongert, 2008), but there are limited data on the prevalence of *T. gondii* in raw ham (Opsteegh et al., 2016) and studies carried out by Juránková et al. (2014) indicate low *T. gondii* infection of muscular tissues in pigs. However, our results show that nearly 70% of raw ham from seropositive pigs has *Toxoplasma* tissues cysts. Probably, selection of tissues from seropositive pigs increased the efficiency of isolation versus bioassays of tissues irrespective of antibody status (Dubey, 2009). Nevertheless, the mouse positivity and the PCR results in meat samples detect both viable and non-viable *T. gondii*, which leads to an overestimate of the infectivity of meat. Finding a *T. gondii* cyst in mouse brain is dependent upon the level of the parasite in the tissue (Guo et al., 2015); the PCR assay in mice brain, could detect viable cysts in the 31.6% of raw hams. Nevertheless, the bioassay results suggested that pork tissues contained low levels of infective organisms since titers in mice were low and PCR results in mouse brain and extracts show a low parasite burden (equivalent to [median value] <69.44

parasites per gram of tissues). However, this parasite burden is higher than that found by Juránková et al. (2014) where a very low parasite burden was estimated for fore and hind limb muscles, equivalent to [median] 0.2 parasites per gram of tissues.

Although these results suggest a low *T. gondii* burden of muscular tissues in pigs, there are raw hams that contain viable cysts and, therefore, pose a risk to consumers. *T. gondii* transmission risk is also associated with consumers' cooking behaviors. According to a 2007 survey, approximately 9% of consumers cooked their pork products to a temperature of less than 48 °C (EcoSure, 2008), which may not be sufficient to inactivate *T. gondii* cysts. Tissue cysts were generally rendered nonviable by heating to 61 °C or higher temperature for 3.6 min (Dubey et al., 1990). It should be noticed that dry-cured ham is consumed without heat treatment and the consequences of consumption of viable *T. gondii* cysts could be severe, especially for the pregnant and immunocompromised people.

Considering the ecology of *T. gondii* infection and formation of tissue cysts as the cause of the immunological response, it may be assumed that seropositive animals will have tissue cyst to a greater level (Dubey, 2009). However, presence of *T. gondii* in various tissues can be dependent on the duration of the infection. Verhelst et al. (2011) observed a clearance of the parasite in pig tissues after 6 months of experimental infection. Indirect detection showed relation with the detection of parasites by mouse bioassay, and the isolation of *T. gondii* was found to increase with antibody titer. At the moment, the detection of *T. gondii* is impossible by currently practiced meat inspection, the serology could be used to identify potentially infected pork. Titer $\geq 1:80$ may represent a first line selection that could be used as a screening tool to detect more risk raw material in order to apply a specific technological treatment to reduce the risk.

The inactivation of *T. gondii* during the curing process depends on the synergistic interaction among salt concentration, maturation time, and temperature of storage (Kijlstra and Jongert, 2008; Mie et al., 2008).

The main objective of this investigation was to evaluate the efficiency of the curing process for the inactivation of the parasite *T. gondii*. The technological process of curing clearly has evidenced an effect on the inactivation of *T. gondii*; differences between fresh and cured ham are significant both regarding the presence and the viability of *T. gondii*. However, the process of curing does not completely inactivate *T. gondii*, as the parasite has been detected in 11 of 26 hams analyzed and remained viable in 4 of them. The viability of *T. gondii* found in our study was higher than data previously obtained (1.5%–4.8%) (Gomez-Samblas et al., 2015; Warnekulasuriya et al., 1998). However, it must be taken into account that the mentioned studies were performed with commercial samples whose previous serological status was unknown.

Some studies indicate that inactivation of *T. gondii* may be dependent on the time of curing (Bayarri et al., 2010; Gomez-Samblas et al., 2016). In this assay, the viability seems higher in hams of 9 months of curing than in those of 12 months, in which the parasite viability was confirmed only in one ham. The risk assessment depends not only on the viability of *T. gondii* but also on the quantity of the parasite present in the cured product. Levels detected in cured meats in the United Kingdom were estimated at 5×10^3 bradyzoites per gram (Warnekulasuriya et al., 1998), and the researchers concluded that there were sufficient *T. gondii* bradyzoites to cause infection after consumption of a normal portion of cured meat. Levels detected in cured hams in our work were estimated between 23.3 and 153.3 parasites per gram, that is a lower burden. Nevertheless, there is a reduction of the risk but not a complete elimination of risk and there is likelihood of cured meat drying for 9 or 12 months containing viable cysts. Our results

Table 3
Physicochemical parameters of cured hams.

Pig	Haunch weight (Kg)	Cured ham weight (Kg)	Weight loss (%)	Curing time (months)	Nitrates (mg/Kg)	Nitrites (mg/Kg)	Moisture content (%)	a _w	pH	NaCl (%)	Fat content (%)
1	12.98	8.66	33.28	12	82	74	51.1	0.916	5.80	3.6	4.5
2	12.6	8.17	35.16	12	<50	90	53.2	0.894	5.90	3.7	4.7
3	13.16	8.42	36.02	12	<50	42.6	53.1	0.914	5.85	3.2	5.1
4	14.76	10.14	31.30	12	53	53.8	55.2	0.909	5.95	2.7	5.7
5	13.66	8.96	34.41	12	<50	54.2	55.1	0.897	5.70	2.8	7.4
6	12.64	8.21	35.05	9	83	<6	58.0	0.933	5.90	2.5	5.5
7	10.57	6.44	39.07	9	81	<6	55.7	0.945	5.55	3.9	3.4
8	13.72	10.05	26.75	9	48	<6	59.2	0.939	5.80	2.4	5.9
9	12.3	7.58	38.37	12	<50	58.6	55.4	0.889	5.85	2.8	4.5
10	14.76	9.8	33.60	12	<50	79	53.3	0.898	5.80	3.1	5.0
11	12.76	8.24	35.42	12	<50	66	55.1	0.901	5.80	2.6	3.8
12	12.9	8.32	35.50	12	<50	73	54.6	0.902	6.00	2.5	3.9
13	12.07	7.05	41.59	12	74	34.6	50.3	0.893	5.65	3.0	7.3
14	14.24	7.83	45.01	12	<50	63	54.3	0.887	6.05	4.6	3.8
15	15.01	9.97	33.58	9	59	<6	59.9	0.950	5.75	2.5	3.3
16	11.62	7.84	32.53	9	70	<6	59.1	0.948	5.75	3.4	5.1
17	12.2	7.18	41.15	9	73	<6	49.3	0.948	5.75	3.4	4.9
18	12.89	8.46	34.37	12	69	<6	54.8	0.929	5.90	2.9	3.9
19	11.14	6.67	40.13	9	81	<6	54.2	0.926	5.95	3.0	5.3
20	8.59	5.23	39.12	9	108	<6	49.5	0.932	5.90	3.8	6.4
21	11.36	7.11	37.41	9	77	7.8	53.9	0.934	5.90	2.9	5.3
22	12.13	7.72	36.36	9	82	<6	55.5	0.936	5.65	3.2	6.2
23	12.01	7.37	38.63	9	78	<6	53.9	0.940	5.75	2.9	5.2
24	12.92	8.76	32.20	9	70	6.7	57.6	0.942	5.75	3.3	5.4
25	12.72	7.83	38.44	9	74	<6	50.5	0.931	6.00	3.4	6.4
26	12.04	8.07	32.97	9	64	<6	58.6	0.942	5.75	2.7	3.6
27	11.85	6.78	42.78	12	84	<6	47.4	0.903	5.90	3.8	3.3
28	12.75	7.35	42.35	12	92	<6	49.1	0.920	5.80	4.0	4.2
29	9.49	5.13	45.94	12	74	<6	46.3	0.879	5.80	3.9	3.5
30	13.14	8.83	32.80	12	72	<6	50.2	0.882	5.95	3.1	8.5
31	11.48	7.0	39.02	12	68	<6	54.3	0.918	5.95	3.3	3.8
32	12.05	7.89	34.52	12	86	<6	54.8	0.925	5.80	2.9	7.5
33	12.76	8.35	34.56	12	<50	58.7	52.0	0.903	5.85	2.9	6.3
34	10.4	6.58	36.73	9	83	<6	53.0	0.937	5.75	2.9	3.2
35	14.76	10.36	29.81	9	52	<6	55.9	0.942	5.80	2.2	5.3
36	11.93	8.10	32.10	9	79	<6	49.7	0.947	5.80	3.3	4.9
37	12.2	7.88	35.41	9	77	10.4	54.3	0.934	5.80	3.1	5.2
38	11.09	7.83	29.40	9	58	24	52.6	0.937	5.95	3.6	5.8
39	14.3	9.98	30.21	9	85	<6	48.5	0.948	5.75	2.3	4.3
40	12.86	9.0	30.02	9	91	<6	59.4	0.949	5.60	2.1	5.4
41	12.5	8.14	34.88	12	97	<6	55.4	0.927	5.85	3.0	6

suggest that, from a food safety point of view, it is better to consume cured ham with periods of curing higher than 12 months. Moreover, according to results reported by Bayarri et al. (2010), 14 months of curing time matches the loss of *T. gondii* viability.

Another goal of this study was to test the physical and chemical parameters such as water activity, content of salt (NaCl, nitrate, nitrite), pH and fat content, in order to evaluate their influence on *T. gondii* bradyzoites survival. As far as we know previous studies lacked or reported limited information on meat product characteristics and their relationship with the viability of *T. gondii* in cured ham. In this context, the study of Gomez-Samblas et al. (2016) should be mentioned as they analyzed some physicochemical parameters (water activity, salt content, and pH).

Raising the salt concentration or the temperature leads to inactivation of the parasite (Kijlstra and Jongert, 2008; Mie et al., 2008). However, occasionally some tissue cysts may survive the curing process (Gomez-Samblas et al., 2015; Warnekulasuriya et al., 1998). It has also been reported that salting does not necessarily kill tissue cysts; in fact, the presence of viable *T. gondii* organisms in commercially cured meat was recently described in a study carried out in Spain (Gomez-Samblas et al., 2015). However, the lack of information about the salt concentration, period of curing and other commonly used parameters in meat industry, such as water activity and pH, make the comparison rather difficult.

Sodium chloride is used in the curing process for its effect on flavor, water activity, and preservation of final product. The salt concentration will always increase during maturation due to the loss of water. Sodium nitrate and potassium nitrate induce color development in cured meat products and are used when drying is a long term process. Nitrates also reduce water activity. To be effective, reduction of nitrates to nitrites under the influence of bacterial enzymes is required, and this is a time-consuming process. Nitrites affect the color and flavor of the product and aid in its preservation (Guo et al., 2015). There is currently little knowledge about the effects of the nitrates and nitrites on the inactivation of *T. gondii*. These may, themselves or in combination, provide further interventions for the reduction of *T. gondii* in the final product (Mie et al., 2008). The loss of viability of *T. gondii* during the curing process may be due to the dehydration suffered. Meat loses weight during drying and the increase in the concentration of NaCl and other electrolytes may affect the viability of the protozoan cysts (Dubey, 1997; Mie et al., 2008; Sommer et al., 1965; Work, 1968). Likewise, the buildup of peroxides, together with the free fatty acids and their detergent effect (Ventanas, 2001), may alter the membrane of cysts and protozoan bradyzoites resulting in a loss of infectivity. The dehydration, the dry environment and the buildup of free fatty acids reach their maximum levels after around 14–15 months in the drying shed (Gomez-Samblas et al., 2015). This could explain the need of

curing for times longer than 12 months to ensure the inactivation of *T. gondii*.

Bayarri et al. (2010) evaluated cured ham made in the traditional manner, and indicated that the final curing salt concentration of 3.9% NaCl, 25 mg/kg nitrate, and 3 mg/kg nitrite as well as the duration of the curing period (14 months) inactivate *T. gondii*. Recently, Gomez-Samblas et al. (2016) studied different ham curing treatments, and observed that the parasite was still viable after 5 months in the samples with the lowest NaCl content. Neumayerová et al. (2014) analyzed vacuum packed goat meat and concluded that 2.5% initial amount of sodium nitrite was effective in killing *T. gondii* cysts in 14 days; this time is much shorter than the usual curing time. These authors also report that the following physical and chemical parameters are lethal for the parasite: 0.960 ± 0.002 meat a_w , $1.856\% \pm 0.70\%$ salt content and 5.825 ± 0.008 pH. However, in our study we detected viable parasites in a final product with a lower a_w (0.903–0.942) and a higher salt concentration (NaCl 2.7–2.9), and no relation was found between viability of *T. gondii* and water activity and content of salt (NaCl, nitrate, nitrite). Neither relation was found between viability and pH. During curing, the pH usually falls, while dehydration is achieved by keeping the product under controlled temperature and humidity, this drop in pH is unlikely to have an impact on the viability of the tissue cyst, which has been reported to be resistant at $\text{pH} < 1.0$ (Dubey, 1998). Apparently, this product's high salt content, pH and low water activity is not completely amenable for *T. gondii* bradyzoite survival. When the hams are rubbed with the salting mix we assume that salt is able to penetrate the raw meat effectively and results in a homogeneous concentration lethal to *T. gondii* bradyzoites. However, there may be areas where lethal concentrations of salts have not been distributed evenly or were unable to exert its effect on the bradyzoites because they are protected by the cyst wall. An important function of the cyst wall and matrix is to protect bradyzoites from harsh environmental conditions such as dehydration (Weiss and Kim, 2007). In addition, fat may protect tissue cysts from the effects of salt, and in this sense, it should be noted that in cured hams an association between loss of viability of *T. gondii* and lower fat content was found. To date no investigation of this specific issue has been published.

A possible limitation of our study is that although we use both hind legs, we cannot guarantee that both pieces are identical in parasite load. In fact, detection of the parasite in a leg does not ensure its detection in the other and, reciprocally no parasite detection in the fresh ham does not ensure that the cured ham will be free of the parasite. This is especially important in studies, such as ours, in which naturally infected animals are used and, particularly, when parasitism levels are low.

In conclusion, a high number of seropositive pigs had *Toxoplasma* tissues cysts in the raw ham although the parasite burden was low. We observe that time of curing significantly contributed to *T. gondii* cyst survival; nevertheless curing during 12 months resulted in the reduction but not in a complete elimination of the risk. Thus, from a public health point of view, under the conditions of this study it is safer to consume dry-cured ham with times of curing higher than 12 months. Furthermore, we did not identify any variable with significant influence on the presence and viability of *T. gondii* in cured ham and further research is required to validate combinations of salt concentration, and time of curing as a critical control points. We can also conclude that there is urgent need for further development and standardization of methods for the testing of the pathogen survival in dry-cured meat products. It is desirable to avoid animal experimentation and development of sensitive viability assays that are not based on the use of experimental animals would be valuable.

Acknowledgements

This project has been cofinanced by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund (INNFACTO IPT-2012-0189-060000). The authors thank the Government of Aragón and the European Regional Development Fund (Consolidated Research Group A01).

References

- Baril, L., Ancelle, T., Goulet, V., Thulliez, P., Tirard-Fleury, V., Carme, B., 1999. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand. J. Infect. Dis.* 31, 305–309.
- Bayarri, S., Gracia, M.J., Lázaro, R., Barberán, M., Herrera, A., 2010. Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* in cured ham using bioassay: influence of technological processing and food safety implications. *J. Food Prot.* 73 (12), 2239–2243.
- Buffolano, W., Gilbert, R.E., Holland, F.J., Fratta, D., Palumbo, F., Ades, A.E., 1996. Risk factors for recent *Toxoplasma* infection in pregnant women in Naples. *Epidemiol. Infect.* 116, 347–351.
- Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A.M., Peneau, C., Neron, P., Dardé, M.L., 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4037–4044.
- Choi, W.Y., Nam, H.W., Kwak, N.H., Huh, W., Kim, Y.R., Kang, M.W., Cho, S.Y., Dubey, J.P., 1997. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 175, 1280–1282.
- Cook, A.J.C., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T., 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Br. Med. J.* 321, 142–147.
- Cruz, J., 2015. Informe sobre el sector del Jamón Curado en 2014. *Eurocarne* 237, 41–52.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22, September 2010. on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* L276 (2010), 33–79.
- Dubey, J.P., Murrell, K.D., Fayer, R., Schad, G.A., 1986. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188 (9), 1035–1037.
- Dubey, J.P., Kotula, A.W., Sharac, A., Andrews, C.D., Lindsay, D.S., 1990. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J. Parasitol.* 76, 201–204.
- Dubey, J.P., 1997. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0.85–6% NaCl solutions at 4–20 °C. *J. Parasitol.* 83, 946–949.
- Dubey, J.P., 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology* 116, 43–50.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 267–299.
- Dubey, J.P., Jones, J.L., 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38, 1257–1278.
- Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in pigs—the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164 (2), 89–103.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, second ed. CRC press, Boca Raton.
- EcoSure, 2008. 2007 U.S. Cold Temperature Evaluation Design and Study Summary. Available at: http://foodrisk.org/default/assets/File/EcoSure_2007_Cold_Temperature_Report.pdf (Accessed 09 March, 2017).
- Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2015. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 46, 107–113.
- Gomez-Samblas, M., Vilchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2016. *Toxoplasma gondii* detection and viability assays in ham legs and shoulders from experimentally infected pigs. *Food Microbiol.* 58, 112–120.
- Guo, M., Dubey, J.P., Hill, D., Buchanan, R.L., Gamble, R., Jones, J.L., Pradhan, A.K., 2015. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *J. Food Prot.* 78 (2), 457–476.
- Herrero, L., Gracia, M.J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera, M., Herrera, A., Bayarri, S., 2016. *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Vet. Parasitol.* 224, 52–59.
- International Organization for Standardization, 1975a. Meat and Meat Products. Determination of Nitrite Content (Reference Method). ISO 2918:1975. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization, 1975b. Meat and Meat Products. Determination of Nitrate Content (Reference Method). ISO 3091:1975. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization, 1996a. Meat and Meat Products. Determination of Chloride Content. Part 1: Volhard Method. ISO 1841-1:1996. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization, 1996b. Meat and Meat Products.

- Determination of Free Fat Content. ISO 1444:1996. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization, 1997. Meat and Meat Products. Determination of Moisture Content (Reference Method). ISO 1442:1997. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization, 1999. Meat and Meat Products. Measurement of PH (Reference Method). ISO 2917:1999. Geneva, Switzerland.
- International Organization for Standardization, 2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Determination of Water Activity. ISO 21807:2004. Geneva, Switzerland.
- Juránková, J., Basso, W., Neumayerová, H., Baláz, V., Jánová, E., Sidler, X., Deplazes, P., Koudela, B., 2014. Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiol.* 38, 167–170.
- Kijlstra, A., Jongert, E., 2008. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* 38, 1359–1370.
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P., 2002. Risk Profile: *Toxoplasma Gondii* in Red Meat and Meat Products. New Zealand Food Safety Authority, pp. 1–33. <http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/ToxoplasmaGondii-in-red-meat.pdf>.
- Mie, T., Pointon, A.M., Hamilton, D.R., Kiermeier, A., 2008. A qualitative assessment of *Toxoplasma gondii* risk in ready-to-eat smallgoods processing. *J. Food Prot.* 71, 1442–1452.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Saláková, A., Gallas, L., Kovarcík, K., Koudela, B., 2014. Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. *Food Microbiol.* 39, 47–52.
- Opsteegh, M., Schares, G., van der Giessen, Joke, on behalf of the consortium, 2016. Relationship between Seroprevalence in the Main Livestock Species and Presence of *Toxoplasma Gondii* in Meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01). An Extensive Literature Review. Final Report, p. 294. EFSA supporting publication 2016: EN-996.
- Ross, R.D., Stec, L.A., Werner, J.C., Blumenkranz, M.S., Glazer, L., Williams, G.A., 2001. Presumed acquired ocular toxoplasmosis in deer hunters. *Retina. J. Retin. Vit. Dis.* 21, 226–229.
- Saadatnia, G., Golkar, M., 2012. A review on human toxoplasmosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 44, 805–814.
- Sommer, R., Rommel, M., Levetzow, R., 1965. Die Überlebensdauer von Toxoplasmazysten in fleisch und fleishzubereitungen. *Fleischwirtschaft* 5, 454–457.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217–1258.
- Ventanas, J., 2001. Tecnología del jamón Ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación del aroma y del sabor, Primera edición. Ediciones Mundi-Prensa.
- Verhelst, D., De Craeye, S., Dorny, P., Melkebeek, V., Goddeeris, B., Cox, E., Jongert, E., 2011. IFN- γ expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues are associated with an antibody response against GRA7 in experimentally infected pigs. *Vet. Parasitol.* 179 (1–3), 14–21.
- Warnekulasuriya, M.R., Johnson, J.D., Holliman, R.E., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 211–215.
- Weiss, L.M., Kim, K., 2007. Bradyzoite development. In: Weiss, L.M., Kim, K. (Eds.), *Toxoplasma Gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*. Elsevier, London, pp. 341–366.
- Weiss, L.M., Kiss, K., 2013. *Toxoplasma Gondii*, 2nd Edition. The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods. Academic Press Elsevier, London.
- Work, K., 1968. Resistance of *Toxoplasma gondii* encysted in pork. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 73, 85–92.
- Zia-Ali, N., Fazaeli, A., Khoramizadeh, M., Ajzenberg, D., Darde, M., Keshavarz-Valian, H., 2007. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. *Parasitol. Res.* 101, 111–115.



LABORATORY



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

EVALUACIÓN Y CONTROL DEL RIESGO DE
TOXOPLASMA GONDII EN EL PROCESO
INTEGRAL DE ELABORACIÓN DEL JAMÓN
CURADO

Autor

Laura Herrero Querol

Director/es

Bayarri Fernandez, Susana
Gracia Salinas, María Jesús

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2019

