

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
EN ALIMENTOS (DIPA)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS

“DESARROLLO DE ENSAYOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN,  
CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE  
*Cyclospora cayetanensis* EN FRUTILLAS Y HORTALIZAS”

TESIS

PRESENTA

**QFB. Carolina Nathalie Reséndiz Nava**

DIRIGIDA POR

**Dr. Gerardo Manuel Nava Morales**

CO-DIRIGIDA POR

**Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., DICIEMBRE, 2017



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Desarrollo de ensayos moleculares para la detección, cuantificación y  
caracterización genética de *Cyclospora cayetanensis* en frutillas y hortalizas  
**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en  
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:  
QFB. Carolina Nathalie Reséndiz Nava

Dirigida por:  
Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales  
Presidente

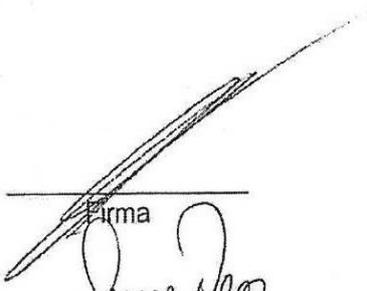
Dra. Hilda Victoria Silva Rojas  
Secretario

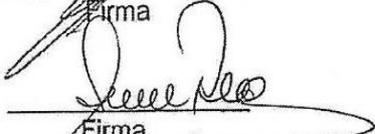
Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Vocal

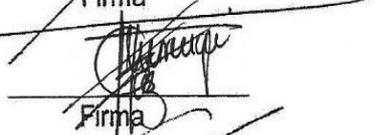
Dr. Edmundo Mercado Silva  
Suplente

M.S.P. Juana Susana Flores Robles  
Suplente

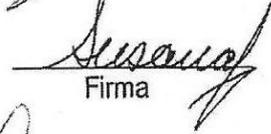
  
M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad de Química

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre  
2017

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Molecular en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección del Dr. Gerardo Manuel Nava Morales.

## RESUMEN

*Cyclospora cayetanensis* es un protozooario que ocasiona severas infecciones gastrointestinales en humanos. La infección es adquirida a través del consumo de alimentos y agua contaminada con oocistos del parásito. En EE.UU. se estima que este parásito ha ocasionado 1,481 casos durante los recientes brotes de ciclosporiasis; generando pérdidas económicas superiores a los 2 millones de dólares. Los últimos brotes de ciclosporiasis en EE.UU. se han asociado al consumo de cilantro producido en el estado de Puebla, México. La restricción de la importación de este producto generó pérdidas de ~60 millones de pesos en México. Las limitaciones técnicas para la identificación del parásito en alimentos, dificultan la vigilancia epidemiológica de *C. cayetanensis*. Convencionalmente, la detección de *C. cayetanensis* se basa en la identificación morfológica de oocistos mediante microscopía óptica; sin embargo, este método es laborioso, poco sensible y no específico. En el presente trabajo, se estandarizaron ensayos moleculares para la detección, cuantificación y genotipificación de *C. cayetanensis* en matrices alimentarias (frutillas y hortalizas) y ambientales. Para esto, se obtuvieron muestras de suelo, lavados de frutas y hortalizas que fueron sometidos al proceso de extracción de DNA. La detección de *C. cayetanensis* se realizó a través de la amplificación del gen *18S rRNA*. Los ensayos de PCR anidada y cuantitativa (qPCR) fueron capaces de detectar concentraciones de 10 oocistos/g muestra y la estimación de oocistos fue comparable a las concentraciones estimadas por técnicas convencionales de microscopía óptica. El análisis filogenético del gen *18S rRNA*, identificó seis genotipos de *C. cayetanensis* prevalentes en ocho regiones geográficas del mundo. Estas herramientas moleculares permitirán la rápida y oportuna detección del parásito en matrices alimentarias o en las unidades de producción agrícola. Además, el presente trabajo provee la primera evidencia de genotipos de *C. cayetanensis* endémicos en México.

**Palabras clave:** *Cyclospora*, oocisto, PCR, qPCR, gen, *18S rRNA*.

## SUMMARY

*Cyclospora cayetanensis*, a coccidian parasite, causes gastroenteritis in humans. This pathogen is transmitted by the ingestion of sporulated oocysts present in contaminated food or water. In the USA, *C. cayetanensis* outbreaks generate ~1,481 cases and economic losses >2 million dollars annually. The latest cyclosporiasis outbreaks in the USA were linked to consumption of cilantro imported from Mexico. These outbreaks caused import prohibitions generating ~3 million dollars in economic losses in Mexico. An important limitation for detecting this pathogen in foods is the lack of rapid, specific and sensible surveillance tools. The main goal of the present study was to standardize and validate a nested PCR, a qPCR and phylogenetic assays for the detection, quantification and genetic characterization of *C. cayetanensis* in food and stool samples. The nested PCR assay was able to detect as few as 10 oocyst per gram of sample. Performance of the qPCR was comparable to oocyst counts by the gold standard microscopy method. The phylogenetic analysis of the *18S rRNA* gen allowed the identification of six *C. cayetanensis* genotypes prevalent in eight different countries. Taken together, these results indicate that the use of these molecular assays for detection, quantification and genetic characterization of *C. cayetanensis* could be an important tool for the surveillance of this pathogen in food and clinical samples. Importantly, the present study provides the first information of *C. cayetanensis* genotypes endemic in Mexico.

**Keywords:** *Cyclospora*, oocyst, PCR, qPCR, gene, *18S rRNA*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por llenar mi vida de tantas bendiciones: mi bonita familia y mis amig@s.

A mis papás, Ma. Luisa y Jaime; y a mis hermanos, Adriana, Luis y Hugo; ustedes son mi cimiento, mi fortaleza, mi motor y mi razón de ser; sin ustedes jamás lo hubiera logrado. Los amo. A toda mi familia Reséndiz y familia Nava, por siempre creer en mí y apoyarme en todo momento.

A las princesas: Araceli, Alejandra, Diana y Liliana. Sin ustedes hubiera terminado la tesis antes, pero no igual de divertido, intenso y emocionante. Son la chispa en mi vida. Gracias por permitirme ser parte de su equipo de bienvenida y de sus vidas. Las adoro.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular. Gracias por tantas enseñanzas y buenos momentos.

A la Dra. Hilda y al Dr. Mercado, gracias por el apoyo y sus valiosos comentarios a mi proyecto. A la Dra. Montse y a la Dra. Sofi, mil gracias por todas sus enseñanzas y el apoyo incondicional.

A la Maestra Susana Flores; mil gracias por todos sus consejos académicos y espirituales; gracias por su fuerza y su amor a la vida. La admiro muchísimo, es un ejemplo de vida. La quiero mucho.

Al Dr. Gerardo M. Nava; ingresar a su equipo de trabajo fue un parte aguas en mi vida. Estoy eternamente agradecida por las enseñanzas, las habilidades (académicas, profesionales y personales) transmitidas y sus sabios consejos; por la paciencia y la fe que me tuvo. Mil gracias por compartir con todos la pasión tan grande que tiene por su trabajo.

A CONACYT, por el apoyo económico brindado.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
II.1 Taxonomía y morfología de <i>Cyclospora cayetanensis</i> . .....	3
II.2 Biología, transmisión y mecanismo de patogenicidad. ....	4
II.3 Distribución y prevalencia de <i>C. cayetanensis</i> .....	4
II.3.1 Prevalencia en alimentos .....	5
II.3.2 Prevalencia en suelos .....	6
II.4 Brotes de ciclosporiasis asociados al consumo de alimentos.....	6
II.5 Prevalencia e impacto de la ciclosporiasis en humanos. ....	6
II.6 Perdidas económicas en el sector agroalimentario. ....	9
II.7 Detección y cuantificación de <i>C. cayetanensis</i> en alimentos a través de métodos convencionales. ....	9
II.8 Métodos moleculares para la detección de <i>C. cayetanensis</i> en alimentos. ....	10
II.9 Cuantificación de <i>C. cayetanensis</i> a través de qPCR.....	10
II.10 Genotipificación de <i>C. cayetanensis</i> .....	11
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>IV.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	13
<b>IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	13
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
V.1 Materiales.....	14
V.1.1 Equipo.....	14
V.1.2 Soluciones .....	14
V.1.3 Reactivos .....	14
V.1.4 Material biológico .....	14

V.2 Métodos.....	15
V.2.1 Estandarización de un protocolo de PCR para detección de coccidias. .....	15
V.2.2 Estandarización de un protocolo molecular para obtener material genético de <i>C. cayetanensis</i> . ....	17
V.2.3 Validación de un ensayo de PCR anidada para la detección de <i>C. cayetanensis</i> en matrices alimentarias y ambientales. ....	18
V.2.5 Estandarización de ensayos de qPCR para la cuantificación de <i>C. cayetanensis</i> .....	19
V.2.6 Análisis filogenético de las secuencias del gen <i>18S rRNA</i> de <i>C. cayetanensis</i> .....	20
V.2.7 Genotipificación de <i>C. cayetanensis</i> . ....	21
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
VI.1 Identificación y purificación de coccidias. ....	23
VI.2 Validación de iniciadores para la amplificación del gen <i>18S rRNA</i> de coccidias. ....	23
VI.3 Evaluación del desempeño de Taq DNA polimerasas comerciales para amplificar DNA genómico a partir de muestras ambientales .....	24
VI.4 Validación de ensayos de PCR para la amplificación del gen <i>18S rRNA</i> de <i>C. cayetanensis</i> . ....	25
VI.4 Validación de un ensayo de PCR anidada para detección de <i>C. cayetanensis</i> en matrices alimentarias y ambientales.....	26
VI.4.1 Límite de detección del ensayo de PCR anidada. ....	27
VI.4.2 Detección de <i>C. cayetanensis</i> en frutillas, hortalizas y muestras ambientales. ....	28
VI.5 Estandarización de ensayos de qPCR para la cuantificación de <i>C. cayetanensis</i> . ....	29
VI.6 Análisis filogenético de las secuencias del gen <i>18S rRNA</i> de <i>C. cayetanensis</i> . ....	32
VI.7 Genotipificación de <i>C. cayetanensis</i> .....	34
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Pág.</b>
1. Brotes asociados al consumo de alimentos en países donde <i>C. cayetanensis</i> es considerado endémico	7
2. Brotes de ciclosporiasis asociados al consumo de alimentos importados de países en vías de desarrollo	8
3. Números de acceso en GenBank de las secuencias del gen <i>18S rRNA</i> de <i>C. cayetanensis</i> utilizadas en el análisis de genotipificación	22
4. Comparación del recuento por método convencional y cuantificación molecular por qPCR de oocistos de <i>C. cayetanensis</i> .	31
5. Distribución geográfica de los genotipos de <i>C. cayetanensis</i> determinados por el análisis filogenético del gen <i>18S rRNA</i>	34
6. Matriz del porcentaje de identidad entre los diferentes genotipos de <i>C. cayetanensis</i>	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pág.</b>
1. Oocisto esporulado con dos esporocistos (Sc)	3
2. Ciclo de vida y transmisión de <i>C. cayetanensis</i>	5
3. Identificación morfológica de oocistos	23
4. Amplificación del gen <i>18S rRNA</i> de coccidias a partir de excretas de pollo	24
5. Evaluación del desempeño de tres Taq DNA polimerasas comerciales	25
6. Amplificación del gen <i>18S rRNA</i> de <i>C. cayetanensis</i>	26
7. Productos de la PCR anidada en un gradiente de temperatura de alineación	27
8. Límite de detección de la PCR anidada para detección de <i>C. cayetanensis</i> en matrices alimentarias	28
9. Detección de <i>C. cayetanensis</i> en frutillas y suelos	29
10. Curva de disociación de la qPCR	30
11. Curva estándar de la qPCR para cuantificación de <i>C. cayetanensis</i>	31
12. Comparación del recuento de oocistos de <i>C. cayetanensis</i> por el método convencional y cuantificación molecular por qPCR	37
13. Análisis filogenético del gen <i>18S rRNA</i> de la familia Eimeriidae	33
14. Genotipificación de <i>C. cayetanensis</i> basada en el análisis del gen <i>18S rRNA</i>	36
15. Alineación de las secuencias representativas de cada genotipo de <i>C. cayetanensis</i>	37

## I. INTRODUCCIÓN

En Europa y EE.UU., los consumidores de frutas frescas y hortalizas importadas de México y Centro América se exponen a patógenos endémicos de estas regiones; como es el caso de *Cyclospora cayetanensis* (Ortega y Sanchez, 2010). *C. cayetanensis* es el agente causal de la ciclosporiasis en humanos; la cual se caracteriza por cuadros de diarrea acuosa severa, náuseas, vómito, fiebre y pérdida de peso (Connor et al., 1999).

En EE.UU., del año 2013 al 2015, se estimaron ~1,481 casos de ciclosporiasis atribuidos al consumo de agua y alimentos contaminados con este parásito (Murphy et al., 2017) y pérdidas económicas de ~2 millones de dólares (Abanyie et al., 2015). En EE.UU., Canadá y Reino Unido, se han reportado brotes de ciclosporiasis asociados al consumo de albahaca, cilantro, frutillas y lechugas provenientes de México (Nichols et al., 2015; Abanyie et al., 2015; Shah et al., 2009). A pesar del grave impacto ocasionado en la salud y en el sector agrícola exportador de alimentos, en México se desconoce la prevalencia y distribución de este protozooario.

Convencionalmente, la detección y cuantificación de *Cyclospora* se basa en la descripción morfológica de oocistos bajo el microscopio óptico (Ortega y Sanchez, 2010). Esta técnica es laboriosa, no específica, poco sensible y no permite distinguir las diferentes especies de *Cyclospora* y/u otros géneros de coccidias (Steele et al., 2003). Una alternativa para resolver estas limitantes, ha sido la implementación de ensayos de PCR basados en la amplificación de los espacios intergénicos ribosomales (ITS) (Adam et al., 2000; Lalonde y Gajadhar, 2008), del gen que codifica la proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Sulaiman et al., 2013) y del gen *18S rRNA* (Relman et al., 1996). Estos ensayos se han utilizado para la detección de *C. cayetanensis* en excretas de pacientes (Taniuchi et al., 2011); sin embargo, la implementación de estos ensayos en matrices alimentarias o ambientales está limitada por la baja concentración de oocistos en este tipo de muestras (Jinneman et al., 1998). También, se han desarrollado ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) para estimar las concentraciones de *C. cayetanensis* en muestras clínicas (Varma et al., 2003; Marangi et al., 2015); no obstante, el uso de esta técnica ha sido limitado en microbiología de alimentos (Caradonna et al., 2017).

La disponibilidad de material biológico (oocistos) es una de las principales limitaciones para el desarrollo y validación de ensayos dirigidos a la detección y cuantificación de *C. cayetanensis*; debido a que este parásito se replica exclusivamente en la mucosa intestinal del ser humano y no ha sido posible replicar oocistos en cultivos celulares o modelos animales (Eberhard et al., 2000). Por esta razón, es prioritario desarrollar una estrategia molecular para generar material genómico (gDNA) que pueda ser utilizado como templete o molde para la validación de ensayos de PCR.

Por otra parte, es fundamental identificar un marcador molecular que permita identificar los diferentes linajes o genotipos de *C. cayetanensis* que circulan en diferentes regiones geográficas del mundo. Esto permitirá identificar genotipos endémicos y exóticos de cada región, establecer patrones de distribución y sistemas de rastreabilidad del parásito.

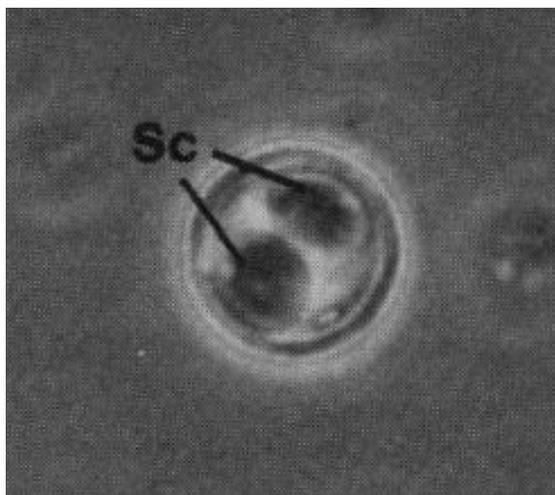
El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo molecular para la síntesis de gDNA de *C. cayetanensis*, estandarizar y validar ensayos de PCR sensibles y específicos para la detección y cuantificación del parásito en muestras ambientales y de alimentos. Además, se realizó una caracterización genética basada en el gen *18S rRNA* de aislamientos de *C. cayetanensis* prevalentes en México. Estas herramientas moleculares permitirán la oportuna detección del parásito en matrices alimentarias e identificar posibles fuentes de contaminación.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Taxonomía y morfología de *Cyclospora cayetanensis*.

*C. cayetanensis* es un protozoario, parásito intracelular obligado, reconocido como un patógeno emergente que ocasiona diarrea endémica y epidémica en el mundo (Mansfield y Gajadhar, 2004). El primer reporte publicado de ciclosporiasis data del año 1979, en el cual se describió la presencia de coccidias asociadas a diarrea en dos niños y una mujer en Papúa, Nueva Guinea (Ashford, 1979). En 1993, este parásito fue clasificado como *C. cayetanensis* por Ortega y colaboradores (Ortega et al., 1993). En 1996, estudios moleculares basados en la secuenciación y análisis filogenético del gen *18S rRNA* revelaron que *Cyclospora* spp. está altamente relacionada al género *Eimeria* (Relman et al., 1996).

Actualmente, se ha establecido que *Cyclospora* pertenece al filo Apicomplexa, clase Coccidia y familia Eimeriidae. Se conocen cinco especies de *Cyclospora*: *cayetanensis*, *cercopithecii*, *colobi*, *papionis* y *macacae*; las últimas cuatro, se han identificado en primates y no causan infecciones en humanos (Eberhard et al., 1999b; Li et al., 2015). Morfológicamente, los oocistos de *C. cayetanensis* son esféricos de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una doble membrana que contiene dos esporocistos (**Figura 1**) (Ortega y Sanchez, 2010).



**Figura 1.** Oocisto esporulado con dos esporocistos (Sc). Fuente: Ortega et al., 1993.

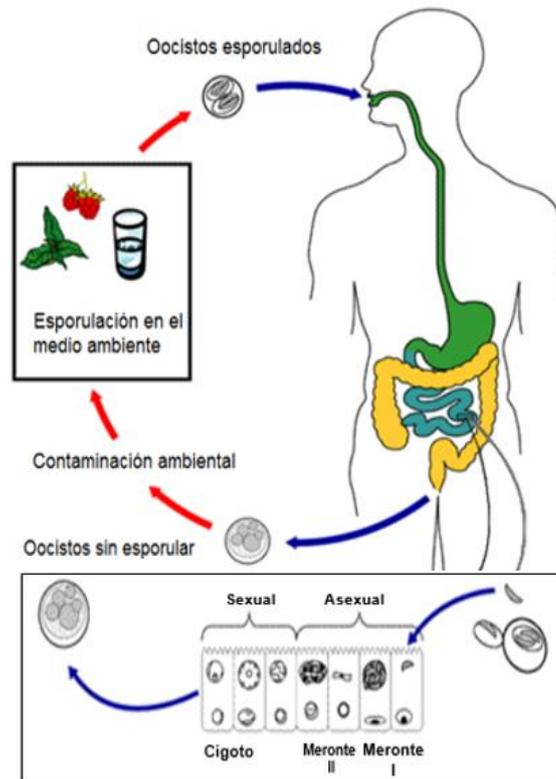
## **II.2 Biología, transmisión y mecanismo de patogenicidad.**

Los oocistos de *C. cayetanensis* excretados en las heces no son infecciosos; para serlo, requieren esporular en el ambiente; por lo tanto, es necesario un vehículo (agua o alimentos) para su transmisión (Ortega et al., 1993). No existe información sobre los mecanismos moleculares de virulencia e invasión de células epiteliales, debido a que hasta el momento, no existen cultivos celulares o modelos animales para replicar al parásito (Eberhard et al., 2000). Con datos extrapolados de infecciones por coccidias se ha calculado que la dosis infectante de *C. cayetanensis* es de aproximadamente 10 a 100 oocistos (Sterling y Ortega, 1999; Dixon et al., 2005).

El ciclo de vida de *C. cayetanensis* inicia cuando los oocistos esporulan en el medio ambiente después de ~2 semanas de ser excretados por un individuo infectado (**Figura 2**) (Plutzer y Karanis, 2016). Cuando los oocistos son ingeridos, los jugos gástricos del huésped reblandecen su pared, lo que permite la desenquistación en la porción proximal del intestino delgado. Los esporozoítos se liberan e invaden las células epiteliales del yeyuno (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011). Posteriormente, los esporozoítos se transforman en trofozoítos dentro de una vacuola parasitófora localizada en la zona citoplasmática, y mediante división nuclear asexual forman merontes de tipo I, que contienen de 8 a 12 merozoítos; y merontes de tipo II que contienen 4 merozoítos (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011). Estas células hijas pueden infectar nuevas células del huésped e iniciar una nueva etapa de merogonia, o pueden seguir una vía de reproducción sexual a través de gametogonia. Los oocistos inmaduros y no esporulados (no infecciosos) se eliminan a través de las heces (**Figura 2**) (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011).

## **II.3 Distribución y prevalencia de *C. cayetanensis***

La ciclosporiasis es un importante problema de salud pública a nivel mundial; sin embargo, los estudios de prevalencia del parásito son limitados. En países donde *C. cayetanensis* es endémico, en la mayoría de los casos, sólo se realiza la identificación morfológica, lo cual dificulta la tipificación y establecer patrones de distribución del parásito (Chacín-Bonilla, 2010).



**Figura 2. Ciclo de vida y transmisión de *C. cayetanensis*.** Los oocistos se replican en el intestino delgado de humanos y son excretados en su forma no infecciosa. Después de esporular en el medio ambiente, son infecciosos y se transmiten por el consumo de agua y alimentos contaminados. Fuente: CDC, 2016.

### II.3.1 Prevalencia en alimentos

Las frutas y hortalizas frescas son consideradas las principales fuentes de *C. cayetanensis* (**Cuadro 1**). En Perú, se reportó una prevalencia de 1.8 % en muestras de lechugas y hierba buena (Ortega et al., 1997). En Nepal, donde *C. cayetanensis* es considerado endémico, se ha detectado al parásito en muestras de repollo y lechuga durante los meses de junio, agosto, octubre y noviembre (Sherchand et al., 1999). En muestras de lechugas la prevalencia del parásito fue de 5.9% y 8.0%, en mercados públicos de Venezuela y Costa Rica, respectivamente (Calvo et al., 2005; Devera et al., 2006). En Italia, la prevalencia de *C. cayetanensis* en muestras de pepino, hinojo, apio y tomate fue de 9.1%, 7.1%, 12.5% y 18.7%; respectivamente (Annunziata Giangaspero, 2015). Otro estudio llevado a cabo en Italia ente 2015 y 2016, reveló una prevalencia del parásito del 1.3% en ensaladas listas para consumo (Caradonna et al., 2017). En Corea del Sur, se detectó la presencia del parásito en el 2.9% de las muestras de

repollo y 2.3% de arándanos, durante los años 2014 y 2015 (Sim et al., 2017). Estos resultados indican que en países donde el parásito es endémico la prevalencia oscila del 1 al 8%.

### **II.3.2 Prevalencia en suelos**

En EE.UU., durante un brote de ciclosporiasis acontecido en Florida en 1995 se determinó que el contacto directo con suelo contaminado es un factor de riesgo (OR = 5.4) para contraer la enfermedad (Koumans et al., 1998). En Guatemala, se observó que el 78% de los casos de ciclosporiasis estuvieron asociados al contacto con suelo contaminado (Bern et al., 1999). En Venezuela, se reportó que el contacto con suelo contaminado aumenta ~4 veces el riesgo a contraer la infección (Chacín-Bonilla, 2008). Por otra parte, se ha observado una prevalencia de *C. cayetanensis* en 11.8% de los suelos utilizados para la siembra de frutas y hortalizas (Annunziata Giangaspero, 2015). Estos datos sugieren que el suelo es un vehículo importante para la transmisión de este parásito.

### **II.4 Brotes de ciclosporiasis asociados al consumo de alimentos.**

En países desarrollados, el incremento en el número de casos de ciclosporiasis se ha asociado a un aumento en el consumo de frutas y hortalizas frescas, provenientes principalmente de países en vías de desarrollo (**Cuadro 2**). En EE.UU., del año 2013 al 2015, se reportaron tres brotes de ciclosporiasis asociados al consumo de cilantro contaminado proveniente del estado de Puebla, México; sin embargo, no se evidenció la presencia del parásito en dicho producto. Estos brotes provocaron la restricción de las exportaciones de cilantro hacia EE.UU, lo que generó graves pérdidas económicas en el sector agroalimentario mexicano (López, 2015).

### **II.5 Prevalencia e impacto de la ciclosporiasis en humanos.**

La mayoría de la información epidemiológica de *C. cayetanensis* se ha generado en los países donde el parásito es endémico. Por ejemplo, en Haití, de 1997 a 1998, se reportó una prevalencia de *C. cayetanensis* del 15% al 20% (Eberhard et al., 1999). En Guatemala, en un estudio epidemiológico realizado en centros de salud reveló una prevalencia del parásito entre el 2% y 7% (Bern et al., 1999). En Perú, estudios realizados en niños (1 a 2 años) y adultos, revelaron

prevalencias de *C. cayetanensis* del 18% y 46%, respectivamente (Bern et al., 2002; Torres-Slimming et al., 2006). Un estudio realizado en centros de salud de Nepal, documentó la presencia del parásito en el 30% de las muestras analizadas (Sherchand et al., 1999). En Henan, China, de 2007 al 2009, se reportó una prevalencia del parásito de 0.7% (Zhou et al., 2011). En México, datos del Hospital Pediátrico de Morelia, Michoacán, revelaron una prevalencia del 0.7% en niños ingresados al Hospital Infantil (Orozco-Mosqueda et al., 2014). Otro estudio, en la Ciudad de México, reveló una prevalencia del 3% en niños de 2 a 14 años (Díaz et al., 2003). Estos datos indican que la prevalencia de este agente es elevada (hasta 46%) en regiones donde el parásito es endémico. Es importante destacar que en estos estudios, la detección del parásito se realizó a través de microscopía óptica y análisis morfológico, métodos que pueden generar una subestimación de la presencia de *C. cayetanensis* (Dixon et al., 2005).

En EE.UU., país donde *C. cayetanensis* no es endémico, se han estimado 11,407 casos anuales de ciclosporiasis (Scallan et al., 2011) que generan una pérdida económica de aproximadamente ~2 millones de dólares (Hoffmann et al., 2012). Hasta donde sabemos, no existe información disponible del impacto económico de esta parasitosis en otras regiones del mundo.

**Cuadro 1. Brotes asociados al consumo de alimentos en países donde *C. cayetanensis* es considerado endémico.**

<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Casos</b>	<b>Producto asociado</b>
2001	México	70	Berro
	Indonesia	14	NI*
2002	Colombia	31	Ensaladas
2004	Perú	127	NI
2005	Perú	45	NI
	Turquía	35	NI

\*NI= No identificado. Adaptado de Ortega y Sanchez, 2010.

**Cuadro 2. Brotes de ciclosporiasis asociados al consumo de alimentos importados de países en vías de desarrollo.**

<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>No. de casos</b>	<b>Alimento asociado</b>	<b>Procedencia del alimento</b>	<b>Referencia</b>
1995	EE.UU.	38	Frambuesas	Guatemala y Chile	Strausbaugh y Herwaldt, 2000
1996	EE.UU. y Canadá	1,465	Frambuesas	NI*	Herwaldt y Beach, 1999
1997	EE.UU. y Canadá	1,012	Frambuesas	Guatemala	Herwaldt y Beach, 1999
1997	EE.UU.	12	Lechugas	Perú	Strausbaugh y Herwaldt, 2000
1998	Canadá	221	Frambuesas	Guatemala	CDC, 1998
1999	EE.UU.	94	Frutillas	NI	Strausbaugh y Herwaldt, 2000
1999	EE.UU.	62	Albahaca	México y EE.UU.	Strausbaugh y Herwaldt, 2000
2000	EE.UU.	73	Frambuesas	Guatemala	Abanyie et al., 2015
2002	Alemania	34	Lechugas	Europa del Sur	Döller et al., 2002
2003	España	11	Jugo de frambuesa	Guatemala	Puente et al., 2006
2004	EE.UU.	96	Chícharos	Guatemala	CDC, 2004
2009	Suecia	18	Chícharos	Guatemala	Insulander et al., 2010
2013	EE.UU.	631	Lechuga y cilantro	México	Abanyie et al., 2015
2014	EE.UU.	304	Cilantro	México	Abanyie et al., 2015
2015	EE.UU.	546	Cilantro	México	Abanyie et al., 2015
2015	Reino Unido	79	NI	México	Nichols et al., 2015

\*NI = No identificado. Adaptado de Ortega y Sanchez, 2010.

## **II.6 Pérdidas económicas en el sector agroalimentario.**

En 1997, los brotes de ciclosporiasis reportados en EE.UU. y Canadá fueron asociados al consumo de frambuesas provenientes de Guatemala, obligando a los productores a detener la exportación de frutillas, ocasionando pérdidas de ~10 millones de dólares (Powell, 1998). En 1998, el Departamento de Salud de Texas en EE.UU., emitió una alerta de brote causada por *C. cayetanensis*, donde se identificó erróneamente como fuente de contaminación a las fresas provenientes de California. La Comisión de la Fresa en California, estimó que esta falsa alarma provocó una pérdida de ~20 a 40 millones de dólares (Powell, 1998). En México, el brote de ciclosporiasis en EE.UU., asociado al cilantro cultivado en el estado de Puebla, generó, pérdidas económicas de ~60 millones de pesos (López, 2015). A pesar de las considerables pérdidas económicas generadas en el sector agrícola, en México, no existe un programa de vigilancia epidemiológica para este parásito.

## **II.7 Detección y cuantificación de *C. cayetanensis* en alimentos a través de métodos convencionales.**

La detección y cuantificación de oocistos de *C. cayetanensis* en alimentos y en muestras ambientales, se lleva a cabo mediante microscopía óptica (Ortega y Sanchez, 2010), técnicas de concentración y purificación (Quintero-Betancourt et al., 2002). Los oocistos de *Cyclospora* son concentrados a partir de lavados de frutas y hortalizas, antes de ser observados bajo el microscopio (Ortega y Sanchez, 2010). Para concentrar los oocistos, se utilizan técnicas de centrifugación a 1800 xg por 15 minutos (Annunziata Giangaspero, 2015), 1,500 xg por 10 a 15 minutos a 4°C (BAM, 2004) y 1,200 xg por 10 min (Ortega et al., 1997). Para la purificación de los oocistos se utiliza la técnica de flotación con solución de sacarosa (densidad ~1.18 g/mL) (Annunziata Giangaspero, 2015). Algunos oocistos de *Cyclospora* no se tiñen o lo hacen de forma variable (morado a rosa) mediante la tinción modificada de Ziehl-Neelsen, Kinyoun o tinción con Safranina (Ortega y Sanchez, 2010); posteriormente, los oocistos se identifican bajo un microscopio de campo brillante, contraste de fases o fluorescencia. El recuento de oocistos se lleva a cabo en el hemocitómetro o la cámara de McMaster (Varma et al., 2003; Raj et al., 2013).

Las principales limitaciones de los métodos de microscopia para la detección y cuantificación de *C. cayetanensis* son la baja especificidad y sensibilidad (Mundaca et al., 2008). Además, se requiere de personal altamente entrenado para lograr diferenciar los oocistos de otras especies de coccidias mediante parámetros morfológicos. Por esta razón, se han desarrollado métodos alternativos basados en la amplificación de ácidos nucleicos. Sin embargo, estas técnicas necesitan ser adecuadas para su implementación en matrices alimentarias o ambientales (Shields y Olson, 2003).

## **II.8 Métodos moleculares para la detección de *C. cayetanensis* en alimentos.**

Los ensayos moleculares se han implementado para superar las limitaciones de los métodos de microscopia óptica utilizados para la detección de *C. cayetanensis*. Estos ensayos se basan en la amplificación y análisis de los genes *18S rRNA* (Relman et al., 1996; Sulaiman et al., 2014; Hussein et al., 2016; Shin et al., 2016), *hsp-70* (proteína de choque térmico 70) (Sulaiman et al., 2013), ITS-1 e ITS-2 (espacios intergénicos ribosomales) (Adam et al., 2000; Olivier et al., 2001; Lalonde y Gajadhar, 2008; Marangi et al., 2015).

La detección de *C. cayetanensis* en muestras clínicas se lleva a cabo a través de la PCR anidada. En la primera PCR se utilizan los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1 que amplifican una región de ~600 pares de bases del gen *18S rRNA* (posición 418 - 1,035) altamente conservada en miembros de la familia Eimeriidae (Relman et al., 1996). En la segunda PCR se utilizan los iniciadores específicos CC719-F2 y CRP999-R2 para amplificar un segmento intermedio de ~290 pares de bases del gen *18S rRNA* (posición 711 – 999) de *C. cayetanensis* (Orlandi et al., 2003). Esta metodología se ha recomendado para la detección de *C. cayetanensis* en frutas y hortalizas frescas (Orlandi et al., 2004) debido a que el parásito se encuentra en bajas concentraciones (<1,500 oocistos/g muestra) (Caradonna et al., 2017).

## **II.9 Cuantificación de *C. cayetanensis* a través de qPCR.**

La PCR cuantitativa (qPCR) es un método molecular que permite estimar las concentraciones de un organismo a través de la amplificación de marcadores moleculares (Heid et al., 1996). Este método es comúnmente utilizado para la cuantificación de organismos (parásitos, bacterias y virus) cuya replicación en el

laboratorio representa un desafío (Gruber et al., 2001; Plumet y Gerlier, 2005; Kokkinos y Clark, 2006; Welzel et al., 2006; Vrba et al., 2010; Raj et al., 2013).

Para el desarrollo de la curva estándar y validación de la qPCR se requieren oocistos de *C. cayetanensis* en altas concentraciones; factor limitante en muchos laboratorios o regiones donde el parásito no es endémico (Varma et al., 2003). Para resolver esta limitante, la ATCC (American Type Culture Collection) en EE.UU. ha generado DNA sintético (ATCC PRA-3000SD) disponible al público; sin embargo, su costo es elevado o de difícil acceso para algunos países.

## **II.10 Genotipificación de *C. cayetanensis*.**

Para llevar a cabo estudios epidemiológicos, es necesaria la caracterización genética de aislamientos de *C. cayetanensis*; esta información permitirá identificar aislamientos endémicos y exóticos de diferentes regiones geográficas. A su vez, la genotipificación permitirá identificar el origen y la posible ruta de contaminación de los alimentos (Cinar et al., 2016; Guo et al., 2016). Para alcanzar este objetivo, se han realizado estudios filogenéticos del gen *18S rRNA* (Zhou et al., 2011; Sulaiman et al., 2014), *hsp70* (Sulaiman et al., 2013) y el ITS-1 (Adam et al., 2000; Olivier et al., 2001); sin embargo, estos estudios han revelado que el nivel de conservación de la secuencia de nucleótidos no ha permitido la distinción de diferentes linajes o genotipos.

La escases de marcadores moleculares para la caracterización genética de este parásito, se debe principalmente al limitado número de secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. Es necesario aumentar la información genética de *C. cayetanensis* en las bases de datos, para identificar nuevos locus que permitan la genotipificación de los aislamientos. Esta información es esencial para estudios de rastreabilidad del parásito.

### III. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, *C. cayetanensis* es considerado un parásito emergente asociado al consumo de alimentos frescos contaminados. El aumento en el número de brotes de ciclosporiasis en EE.UU. y países europeos, asociados a alimentos que se exportan desde México, resalta la necesidad de desarrollar herramientas para la identificación oportuna de este agente.

A nivel nacional, sólo existen datos del impacto económico ocasionado por este parásito en la industria agroalimentaria que exporta sus productos. Por ejemplo, el reciente brote de ciclosporiasis asociado al consumo de cilantro cultivado en Puebla, provocó restricciones de importación del producto, afectando a ~80,000 trabajadores del sector y generando pérdidas económicas superiores a los 60 millones de pesos. Desafortunadamente, en México se desconoce el impacto en la salud que provoca el consumo de alimentos contaminados con *C. cayetanensis*. Esta información resalta la necesidad de desarrollar ensayos microbiológicos modernos enfocados a la rápida y oportuna detección y cuantificación de este parásito en frutas y hortalizas.

Sin embargo, la limitada cantidad de material biológico representa un obstáculo para la estandarización de ensayos moleculares, debido a que el único medio disponible para obtener aislamientos de oocistos son las excretas de pacientes infectados. Por lo tanto, es necesario desarrollar protocolos alternativos que permitan generar material biológico para la validación de ensayos moleculares suficientemente sensibles y específicos para detectar bajas cantidades de oocistos presentes en alimentos.

Además, es elemental contar con una herramienta molecular que permita identificar genotipos de *C. cayetanensis* endémicos en México. Esta información, es fundamental para corroborar o refutar las imputaciones de origen del parásito en brotes de ciclosporiasis acontecidos a nivel nacional o internacional.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y estandarizar ensayos moleculares para la detección, cuantificación y caracterización genética de *C. cayetanensis* en frutillas y hortalizas.

### **IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar un protocolo molecular para amplificar material genético de *C. cayetanensis* que permita validar ensayos moleculares para la detección y cuantificación del parásito.
2. Estandarizar un ensayo de PCR anidada que sea altamente sensible, específico, y reproducible para la detección de *C. cayetanensis* en muestras ambientales y de alimentos (frutillas y hortalizas).
3. Validar un ensayo de qPCR para la cuantificación de oocistos de *C. cayetanensis*.
4. Determinar los genotipos de *C. cayetanensis* endémicos de México.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **V.1 Materiales**

#### **V.1.1 Equipo**

- Fotodocumentador (MiniBis Pro)
- Mini-sistema de electroforesis horizontal (Bio-rad)
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- PowerLyzer® 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer (MoBio)
- Termociclador tiempo real, modelo CFX96 Touch™ (Bio-rad)
- Termociclador, modelo c1000 de 96 pozos (Bio-rad)
- Centrífuga Velocity 14 (Dynamica)

#### **V.1.2 Soluciones**

- Solución amortiguadora Tris/Borato/EDTA (TBE)
- Solución de sacarosa concentrada (densidad ~1.2 g/ml)
- Agua destilada estéril
- Solución salina isotónica (SSI) 0.85%
- Bromuro de etidio 10 mg/mL (Bio-Rad)

#### **V.1.3 Reactivos**

- Agarosa al 1 y 1.5% (Bio-rad)
- ZymoBIOMICS™ DNA Mini Kit (Zymo Research)
- Albúmina bovina sérica (BSA) 20 µg/µL (New England Biolabs Inc.)
- Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific)
- Enzimas comerciales para ensayos de PCR
  - Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa)
  - Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific)
  - Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific)
  - SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa)

#### **V.1.4 Material biológico**

- Oocistos de *C. cayetanensis* almacenados en solución de dicromato de potasio (2.5%), donados por la QFB Guadalupe E. Orozco Mosqueda, del Hospital Infantil de Morelia, Eva Sámano de López Mateos.

## **V.2 Métodos**

### **V.2.1 Estandarización de un protocolo de PCR para detección de coccidias.**

Con la finalidad de estandarizar los protocolos de PCR para la amplificación del gen *18S rRNA* de coccidias, se colectaron muestras de excretas de pollo en una unidad de producción comercial. Los pollos de engorda son susceptibles a la infección por coccidia (*Eimeria tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina* y *E. necatrix*) durante todo el ciclo de producción (Blake et al., 2008). Las excretas de pollo (1 g) fueron sometidas a la técnica de flotación con solución de sacarosa (9 mL, densidad = 1.2 g/mL) para purificar y concentrar los oocistos (Gajadhar, 1994). La identificación de oocistos de *Eimeria* spp. se realizó colectando 40 µL del concentrado en laminillas para su inspección bajo el microscopio óptico. Muestras con concentraciones >100,000 oocistos/g se utilizaron para la extracción de DNA.

#### **V.2.1.1 Extracción de material genético.**

Muestras de excretas y del concentrado de las flotaciones se sometieron al proceso de extracción de DNA, utilizando el kit comercial ZymoBIOMICS (Zymo Research). Ensayos realizados en nuestro laboratorio comprobaron que este kit comercial es más efectivo para la extracción de DNA a partir de muestras ambientales. Para la extracción de DNA, la muestra se sometió a un proceso de lisis física a través de un proceso de pulverización (4,000 rpm/45 s) con perlas de sílica con un homogeneizador comercial (PowerLyzer 24 Bench Top Bead-Based Homogenizer, MoBio). La muestra homogenizada se sometió a un proceso de extracción química siguiendo el protocolo de ZymoBIOMICS. La pureza y concentración del DNA fue evaluada con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y mediante geles de integridad (1% agarosa). El DNA obtenido fue utilizado para la estandarización de los ensayos de PCR.

#### **V.2.1.2 Validación de iniciadores para amplificación del gen *18S rRNA* de coccidias.**

Para la validación del protocolo de amplificación del gen *18S rRNA* de coccidias se utilizó el DNA obtenido a partir de excretas y de concentrados de las flotaciones de heces de pollo. Se utilizaron iniciadores específicos para coccidias CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1 (Relman et al., 1996). Se ha demostrado que estos iniciadores amplifican el gen *18S rRNA* de la mayoría de los miembros de la

familia Eimeriidae, incluyendo *Eimeria* spp. y *Cyclospora* spp. (Relman et al., 1996). La estandarización del ensayo de PCR consistió en realizar amplificaciones en gradientes de temperatura de alineación (48 a 57 °C) para seleccionar las mejores condiciones de amplificación. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo utilizando la Taq polimerasa comercial *Maxima Hot Start* (Thermo Scientific), bajo las siguientes condiciones: cada reacción consistió de 0-1 ng/μL de DNA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, buffer de reacción 10X, 10 mM dNTP, 2 μg/μL BSA, 1 μM de cada iniciador y 1.25 U de Taq polimerasa, para un volumen total de 17 μL por reacción. La PCR se llevó a cabo con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, alineación de 53.6 °C por 30 s, extensión de 72 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 2 min. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa a una concentración de 1.5%. Cada pozo del gel fue cargado con 5 μL de producto de PCR. Los geles se corrieron a 90 V por 30 min, fueron teñidos con solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) y analizados con un fotodocumentador (MiniBis Pro).

#### **V.2.1.3 Evaluación del desempeño de Taq DNA polimerasas comerciales para amplificar DNA genómico a partir de excretas.**

Con la finalidad de amplificar exitosamente material genómico a partir de muestras ambientales ricas en sustancias inhibitorias, se evaluó el desempeño de tres Taq DNA polimerasas comerciales: *TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version*, *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase* y *Phire Hot Start II DNA Polymerase*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron dos concentraciones de DNA (0.5 y 0.25 ng/ μL) obtenido a partir de excretas de pollo. La amplificación por PCR del gen *18S rRNA* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado V.2.1.2.

## **V.2.2 Estandarización de un protocolo molecular para obtener material genético de *C. cayetanensis*.**

### **V.2.2.1 Extracción de DNA a partir de oocistos de *C. cayetanensis*.**

La extracción de DNA de *C. cayetanensis* se realizó a partir de 27 aislamientos de oocistos donados por la QFB. Eréndira Orozco Mosqueda del Hospital Infantil de Morelia, Eva Sámano de López Mateos. Los oocistos se recibieron en solución de dicromato de potasio al 2.5% que fue retirada mediante lavados con agua destilada estéril. Para esto, una alícuota de la muestra (~3 mL) se centrifugó a 4,500 rpm por 10 min, el sobrenadante se eliminó y el sedimento se reconstituyó en 10 mL de agua destilada estéril. Este proceso se repitió dos veces más para cada muestra (Lalonde y Gajadhar, 2008). La extracción de material genético se realizó a partir de 250 mg de sedimento utilizando el kit comercial ZymoBIOMICS como se describe en el apartado V.2.1.1.

### **V.2.2.2 Validación de ensayos de PCR para la amplificación del gen 18S rRNA de *C. cayetanensis*.**

El material genómico obtenido de los sedimentos se utilizó para la amplificación del gen 18S rRNA de *C. cayetanensis* utilizando los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1. El ensayo de PCR se realizó con la enzima *Phire Hot Start II DNA Polymerase*, que mostró el mejor desempeño para muestras ambientales. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: cada reacción consistió de 3 ng/ $\mu$ L de DNA, buffer de reacción 5X, 10 mM dNTP, 2  $\mu$ g/ $\mu$ L BSA, 1  $\mu$ M de cada iniciador y 1.25 U de Taq polimerasa, para un volumen final de 17  $\mu$ L por reacción. El protocolo de la PCR y el análisis de los productos, se llevó a cabo como se describe en el apartado V.2.1.2. Los productos de PCR (~600 p.b.) fueron secuenciados utilizando el método Sanger (Sanger et al., 1977). Las secuencias fueron analizadas filogenéticamente como se describe en el apartado V.2.6.

Una vez confirmado que los aislamientos pertenecen a la especie *C. cayetanensis*, el material genómico de los oocistos se utilizó para la estandarización del ensayo de PCR específico de *C. cayetanensis*. Para este fin, se utilizaron los iniciadores CC719-F2 y CRP999-R2 (Orlandi et al., 2003) que

amplifican un segmento de ~290 p.b. del gen *18S rRNA*. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo utilizando las siguientes condiciones: cada reacción consistió de 4 ng/μL de DNA, buffer de reacción 5X, 10 mM dNTP, 2 μg/μL BSA, 1 μM de cada iniciador y 1.25 U de Taq polimerasa *Phire Hot Start II*, para un volumen final de 17 μL por reacción. El protocolo de la PCR consistió de una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, alineación de 75.6 °C por 20 s, extensión de 72 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 2 min. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa a una concentración de 1.5% y fueron teñidos con solución de bromuro de etidio (10 mg/mL).

### **V.2.3 Validación de un ensayo de PCR anidada para la detección de *C. cayetanensis* en matrices alimentarias y ambientales.**

#### **V.2.3.1 Estandarización de la PCR anidada.**

La PCR anidada consistió en una primera amplificación con los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1. Los productos de la PCR fueron diluidos 1:100 y utilizados como DNA molde para la segunda amplificación utilizando los iniciadores CC719-F2 y CRP999-R2. Los protocolos de PCR se describen a detalle en el *apartado V.2.2.2*. Con la finalidad de identificar las mejores condiciones de amplificación, se realizaron gradientes de temperatura (60.6 – 75.6 °C) de la PCR anidada. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa a una concentración de 1.5% y fueron teñidos con solución de bromuro de etidio (10 mg/mL).

#### **V.2.3.2. Límite de detección del ensayo de PCR anidada**

Para determinar el límite de detección del ensayo de PCR anidada, se realizaron dos experimentos. En el primero, se inocularon concentraciones conocidas de oocistos (0, 10, 100 y 1,000 oocistos/g de muestra) de *C. cayetanensis* en lavados de muestras de cilantro para evaluar la eficacia del proceso de extracción del DNA. En el segundo experimento, se inocularon concentraciones conocidas de oocistos (0, 10, 100 y 1,000 oocistos/g de muestra) directamente en las muestras de cilantro para evaluar la eficacia del proceso de

lavado y de extracción del DNA. Para este fin, muestras de 25 g de cilantro obtenido en un Supermercado fueron lavados con 50 mL de agua destilada estéril. Las muestras se masajearon manualmente por 1 min y los lavados se transfirieron a tubos de 50 mL. Los lavados fueron centrifugados (10,000 RPM por 10 min) y el sedimento sometido a extracción de DNA con el kit comercial ZymoBIOMICS. El DNA obtenido se utilizó en el ensayo de PCR anidada descrito anteriormente. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa a una concentración de 1.5% y fueron teñidos con solución de bromuro de etidio (10 mg/mL).

#### **V.2.4 Detección de *C. cayetanensis* en frutillas, hortalizas y muestras ambientales.**

Se colectaron muestras de arándanos (n = 6), frambuesas (n = 6) y zarzamoras (n = 11) en unidades de producción de Michoacán, Jalisco y Guanajuato. Para cada muestra 500 g de frutillas se lavaron con 100 mL de agua destilada estéril. Veinticinco gramos de muestra fueron lavados en 50 mL de agua destilada estéril. Los lavados se procesaron para extraer DNA como se describió anteriormente. Adicionalmente, se colectaron muestras de suelo (n = 5) en huertas productoras de zarzamoras de Guanajuato. La extracción de DNA a partir de las muestras de frutillas, hortalizas y suelo se llevó a cabo con el kit comercial ZymoBIOMICS. La detección de *C. cayetanensis* se realizó mediante el ensayo de PCR anidada.

#### **V.2.5 Estandarización de ensayos de qPCR para la cuantificación de *C. cayetanensis*.**

La curva estándar de cuantificación del ensayo de qPCR se construyó con el fragmento de ~600 p.b. del gen *18S rRNA* generado a partir de la amplificación de material genómico de *C. cayetanensis*. Para la curva estándar se realizaron diluciones triples seriadas que abarcaron concentraciones de  $2.45 \times 10^{-6}$  a  $1.79 \times 10^{-3}$  ng DNA/ $\mu$ L. El ensayo de qPCR se llevó a cabo con los iniciadores CC719-F2 y CRP999-R2, bajo las siguientes condiciones: cada reacción consistió de 25 ng/ $\mu$ L de DNA, 8.5  $\mu$ L de SYBR® Premix Ex Taq™ (2X), 1  $\mu$ M de cada iniciador y 2  $\mu$ g/ $\mu$ L de BSA, para un volumen final de 17  $\mu$ L. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. La amplificación se realizó con el siguiente

protocolo: desnaturalización inicial a 95 °C por 30 s, seguido de 32 ciclos de 95 °C por 30 s, alineación de 62.1 °C por 20 s, extensión de 72 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 2 min. Al final de la amplificación se evaluaron la curva de amplificación, disociación, y la curva estándar de cuantificación; considerando los siguientes parámetros: pendiente ( $S$ ), eficiencia ( $E$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El número de copias del gen *18S rRNA* se determinó con la siguiente fórmula (Whelan et al., 2003; Godornes et al., 2007):

$$\text{Copias}/\mu\text{L} = 6.02 \times 10^{23} \times (\text{concentración } g/\mu\text{L}) / (\text{número de bases}) \\ \times (660 \text{ daltones/base})$$

El número de oocistos, se determinó asumiendo que cada célula de *C. cayetanensis* posee 15 copias del gen *18S rRNA* (Varma et al., 2003; Marangi et al., 2015; Lalonde y Gajadhar, 2016). Esta metodología se ha utilizado ampliamente para la cuantificación de parásitos, bacterias y virus que no se pueden replicar en condiciones de laboratorio (Gruber et al., 2001; Varma et al., 2003; Vrba et al., 2010).

#### **V.2.6 Análisis filogenético de las secuencias del gen *18S rRNA* de *C. cayetanensis*.**

Se realizó una búsqueda de secuencias del gen *18S rRNA* de *Cyclospora* spp., utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990) y la base de datos del GenBank. En total, se obtuvieron 69 secuencias de *Cyclospora* spp., que conforman la totalidad de secuencias de este gen depositadas en la base de datos (al mes de noviembre, 2017). Para verificar su correcta clasificación, adicionalmente se obtuvieron >900 secuencias del gen *18S rRNA* de la familia Eimeriidae. Las secuencias se sometieron a un análisis de homología de nucleótidos con la herramienta CD-HIT (Li y Godzik, 2006) para eliminar secuencias repetidas (100% identidad). Las secuencias representativas ( $n = 353$ ) fueron alineadas, inspeccionadas y cortadas con el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Los alineamientos fueron sometidos a un análisis filogenético con el método Neighbor-Joining, el modelo de *p-distance* y un soporte estadístico de 500 réplicas de bootstrapping (Saitou y Nei, 1987). El árbol filogenético inferido fue inspeccionado para corroborar la correcta clasificación de las secuencias de

*Cyclospora* spp. Se detectaron 4 secuencias de *Eimeria* spp. clasificadas erróneamente como *C. cayetanensis*, las cuales fueron eliminadas de nuestra base de datos. Posteriormente, se identificaron y obtuvieron las secuencias del linaje de *Cyclospora* (n = 52), incluyendo las especies *C. colobi*, *C. cercophiteci*, *C. macacae* y *C. papionis*. De esta base de datos, se eliminaron 9 secuencias con diferente locus del gen *18S rRNA*. Esta colección de secuencias (n = 43) de *Cyclospora* spp., se utilizó para la identificación y genotipificación de las secuencias de *C. cayetanensis* obtenidas en diversas regiones geográficas del mundo, incluyendo las obtenidas en el presente trabajo.

### **V.2.7 Genotipificación de *C. cayetanensis*.**

Se analizaron 37 secuencias del gen *18S rRNA* de *C. cayetanensis* obtenidas a partir de 8 regiones geográficas (**Cuadro 3**) y las 29 secuencias obtenidas en el presente trabajo. Las secuencias fueron alineadas, inspeccionadas y cortadas con el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Los alineamientos fueron sometidos a un análisis filogenético para seleccionar el mejor modelo evolutivo de análisis; posteriormente, los alineamientos fueron utilizados para la construcción de un árbol filogenético con el método Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981), el modelo evolutivo de Jukes-Cantor (Jukes et al., 1969) y un soporte estadístico de 500 réplicas de bootstrapping. Una vez identificados los genotipos, se estimaron los porcentajes de identidad por pares y los alineamientos se inspeccionaron para identificar los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en cada genotipo.

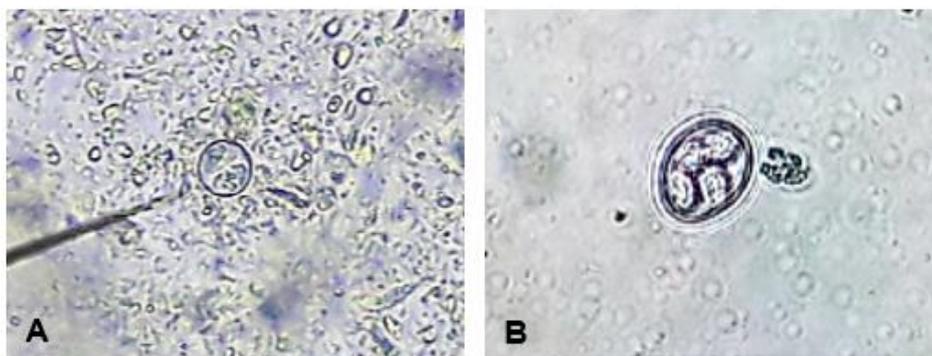
**Cuadro 3. Números de acceso en GenBank de las secuencias del gen 18S rRNA de *C. cayetanensis* utilizadas en el análisis de genotipificación.**

<b>Números de acceso</b>	<b>Origen</b>
AB368541 - AB368543	Japón
AF111183.1	Guatemala-Haití
FJ009120 - FJ009129	China
GQ292774 - GQ292776	China
GQ292778 - GQ292782	China
KC662279 - KC662280	México
KC662292.1	Perú
KJ569531 - KJ569535	China
KP642664.1	Polonia
KX618190.1	Singapore
KY770755 - KY770759	China

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1 Identificación y purificación de coccidias.

A través de la técnica de flotación se identificaron oocistos de *Eimeria* spp. (20 – 40  $\mu\text{m}$ ) y *C. cayetanensis* (8 – 10  $\mu\text{m}$ ) a partir de las muestras analizadas (**Figura 3**). El procesamiento de las muestras y la identificación morfológica fueron laboriosas y requirieron entrenamiento prolongado (~1 mes) para estandarizar la técnica de identificación de oocistos. Las dificultades para lograr la distinción de coccidias mediante parámetros morfológicos, resaltan la necesidad de desarrollar estrategias moleculares para la detección y cuantificación de *C. cayetanensis* en muestras ambientales y de alimentos.

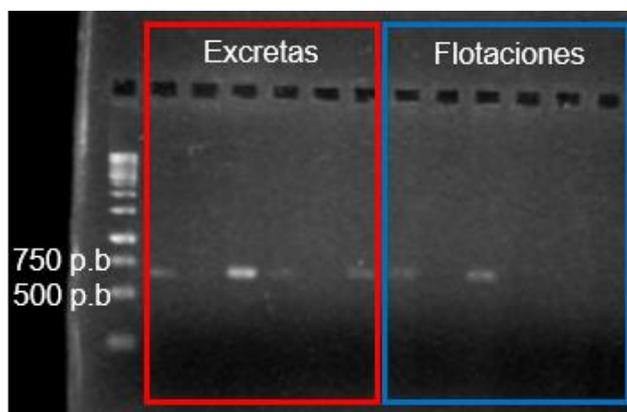


**Figura 3. Identificación morfológica de oocistos.** A) Oocistos de *C. cayetanensis* y B) Oocistos de *Eimeria* spp. Los oocistos se purificaron con la técnica de flotación. Magnificación de 400X.

### VI.2 Validación de iniciadores para la amplificación del gen *18S rRNA* de coccidias.

La amplificación del gen *18S rRNA* a partir de DNA extraído de excretas de pollo positivas a *Eimeria* spp., se logró mediante el protocolo de PCR con los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1; como se esperaba, se amplificaron fragmentos específicos de ~600 p.b. Sin embargo, sólo se logró la amplificación en 5/12 muestras (**Figura 4**) debido a una inhibición de la PCR, probablemente causada por la alta concentración de sustancias inhibitorias presentes en los extractos de heces (Kermekchiev et al., 2009).

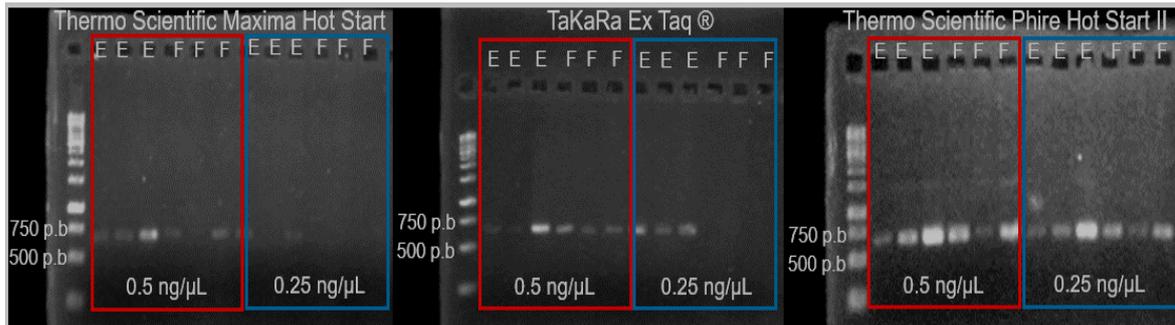
Estos resultados evidencian que para el desarrollo de ensayos de PCR altamente sensibles, es necesario evaluar la eficiencia de las Taq polimerasas utilizadas para detectar al parásito a partir de excretas (Al-Soud y Rådström, 1998).



**Figura 4. Amplificación del gen 18S rRNA de coccidias a partir de excretas de pollo.** Fragmentos de ~600 p.b. obtenidos de la amplificación del gen 18S rRNA de coccidias a partir de DNA de excretas y concentrado de flotaciones utilizando Taq DNA polimerasa *Maxima Hot Start*.

### **VI.3 Evaluación del desempeño de Taq DNA polimerasas comerciales para amplificar DNA genómico a partir de muestras ambientales**

El ensayo reveló diferencias considerables en el desempeño de las Taq polimerasas comerciales para amplificar DNA extraído a partir de excretas de pollo. La Taq polimerasa *Maxima Hot Start* generó amplificaciones débiles en 7/12 muestras con concentraciones de 0.5 y 0.25 ng/μL. Por otro lado, la Taq polimerasa *Ex Taq* generó amplicones en 8/12. La mejor amplificación se observó con la Taq polimerasa *Phire Hot Start II*, la cual generó amplicones en 12/12 muestras (**Figura 5**). Estos datos, demuestran que la sensibilidad del ensayo de PCR está determinada por la eficiencia de la Taq polimerasa utilizada, especialmente en muestras con altas concentraciones de sustancias inhibitorias (Al-Soud y Rådström, 1998). En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la enzima *Phire Hot Start II* para la validación de protocolos de PCR a partir de muestras ambientales.



**Figura 5. Evaluación del desempeño de tres Taq DNA polimerasas comerciales.** Comparación de la amplificación del gen *18S rRNA* de coccidias a partir de DNA obtenido de excretas (E) y concentrado de flotaciones (F).

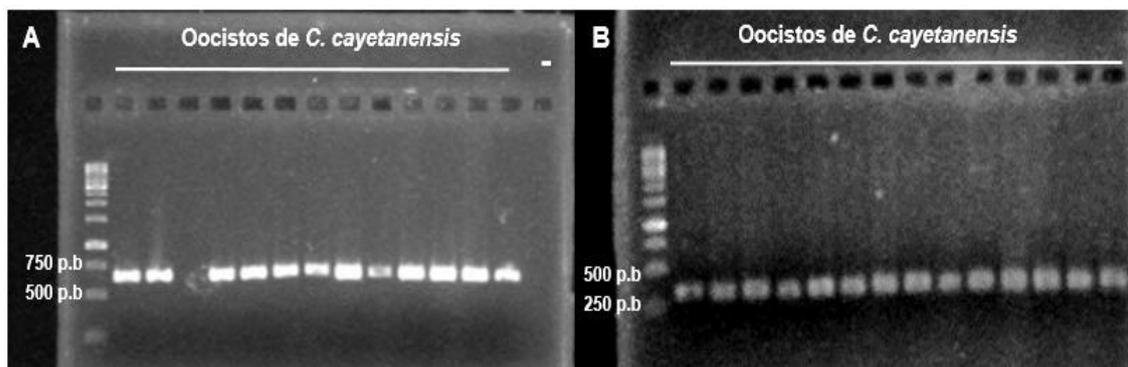
#### **VI.4 Validación de ensayos de PCR para la amplificación del gen *18S rRNA* de *C. cayetanensis*.**

Utilizando el protocolo de PCR descrito en la literatura para los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1 (Relman et al., 1996), se observaron artefactos en la amplificación del DNA extraído a partir de los aislamientos de oocistos obtenidos del Hospital Infantil de Morelia (datos no mostrados). Por esta razón se realizaron ensayos de gradiente de temperatura con la enzima *Phire Hot Start II*. Estos ensayos revelaron que la mejor temperatura de alineación para la amplificación del gen *18S rRNA* es de 56.3 °C. Con esta temperatura, se lograron amplificaciones específicas de fragmentos del tamaño esperado (~600 p.b.) (**Figura 6A**), los cuales fueron secuenciados y confirmados como *Cyclospora cayetanensis*.

Una vez que los aislamientos fueron confirmados como *C. cayetanensis*, este material biológico se utilizó para la validación de ensayos de PCR específicos para este parásito. Para este fin, se utilizaron los iniciadores CC719-F2 y CRP999-R2 (Orlandi et al., 2003) y se realizaron gradientes de temperatura de alineación. Una vez seleccionado el mejor protocolo de amplificación, se llevaron a cabo las reacciones de PCR y se obtuvieron productos del tamaño esperado (~290 p.b.) sin la presencia de artefactos (**Figura 6B**).

Debido a la formación de artefactos y amplificaciones no específicas, fue necesario estandarizar y validar los protocolos y las condiciones de PCR descritos en la literatura.

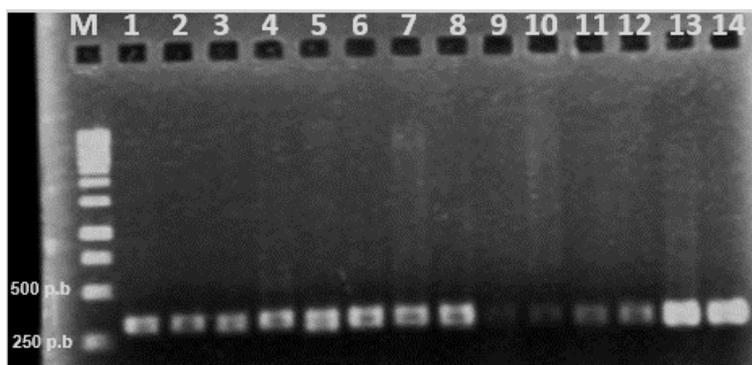
La estandarización de las condiciones del ensayo de PCR, permitió la amplificación de fragmentos específicos del tamaño esperado de *C. cayetanensis* a partir de muestras clínicas obtenidas del Hospital Infantil de Morelia.



**Figura 6. Amplificación del gen 18S rRNA de *C. cayetanensis*.** **A)** Ensayo de PCR con los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1 para generar un producto de ~600 p.b. **B)** Ensayo de PCR con los iniciadores CC719-F2 y CRP999-R2 para generar un producto de ~290 p.b. Carril 1 = marcador de peso molecular; carril 2-13 = DNA de *C. cayetanensis*.

#### **VI.4 Validación de un ensayo de PCR anidada para detección de *C. cayetanensis* en matrices alimentarias y ambientales.**

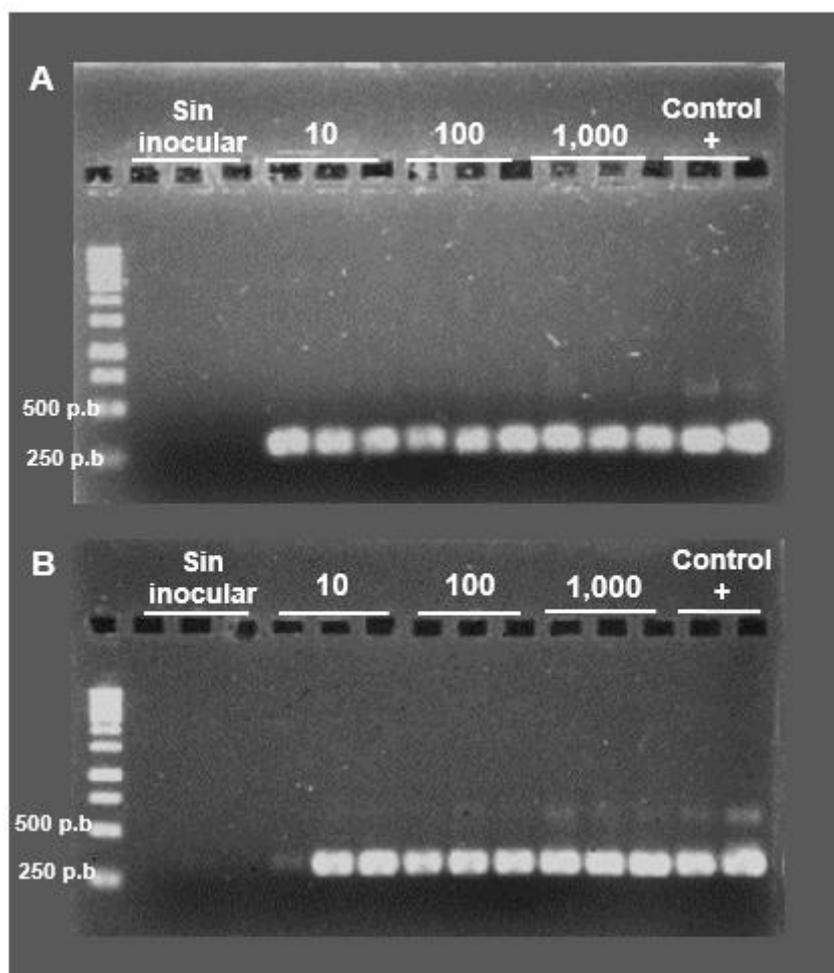
Debido a que la concentración de oocistos en matrices alimentarias y ambientales es baja (<1,500 oocistos/g) (Caradonna et al., 2017), se requiere validar un ensayo de PCR anidada. Para este fin, cada muestra se somete a dos rondas de amplificación. En la primera, se utilizó el protocolo de PCR descrito para los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1. Los productos generados en esta PCR se utilizaron para la segunda ronda de amplificación con los iniciadores CC719-F2 y CRP999-R2. Para encontrar las mejores condiciones de amplificación de la PCR anidada se realizó un gradiente de temperatura de alineación. Este ensayo reveló que la temperatura de alineación de 66.5 °C genera productos específicos a partir de DNA obtenido de muestras ambientales (**Figura 7**).



**Figura 7. Productos de la PCR anidada en un gradiente de temperatura de alineación.** Cada uno de los carriles representa una temperatura (°C) específica. Carril 1 y 9 = 75.6 °C; carril 2 y 10 = 74.6 °C; carril 3 y 11 = 72.7 °C; carril 4 y 12 = 70 °C; carril 5 y 13 = 66.5 °C; carril 6 y 14 = 64.1 °C; carril 7 = 62 °C; carril 8 = 60.6 °C.

#### **VI.4.1 Límite de detección del ensayo de PCR anidada.**

Los ensayos de PCR anidada de los lavados y muestras de cilantro inoculadas, revelaron que el límite de detección del ensayo de PCR es de 10 oocistos/g de muestra (**Figura 8**). Se ha reportado que el número de oocistos de *C. cayetanensis* en frutas y hortalizas oscila entre 40 y 1,500 oocistos/g (Caradonna et al., 2017). Por lo tanto, este ensayo es suficientemente sensible y específico para la detección del parásito en este tipo de matrices alimentarias. Además, se ha estimado que la dosis infectiva de *C. cayetanensis* varía entre 10 y 100 oocistos (Sterling y Ortega, 1999; Dixon et al., 2005); por lo cual, el protocolo de PCR anidada puede detectar la presencia del parásito a niveles que pueden provocar infecciones. Otros estudios también han detectado bajas concentraciones de oocistos de *C. cayetanensis* a través de PCR anidada. Por ejemplo, un estudio por Jinneman y colaboradores logró detectar hasta 25 oocistos inoculados directamente en lavados obtenidos de frambuesas (Jinneman et al., 1998). Adicionalmente, Orlandi y Lampel lograron detectar 30 oocistos inoculados en 100 g de frambuesas (Orlandi y Lampel, 2000); y Steele y colaboradores, detectaron 100 oocistos inoculados en 10 g de una mezcla de lechugas (Steele et al., 2003). En conjunto, estos estudios respaldan el uso de la PCR anidada para detectar bajas concentraciones de oocistos de *C. cayetanensis* en matrices alimentarias.

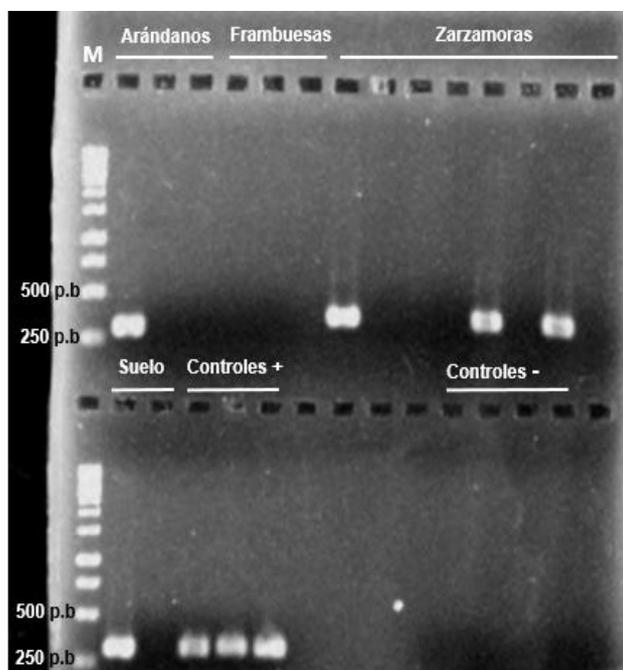


**Figura 8. Límite de detección de la PCR anidada para detección de *C. cayetanensis* a partir de una matriz alimentaria.** El ensayo de PCR anidada amplificó DNA de *C. cayetanensis* a partir de **A)** lavados de cilantro y **B)** cilantro inoculados con 10, 100 y 1,000 oocistos/g de muestra.

#### **VI.4.2 Detección de *C. cayetanensis* en frutillas, hortalizas y muestras ambientales.**

Utilizando el ensayo de PCR anidada, se logró detectar *C. cayetanensis* en 16.6% (1/6), 27.3% (3/11) y 20% (1/5) de las muestras de arándanos, zarzamoras y suelos; respectivamente, obtenidas de unidades de producción de Jalisco, Guanajuato y Michoacán (**Figura 9**). La presencia de *C. cayetanensis* en muestras de frutillas y suelos fue confirmada a través de la secuenciación del DNA y análisis filogenético. Estos resultados confirman la capacidad del ensayo de PCR anidada para detectar la presencia de *C. cayetanensis* en muestras de alimentos y ambientales. Además, la presencia de *C. cayetanensis* en muestras de suelo, arándanos y zarzamoras representa un potencial riesgo a la salud de los

consumidores mexicanos y extranjeros; lo que resalta la necesidad de establecer un sistema de detección y rastreo de este patógeno durante la cadena de producción de estos alimentos.

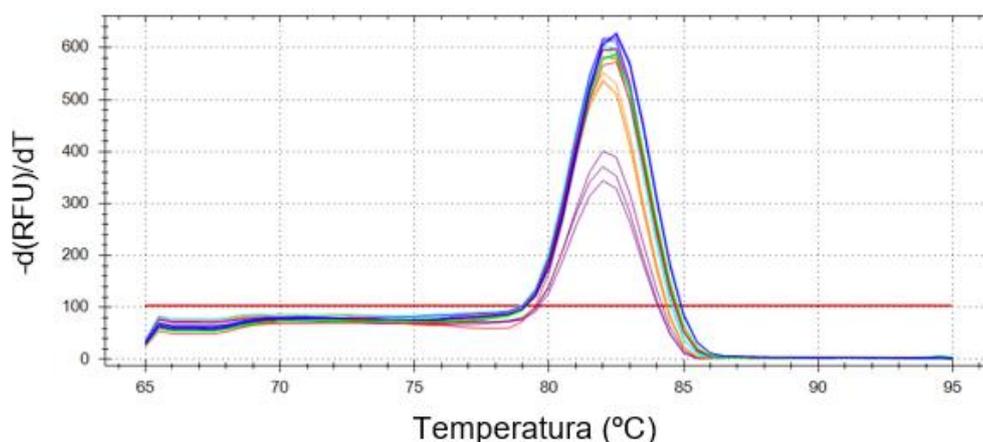


**Figura 9. Detección de *C. cayetanensis* en frutillas y suelos.** Muestras representativas con la presencia de productos de PCR de *C. cayetanensis* utilizando el protocolo de PCR anidada.

#### **VI.5 Estandarización de ensayos de qPCR para la cuantificación de *C. cayetanensis*.**

A partir del DNA sintetizado con el protocolo de PCR utilizando los iniciadores CYCF1E-F1 y CYCR2B-R1, se construyó una curva estándar de cuantificación para la detección de *C. cayetanensis* a partir de muestras ambientales. La amplificación de este material genético fue altamente específica, generando una curva única de disociación a una temperatura de 82.5 °C, sin la presencia de artefactos (**Figura 10**).

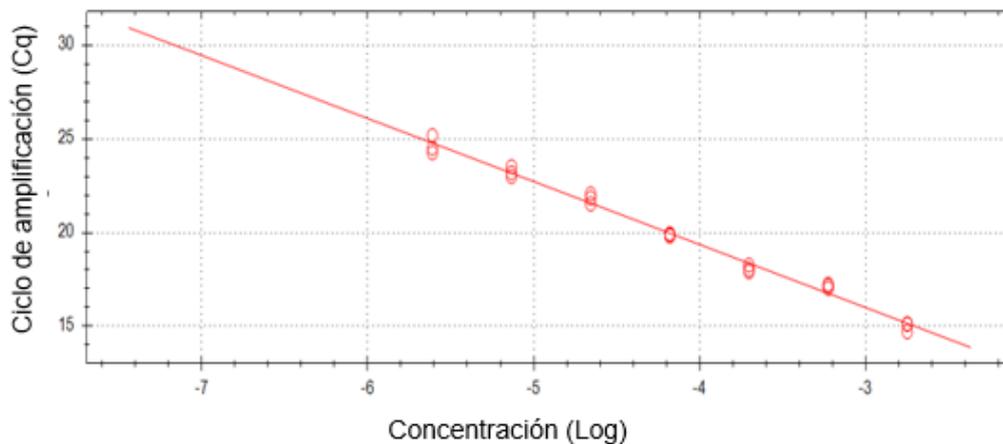
El límite inferior y superior de detección del ensayo de qPCR fue  $2.45 \times 10^{-6}$  y  $1.79 \times 10^{-3}$  ng DNA/ $\mu$ L, respectivamente. La eficiencia de la curva estándar fue de 98%, con una pendiente de -3.4 y una  $R^2$  de 0.98 (**Figura 11**). Estos valores indican que la cuantificación fue altamente sensible y eficiente.



**Figura 10. Curva de disociación de la qPCR.** La temperatura de disociación de todos los productos de qPCR generados fue de 82.5°C.

La cuantificación de oocistos a partir de concentraciones de DNA se realizó a través de la fórmula descrita en el apartado V.2.5. Los resultados obtenidos corroboran que el uso de gDNA de *C. cayetanensis*, permite la construcción de curvas estándar de cuantificación con valores de eficiencia, pendiente y  $R^2$  comparables con estudios previos (Martínez-Martínez et al., 2011; May et al., 2015). Este protocolo es una herramienta capaz de generar material genético accesible para su uso en la estandarización y validación de ensayos moleculares para la detección y cuantificación de *C. cayetanensis*. Esta metodología se utiliza convencionalmente para la cuantificación de parásitos, bacterias y virus que no se pueden replicar en condiciones de laboratorio (Gruber et al., 2001; Varma et al., 2003; Welzel et al., 2006; Alvarez et al., 2013; Nolan et al., 2015).

Para corroborar la validez de esta metodología se compararon concentraciones conocidas de oocistos y las concentraciones obtenidas mediante el ensayo de qPCR ( $n = 5$ ). Este ensayo reveló diferencias  $<0.3$  logaritmos entre ambas técnicas (**Cuadro 4**).

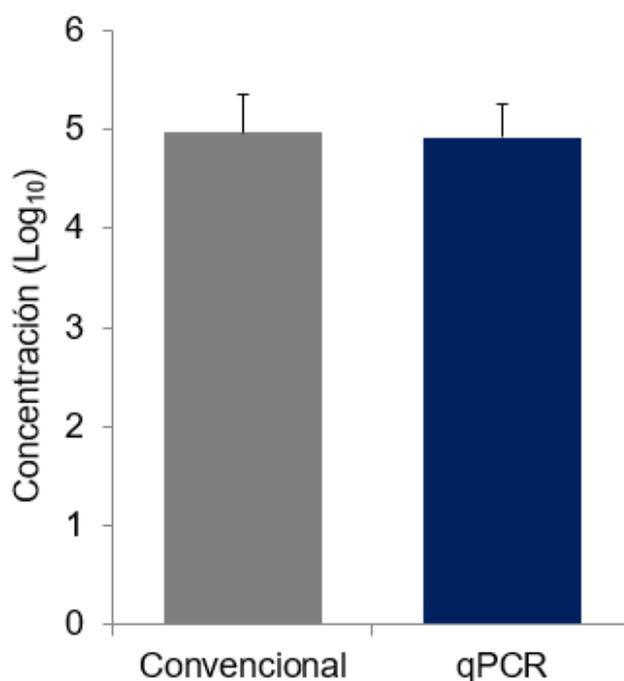


**Figura 11. Curva estándar de la qPCR para cuantificación de *C. cayetanensis*.** Los 7 puntos indican las diluciones seriadas de DNA ( $2.45 \times 10^{-6}$  a  $1.79 \times 10^{-3}$  ng DNA/ $\mu$ L). La curva estándar tuvo una eficiencia del 98%, pendiente de -3.4 y  $R^2$  de 0.98.

El análisis reveló que no existen diferencias significativas entre los recuentos realizados por el método convencional y el ensayo de qPCR ( $P > 0.05$ ) (**Figura 12**). En conjunto, los resultados demuestran la alta eficiencia, sensibilidad y especificidad del ensayo de qPCR para detectar al parásito en muestras ambientales. Este protocolo puede ser utilizado para la detección y cuantificación del parásito en matrices alimentarias.

**Cuadro 4. Recuento de oocistos de *C. cayetanensis* por el método convencional y cuantificación molecular por qPCR.** Los resultados representan el promedio del número de oocistos expresados en  $\text{Log}_{10}$ .

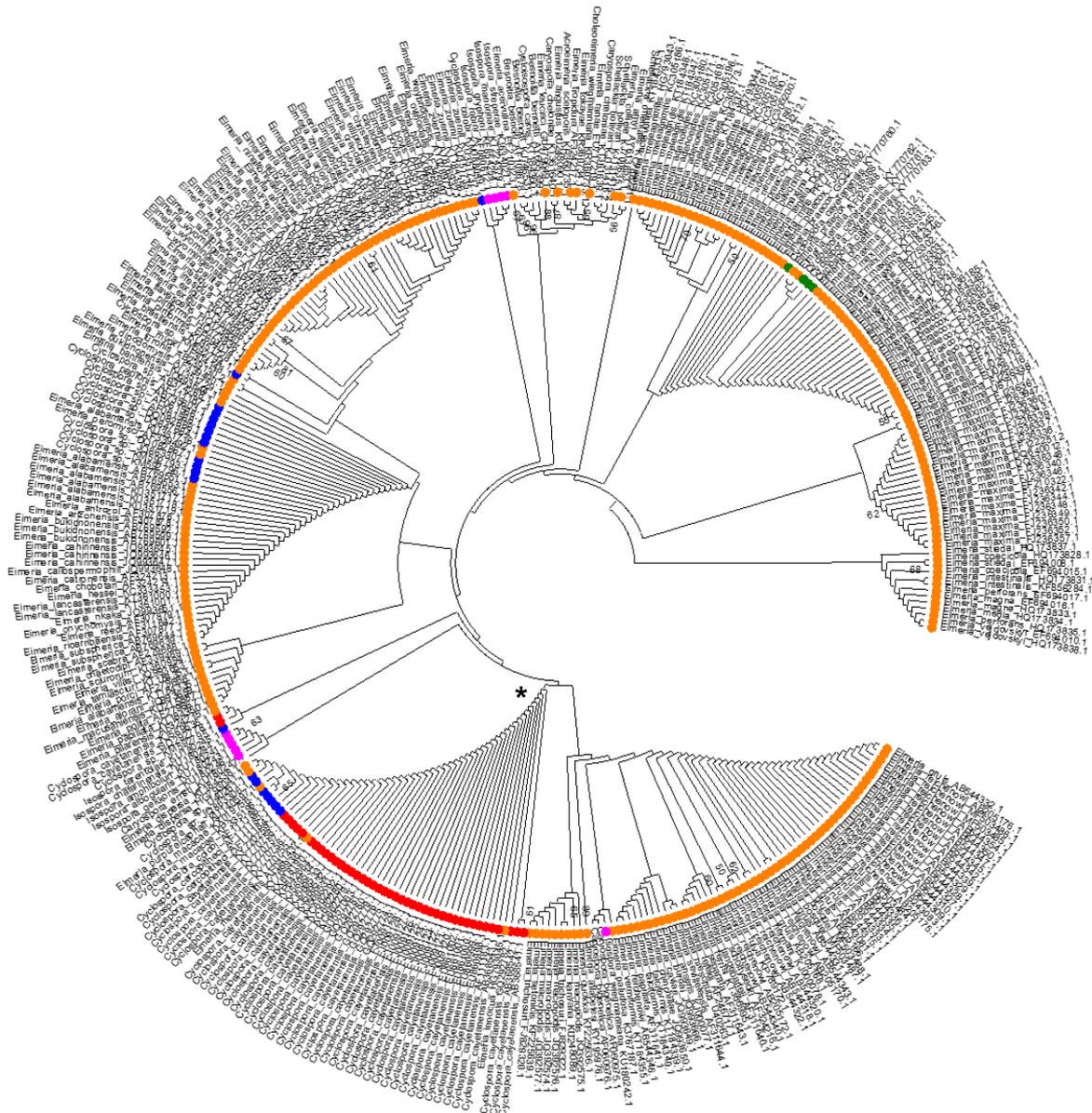
<b>Muestra</b>	<b><math>\text{Log}_{10}</math> hemocitómetro</b>	<b><math>\text{Log}_{10}</math> qPCR</b>	<b>Diferencia <math>\text{Log}_{10}</math></b>
<b>199</b>	5.34	5.33	0.28
<b>162</b>	5.20	4.96	0.24
<b>206</b>	4.78	4.82	0.05
<b>207</b>	5.15	5,07	0.07
<b>208</b>	4.4	4.43	0.03



**Figura 12. Comparación del recuento de oocistos de *C. cayetanensis* por el método convencional y cuantificación molecular por qPCR.** Concentraciones de oocistos (n = 5) expresados en Log<sub>10</sub>. Datos representan medias  $\pm$  desviación estándar. Comparación de medias por la prueba de T-Student. ( $P > 0.05$ ).

#### **VI.6 Análisis filogenético de las secuencias del gen *18S rRNA* de *C. cayetanensis*.**

El análisis filogenético de las secuencias del gen *18S rRNA* (n = 69) de *C. cayetanensis* disponibles en el GenBank, reveló la existencia de 4 secuencias de *Eimeria* spp. clasificadas erróneamente como *C. cayetanensis* (KY770760 – KY770763). Además, este análisis corrobora la idea que el género *Cyclospora* debería ser reclasificado como *Eimeria* (Relman et al., 1996; Pieniazek y Herwaldt, 1997) (**Figura 13**). Para la genotipificación de los aislamientos de *C. cayetanensis* se utilizaron las secuencias pertenecientes al linaje de *Cyclospora*, el cual tiene un porcentaje de identidad promedio del 99.7%, e incluye secuencias de las especies: *colobi*, *macacae*, *cercophiteci* y *papionis* (**Figura 13**).



**Figura 13. Análisis filogenético del gen 18S rRNA de la familia Eimeriidae.** Árbol filogenético inferido a partir de 353 secuencias, utilizando el método Neighbor-Joining y el modelo de *p-distance* con 500 réplicas de bootstrapping; el número de cada brazo del árbol corresponde al valor de bootstrap para cada linaje. Color naranja: *Eimeria* spp.; color rosa: *Isospora* spp.; color azul: *Cyclospora* sp.; color rojo: *Cyclospora cayetanensis*; color verde: *Eimeria* spp. clasificadas erróneamente como *C. cayetanensis*. \*Linaje de *Cyclospora*.

## VI.7 Genotipificación de *C. cayetanensis*

Para la genotipificación de aislamientos de *C. cayetanensis* se compararon las secuencias del gen *18S rRNA* obtenidas en diferentes regiones del mundo depositadas en el GenBank. También se incluyeron 25 secuencias del gen *18S rRNA* obtenidas a partir de aislamientos de pacientes infectados en México; así como 4 secuencias del mismo gen obtenidas de muestras de zarzamoras y suelo provenientes de unidades de producción agrícola de Jalisco y Guanajuato. El análisis filogenético identificó 6 genotipos prevalentes en 8 regiones del mundo (**Figura 14**). En China se identificaron 5 genotipos (I, III, IV, V y VI) y en Japón, 2 genotipos (II y V). En México, Polonia, Irán y Singapur, sólo se identificó el genotipo V; mientras que en Perú y Guatemala, se identificaron los genotipos I y V, respectivamente (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5. Distribución geográfica de los genotipos de *C. cayetanensis* determinados por el análisis filogenético del gen *18S rRNA*.**

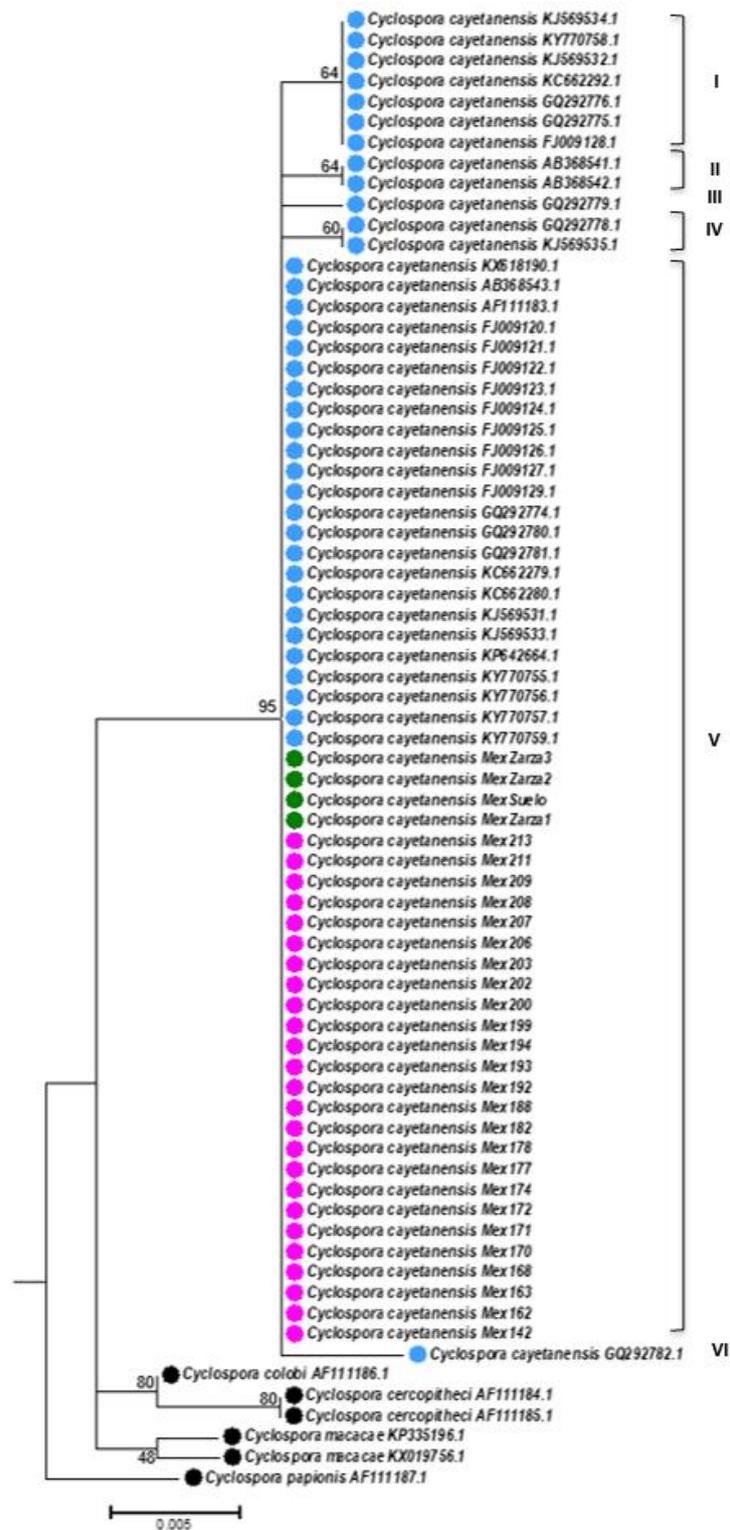
Genotipo	País
I	China y Perú
II	Japón
III	China
IV	China
V	Singapore, Japón, Guatemala-Haití, China, México, Polonia, Irán
VI	China

Los 6 genotipos del gen *18S rRNA* de *C. cayetanensis* poseen un alto porcentaje de identidad (promedio: 99.4%) lo que indica diferencia en sólo algunos nucleótidos (**Cuadro 6**). Para corroborar esta información, se analizaron los alineamientos de los diferentes genotipos y se identificaron 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en las posiciones 687, 696, 710, 732, 823, 873 y 958, del gen *18S rRNA* (**Figura 15**); algunos de estos polimorfismos (posiciones 687 y 696) ya habían sido identificados en estudios previos (Zhou et al., 2011; Sulaiman et al., 2014).

En conjunto, estos resultados respaldan el uso del gen *18S rRNA* como marcador molecular para identificar genotipos endémicos de *C. cayetanensis* en diferentes regiones del mundo.

**Cuadro 6. Matriz del porcentaje de identidad entre los diferentes genotipos de *C. cayetanensis*.**

	I	II	III	IV	V	VI
Genotipo I						
Genotipo II	99.5					
Genotipo III	99.3	99.3				
Genotipo IV	99.5	99.5	99.3			
Genotipo V	99.5	99.5	99.8	99.3		
Genotipo VI	99.3	99.3	99.0	99.3	99.5	



**Figura 14. Genotipificación de *C. cayetanensis* basada en el análisis del gen *18S rRNA*.** Árbol filogenético inferido con el método Maximum Likelihood y el modelo evolutivo de Jukes-Cantor con 500 réplicas de bootstrapping; el número de cada brazo del árbol corresponde al valor de bootstrap para cada linaje. Color azul: secuencias de *C. cayetanensis* de diferentes regiones del mundo. Color verde: secuencias obtenidas de unidades de producción agrícola (presente estudio). Color rosa: secuencias obtenidas de aislamientos del Hospital Infantil de Morelia (presente estudio). Color negro: secuencias de *Cyclospora* spp.



## VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se desarrolló un protocolo molecular para la obtención de material genético de *C. cayetanensis*. Esto permitió la validación y estandarización de ensayos de PCR anidada y qPCR para la detección y cuantificación del parásito. Adicionalmente, con este protocolo se podrá proveer de material genómico a laboratorios interesados en la implementación de ensayos moleculares para la detección de *C. cayetanensis*.

Además, en el presente trabajo se validaron dos herramientas sensibles y específicas para la detección de *C. cayetanensis* a partir de matrices alimentarias y ambientales. La primera, un ensayo de PCR anidada capaz de detectar la presencia de 10 oocistos/g de muestra. Segundo, un ensayo de qPCR capaz de cuantificar hasta 500 oocistos por muestra.

El uso de estas herramientas moleculares permitió identificar la presencia de *C. cayetanensis* en muestras de suelo, arándano y zarzamora obtenidas de unidades de producción de Jalisco y Guanajuato; lo que evidencia el riesgo potencial a la salud de los consumidores mexicanos.

Finalmente, el análisis filogenético de las secuencias del gen *18S rRNA* permitió identificar 6 genotipos de *C. cayetanensis* distribuidos en 8 regiones geográficas del mundo. Interesantemente, en México sólo se encontró evidencia de la presencia de un sólo genotipo. Hasta donde sabemos, el presente trabajo ofrece la primera evidencia de los posibles genotipos endémicos en el país; así como las primeras secuencias del gen *18S rRNA* de *C. cayetanensis* obtenidas a partir de muestras ambientales y de alimentos provenientes de México.

Los resultados del presente trabajo serán fundamentales para establecer programas de vigilancia epidemiológica y de trazabilidad de *C. cayetanensis* en México. A corto plazo, el uso de las herramientas moleculares desarrolladas en el presente trabajo, permitirán establecer estrategias de control para reducir la presencia de este parásito en frutas y hortalizas producidas en México y con esto evitar las pérdidas económicas por las restricciones impuestas a los productos agrícolas mexicanos. A largo plazo, estas herramientas permitirán generar una base de datos de genotipos endémicos en el país para impugnar la asociación de brotes epidémicos de ciclosporiasis con alimentos producidos e importados de México.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abanyie, F., R. R. Harvey, J. R. Harris, R. E. Wiegand, L. Gaul, M. Desvignes-Kendrick, K. Irvin, I. Williams, R. L. Hall, B. Herwaldt, E. B. Gray, Y. Qvarnstrom, M. E. Wise, V. Cantu, P. T. Cantey, S. Bosch, A. J. Da Silva, A. Fields, H. Bishop, A. Wellman, J. Beal, N. Wilson, A. E. Fiore, R. Tauxe, S. Lance, L. Slutsker, y M. Parise. 2015. 2013 multistate outbreaks of *Cyclospora cayetanensis* infections associated with fresh produce: focus on the Texas investigations. *Epidemiol. Infect.* 143:3451–3458.

Adam, R. D., Y. R. Ortega, R. H. Gilman, y C. R. Sterling. 2000. Intervening Transcribed Spacer Region 1 Variability in *Cyclospora cayetanensis*. *J. Clin. Microbiol.* 38:2339–2343.

Alfano-Sobsey, E. M., M. L. Eberhard, J. R. Seed, D. J. Weber, K. Y. Won, E. K. Nace, y C. L. Moe. 2004. Human Challenge Pilot Study with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 10:726–728.

Al-Soud, W. A., y P. Rådström. 1998. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3748–3753.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.

Alvarez, W. A., P. M. Gibbons, S. Rivera, L. L. Archer, A. L. Childress, y J. F. X. Wellehan Jr. 2013. Development of a quantitative PCR for rapid and sensitive diagnosis of an intranuclear coccidian parasite in Testudines (TINC), and detection in the critically endangered Arakan forest turtle (*Heosemys depressa*). *Vet. Parasitol.* 193:66–70.

Annunziata Giangaspero, M. M. 2015. Molecular detection of *Cyclospora* in water, soil, vegetables and humans in southern Italy signals a need for improved monitoring by health authorities. *Int. J. Food Microbiol.* 211:95–100.

Ashford, R. W. 1979. Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73:497–500.

Bern, C., B. Hernandez, M. B. Lopez, M. J. Arrowood, M. A. de Mejia, A. M. de Merida, A. W. Hightower, L. Venczel, B. L. Herwaldt, y R. E. Klein. 1999. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerg. Infect. Dis.* 5:766–774.

Bern, C., Y. Ortega, W. Checkley, J. M. Roberts, A. G. Lescano, L. Cabrera, M. Verastegui, R. E. Black, C. Sterling, y R. H. Gilman. 2002. Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. *Emerg. Infect. Dis.* 8:581–585.

Blake, D. P., Z. Qin, J. Cai, y A. L. Smith. 2008. Development and validation of real-time polymerase chain reaction assays specific to four species of *Eimeria*. *Avian Pathol.* 37:89–94.

- Calvo, M., M. Carazo, M. L. Arias, C. Chaves, R. Monge, y M. Chinchilla. 2005. Prevalence of *Cyclospora* sp., *Cryptosporidium* sp, microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. Arch. Latinoam. Nutr. 54:428–32.
- Caradonna, T., M. Marangi, F. Del Chierico, N. Ferrari, S. Reddel, G. Bracaglia, G. Normanno, L. Putignani, y A. Giangaspero. 2017. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. Food Microbiol. 67:67–75.
- Chacín-Bonilla, L. 2008. Transmission of *Cyclospora cayetanensis* infection: a review focusing on soil-borne cyclosporiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 102:215–216.
- Chacín-Bonilla, L. 2010. [Importance of contact with soil in the transmission of cyclosporiasis]. Investig. Clínica. 51:441–443.
- Chacín-Bonilla, L., y F. Barrios. 2011. *Cyclospora cayetanensis*: biology, environmental distribution and transfer. Biomédica. 31:132–144.
- Cinar, H. N., Y. Qvarnstrom, Y. Wei-Pridgeon, W. Li, F. S. Nascimento, M. J. Arrowood, H. R. Murphy, A. Jang, E. Kim, R. Kim, A. da Silva, y G. R. Gopinath. 2016. Comparative sequence analysis of *Cyclospora cayetanensis* apicoplast genomes originating from diverse geographical regions. Parasit. Vectors. 9. doi:10.1186/s13071-016-1896-4.
- Connor, B. A., J. Reidy, y R. Soave. 1999. Cyclosporiasis: Clinical and Histopathologic Correlates. Clin. Infect. Dis. 28:1216–1222.
- Devera, R., Y. Blanco, H. González, y L. García. 2006. Parásitos intestinales en lechugas comercializadas en mercados populares y supermercados de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. Rev. Soc. Venez. Microbiol.
- Diaz, E., J. Mondragon, E. Ramirez, y R. Bernal. 2003. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68:384–385.
- Dixon, B. R., J. M. Bussey, L. J. Parrington, y M. Parenteau. 2005. Detection of *Cyclospora cayetanensis* Oocysts in Human Fecal Specimens by Flow Cytometry. J. Clin. Microbiol. 43:2375–2379.
- Döller, P. C., K. Dietrich, N. Filipp, S. Brockmann, C. Dreweck, R. Vonthein, C. Wagner-Wiening, y A. Wiedenmann. 2002. Cyclosporiasis Outbreak in Germany Associated with the Consumption of Salad. Emerg. Infect. Dis. 8:992–994.
- Eberhard, M. L., E. K. Nace, A. R. Freeman, T. G. Streit, A. J. da Silva, y P. J. Lammie. 1999. *Cyclospora cayetanensis* infections in Haiti: a common occurrence in the absence of watery diarrhea. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60:584–586.
- Eberhard, M. L., Y. R. Ortega, D. E. Hanes, E. K. Nace, R. Quy Do, M. G. Robl, K. Y. Won, C. Gavidia, N. L. Sass, K. Mansfield, A. Gozalo, J. Griffiths, R. Gilman, C.

- R. Sterling, y M. J. Arrowood. 2000. Attempts to establish experimental *Cyclospora cayetanensis* infection in laboratory animals. *J. Parasitol.* 86:577–582.
- Eberhard, M. L., A. J. da Silva, B. G. Lilley, y N. J. Pieniazek. 1999. Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian monkeys: *C. cercopithecii* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerg. Infect. Dis.* 5:651–658.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368–376.
- Gajadhar, A. A. Host specificity studies and oocyst description of a *Cryptosporidium* sp. isolated from ostriches. *Parasitol. Res.* 80:316–319.
- Godornes, C., B. T. Leader, B. J. Molini, A. Centurion-Lara, y S. A. Lukehart. 2007. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine.* 38:1–7.
- Gruber, F., F. G. Falkner, F. Dorner, y T. Hämmerle. 2001. Quantitation of Viral DNA by Real-Time PCR Applying Duplex Amplification, Internal Standardization, and Two-Color Fluorescence Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2837–2839.
- Guo, Y., D. M. Roellig, N. Li, K. Tang, M. Frace, Y. Ortega, M. J. Arrowood, Y. Feng, Y. Qvarnstrom, L. Wang, D. M. Moss, L. Zhang, y L. Xiao. 2016. Multilocus Sequence Typing Tool for *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 22:1464–1467. doi:10.3201/eid2208.150696.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, y P. M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986–994.
- Herwaldt, B. L., y M. J. Beach. 1999. The return of *Cyclospora* in 1997: another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported raspberries. *Cyclospora Working Group. Ann. Intern. Med.* 130:210–220.
- Hoffmann, S., M. B. Batz, y J. G. Morris. 2012. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 75:1292–1302.
- Hussein, E. M., A. A. El-Moamly, M. A. Mahmoud, y N. S. Ateek. 2016. Wide genetic variations at 18S ribosomal RNA locus of *Cyclospora cayetanensis* isolated from Egyptian patients using high resolution melting curve. *Parasitol. Res.*
- Insulander, M., B. Svenungsson, M. Lebbad, L. Karlsson, y B. de Jong. 2010. A Foodborne Outbreak of *Cyclospora* Infection in Stockholm, Sweden. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:1585–1587.
- Jinneman, K. C., J. H. Wetherington, W. E. Hill, A. M. Adams, J. M. Johnson, B. J. Tenge, N. L. Dang, R. L. Manger, y M. M. Wekell. 1998. Template preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora* sp. and *Eimeria* spp. Oocysts directly from raspberries. *J. Food Prot.* 61:1497–1503.

- Jukes, T. H., C. R. Cantor, y H. N. Munro. 1969. Evolution of protein molecules. *Mamm. Protein Metab.* 3:132.
- Kermekchiev, M. B., L. I. Kirilova, E. E. Vail, y W. M. Barnes. 2009. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Res.* 37:e40.
- Kokkinos, C. D., y C. A. Clark. 2006. Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Sweetpotato Viruses. *Plant Dis.* 90:783–788.
- Koumans, E. H., D. J. Katz, J. M. Malecki, S. Kumar, S. P. Wahlquist, M. J. Arrowood, A. W. Hightower, y B. L. Herwaldt. 1998. An outbreak of cyclosporiasis in Florida in 1995: a harbinger of multistate outbreaks in 1996 and 1997. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:235–242.
- Lalonde, L. F., y A. A. Gajadhar. 2008. Highly Sensitive and Specific PCR Assay for Reliable Detection of *Cyclospora cayetanensis* Oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4354–4358.
- Lalonde, L. F., y A. A. Gajadhar. 2016. Detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii* on imported leafy green vegetables in Canadian survey. *Food Waterborne Parasitol.* 2:8–14.
- Lalonde, L. F., y A. A. Gajadhar. 2016. Optimization and validation of methods for isolation and real-time PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits. *Food Waterborne Parasitol.* 2:1–7.
- Li, N., J. Ye, M. J. Arrowood, J. Ma, L. Wang, H. Xu, Y. Feng, y L. Xiao. 2015. Identification and morphologic and molecular characterization of *Cyclospora macacae* n. sp. from rhesus monkeys in China. *Parasitol. Res.* 114:1811–1816.
- Li, W., y A. Godzik. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 22:1658–1659.
- López, V. 2015. Veto al cilantro poblano genera pérdidas por 60 mdp. Milenio. Available from: [http://www.milenio.com/estados/vcero\\_de\\_perejil\\_ya\\_trae\\_consecuencias-perejil\\_vetado\\_en\\_EU-perejil\\_poblano\\_0\\_580142120.html](http://www.milenio.com/estados/vcero_de_perejil_ya_trae_consecuencias-perejil_vetado_en_EU-perejil_poblano_0_580142120.html)
- Mansfield, L. S., y A. A. Gajadhar. 2004. *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Vet. Parasitol.* 126:73–90.
- Marangi, M., A. V. Koehler, S. A. Zanzani, M. T. Manfredi, E. Brianti, A. Giangaspero, y R. B. Gasser. 2015. Detection of *Cyclospora* in captive chimpanzees and macaques by a quantitative PCR-based mutation scanning approach. *Parasit. Vectors.* 8.
- Martínez-Martínez, M., M. Diez-Valcarce, M. Hernández, y D. Rodríguez-Lázaro. 2011. Design and Application of Nucleic Acid Standards for Quantitative Detection of Enteric Viruses by Real-Time PCR. *Food Environ. Virol.* 3:92–98.

- May, T., M. Koch-Singenstreu, J. Ebling, R. Stantscheff, L. Müller, F. Jacobi, D. Polag, F. Keppler, y H. König. 2015. Design and application of a synthetic DNA standard for real-time PCR analysis of microbial communities in a biogas digester. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:6855–6863.
- Mundaca, C. C., P. A. Torres-Slimming, R. V. Araujo-Castillo, M. Morán, D. J. Bacon, Y. Ortega, R. H. Gilman, y D. L. Blazes. 2008. Use of PCR to improve diagnostic yield in an outbreak of cyclosporiasis in Lima, Peru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102:712–717.
- Murphy, H. R., S. Almeria, A. J. da Silva, y S. Appendices. 2017. BAM 19b: Molecular Detection of *Cyclospora cayetanensis* in Fresh Produce Using Real-Time PCR.
- Nichols, G. L., J. Freedman, K. G. Pollock, C. Rumble, R. M. Chalmers, P. Chiodini, G. Hawkins, C. L. Alexander, G. Godbole, C. Williams, H. A. Kirkbride, M. Hamel, y J. I. Hawker. 2015. *Cyclospora* infection linked to travel to Mexico, June to September 2015. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 20.
- Nolan, M. J., F. M. Tomley, P. Kaiser, y D. P. Blake. 2015. Quantitative real-time PCR (qPCR) for *Eimeria tenella* replication. Implications for experimental refinement and animal welfare. *Parasitol. Int.* 64:464–470.
- Olivier, C., S. van de Pas, P. W. Lepp, K. Yoder, y D. A. Relman. 2001. Sequence variability in the first internal transcribed spacer region within and among *Cyclospora* species is consistent with polyparasitism. *Int. J. Parasitol.* 31:1475–1487.
- Orlandi, P. A., L. Carter, A. M. Brinker, A. J. da Silva, D.-M. Chu, K. A. Lampel, y S. R. Monday. 2003. Targeting Single-Nucleotide Polymorphisms in the 18S rRNA Gene To Differentiate *Cyclospora* Species from *Eimeria* Species by Multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4806–4813.
- Orlandi, P. A., C. Frazar, L. Carter, y D.-M. T. Chu. 2004. BAM 19a: Detection of *Cyclospora* and *Cryptosporidium*.
- Orlandi, P. A., y K. A. Lampel. 2000. Extraction-Free, Filter-Based Template Preparation for Rapid and Sensitive PCR Detection of Pathogenic Parasitic Protozoa. *J. Clin. Microbiol.* 38:2271–2277.
- Orozco-Mosqueda, G. E., O. A. Martínez-Loya, e Y. R. Ortega. 2014. *Cyclospora cayetanensis* in a Pediatric Hospital in Morelia, México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91:537–540.
- Ortega, Y. R., C. R. Roxas, R. H. Gilman, N. J. Miller, L. Cabrera, C. Taquiri, y C. R. Sterling. 1997. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57:683–686.
- Ortega, Y. R., y R. Sanchez. 2010. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a Food-Borne and Waterborne Parasite. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:218–234.

- Ortega, Y. R., C. R. Sterling, R. H. Gilman, V. A. Cama, y F. Diaz. 1993. *Cyclospora* Species – A New Protozoan Pathogen of Humans. *N. Engl. J. Med.* 328:1308–1312.
- Pieniazek, N. J., y B. L. Herwaldt. 1997. Reevaluating the molecular taxonomy: is human-associated *Cyclospora* a mammalian *Eimeria* species? *Emerg. Infect. Dis.* 3:381–383.
- Plumet, S., y D. Gerlier. 2005. Optimized SYBR green real-time PCR assay to quantify the absolute copy number of measles virus RNAs using gene specific primers. *J. Virol. Methods.* 128:79–87.
- Plutzer, J., y P. Karanis. 2016. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res.* 101:318–332.
- Powell, D. 1998. Risk-Based Regulatory Responses in Global Food Trade: Guatemalan Raspberry Imports Into the US and Canada, 1996-1998. *Risk Regul.* 131–135.
- Puente, S., A. Morente, T. García-Benayas, M. Subirats, J. Gascón, y J. M. González-Lahoz. 2006. Cyclosporiasis: A Point Source Outbreak Acquired in Guatemala. *J. Travel Med.* 13:334–337.
- Quintero-Betancourt, W., E. R. Peele, y J. B. Rose. 2002. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J. Microbiol. Methods.* 49:209–224.
- Raj, G. D., S. Aarthi, R. Selvabharathi, M. Raman, D. P. Blake, y F. M. Tomley. 2013. Real-time PCR-based quantification of *Eimeria* genomes: a method to outweigh underestimation of genome numbers due to PCR inhibition. *Avian Pathol.* 42:304–308.
- Relman, D. A., T. M. Schmidt, A. Gajadhar, M. Sogin, J. Cross, K. Yoder, O. Sethabutr, y P. Echeverria. 1996. Molecular Phylogenetic Analysis of *Cyclospora*, the Human Intestinal Pathogen, Suggests that It Is Closely Related to *Eimeria* Species. *J. Infect. Dis.* 173:440–445.
- Saitou, N., y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Sanger, F., S. Nicklen, y A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:5463–5467.
- Scallan, E., R. M. Hoekstra, F. J. Angulo, R. V. Tauxe, M.-A. Widdowson, S. L. Roy, J. L. Jones, y P. M. Griffin. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17:7–15.
- Shah, L., L. MacDougall, A. Ellis, C. Ong, S. Shyng, y L. LeBlanc. 2009. Challenges of Investigating Community Outbreaks of Cyclosporiasis, British Columbia, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1286–1288.

- Sherchand, J. B., J. H. Cross, M. Jimba, S. Sherchand, y M. P. Shrestha. 1999. Study of *Cyclospora cayetanensis* in health care facilities, sewage water and green leafy vegetables in Nepal. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 30:58–63.
- Shields, J. M., y B. H. Olson. 2003. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method for Detection of *Cyclospora cayetanensis* in Environmental Waters without Microscopic Confirmation. Appl. Environ. Microbiol. 69:4662–4669.
- Shin, J.-H., S.-E. Lee, T. S. Kim, D.-W. Ma, J.-Y. Chai, y E.-H. Shin. 2016. Multiplex-Touchdown PCR to Simultaneously Detect *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Cyclospora cayetanensis*, the Major Causes of Traveler's Diarrhea. Korean J. Parasitol. 54:631–636.
- Sidel, P. S. 1986. Software Reviews: Statview, Version 1.0. Soc. Sci. Microcomput. Rev. 4:232–237.
- Sim, S., J. Won, J.-W. Kim, K. Kim, W.-Y. Park, y J.-R. Yu. 2017. Simultaneous Molecular Detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* from Raw Vegetables in Korea. Korean J. Parasitol. 55:137–142.
- Steele, M., S. Unger, y J. Odumeru. 2003. Sensitivity of PCR detection of *Cyclospora cayetanensis* in raspberries, basil, and mesclun lettuce. J. Microbiol. Methods. 54:277–280.
- Sterling, C. R., e Y. R. Ortega. 1999. *Cyclospora*: an enigma worth unraveling. Emerg. Infect. Dis. 5:48–53.
- Strausbaugh, L. J., y B. L. Herwaldt. 2000. *Cyclospora cayetanensis*: A Review, Focusing on the Outbreaks of Cyclosporiasis in the 1990s. Clin. Infect. Dis. 31:1040–1057.
- Sulaiman, I. M., Y. Ortega, S. Simpson, y K. Kerdahi. 2014. Genetic characterization of human-pathogenic *Cyclospora cayetanensis* parasites from three endemic regions at the 18S ribosomal RNA locus. Infect. Genet. Evol. 22:229–234.
- Sulaiman, I. M., P. Torres, S. Simpson, K. Kerdahi, e Y. Ortega. 2013. Sequence Characterization of Heat Shock Protein Gene of *Cyclospora cayetanensis* Isolates from Nepal, Mexico, and Peru. J. Parasitol. 99:379–382.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30:2725–2729.
- Taniuchi, M., J. J. Verweij, O. Sethabutr, L. Bodhidatta, L. Garcia, A. Maro, H. Kumburu, J. Gratz, G. Kibiki, y E. R. Houpt. 2011. Multiplex PCR method to detect *Cyclospora*, *Cystoisospora*, and *Microsporidia* in stool samples. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 71:386–390.

Torres-Slimming, P. A., C. C. Mundaca, M. Moran, J. Quispe, O. Colina, D. J. Bacon, A. G. Lescano, R. H. Gilman, y D. L. Blazes. 2006. Outbreak of cyclosporiasis at a naval base in Lima, Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:546–548.

Varma, M., J. D. Hester, F. W. Schaefer III, M. W. Ware, y H. D. A. Lindquist. 2003. Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods.* 53:27–36.

Vrba, V., D. P. Blake, y M. Poplstein. 2010. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Vet. Parasitol.* 174:183–190.

Welzel, T. M., W. J. Miley, T. L. Parks, J. J. Goedert, D. Whitby, y B. A. Ortiz-Conde. 2006. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Hepatitis B Virus Genotypes A to G. *J. Clin. Microbiol.* 44:3325–3333.

Whelan, J. A., N. B. Russell, y M. A. Whelan. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods.* 278:261–269.

Zhou, Y., B. Lv, Q. Wang, R. Wang, F. Jian, L. Zhang, C. Ning, K. Fu, Y. Wang, M. Qi, H. Yao, J. Zhao, X. Zhang, Y. Sun, K. Shi, M. J. Arrowood, y L. Xiao. 2011. Prevalence and Molecular Characterization of *Cyclospora cayetanensis*, Henan, China. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1887–1890.