

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**“DETECCIÓN DE *Cyclospora cayetanensis* ASOCIADA
CON EL CONSUMO DE ALIMENTOS CONTAMINADOS”**

Tesis profesional para obtener el título de:
Licenciado en Ingeniería en Alimentos

Presenta:

Ismael Antonio Villa Navarro

Directora de tesis:

Dra. María Lorena Luna Guevara

Asesora de tesis:

Dra. Cristina Lara Ochoa

Mayo de 2024



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/281/2023
Asunto: Registro de Tema de Tesis.

C. ISMAEL ANTONIO VILLA NAVARRO
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA EN ALIMENTOS
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería en Alimentos cuyo título es el siguiente:

“Detección de *Cyclospora cayetanensis* asociada con el consumo de alimentos contaminados”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Directora de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara.

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO**

Atentamente
“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”
H. Puebla de Z., a 19 de Diciembre de 2023

Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaría Académica



C.c.p. Directora de Tesis: Dra. María Lorena Luna Guevara
C.c.p. Archivo.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251



Autorización de Impresión de Tesis

- Ingeniería Química ()
- Ingeniería Ambiental ()
- Ingeniería en Alimentos (X)
- Ingeniería en Materiales ()

Matrícula: 201742350

Al C. Sustentante Ismael Antonio Villa Navarro

De acuerdo a la **presentación y revisión** de la tesis:

Detección de cyclospora cayentanensis asociada
con el consumo de alimentos contaminados.

se aprueba la impresión y empastado de la misma.

Jurado de examen profesional:

		Firma
Presidente:	<u>Juan José Luna Guzmán</u>	<u>[Firma]</u>
Secretario:	<u>Machú Eizeh Sánchez Orzúbidó</u>	<u>[Firma]</u>
Vocal:	<u>Ma. Lorena Luna Guzmán</u>	<u>[Firma]</u>
Coasesora:	<u>CRISTINA LARA OCTOY</u>	<u>[Firma]</u>

Fecha de examen: 17 de mayo de 2024

H. Puebla de Zaragoza a 18 de abril de 2024.

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente a mis padres: Martha y Carlos, por apoyarme siempre y tenerme paciencia para la realización de este proyecto de investigación; a mi familia (Ale, Emmanuel, Chole, Cata, Rica, Abraham, Juan, Kuri) por animarme a seguir adelante a pesar de la distancia y contra todo.

A mis profesores, por darme las herramientas que me hicieron cumplir uno de mis sueños, y en especial a la Dra. Ma. Lorena Luna Guevara por darme la oportunidad de unirme a este proyecto, y a la Dra. Cristina Lara Ochoa por ser mi acompañante en el tortuoso desafío que representó la parte experimental. A la maestra Limón, por ser casi una mamá para mí en Puebla.

Al Dr. Juan L. Silva de Mississippi State UniversityTM, por permitirme ser parte de este proyecto interinstitucional y la financiación de este; a la Dra. Sonia Almeria de la FDA por su paciencia y disposición para orientarnos, al HUP por acceder a colaborar, y a la BUAP por todo lo que me ha dado.

A mis amigos, por apoyarme, animarme y, simplemente, por estar. En especial a Guillermo, que soportó el huracán en el que me convierto y quien me dio el empujón que necesitaba para venir a Puebla.

Al Ismael de 8 años, que soñaba con hacer ciencia cuando fuera grande.

Finalmente, a Luis, por dejarme ser su compañero de vida aun cuando presencié el estrés viviente en el que me convertí después de días y días de desánimo en el laboratorio. Siempre tendrás mi corazón ♥.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
I INTRODUCCIÓN.....	1
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
III JUSTIFICACIÓN.....	3
IV OBJETIVOS	5
IV.1 OBJETIVO GENERAL	5
IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
V HIPÓTESIS.....	5
VI MARCO TEÓRICO.....	6
VI.1 PRODUCCIÓN DE HORTALIZAS	6
VI.1.1 <i>Producción de cilantro en Puebla</i>	7
VI.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA).....	10
VI.2.1 <i>Clasificación</i>	11
VI.2.2 <i>Grupos vulnerables</i>	12
VI.2.3 <i>Síntomas</i>	13
VI.3 PARÁSITOS PRESENTES EN ALIMENTOS	13
VI.4 <i>CYCLOSPORA CAYETANENSIS</i>	15
VI.4.1 <i>Taxonomía</i>	15
VI.4.2 <i>Morfología y Biología</i>	15
VI.4.3 <i>Ciclo de vida</i>	17
VI.4.4 <i>Posibles vehículos de transmisión de C. cayetanensis</i>	19
VI.4.4.1 Muestras clínicas.....	19
VI.4.4.2 Agua.....	19
VI.4.4.3 Productos frescos y bebidas	21
VI.4.4.4 Mariscos.....	23

VI.4.4.5	Suelo	24
VI.4.5	<i>Estacionalidad</i>	24
VI.4.6	<i>Manifestaciones clínicas</i>	25
VI.4.7	<i>Alimentos asociados con C. cayetanensis</i>	26
VI.4.8	<i>Tratamiento</i>	27
VI.4.9	<i>C. cayetanensis en México</i>	27
VI.5	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>C. CAYETANENSIS</i>	31
VI.5.1	<i>Método por microscopía óptica</i>	32
VI.5.2	<i>Métodos de microscopía asistida con tinción</i>	33
VI.5.2.1	Tinción de Ziehl-Neelsen modificada o Kinyoun	33
VI.5.2.2	Tinción de safranina modificada (“en caliente”).....	34
VI.5.3	<i>Métodos moleculares</i>	35
VI.5.3.1	Polymerasa Chain Reaction (PCR)	35
VI.5.3.1.1	Tipos de PCR	35
VI.5.3.1.1.1	PCR de punto final	35
VI.5.3.1.1.2	PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR).....	37
VI.5.3.1.1.3	PCR digital	37
VI.5.3.1.1.4	PCR de células viables	38
VI.5.3.1.1.5	PCR inversa.....	38
VI.5.3.1.1.6	PCR anidada.....	38
VI.5.3.1.1.7	PCR con adaptadores	39
VI.5.3.1.1.8	PCR in situ	39
VI.5.3.1.1.9	PCR asimétrica.....	39
VI.5.3.1.1.10	PCR múltiple.....	39
VI.5.3.1.1.11	PCR larga	39
VI.5.3.1.1.12	RT-PCR.....	40
VI.5.3.1.2	Material necesario para la técnica de PCR	40
VI.5.3.1.3	Ventajas y limitaciones de la PCR	41
VI.6	PCR EN TIEMPO REAL (QPCR).....	41
VI.6.1	<i>Material necesario para la qPCR</i>	42
VI.6.2	<i>Sistemas de detección de la fluorescencia en la qPCR</i>	42
VI.6.3	<i>Entendiendo la qPCR</i>	45
VII	METODOLOGÍA	47
VII.1	ETAPA 1. PREPARACIÓN DE MATERIALES Y REVISIÓN DE METODOLOGÍA.....	48

VII.1.1	<i>Resumen del método BAM capítulo 19b para la detección de C. cayetanensis</i>	48
VII.1.2	<i>Obtención del control positivo</i>	49
VII.2	ETAPA 2. IMPLEMENTACIÓN (PRUEBAS PRELIMINARES)	49
VII.2.1	<i>Extracción de ADN</i>	49
VII.2.1.1	Extracción de ADN del control positivo conservado en formalina	50
VII.2.1.1.1	Preparación de la muestra	50
VII.2.1.1.2	Lisis con ciclos de congelación-descongelación	51
VII.2.1.1.3	Lisis con homogeneizador	51
VII.2.1.2	Extracción del ADN del control positivo conservado en dicromato de potasio	52
VII.2.1.2.1	Preparación de la muestra	52
VII.2.1.2.2	Lisis con homogeneizador	52
VII.2.1.3	Etapas de unión, lavado y elución de AND con el kit FastDNA™ Spin for Soil	53
VII.2.1.3.1	Unión de ADN	54
VII.2.1.3.2	Lavado del ADN	54
VII.2.1.3.3	Elución del ADN	54
VII.2.1.4	Etapas de unión, lavado y elución de ADN con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro	55
VII.2.1.4.1	Unión del ADN	56
VII.2.1.4.2	Lavado del ADN	56
VII.2.1.4.3	Elución del ADN	56
VII.2.2	<i>Análisis de la integridad y cuantificación del ADN</i>	57
VII.2.2.1	Electroforesis en gel de agarosa	57
VII.2.3	<i>Evaluación de C. cayetanensis empleando PCR en tiempo real (qPCR)</i>	58
VII.2.3.1	Protocolo de qPCR para la detección de C. cayetanensis	61
VII.2.3.2	Guía para interpretación de resultados	62
VII.3	ETAPA 3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	63
VII.3.1	<i>Obtención de las muestras</i>	63
VII.3.1.1	Muestras de heces	63
VII.3.1.2	Muestras ambientales	64
VII.3.1.2.1	Suelo	65
VII.3.1.2.2	Agua	65
VII.3.1.2.3	Producto	65
VII.3.2	<i>Procesamiento de las muestras (concentración de ooquistes)</i>	66
VII.3.2.1	Muestras ambientales	66
VII.3.2.1.1	Agua	66
VII.3.2.1.2	Suelo	67

VII.3.2.1.3	Producto	68
VII.3.3	<i>Extracción de ADN de las muestras</i>	68
VII.3.3.1	Muestras clínicas	68
VII.3.3.2	Muestras ambientales	69
VII.3.4	<i>Evaluación de C. cayetanensis empleando PCR en tiempo real (qPCR)</i>	69
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
VIII.1	ETAPA 1. PREPARACIÓN DE MATERIALES Y REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA	70
VIII.2	ETAPA 2. REALIZACIÓN DE PRUEBAS PRELIMINARES	70
VIII.2.1	<i>Extracción de ADN del control positivo de C. cayetanensis conservado en formalina</i>	70
VIII.2.1.1	Lisis mediante ciclos de congelación-descongelación	70
VIII.2.1.2	Lisis con homogeneizador	71
VIII.2.2	<i>Extracción de ADN del control positivo de C. cayetanensis conservado en dicromato de potasio</i>	75
VIII.2.2.1	Evaluación por qPCR de ADN del control positivo a <i>C. cayetanensis</i> conservado en dicromato de potasio	75
VIII.3	ETAPA 3. DETECCIÓN DE <i>C. CAYETANENSIS</i> EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES	81
VIII.3.1	<i>Identificación de C. cayetanensis en muestras biológicas</i>	81
VIII.3.2	<i>Identificación de C. cayetanensis en muestras ambientales (agua, suelo y productos agrícolas)</i>	81
IX	CONCLUSIONES	90
X	BIBLIOGRAFÍA	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUCCIÓN MUNDIAL PROMEDIO DE HORTALIZAS FRESCAS (1994-2022). FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.	6
FIGURA 2. PRINCIPALES MUNICIPIOS PRODUCTORES DE CILANTRO EN PUEBLA, MÉXICO. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.	8

FIGURA 3. MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE TRANSMISIÓN DE OOQUISTES DE <i>CYCLOSPORA CAYETANENSIS</i> OOQUISTES. (A) NO ESPORULADOS; (B) ESPORULADOS. CW, PARED DEL QUISTE; MN, MICRONEMAS; N, NÚCLEO; OC, OOQUISTE; SC, ESPOROQUISTES; SP, ESPOROZOÍTOS. SE OBSERVAN LOS RIZOMAS. FUENTE: (YNES R. ORTEGA <i>ET AL.</i> , 1998).	16
FIGURA 4. CICLO DE VIDA DE <i>CYCLOSPORA CAYETANENSIS</i> . FUENTE: (CDC, 2019).....	18
FIGURA 5. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE OOQUISTES DE <i>C. CAYETANENSIS</i> A PARTIR DE ALIMENTOS CONTAMINADOS. ADAPTADO DE (SMITH, 2007)	23
FIGURA 6. LÍNEA DE TIEMPO DE LAS PUBLICACIONES DE <i>C. CAYETANENSIS</i> EN MÉXICO	28
FIGURA 7. (A) OOQUISTES DE <i>C. CAYETANENSIS</i> TEÑIDOS CON TINCIÓN ACIDORRESISTENTE MODIFICADA. OBSÉRVESE LA VARIABILIDAD DE LA TINCIÓN EN LOS CUATRO OOQUISTES. (B) DOS OOQUISTES DE <i>C. CAYETANENSIS</i> TEÑIDOS CON LA TINCIÓN ÁCIDO RESISTENTE MODIFICADA. AMBOS OOQUISTES. FUENTE (CDC, 2019).....	32
FIGURA 8. (A) OOQUISTES DE <i>C. CAYETANENSIS</i> TEÑIDOS CON TINCIÓN ACIDORRESISTENTE MODIFICADA. OBSÉRVESE LA VARIABILIDAD DE LA TINCIÓN EN LOS CUATRO OOQUISTES. (B) DOS OOQUISTES DE <i>C. CAYETANENSIS</i> TEÑIDOS CON LA TINCIÓN ÁCIDO RESISTENTE MODIFICADA. AMBOS OOQUISTES. FUENTE (CDC, 2019).....	33
FIGURA 9. (A) OOQUISTE DE <i>C. CAYETANENSIS</i> TEÑIDO CON SAFRANINA. (B) OOQUISTE DE <i>C. CAYETANENSIS</i> TEÑIDO CON SAFRANINA. FUENTE: (CDC, 2019)	34
FIGURA 10. CURVA TÍPICA DE UNA qPCR	46
FIGURA 11. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA GENERAL DIVIDIDA EN LAS ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	47
FIGURA 12. ETAPAS GENERALES PARA LA DETECCIÓN DE <i>C. CAYETANENSIS</i> INDICADAS EN EL BAM CAPÍTULO 19B	48
FIGURA 13. RESUMEN DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>C. CAYETANENSIS</i> A PARTIR DE LOS CONTROLES POSITIVOS.....	50
FIGURA 14. COMPARACIÓN DE DOS ALÍCUOTAS DE CONTROL EN DICROMATO DE POTASIO: SOMETIDA A LAVADOS CON PBS 1X Y CENTRIFUGACIÓN (IZQUIERDA), Y SOLO CENTRIFUGADA (DERECHA)	52
FIGURA 15. MUESTRAS SIENDO HOMOGENEIZADAS EN EL EQUIPO BEAD RUPTOR 4 DE OMNI INTERNATIONAL®	53
FIGURA 16. TUBOS LYSING MATRIX E CON MUESTRA AMBIENTAL, HOMOGENEIZADOS Y CENTRIFUGADOS	53
FIGURA 17. MUESTRA AMBIENTAL SIENDO PROCESADAS CON DNEASY® POWERSOIL® PRO KIT DE QIAGEN®.....	55
FIGURA 18. MUESTRAS CLÍNICAS EN CAMA DE HIELO DURANTE LA ETAPA DE HOMOGENEIZACIÓN	55
FIGURA 19. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1%. DE IZQUIERDA A DERECHA, POCILLOS CON MARCADOR, EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>C. CAYETANENSIS</i> , Y ADN DE EPEC	58
FIGURA 20. TUBOS DE MICROCENTRÍFUGA CONTENIENDO LAS SONDAS PARA EL GEN MIT1C, EL CONTROL IAC Y EL CONTROL POSITIVO SINTÉTICO DE <i>C. CAYETANENSIS</i>	60
FIGURA 21. EQUIPO <i>APPLIED BIOSYSTEMS 7500 FAST REAL-TIME PCR SYSTEM</i> , CON LA PC DESTINADA AL EQUIPO.	62
FIGURA 22. MAPA DE PALMARITO TOCHAPAN, PERTENECIENTE AL MUNICIPIO DE QUECHOLAC, PUEBLA.....	64

FIGURA 23. PUNTOS DE MUESTREO EN LAS PARCELAS	65
FIGURA 24. PARCELAS DE CULTIVO DONDE SE REALIZÓ EL MUESTREO DE SUELO Y PRODUCTO. IZQUIERDA: PARCELA DE ACELGA, DERECHA: PARCELA DE CILANTRO	66
FIGURA 25. CENTRIFUGACIÓN DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES. DEL LADO IZQUIERDO SE OBSERVA LA CENTRIFUGA EMPLEADA, DEL LADO DERECHO SE OBSERVA UNA MUESTRA CENTRIFUGADA	67
FIGURA 26. GEL DE AGAROSA 1% DESPUÉS DE LA ELECTROFORESIS, EN DONDE SÓLO SE OBSERVA EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1 KB. NO HAY EVIDENCIA DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	70
FIGURA 27. GRÁFICA DE LA AMPLIFICACIÓN POR QPCR DEL CONTROL POSITIVO DE <i>C. CAYETANENSIS</i> CONSERVADO EN FORMALINA, CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN COMO MÉTODO DE LISIS DE LOS OOQUISTES.....	71
FIGURA 28. GRÁFICA DE LA AMPLIFICACIÓN POR QPCR DEL CONTROL POSITIVO DE <i>C. CAYETANENSIS</i> CONSERVADO EN FORMALINA, HOMOGENIZADO COMO MÉTODO DE LISIS DE LOS OOQUISTES.....	72
FIGURA 29. GEL AGAROSA 1% TRAS LA ELECTROFORESIS, DE IZQUIERDA A DERECHA: CARRIL CON MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KB, VACÍO, INTENTO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>C. CAYETANENSIS</i> , VACÍO, ADN DE <i>E. COLI</i> EPEC	74
FIGURA 30. GRÁFICA DE LA AMPLIFICACIÓN POR QPCR DEL CONTROL POSITIVO DE <i>C. CAYETANENSIS</i> CONSERVADO EN DICROMATO DE POTASIO 2.5%, HOMOGENIZADOS COMO MÉTODO DE LISIS DE LOS OOQUISTES Y CONCENTRADOS CON GLUCÓGENO.....	78
FIGURA 31. GRÁFICA DE LA AMPLIFICACIÓN POR QPCR DEL CONTROL POSITIVO DE <i>C. CAYETANENSIS</i> CONSERVADO EN DICROMATO DE POTASIO 2.5%, HOMOGENIZADOS COMO MÉTODO DE LISIS DE LOS OOQUISTES Y CONCENTRADOS CON GLUCÓGENO. SIN LA CURVA DEL CONTROL SINTÉTICO PARA UNA MAYOR VISIBILIDAD DE LA AMPLIFICACIÓN.....	78
FIGURA 32. OBSERVACIONES EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DEL CONTROL POSITIVO A <i>C. CAYETANENSIS</i> A 10,000X Y 15,000X. FUENTE: GASCA CORONA, 2024.....	79
FIGURA 33. METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN EMPLEANDO FASTDNA™ SPIN KIT FOR SOIL (MP BIOMEDICS®) Y DNEASY® POWERSOIL® PRO (QIAGEN®). FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA	80
FIGURA 34. GRÁFICA DE LA AMPLIFICACIÓN POR QPCR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	81
FIGURA 35. GEL DE AGAROSA 1% TRAS LA ELECTROFORESIS. ARRIBA: MUESTRAS PROCESADAS CON FASTDNA™ SPIN KIT FOR SOIL, ABAJO: MUESTRAS PROCESADAS CON DNEASY® POWERSOIL® PRO KIT	82
FIGURA 36. GRÁFICA DE LA AMPLIFICACIÓN POR QPCR DE MUESTRAS AMBIENTALES. MH2O: MUESTRAS DE AGUA, MA: MUESTRAS DE ACELGA, MP: MUESTRA PROCESADA CON EL KIT FASTDNA™ SPIN FOR SOIL, Q: MUESTRA PROCESADA CON EL KIT DNEASY® POWERSOIL® PRO	83
FIGURA 37. GEL DE AGAROSA 1% TRAS LA ELECTROFORESIS. ARRIBA: MUESTRAS PROCESADAS CON FASTDNA™ SPIN KIT FOR SOIL, ABAJO: MUESTRAS PROCESADAS CON DNEASY® POWERSOIL® PRO KIT. MC: MUESTRA DE CILANTRO, MA: MUESTRA DE ACELGA, MH2O: MUESTRA DE AGUA, MSA: MUESTRA DE SUELO DEL CULTIVO DE ACELGA, MSC: MUESTRA DE SUELO DEL CULTIVO DE CILANTRO.....	84

FIGURA 38. ELECTROFORESIS EN AGAROSA 1%. CARRIL 1 Y 10 CON MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1 KB PLUS, DE IZQUIERDA A DERECHA (CARRILES 2-3): H2O1-MP, H2O1-Q, A1.3-Q, A1.5-Q, A1.3-MP, A1.5-MP, CONTROL POSITIVO SINTÉTICO.	87
FIGURA 39. OOQUISTES DE <i>C. CAYETANENSIS</i> OBSERVADOS EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO, EN FRESCO. A LA IZQUIERDA, OOQUISTE ENCONTRADO EN MUESTRA DE AGUA, A LA DERECHA, OOQUISTE ENCONTRADO EN MUESTRA DE ACELGA.	88

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CIERRE AGRÍCOLA 2022 DE LA PRODUCCIÓN DE CILANTRO EN EL ESTADO DE PUEBLA	9
TABLA 2. FUENTES DE AGUA CONTAMINADA CON <i>CYCLOSPORA</i> SPP. Y/O <i>C. CAYETANENSIS</i> EN DIFERENTES PAÍSES	20
TABLA 3. INFORMES POSITIVOS Y ESTUDIOS DE VIGILANCIA SOBRE LA DETECCIÓN DE OOQUISTES DE <i>CYCLOSPORA</i> SPP. Y/O <i>C. CAYETANENSIS</i> EN PRODUCTOS FRESCOS EN TODO EL MUNDO	26
TABLA 4. RESUMEN DE LOS BROTES ASOCIADOS A <i>C. CAYETANENSIS</i> POR PAÍS Y AÑO DE APARICIÓN Y POSIBLES FUENTES DE EXPOSICIÓN	26
TABLA 5. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA PCR	41
TABLA 6. PRINCIPALES MOLÉCULAS FLUORESCENTES EMPLEADAS COMO MARCADORES EN LA PCR EN TIEMPO REAL	44
TABLA 7. TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DEL CONTROL POSITIVO CON DICROMATO DE POTASIO	52
TABLA 8. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN LA QPCR	59
TABLA 9. SONDAS EMPLEADAS EN LA QPCR	59
TABLA 10. CONTROLES SINTÉTICOS PARA LA QPCR	60
TABLA 11. MEZCLA DE REACTIVOS PARA LA EVALUACIÓN DE <i>C. CAYETANENSIS</i> POR QPCR	61
TABLA 12. COMPONENTES DE LA <i>MASTER MIX</i> EMPLEADA EN LA QPCR	61
TABLA 13. RESULTADOS DE QPCR DE LAS MUESTRAS PROCESADAS CON DIFERENTE TIEMPO EN EQUIPO BEAD RUPTOR 4 (90 s, 3, 4 Y 5 MIN), SIN DILUIR Y DILUCIÓN ¼	72
TABLA 14. RESULTADOS DE QPCR DE LAS MUESTRAS PROCESADAS CON DIFERENTE TIEMPO EN EQUIPO BEAD RUPTOR 4 (90 Y 120 s), SIN DILUIR	73
TABLA 15. RESULTADOS DE QPCR DE LAS MUESTRAS PROCESADAS CON PRETRATAMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ADN, SIN DILUIR Y DILUIDO ¼	74
TABLA 16. RESULTADOS DE QPCR DE LOS CONTROLES 4 Y 5 DE EXTRACCIÓN DE ADN, SIN DILUIR	76
TABLA 17. RESULTADOS DE QPCR DE LOS CONTROLES 1-3 DE EXTRACCIÓN DE ADN, SIN DILUIR	76
TABLA 18. RESULTADOS DE QPCR DE LOS CONTROLES 1-5 DE EXTRACCIÓN DE ADN, SIN DILUIR Y DILUCIÓN ¼	77

TABLA 19. RESULTADOS DE QPCR DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES PROCESADAS CON AMBOS KITS.....	83
TABLA 20. RESULTADOS DE QPCR DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES, SEGUNDO ANÁLISIS.	85
TABLA 21. RESULTADOS DE QPCR DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES, TERCER ANÁLISIS	86

I INTRODUCCIÓN

Actualmente se conocen más de 250 enfermedades relacionadas con el consumo de agua o alimentos contaminados, la mayoría de las cuales son infecciones ocasionadas por bacterias, virus y parásitos (González Flores y Rojas Herrera, 2005; Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014). De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que anualmente 600 millones de personas padecen una enfermedad transmitida por alimentos (ETA), de las cuales cerca de 420 mil mueren, de éstos un aproximado de 125 mil corresponden a menores de 5 años (Marin Mendez *et al.*, 2020).

En México se estima que anualmente se registran más de 5 millones de padecimientos relacionados con el consumo de agua y alimentos contaminados, aunque estos casos representan sólo aquellos que son reportados, por lo que el número real de casos supera esta cifra con facilidad, sobre todo al tomar en cuenta que llegan a reportarse más de 500 brotes de ETA cada año, englobadas principalmente como infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas, seguida por las infecciones por helmintiasis y salmonelosis (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica [SINAVE] y Sistema Único de Información [SUIVE], 2015).

Por su parte, en el estado de Puebla tan solo en 2021 existieron 9 629 casos relacionados con amebiasis intestinal y 149 518 casos de infecciones intestinales causadas por otros organismos y las mal definidas, dentro de las 20 principales causas de enfermedad; mientras que en 2022 se reportaron 8 303 casos relacionados con amebiasis intestinal, y 171 891 casos de infecciones intestinales causadas por otros organismos y las mal definidas (Secretaría de Salud, 2023), por lo que las ETA se vuelven un serio problema de salud para el estado, al encontrarse dentro de las principales causas de enfermedad en el histórico registrado.

Estas enfermedades son fruto de la contaminación de los alimentos, la cual puede producirse en cualquiera de las etapas del proceso de fabricación o incluso de distribución, aunque en su mayoría las ETA pueden surgir como consecuencia de una mala preparación o manipulación en cualquier etapa de la cadena de valor de los alimentos, así como en el hogar (OMS, 2020). Así mismo, debido a que el agua cumple un rol esencial en la industria de los alimentos por su uso en etapas como el riego de cultivos, el lavado de productos frescos y en el procesamiento, existe una problemática ocasionada por la escasez de agua, ya que esto

orilla a que se empleen aguas residuales para las actividades mencionadas, aumentando así el riesgo de contaminación de los productos frescos (Chávez Ruvalcaba *et al.*, 2021).

Dado lo anterior, los reportes de parasitosis en humanos tienen como principal vía de transmisión la fecal-oral. De ahí que se hayan registrado brotes por el parásito *C. cayetanensis* debido al consumo de alimentos contaminados con los ooquistes que se excretan en las heces humanas, dentro de los cuales existe una larga lista de vegetales, frutas y hierbas ya sean frescas o congeladas, incluyendo el cilantro que se produce en el estado de Puebla. Por lo que el objetivo principal de este trabajo es investigar la presencia de *C. cayetanensis* en muestras fecales y ambientales que pudiesen estar relacionadas con el consumo de vegetales contaminados.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ciclosporiasis o ciclosporiasis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos, causada por el parásito *Cyclospora cayetanensis*, un protozoo coccidio intracelular obligado que forma esporas e infecta el segmento proximal del intestino delgado (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2016; Marie y Petri, 2022; SINAVE y SUIVE, 2015).

A la fecha, se han reportado distintos brotes ocasionados por *Cyclospora*, uno de los primeros publicados fue en el año de 1979 en dos niños y una mujer en Papúa Nueva Guinea, pero no fue hasta 1986 que se describió como un parásito del humano, refutando que fuera una alga verde-azul o una cianobacteria presente en pacientes con diarrea crónica y SIDA. Desde entonces, se han logrado asociar con distintos brotes por el consumo de agua, frutas, vegetales, ensaladas, jugos, salsas de vegetales y, específicamente en México, se relacionaron con berros contaminados en 2001 (SINAVE y SUIVE, 2015).

Adicionalmente en Estados Unidos los brotes se han identificado desde la década de 1990 con las frambuesas, albahaca, lechuga mixta y guisantes frescos importados, aunque el caso más reciente se reportó por cilantro contaminado proveniente de Puebla, México, en al menos 304 personas que padecieron ciclosporiasis en 2014 tras la ingesta de este vegetal, y otras más reportadas en 2013 (CDC, 2016; Cable News Network [CNN] Español, 2015).

Tras la identificación del cilantro con los ooquistes de *C. cayetanensis* la Administración de Alimentos y Medicinas (FDA, por sus siglas en inglés), la Cámara Nacional de la Industria

de la Transformación (CANACINTRA) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), investigaron 11 granjas y empacadoras en Puebla en los siguientes tres años, donde descubrieron que se mantenían “condiciones objetables” en ocho empresas, de las cuales cinco estuvieron asociadas con los brotes en EEUU, llegando a descubrir incluso heces y papel sanitario dentro de los cultivos de cilantro, quizá debido a que en algunos campos no se tenía acceso a agua potable ni instalaciones sanitarias (Associated Press Spanish, 2015; CNN Español, 2015).

Como medida de prevención tras estos brotes, surgió la alerta sanitaria 24/23, en la cual se establece que el cilantro que exporta México a Estados Unidos tiene un periodo restrictivo en los meses de abril a agosto (tiempo durante el cual existe mayor prevalencia de *C. cayetanensis*), durante los cinco meses sólo las empresas que pertenecen a la Lista Verde tienen permitido exportar el cilantro fresco con regularidad, debido a que estas cuentan con un sistema de reducción de riesgos desde la producción hasta el empaquetado (Agricultura Puebla, 2017). Sin embargo, dado que este cilantro no puede exportarse, termina comercializándose dentro del territorio nacional, convirtiéndose en un peligro latente para la salud de los consumidores nacionales.

III JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son padecimientos que se adquieren tras consumir alimentos o bebidas contaminados ya sea con microorganismos patógenos como bacterias, virus, parásitos, o por sustancias como toxinas o priones. Las ETA son padecimientos frecuentes en todo el mundo, lo que las vuelve un tema importante en materia de salud pública, gracias a las incidencias, secuelas y la mortalidad que conllevan, de forma que termina representando un fuerte gasto en el sector salud. Además, suponen un gran impacto para la industria de los alimentos, y un riesgo latente para los consumidores (Hernández Porrás *et al.*, 2017; Marin Mendez *et al.*, 2020; Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014; Paz Lemus, 2020).

Como menciona Dooley, (2013), se estima que aproximadamente el 46% de las enfermedades registradas entre 1998 y 2008 se asociaron con productos agrícolas. Por su parte, la OMS estima que anualmente 600 millones de personas padecen una ETA, de las cuales cerca de 420 mil mueren, de éstos un aproximado de 125 mil corresponden a menores

de 5 años (Marin Mendez *et al.*, 2020), por lo cual es importante prevenir que los alimentos y el agua de consumo se contaminen, así como detectar aquellos que ya han sido contaminados.

De igual forma, es importante identificar el agente que ocasiona la ETA, ya que de esta forma se logra una disminución de la morbilidad, así como en la mortalidad, además que con esto se reducen los costos económicos asociados (Hernández Porras *et al.*, 2017), que se estima ascienden anualmente a \$110 000 millones de dólares en productividad y gastos médicos, asociados con las ETA en los países de ingresos bajos y medianos (OMS, 2020).

En este sentido, dado el tema de investigación de este trabajo, resulta imprescindible tener presentes los principales parásitos que se asocian con las ETA.

Por lo anterior, *C. cayetanensis* es uno de los principales parásitos que preocupan a la OMS y la FDA, por lo que es de suma importancia tomar consciencia en las implicaciones que dicho parásito tiene en materia de salud pública, en la industria alimentaria y, por ende, en la economía de la población. Sin embargo, como se menciona en el artículo “*Cyclospora cayetanensis*: patógeno protozoario emergente en México”, la ciclosporiasis sigue sin identificarse de forma regular en los laboratorios privados y de salud pública, incluso aunque se tienen registros de este padecimiento en el país. Esto quizá es ocasionado por la falta de información sobre este protozoario y su impacto en la salud pública, lo que desencadena diagnósticos erróneos y tratamientos incorrectos (Sánchez-Vega *et al.*, 2014).

Es por lo expuesto con anterioridad que se pretende evaluar la presencia de *C. cayetanensis* en el estado de Puebla, mediante técnicas de análisis molecular a heces humanas y muestras ambientales, con el objetivo de sentar un precedente que permita el diagnóstico de ciclosporiasis en la comunidad que radica en el estado, y la presencia del parásito en el ambiente, tras la implementación de una red de trabajo entre el Hospital Universitario Puebla (HUP) y el Centro de Detección Biomolecular (CDB), ambos pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), esto como parte de un proyecto interinstitucional entre Mississippi State University, la BUAP (en los departamentos antes mencionados, así como la Facultad de Ingeniería Química-FIQ, y la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados-VIEP), y la Secretaría de Salud del Estado de Puebla. De esta forma, no sólo se tendrán diagnósticos certeros, sino que a futuro se podrá brindar a la población un

tratamiento adecuado, a la vez que se investiga un parásito de importancia en la industria alimentaria que ha sido ignorado en el estado y el país, aun cuando es motivo de restricciones para la exportación.

IV OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL

- Detectar la presencia de *C. cayetanensis* mediante técnicas moleculares en muestras que pudiesen estar asociadas a la producción y consumo de alimentos contaminados con dicho parásito.

IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener muestras clínicas presuntivas de *C. cayetanensis* de derechohabientes del Hospital Universitario de Puebla.
- Obtener muestras ambientales presuntivas de *C. cayetanensis* de regiones productoras de hortalizas en el estado de Puebla.
- Implementar una técnica de detección de *C. cayetanensis* basada en el BAM capítulo 19b de la FDA dentro del Centro de Detección Biomolecular BUAP.
- Extraer el ADN de *C. cayetanensis* proveniente de las muestras recolectadas.
- Evaluar la presencia de *C. cayetanensis* en el ADN extraído de las muestras recolectadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

V HIPÓTESIS

El parásito *C. cayetanensis* está presente en la población del estado de Puebla, por lo que puede ser detectado las regiones productoras de vegetales del estado y en la población general.

VI MARCO TEÓRICO

VI.1 PRODUCCIÓN DE HORTALIZAS

Las hortalizas cumplen un rol fundamental en la sociedad, tanto por el valor nutritivo que aportan en la dieta (resultado del alto contenido de minerales, vitaminas y proteínas que contribuyen a mejorar y mantener la buena salud), como por el impacto económico que representan (FAO *et al.*, 2011). Además, gracias a la globalización y los cambios en los hábitos alimenticios, se da un mayor movimiento y demanda tanto de frutas como de hortalizas frescas (Tibaduiza-Roa *et al.*, 2018).

En este sentido, la producción mundial de hortalizas ha visto un incremento en los últimos años, tal y como lo reportan los datos presentados por la FAO, mostrados en la Figura 1, en donde se aprecia el promedio de producción mundial en millones de toneladas desde 1994 a 2022.

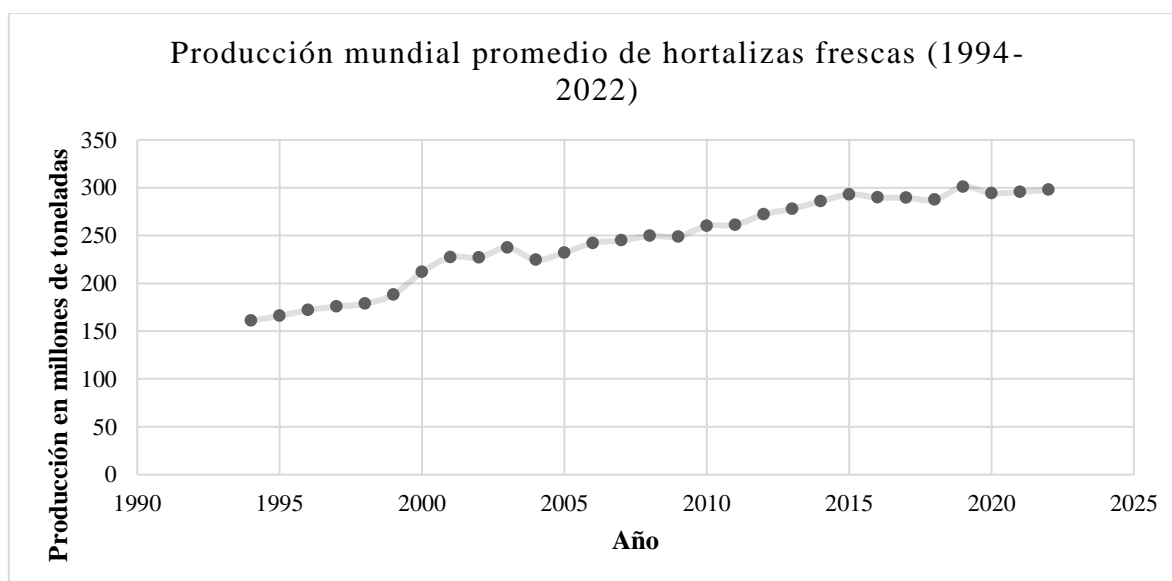


Figura 1. Producción mundial promedio de hortalizas frescas (1994-2022). Fuente: elaboración propia.

En el caso específico de México, la industria agroalimentaria lleva una estrecha relación con la economía del país, debido a que ambos se complementan para brindar un mayor bienestar a la población, tanto así que el sector agropecuario llega a representar el 10% del producto interno bruto (PIB), lo que vuelve a la agricultura la actividad económica que genera mayor valor en el sector primario, aportando el 70% del total, por lo que la agroindustria se vuelve vital para el desarrollo de México (Soto Martínez, 2021).

De acuerdo con el último censo agropecuario realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la mayor parte de las principales hortalizas producidas en México se generan en los estados del Norte, seguidos por la producción en los estados del Pacífico, esto como región. Aunque son siete estados los que concentran el 62.9% de la producción, los cuales son Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Guanajuato, Zacatecas, Puebla y Jalisco (INEGI, 2023).

No es de extrañar que Puebla se encuentre dentro de los principales productores de las hortalizas más importantes del país, ya que el estado cuenta con regiones geográficas que tienen las condiciones ambientales óptimas para la producción agrícola a cielo abierto de diversos cultivos (Tibaduiza-Roa *et al.*, 2018).

Tal es el impacto de Puebla en la agroindustria que desde 2017, SAGARPA y la Unión de Exportadores de Hortalizas del Estado de Puebla (UNACOMEX) veían un panorama con amplias posibilidades de incrementar las exportaciones de distintas hortalizas, ya que el estado poblano ya sobresalía en este tema distribuyendo sus productos a Estados Unidos, Canadá, Rusia, Costa Rica, Bolivia, Colombia, Corea del Norte, Países Bajos, Australia, Chile, Alemania, El Salvador y Guyana. Además, destacaba también teniendo el primer lugar a nivel nacional en la producción de cilantro, coliflor y elote (Representación AGRICULTURA Puebla, 2017), por lo que no solo exporta a otros países, sino que también abastece a los mercados del sureste, centro y norte del país (Zambrano, 2022).

VI.1.1 Producción de cilantro en Puebla

Dado lo anterior, y lo ya tratado referente al tema de *Cyclospora*, el cilantro se vuelve un tema prioritario no solo para el estado, ya que al año se exportan hasta 35 mil toneladas de dicho producto, es decir, entre el 20 y el 30% del cilantro se exporta, mientras que el resto se destina al consumo nacional, lo que lo vuelve un tema preocupante por el impacto que podría tener en la salud de los consumidores y en la economía de la región (Guzmán Uribe, 2021; Tibaduiza-Roa *et al.*, 2018).

De acuerdo con el cierre agrícola 2022, obtenido de los datos abiertos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), tan solo en Puebla se produjeron 46, 747.18 toneladas de cilantro, lo que representa un valor de producción de \$170, 276.01. Dicha producción se genera en 50 de los 217 municipios con los que cuenta el estado, aunque la producción se concentra principalmente en 15 municipios (Figura 2), los cuales tienen una producción mayor al promedio, es decir, producen más de 934.94 ton de cilantro cada una, llegando a aportar casi el 70% de la producción del estado, tal y como se muestra en la

Tabla 1 (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2024).

Estos municipios, en orden descendiente de producción, son: Atlixco, Quecholac, Tepeaca, Palmar de Bravo, Los Reyes de Juárez, Ixcaquixtla, Tecamachalco, San Nicolás Buenos Aires, Tlahuapan, San Salvador El Verde, Tecali de Herrera, Tepexi de Rodríguez, Santa Isabel Cholula, San Salvador Huixcolotla, y Acatzingo, aunque como se aprecia en la

Tabla 1, Santa Isabel Cholula no logra sobrepasar la media del valor de producción pese a su nivel productivo.

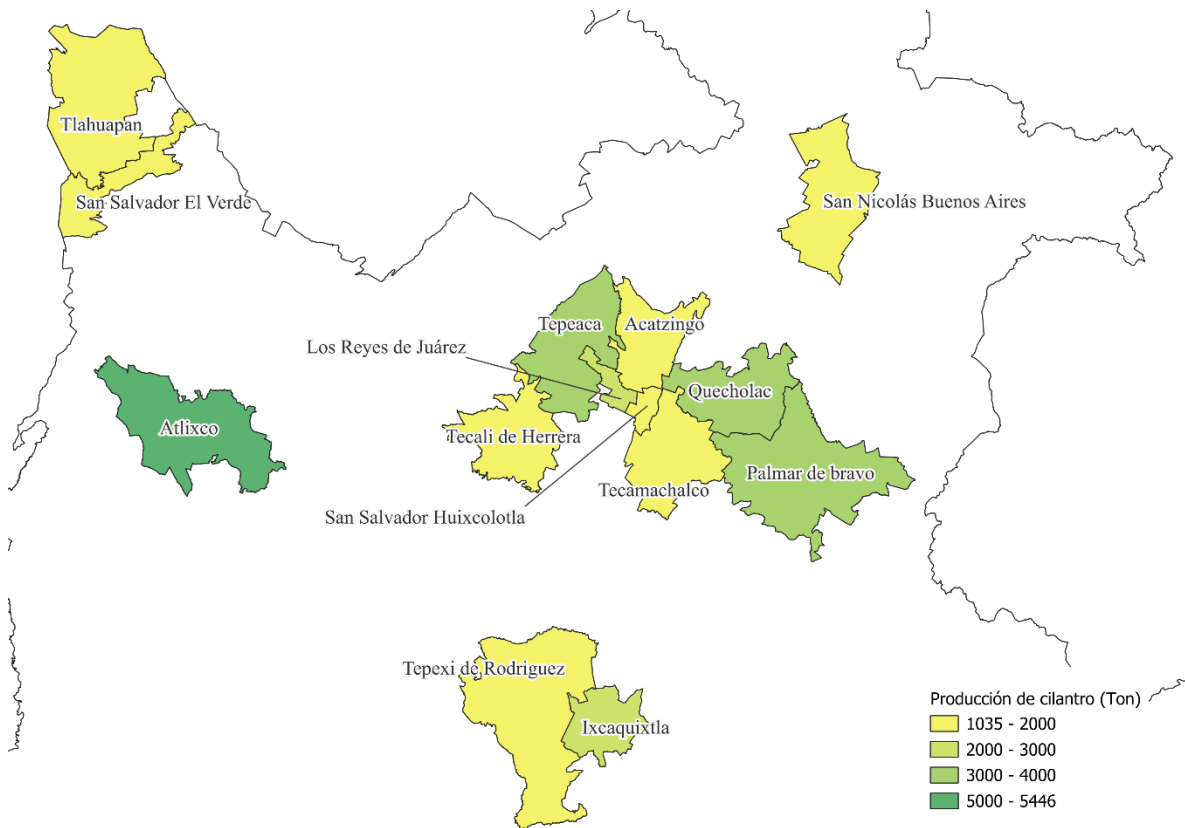


Figura 2. Principales municipios productores de cilantro en Puebla, México. Fuente: elaboración propia.

Tabla 1. Cierre agrícola 2022 de la producción de cilantro en el estado de Puebla

Municipio	Producción (ton)	Porcentaje (%)	Porcentaje acumulado	Valor de producción (miles de pesos)
Atlixco	5,446.18	11.65	11.65	11,957.36
Quecholac	3,531.00	7.55	19.20	15,283.10
Tepeaca	3,294.05	7.05	26.25	10,454.42
Palmar de Bravo	3,116.40	6.67	32.92	13,617.38
Los Reyes de Juárez	2,897.60	6.20	39.12	12,347.82
Ixcaquixtla	2,079.50	4.45	43.56	8,783.10
Tecamachalco	1,816.60	3.89	47.45	7,541.44
San Nicolás	1,788.60	3.83	51.28	4,257.60
Buenos Aires				
Tlahuapan	1,454.47	3.11	54.39	4,468.72
San Salvador El Verde	1,399.79	2.99	57.38	4,637.91
Tecali de Herrera	1,208.24	2.58	59.97	3,462.32
Tepexi de Rodríguez	1,136.50	2.43	62.40	4,818.98
Santa Isabel	1,047.77	2.24	64.64	2,674.93
Cholula				
San Salvador	1,039.50	2.22	66.86	6,498.53
Huixcolotla				
Acatzingo	1,035.00	2.21	69.08	4,491.77
Juan N. Méndez	927.1	1.98	71.06	4,158.74
San Pedro	894.04	1.91	72.97	3,010.30
Cholula				
Huaquechula	888.48	1.90	74.87	2,035.00
Tochtepec	859.2	1.84	76.71	3,497.17
Tepanco de López	835.5	1.79	78.50	3,491.44
San Martín	832.55	1.78	80.28	2,792.45
Texmelucan				
Coyotepec	688.5	1.47	81.75	2,755.27
Zacapala	684.6	1.46	83.22	3,245.89
Cuapiaxtla de Madero	678.5	1.45	84.67	2,898.31
General Felipe	629.2	1.35	86.01	2,710.90
Ángeles				
Tepeyahualco	617.2	1.32	87.33	2,637.82
de Cuauhtémoc				
San Matías	590.9	1.26	88.60	1,897.18
Tlalancaleca				
San Salvador El Seco	527.39	1.13	89.73	1,512.45
Santo Tomás	499.2	1.07	90.79	2,808.60
Hueyotlipan				
Huitziltepec	457.6	0.98	91.77	1,920.55
Tehuacán	434	0.93	92.70	1,952.17

Huejotzingo	432.92	0.93	93.63	1,347.92
Calpan	422.94	0.90	94.53	1,181.06
Molcaxac	267.9	0.57	95.11	1,117.58
Mixtla	249	0.53	95.64	1,053.82
Chiautzingo	240.95	0.52	96.15	697.87
San Jerónimo	237.01	0.51	96.66	839.82
Tecuanipan				
Cuautlancingo	190	0.41	97.07	566.7
Atoyatempan	177.9	0.38	97.45	720.47
San Andrés	172.5	0.37	97.82	561.71
Cholula				
Tlaltenango	157	0.34	98.15	454.04
Coronango	151	0.32	98.47	370.98
Atexcal	146.7	0.31	98.79	678.55
San Felipe	121.28	0.26	99.05	354.34
Teotlalcingo				
Huatlatlauca	114.1	0.24	99.29	525.5
Juan C. Bonilla	97.69	0.21	99.50	303.13
Tlanepantla	87.2	0.19	99.69	321.66
Chalchicomula	78.65	0.17	99.86	194.74
de Sesma				
Atzitzintla	52.5	0.11	99.97	335.34
Tlachichuca	14.78	0.03	100.00	31.17
Total	46,747.18	-	-	170,276.02
Media	934.94			3,405.52

Adaptado de (SIAP, 2024)

VI.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

Las enfermedades transmitidas por alimentos, o ETA, son enfermedades que se adquieren tras consumir alimentos o bebidas que se encuentran contaminadas por microorganismos patógenos como bacterias, virus, parásitos, o por sustancias químicas. Dependiendo del agente que esté contaminando el alimento se pueden presentar algunos signos como: diarrea, meningitis, cáncer, e incluso la muerte. De acuerdo con el CDC, se han identificado más de 250 padecimientos diferentes relacionadas con el consumo alimentos (Paz Lemus, 2020).

Los factores que determinan que las ETA representen un importante problema de salud pública a nivel mundial incluyen: el incremento en la incidencia, las secuelas que pueden generar incluyendo la muerte, las nuevas formas de transmisión, el incremento de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los antimicrobianos (en el caso de las bacterias), además del impacto que tienen estos padecimientos en la economía como consecuencia de los costos en servicio de salud, productividad, demandas, y la confianza de los consumidores (González Flores y Rojas Herrera, 2005; Marin Mendez *et al.*, 2020).

No obstante, no todas las ETA son atendidas, por lo que el impacto es mayor, teniéndose estimaciones que indican que la cifra sería 10 veces mayor al número de brotes notificados. Dentro de estos brotes, se ha encontrado que son debido a diversas causas que terminan en el consumo de alimentos no inocuos, los principales motivos reportados son: manipulación incorrecta por parte de los consumidores, insuficiencias en los controles de inocuidad durante los procesos de transformación, producción y servicios expendedores de alimentos, así como errores en los programas de saneamiento y en los planes de buenas prácticas de manufactura dentro de la industria de alimentos (Marin Mendez *et al.*, 2020).

En México se estima que cada año aproximadamente el 12% de los 44 millones de diagnósticos sujetos a vigilancia epidemiológica son gracias a las ETA, es decir, más de 5 millones de padecimientos (sólo de aquellos que son reportados) fueron ocasionados por alimentos o bebidas contaminadas. Registrándose cerca de 500 brotes de ETA cada año, englobadas principalmente como infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas, seguida por las infecciones por helmintiasis y salmonelosis (SINAVE y SUIVE, 2015).

De igual forma, al revisar el “Anuario de morbilidad 1984-2021”, (2023), provisto por la Secretaría de Salud en México, se estima que tan sólo en Puebla en 2021 existieron 9 629 casos relacionados con amebiasis intestinal, dentro de las 20 principales causas de enfermedad y 149 518 casos de infecciones intestinales causadas por otros organismos y las mal definidas.

VI.2.1 Clasificación

De acuerdo con lo que mencionan la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la OMS y la Sociedad Mexicana de Inocuidad y Calidad para Consumidores de Alimentos (SOMEICCA), (s. f.; 2020), las ETA pueden agruparse en tres diferentes categorías dependiendo la forma en que se contraen, estas son: infecciones, intoxicaciones y toxiinfecciones o infecciones mediadas por toxinas.

Las infecciones son ocasionadas tras la ingesta de un alimentos o agua contaminados con una cantidad adecuada de microorganismos patógenos vivos. En sentido estricto, dependen del número de microorganismos vivos consumidos y su posterior desarrollo en el consumidor, por lo cual requiere tiempo para que se presenten síntomas.

Por otro lado, las intoxicaciones son causadas cuando las toxinas producidas por bacterias u hongos, o las sustancias químicas patógenas ya se encuentran presentes en los alimentos en una cantidad suficiente como para afectar la salud del consumidor. Dichas toxinas suelen tener características termorresistentes por lo que pueden permanecer activas incluso aunque el microorganismo ya no lo esté. Su consumo provoca que los síntomas aparezcan pocas horas después de haber consumido los alimentos contaminados.

Las toxiinfecciones se dan cuando las toxinas se producen en el interior del organismo del consumidor tras ingerir un alimento contaminado con microorganismos patógenos. Los síntomas se presentan después de horas o incluso días de consumido el alimento, esto dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismo.

VI.2.2 Grupos vulnerables

Es importante destacar que todas las personas pueden contraer una ETA, sin embargo, existen grupos poblacionales que presentan un mayor riesgo, ya sea porque su sistema inmune no está desarrollado completamente, se encuentra comprometido, o porque la implicación de contraer alguna ETA podría tener consecuencias más graves. De acuerdo con el CDC, (2021b), estos grupos son:

- **Adultos mayores de 65 años:** ellos tienen un mayor riesgo debido a que conforme las personas envejecen su sistema inmunitario y órganos no logran reconocer y eliminar las patógenos tan bien como solían hacerlo antes. En su mayoría, las personas de este grupo que contraen una ETA requieren hospitalización.
- **Niños menores de 5 años:** en este caso, este grupo continúa desarrollando su sistema inmune, por lo que no tendrá la capacidad de luchar contra patógenos en comparación a un sistema inmunitario completamente desarrollado. Es peligroso que contraigan alguna ETA debido al alto riesgo de desarrollar diarrea y deshidratación; el riesgo llega a ser tan alarmante que incluso 1 de cada 7 niños de este grupo de edad pueden llegar a presentar insuficiencia renal sí contraen una ETA ocasionada por *Escherichia coli* O157:H7 (una cepa enterohemorrágica).
- **Personas con el sistema inmune debilitado:** suele ocurrir por padecimientos como la diabetes, enfermedades en hígado o riñón, alcoholismo, VIH/sida, o por someterse

a tratamientos de quimioterapia y/o radiación. Estas personas al contar con un sistema inmune comprometido no combaten las ETA con tanta eficacia.

- **Personas gestantes:** este grupo tiene más probabilidad de enfermarse que las personas que no se encuentran embarazadas.

VI.2.3 Síntomas

Los síntomas de una ETA varían dependiendo del patógeno que la ocasiona, inclusive pueden ir de leves a muy graves, sin embargo, existen una serie de malestares que son comunes en estas enfermedades, los cuales incluyen malestar estomacal, cólicos estomacales, náuseas, vómito, diarrea y fiebre. No obstante, como ya se mencionó, la aparición de estos síntomas puede pasar desde horas después del consumo del alimento o agua contaminado, hasta días después de la ingesta (CDC, 2021a).

Por otra parte, los síntomas graves implican sangre en las heces, fiebre alta, vómitos frecuentes que conllevan a la deshidratación, incluyendo la disminución o falta de orina, resequedad en boca y garganta, o sensación de mareo al pararse, y diarrea que dure más de tres días, en estos casos, la CDC recomienda buscar atención médica con urgencia, sobre todo tomando en cuenta que la población no siempre atiende sus padecimientos con un profesional cuando presenta los síntomas comunes de una ETA.

VI.3 PARÁSITOS PRESENTES EN ALIMENTOS

Los parásitos son organismos que viven ya sea sobre o dentro de un organismo huésped, y se alimenta a expensas de éste. Actualmente se reconocen tres clases importantes de parásitos que pueden enfermar a los humanos: 1) los protozoos, que se reproducen por división celular, y se multiplican en el interior de los seres humanos; 2) los helmintos, que producen huevos o larvas que posteriormente se desarrollan en el entorno antes de ser capaces de causar infecciones en humanos; y 3) los ectoparásitos, un organismo que vive en el exterior de otro y se beneficia a expensas de su huésped (CDC, 2022). Las ETA ocasionadas por parásitos representan una gran carga en los países con ingresos de medios a bajos, porque suelen ser crónicas y con secuelas a largo plazo.

Estos organismos parasitarios varían en tamaño, pudiendo ser organismos unicelulares hasta gusanos visibles a simple vista, con ciclos de vida que varían dependiendo del organismo del que se trate (Chávez Ruvalcaba *et al.*, 2021).

De acuerdo con la OMS, la contaminación de los alimentos puede producirse en cualquiera de las etapas del proceso de fabricación o incluso de distribución, no obstante, la mayoría de las ETA surgen como consecuencia de alimentos que han sido preparados o manipulados de forma incorrecta en cualquier etapa de la cadena de valor de los alimentos, así como en el hogar (OMS, 2020). Además, debido a que el agua cumple un rol fundamental en la industria de los alimentos por su uso en etapas como el riego de cultivos, el lavado de productos frescos y en el procesamiento, surge una problemática ocasionada por la escasez de agua, ya que esto orilla a que se empleen aguas residuales para las actividades mencionadas, aumentando así el riesgo de contaminación de los productos frescos (Chávez Ruvalcaba *et al.*, 2021).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y la OMS, en su publicación denominada *Multicriteria-bases ranking for risk management of food-borne parasites* (2014), dieron respuesta a una solicitud establecida por el Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH, por sus siglas en inglés) para examinar el conocimiento sobre los parásitos en los alimentos, así como su impacto en la salud pública y el comercio; de ahí que en dicho documento se establecieran los siguientes criterios para evaluar la incidencia de los parásitos de mayor importancia en la industria de los alimentos: 1) número de enfermedades mundiales, 2) distribución mundial, 3) morbilidad aguda, crónica, y porcentaje de cronicidad, 4) mortalidad, 5) potencial creciente de la enfermedad, 6) importancia para el comercio, y 7) impacto socioeconómico. Lo anterior permitió conocer una lista de 24 parásitos de importancia, así como su principal vector alimentario, en donde *C. cayetanensis* ocupó el puesto 14, teniendo como vector las bayas y productos frescos.

Sin embargo, la importancia depende de los criterios con los que se evalúe. En este sentido, si cambiáramos el enfoque de acuerdo con las consideraciones comerciales, los parásitos de mayor preocupación serían *Trichinella spiralis*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Anisakidae* y *C. cayetanensis* (Food and Agriculture Organization of the United Nations y World Health Organization, 2014).

VI.4 CYCLOSPORA CAYETANENSIS

Es probable que el primer reporte relacionado con el parásito *C. cayetanensis* se publicara en 1979 por Ashford, en donde se identificó un patógeno humano en tres pacientes de Papúa Nueva Guinea (dos niños y una mujer), aunque en ese momento se concluyó que el patógeno podría ser un coccidio del género *Isospora* (Naganathan *et al.*, 2022; Ortega y Sanchez, 2010; Rahi *et al.*, 2021; SINAVE y SUIVE, 2015; Totton *et al.*, 2021).

Posteriormente, Soave *et al.*, 1986, reportaron que cuatro viajeros que regresaban de Haití y México presentaban una enfermedad similar a la influenza, por lo que sugirieron que el agente causal podría ser un nuevo parásito enteropatógeno. Sin embargo, en publicaciones posteriores se describió a *C. cayetanensis* como un cuerpo similar a diferentes organismos, como el de un coccidio, una cianobacteria, un alga verdeazulada e incluso se le confundió con el parásito *Cryptosporidium*; aunque todos los reportes hacían referencia a cuerpos esféricos sin orgánulos, con membranas y estructuras lamelares similares a los cloroplastos. Finalmente, en 1992, Ortega *et al.* lograron caracterizar al parásito, denominándolo como un nuevo coccidio intestinal capaz de causar enfermedades en los humanos y perteneciente al género *Cyclospora*, pero no fue hasta 1993-1994 que propusieron el nombre de *C. cayetanensis*, gracias a que el alma mater de la Dra. Ortega es la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Ortega y Sanchez, 2010; SINAVE y SUIVE, 2015; Visvesvara *et al.*, 1997).

VI.4.1 Taxonomía

En orden ascendente de la jerarquía taxonómica, *Cyclospora cayetanensis* pertenece a la familia *Eimeriidae*, al suborden *Apicomplexa*, y a la subclase *Coccidiasina*, y se diferencia de otras especies de *Cyclospora* debido a su hospedador y a su fase de ooquiste, ya que esta última es mucho más pequeña y esférica que el resto de las especies conocidas, además, es la única especie capaz de infectar humanos (Guo *et al.*, 2018; Naganathan *et al.*, 2022; Rahi *et al.*, 2021).

VI.4.2 Morfología y Biología

Cuando es excretado en las heces, *C. cayetanensis* es una esfera indiferenciada que contiene una mórula. Es decir, que cuando se encuentra en su estadio de ooquiste no esporulado y es observado en los frotis fecales de los pacientes que ha infectado, se ha observado que los

ooquistes miden entre 8 y 10 micrómetros (Figura 3.A), los cuales tienen un aspecto vidrioso (hialino) que no refractan la luz, y que contienen una mórula de color verdoso que mide entre 6-7 μm de diámetro, formada por 6 a 9 glóbulos que sí refractan la luz y son de aspecto lipídico dispuestos en forma de racimo o roseta y que miden alrededor de 2 μm . Además, tienen una pared bicapa que contiene un cuerpo polar y un residuo de ooquiste (Ortega y Sanchez, 2010; SINAVE y SUIVE, 2015; Totton *et al.*, 2021; Visvesvara *et al.*, 1997).

Los ooquistes no esporulados tardan de 7 a 15 días en esporular (convertirse en infecciosos), y cuando lo logran dan lugar a dos esporoblastos o esporoquistes de aproximadamente 4 por 6,3 μm , con cuerpos stieda y substieda, la primera se describe como una estructura similar al casquete polar del ooquiste, siendo una prominencia que refracta la luz en uno de los polos de los esporoquistes, y sin la cual se sugieren la ocurrencia de formas extraintestinales en el ciclo de vida del protozooario, mientras que el cuerpo substieda es una estructura prominente y homogénea que se ubica cerca del cuerpo de stieda, y que tiene forma de una protuberancia. A su vez los esporoquistes contienen dos esporozoítos de aproximadamente 1,2 por 9 μm que están plegados en dos. Los esporozoítos tienen la estructura típica de los esporozoítos de coccidias, que incluye un complejo apical, roptrias, un núcleo y micronemas (Figura 3.B) (Ortega y Sanchez, 2010; SINAVE y SUIVE, 2015; Totton *et al.*, 2021; Visvesvara *et al.*, 1997).

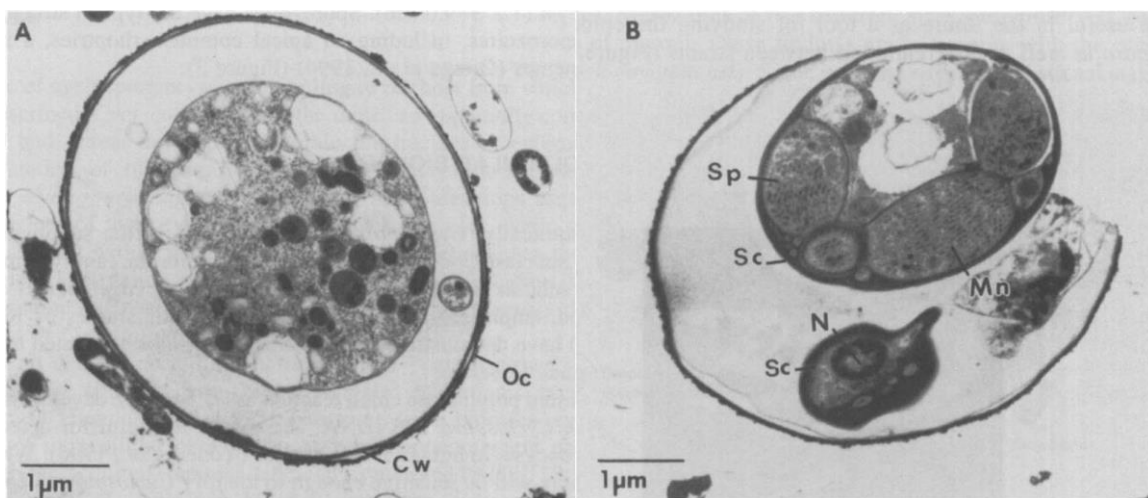


Figura 3. Micrográficas electrónicas de transmisión de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* ooquistes. (A) No esporulados; (B) esporulados. Cw, pared del quiste; Mn, micronemas; N, núcleo; Oc, ooquiste; Sc, esporoquistes; Sp, esporozoítos. Se observan los rizomas. Fuente: (Ynes R. Ortega *et al.*, 1998).

VI.4.3 Ciclo de vida

En la actualidad todavía no se ha acabado de dilucidar el ciclo de vida completo de este parásito, aunque ya pueden identificarse diferentes etapas (Visvesvara *et al.*, 1997), en 2020 se describieron detalles de los cambios endógenos del ciclo de vida, por lo que todavía se desconocen algunos factores que influyen en la epidemiología de este parásito de importancia en la industria alimentaria (Almeria *et al.*, 2021; Almeria y Shipley, 2021).

De los detalles que se conocen, se sabe que *C. cayetanensis* es excretado en las heces por su hospedador: el humano. Se excreta en forma de ooquistes no esporulados, los cuales requieren de 7 a 15 días para esporular bajo condiciones ideales (23-27°C) y se cree que con esto se vuelve infeccioso para un hospedador susceptible. Este proceso se lleva a cabo en el ambiente, donde los ooquistes contaminan agua, suelo o alimentos frescos, los cuales pueden ser consumidos por un hospedador susceptible, momento en el cual los ooquistes ya esporulados sufren de un des-enquistamiento gracias a la bilis, la tripsina y otros factores, liberando así cuatro esporozoitos para de esta forma poder infectar las células epiteliales presentes en el intestino delgado, en específico en la zona del duodeno y el yeyuno, de ahí que se considere un parásito intracelular obligado. Es en las vacuolas parasitóforas de las células epiteliales que se llevan a cabo las fases sexual y asexual de reproducción, en la multiplicación asexual se originan merontes de tipo I y II, los cuales se diferencian en estadios sexuales o gametocitos, de forma que se pasa a la etapa sexual, donde el macrogametocito es fecundado por el microgametocito produciendo un cigoto que terminará siendo un nuevo ooquiste no esporulado, listo para excretarse y ser liberado al ambiente (

Figura 4) (SINAVE y SUIVE, 2015; Ynés R. Ortega y Sanchez, 2010).

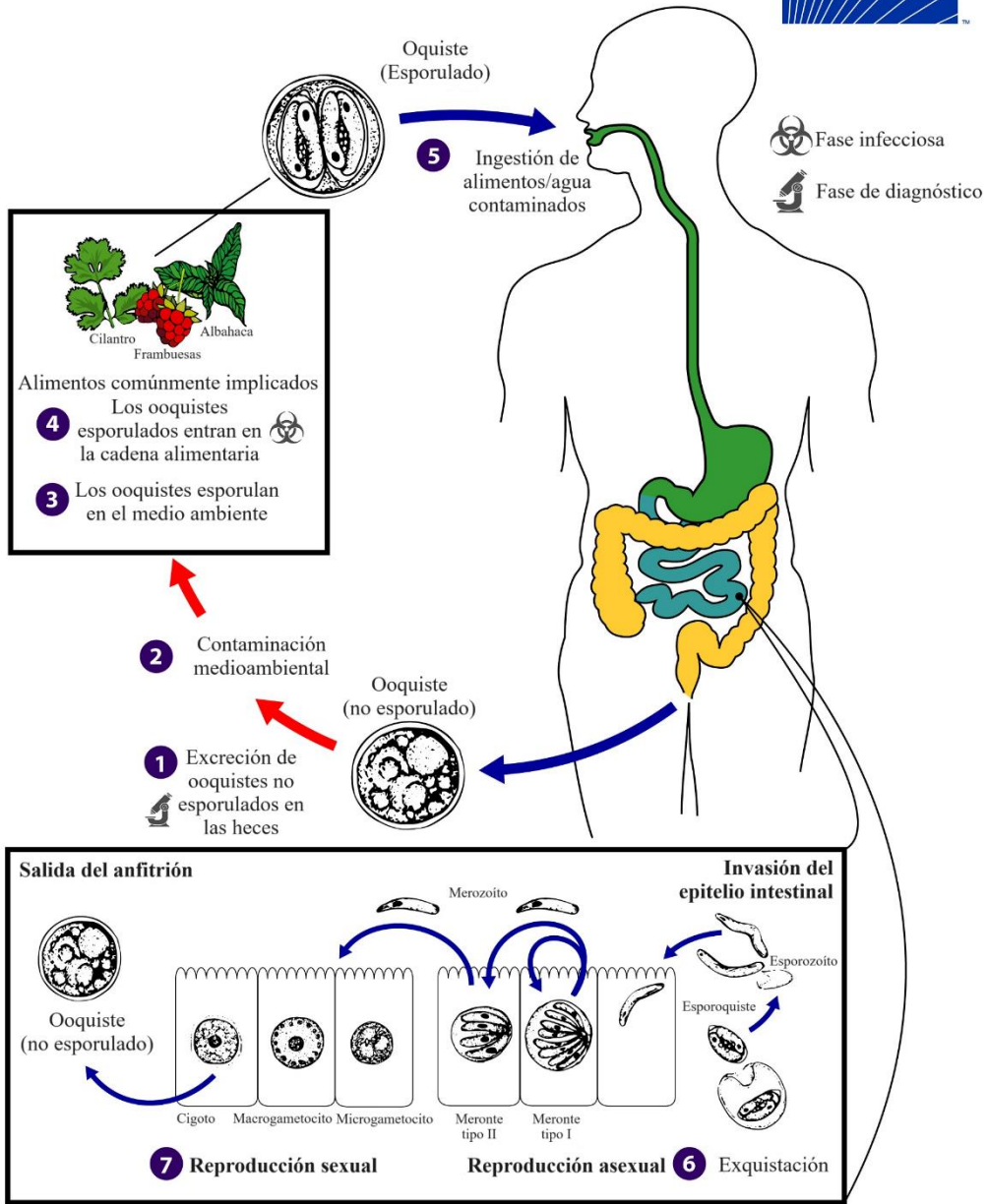


Figura 4. Ciclo de vida de *Cyclospora cayetanensis*. Fuente: (CDC, 2019)

VI.4.4 Posibles vehículos de transmisión de *C. cayetanensis*

VI.4.4.1 Muestras clínicas

Al igual que con otras enfermedades ocasionadas por parásitos, el diagnóstico de la ciclosporiasis se realiza mediante la examinación de muestras fecales. Aunque lo común es realizarlo mediante la observación al microscopio, en el caso de *C. cayetanensis* puede ocurrir que no se lleguen a identificar ooquistes debido a una baja excreción de estos (lo que podrías incluir infecciones tanto sintomáticas como asintomáticas), por lo que la microscopía podría ser solo viable en aquellos casos en que la excreción de ooquistes sea alta. No obstante, las muestras que han sido fijadas para su observación al microscopio permiten preservar la morfología del parásito, para ello, la mayoría de las técnicas suelen emplear formalina al 10%, mertiolato-yodo-formaldehído (MIF), acetato de sodio-ácido acético formalina (SAF), fijador tisular Streck (STF), fijador sin formalina, y el alcohol polivinílico (PVA). Además, el acetato de etilo concentrado puede usarse para la detección de ooquistes y, si se requiere la esporulación, las muestras deben almacenarse usando dicromato de potasio al 2.5% (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017a).

Las muestras fecales o muestras clínicas que busquen la detección de *C. cayetanensis* deben procesarse de acuerdo con cualquiera de las metodologías señaladas en el capítulo anterior. Sin embargo, los ooquistes recuperados de muestras fecales no son sólo de importancia clínica, ya que, si se quiere validar una técnica de detección o establecer alguna técnica de secuenciación y tipificación molecular, es necesario que se haga a partir de ooquistes purificados provenientes de muestras fecales, mediante: gradientes discontinuos de percol, soluciones de desprendimiento, sedimentación con gradientes de renocal-sacarosa y citometría de flujo (Almeria *et al.*, 2019; Ynés R. Ortega y Robertson, 2017a).

VI.4.4.2 Agua

Existen múltiples estudios que identifican ooquistes de *Cyclospora* en agua, lo que hace que se considere el agua como un vehículo de transmisión del parásito gracias a la contaminación con materia fecal (Almeria *et al.*, 2019; Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b; Ynés R. Ortega y Sanchez, 2010). Sin embargo, este es un factor de riesgo que debe dimensionarse de forma adecuada para entender la importancia de una detección oportuna de las personas enfermas de ciclosporiasis, así como la identificación de los ooquistes en el ambiente.

En este sentido, es importante resaltar que ooquistes de *C. cayetanensis* han sido detectados en diversos tipos de agua, lo que sugiere que este parásito tiene el potencial de propagarse a través del agua potable y de uso recreativo, tal y como se muestra en la Tabla 2. De hecho, gracias a estos reportes es que ahora se sabe que en los países en los que *C. cayetanensis* es endémica, y en aquellos que tienen sistemas de tratamiento de agua insuficientes, los ooquistes transportados por el agua son una fuente probable de infección, dado que los ooquistes pueden pasar a través de barreras físicas y no se ven afectados por tratamientos de cloración u otros desinfectantes (Almeria *et al.*, 2019), esto resulta alarmante dado que el agua es un componente importante en los alimentos, no sólo en las matrices alimentarias, sino también por su uso durante la producción y preparación (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b).

Tabla 2. Fuentes de agua contaminada con *Cyclospora* spp. y/o *C. cayetanensis* en diferentes países

País	Tipo de agua
Camboya	Batata acuática
Egipto	Tanques de almacenamiento en Alejandría, pipa de agua tratada, canales de riego, aguas subterráneas poco profundas, y aguas de drenaje, tanques de agua potable tratada, Río Nilo, obras hidráulicas, bombas de agua, depósito de agua, estanque y canales
España	Plantas de tratamiento de agua potable, plantas de tratamiento de aguas residuales, ríos
Estados Unidos	Plantas de tratamiento de aguas residuales (afluente/entrada y efluente/salida*)
Ghana	Agua en bolsitas
Guatemala	Ríos, fuentes de agua potable*
Italia	Agua de grifo*, agua residual tratada*, agua de pozo*
Malasia	Plantas de tratamiento de agua potable y agua de uso recreativo (lago artificial)
Nepal	Agua clorada, contaminación por aguas residuales, agua de riego, agua de estanque, agua del grifo, y agua de pozos de tubería
Perú	Aguas residuales
Túnez	Aguas residuales*
Turquía	Arroyos y agua potable
Vietnam	Lagos y ríos*, muestras de agua de supermercados y granjas

*Estudios en los que se utilizó PCR. Adaptado de (Almeria *et al.*, 2019)

Con la información recabada hasta 2010, *Cyclospora* podía aislarse a partir de aguas de riego y potable si se someten a filtración empleando filtros de cartucho de polipropileno Hannifin o cápsulas Envirocheck. Las partículas que queden retenidas en estos filtros se deben resuspender con un buffer de elución (1% dodecil sulfato sódico, 1% tween 80, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄·12H₂O, KCl, y antiespumante), para posteriormente centrifugarse y resguardar los pellets en dicromato de potasio al 2.5%. Estos pellets son los que deberán someterse a análisis para determinar la presencia de ooquistes de *C. cayetanensis* que, en el

caso específico de las muestras de agua, la autofluorescencia de los ooquistes, su observación con microscopía de contraste de fases, y la técnica de PCR-RFLP han demostrado ser exitosas para la determinación de la presencia del parásito (Ynés R. Ortega y Sanchez, 2010), aunque en la actualidad los estudios apuntan a que la microscopía es un método pobre dado al bajo número de ooquistes que podría desencadenar en la necesidad de examinar una mayor cantidad de pellets (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b).

Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que los ooquistes *C. cayetanensis* pueden concentrarse siguiendo el método 1622 y 1623.1 de la US EPA, los cuales tratan de la concentración ooquistes de *Cryptosporidium*, omitiendo el uso de camas inmunomagnéticas para la separación, debido a que estas son específicas para *Cryptosporidium* y *Giardia*; de igual forma, pueden emplearse métodos de floculación y filtración como los mencionados anteriormente. Además, dependiendo de la naturaleza de la muestra, el aislado subsecuente puede hacerse empleando el método de sedimentación de Ritchie o la flotación con sacarosa, con el inconveniente de que estos métodos ofrecen una baja recuperación de ooquistes, por lo que es preferible que para la detección se empleen métodos moleculares (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017a).

VI.4.4.3 Productos frescos y bebidas

De acuerdo con la información publicada hasta el momento, el vehículo más común para adquirir infecciones por *C. cayetanensis* son los productos agrícolas frescos (frutas y hortalizas), dado que se pueden contaminar desde el campo, ya sea durante el cultivo, por entrar en contacto con agua contaminada durante el riego o porque se atomizó agua contaminada cercana a los cultivos, por la manipulación durante la cosecha; o inclusive, se pueden contaminar fuera del campo en otros procesos, como el lavado, el empaquetado, y en general en cualquier actividad que implique la manipulación del producto. Por otro lado, parece ser que sí los productos se pasteurizan o pasan por procesos de calentamiento, su consumo no implica un riesgo de infección de ciclosporiasis (Almeria *et al.*, 2019; Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b).

Hasta la fecha, las bayas son las que se ven implicadas en brotes de ciclosporiasis, aunque se desconoce con exactitud el motivo, hay algunas características que denotan cierta sinergia entre la matriz que representan las bayas y los ooquistes de *Cyclospora*. En primer lugar,

podemos destacar que los ooquistes parecen tener mayor adherencia a la superficie de las bayas que en otros productos, por lo que el lavado del producto puede no remover todos los ooquistes presentes en las bayas. Además, la superficie de las bayas parece brindar un microambiente adecuado para la esporulación, sobre todo en aquellas que tienen vellosidades, ya que estas proveen una alta humedad y protección para la esporulación de los ooquistes. Por otro lado, aunque el cilantro se ha visto implicado recientemente en brotes de ciclosporiasis, parece ser que este no cuenta con características particulares que sugieran que los ooquistes de *C. cayetanensis* tengan mayor supervivencia o adherencia en él, por lo que en este caso se cree que las contaminaciones son ocasionadas por la manipulación (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b).

En cuanto al tratamiento de los ooquistes en laboratorio, hay que señalar que tanto los ooquistes no esporulados, como los esporulados, tampoco pueden multiplicarse en las matrices alimentarias, por lo que para los análisis dependeremos solo de la cantidad de ooquistes que se encuentren presentes, es por esto por lo que, al igual que con las muestras clínicas, se deben concentrar los ooquistes. Esta concentración se suele realizar por barreras mecánicas, es decir, mediante filtración, lo que resulta en una acumulación de ooquistes y otras partículas de tamaños similares. Por desgracia, estas partículas interfieren con la detección e identificación de los ooquistes, requiriendo entonces de una etapa de clarificación, en donde se separan los ooquistes de las partículas contaminantes. Así, de forma general, la metodología para las matrices alimentarias puede subdividirse en: 1) muestreo, 2) desorción y concentración de los ooquistes de la matriz alimentaria, y 3) identificación, aunque se tendrán algunas variaciones de acuerdo con la matriz alimentaria, como podemos ver en la Figura 5 (Smith, 2007).

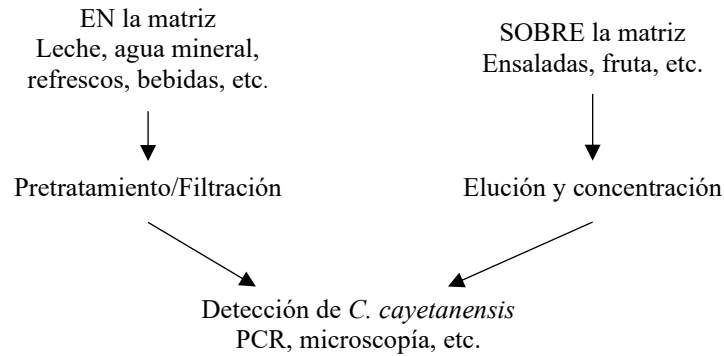


Figura 5. Métodos de detección de ooquistes de *C. cayetanensis* a partir de alimentos contaminados. Adaptado de (Smith, 2007)

Adicional a esto, en el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA (conocido como BAM por sus siglas en inglés, *Bacteriological Analytical Manual*), se publicaron metodologías que fueron validadas para la detección de *C. cayetanensis* en productos frescos, estas se encuentran en el capítulo 19A Detección de *Cyclospora* y *Cryptosporidium* en productos frescos: aislamiento e identificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y análisis microscópico; y 19B Detección de *Cyclospora cayetanensis* en productos frescos usando PCR en tiempo real, siendo una adaptación de esta última la que se usará para este proyecto de investigación, y por lo tanto se detallará en la sección de metodología.

VI.4.4.4 Mariscos

Se ha identificado a los mariscos como concentradores naturales de patógenos, por lo que se cree que es posible que también puedan acumular ooquistes de *C. cayetanensis*. Hasta el momento, sólo se ha identificado que las almejas de agua dulce (*Corbicula fluminea*) son capaces de concentrar los ooquistes de *Cyclospora*, y podría usarse como un indicador biológico de la recuperación de ooquistes de *C. cayetanensis* en fuentes de agua contaminada, ya que entre el 48% y el 100% de las almejas que lograron retener ooquistes lo hicieron por hasta 13 días. Por otra parte, se han identificado ooquistes del parásito en bivalvos gandofli (*Caelatura Iaronia pruneri*) en Egipto, y se ha detectado ADN del parásito en mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) en Turquía. Finalmente, en aguas costeras de Túnez se utilizaron moluscos bivalvos como centinelas biológicos. Esto nos indica que el arrastre de agua dulce terrestre podría llevar ooquistes hacia los ecosistemas marinos (Almeria *et al.*, 2019; Ynés R. Ortega y Robertson, 2017a; Ynés R. Ortega y Sanchez, 2010).

VI.4.4.5 Suelo

El suelo se ha vuelto una potencial fuente importante en la transmisión de *C. cayetanensis*, esto, por desgracia, puede deberse a que se ve contaminado por una inadecuada disposición de materia fecal, convirtiendo el suelo en una fuente de infección por ciclosporiasis. De hecho, en la actualidad el suelo se suele describir como un factor de riesgo para las infecciones ocasionadas por *C. cayetanensis*. Sin embargo, las condiciones socioeconómicas y la actividad humana pueden desempeñar un papel importante en el nivel de riesgo, por ejemplo, en las localidades donde se tiene pobreza extrema y las condiciones no permiten tener piso firme y retrete, se incrementa el riesgo de encontrar ooquistes del parásito. De igual forma, *C. cayetanensis* es más propenso a encontrarse en localidades donde se realizan trabajos agrícolas y hay un nulo o deficiente lavado de manos (Almeria *et al.*, 2019).

VI.4.5 Estacionalidad

Las infecciones por *C. cayetanensis* tienen una clara estacionalidad a nivel mundial, aunque esta varía por región, principalmente derivado de la actividad humana, de la contaminación ambiental, y de la presencia de las condiciones óptimas de esporulación de cada área. Aunque, por desgracia, hasta la fecha se desconoce la razón del por qué existen temporalidades con una ausencia de infecciones sintomáticas en las personas, cuando el parásito está presente en el medio ambiente, y cuáles son las condiciones biológicas necesarias para la supervivencia de *C. cayetanensis* durante estos periodos (Almeria *et al.*, 2019).

La tendencia que suele describirse en la literatura comprende periodos cálidos que coinciden con los periodos de máxima precipitación, esto al comparar lo observado en Guatemala, Honduras, México, Jordania, Nepal, y China. Aunque también se ha reportado que la ciclosporiasis es más frecuente en los meses más secos y calientes del año donde hay ausencia de lluvias en Perú y Turquía; por otro lado, en Haití se reporta en el temporal más fresco y seco donde las variaciones de temperatura parecen ser el disparador de la estacionalidad, mientras que en Indonesia se presenta durante la estación húmeda más fría. Finalmente, en la India los casos clínicos se reportan en el verano antes del temporal de lluvia. Esto hace que la estacionalidad no sea uniforme, algo que es difícil de explicar, aunque esta variación podría sugerir que los factores ambientales son de relevancia en el ciclo de vida, así como que puede

estar influenciado por varios de ellos, tal como la precipitación, la temperatura, la humedad, y el fotoperíodo (Almeria *et al.*, 2019; Chacín Bonilla y Vielma, 2018)

VI.4.6 Manifestaciones clínicas

C. cayetanensis es el único parásito del género *Cyclospora* que provoca una enfermedad gastrointestinal en humanos que recibe el nombre de ciclosporiasis o ciclosporiasis, la cual se caracteriza principalmente por ocasionar diarrea líquida o acuosa, náuseas, dolor abdominal, mialgias y anorexia, aunque también se ha reportado que puede causar fiebre leve, flatulencias, fatiga y pérdida de peso (FAO y OMS, 2014; Guo *et al.*, 2018; SINAVE y SUIVE, 2015). La transmisión de la enfermedad se presume como únicamente por vía fecal-oral, es decir, que las personas se infectan con este parásito por la ingesta de agua y productos contaminados; principalmente se asocia con el consumo de frutas, vegetales y hierbas frescos, sobre todo se ha relacionado con aquellos importados de países en desarrollo. Por otro lado, se tienen reportes de que incluso puede contraerse esta infección al nadar en aguas contaminadas y no sólo con la ingesta. De hecho, se estima que la dosis infecciosa puede ser muy baja (SINAVE y SUIVE, 2015; Totton *et al.*, 2021).

En promedio, el periodo de incubación de *C. cayetanensis* es de aproximadamente una semana, y aunque todos pueden presentar una infección por este parásito, los grupos más vulnerables son los niños pequeños, las personas de edad avanzada, los gestantes y las personas con sistema inmune debilitado, como lo son aquellas que padecen VIH/SIDA, cáncer, diabetes, padecimientos renales, e inclusive pacientes que recientemente han tenido trasplantes de órganos o quienes reciben tratamientos con quimioterapia. Aunque es posible que las personas que viven en zonas donde el parásito es endémico sean asintomáticos, en caso de manifestarse síntomas la enfermedad suele durar entre 7 y 15, o de 10 a 24 días en las personas inmunocompetentes, sin embargo, se ha reportado casos en donde el padecimiento puede durar hasta 3 meses, causando diarreas prolongadas y severas. No obstante, los pacientes enfermos con ciclosporiasis no reciben tratamiento alguno o no es el indicado para tratarla, por lo que puede recaerse en periodos de remisión y recurrencia de los síntomas (FAO y WHO, 2014; Marie y Petri, 2021; Rahi *et al.*, 2021).

VI.4.7 Alimentos asociados con *C. cayetanensis*

En la actualidad se tiene registro de *C. cayetanensis* en diferentes alimentos, ya sea porque se ha encontrado su prevalencia en los productos (Tabla 3) o por que han estado relacionados con brotes (Tabla 4).

Tabla 3. Informes positivos y estudios de vigilancia sobre la detección de ooquistes de *Cyclospora spp.* y/o *C. cayetanensis* en productos frescos en todo el mundo

Alimento analizado	País (fecha de reporte)
Frutas: Arándanos, jugo de fresa fresco, plátano, mango, pepino.	Corea (2017), Egipto (2010), Etiopía (2017), Italia (2015)
Verduras: Ensalada primavera, tomates Cherry, puerro o poro, cebollas verdes, aguacate, zanahoria, tomate, pimienta verde, ensalada envasada lista para consumir, rábanos.	Canadá (2016), Corea (2017), Egipto (2012), Etiopía (2017), Ghana (2014), Italia (2015), Nepal (2005).
Hortalizas de hoja verde: envasadas, espinaca de agua, rúcula/rúcula baby, espinaca baby, lechuga, perejil, puerro o poro, col, apio, hojas de mostaza, albahaca, coliflor, hierbabuena, huacatay, cilantro, cilantro sativum, menta vietnamita, mejorana, persicaria.	Camboya (2007), Canadá (2013, 2016), Costa rica (2004), Egipto (1999, 2012), Etiopía (2017), Ghana (2014), Italia (2015, 2017), Nepal (1999, 2005, 2010), Perú (1997), Venezuela (2006), Vietnam (2008)

Fuente: Adaptado de Dixon *et al.*, (2013), Almeria *et al.*, (2019), y Totton *et al.*, (2021).

Como observamos, se han asociado distintos alimentos en su mayoría productos frescos, de ahí que las frutas y verduras frescas deban lavarse de forma meticulosa, aunque por desgracia, esta práctica no elimina el riesgo de contraer ciclosporiasis, ya que el parásito es resistente a la cloración con hipoclorito de sodio, con dióxido de cloro gaseoso, a la yodación, y otros métodos de desinfección comerciales. Sin embargo, son muy sensibles a la desecación y no pueden ser inducidos a la esporulación si se congelan a -18°C por 24 h o si se calientan a 60 °C durante 1 h (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011; SINAVE y SUIVE, 2015; Totton *et al.*, 2021).

Tabla 4. Resumen de los brotes asociados a *C. cayetanensis* por país y año de aparición y posibles fuentes de exposición

País	Fuente de exposición (año)
Alemania	Ensalada, hierbas de hoja verde (2000)
Australia	Lechuga sospechosa (2010)
Brasil	Fuente indeterminada (1999-2002)
Canadá	Frambuesas (1996-1998), bayas de postre/moras sospechosas (1999), albahaca tailandesa (2001), cilantro (2003, 2004.), mango o albahaca sospechosos (2004), albahaca fresca (2005, 2007, 2010), albahaca o ajo sospechosos (2006), hortalizas de hojas verdes (2013), fuente indeterminada (1999, 2015, 2016)
Colombia	Ensalada, jugos (2002)
España	Jugo de frambuesa sospechoso (2003)
Estados Unidos	Agua de grifo o alimentos (1990), frambuesas sospechosas (1995-1997, 2000-2002), mezcla de frutas sospechosas (1995, 1997, 1998), moras (1996), mezcla de

	hojas verdes (1997), albahaca (1997, 1999, 2005, 2018-2019), bayas (1999), frambuesas y/o zarzamoras sospechosas (2000, 2008, 2009), fuente indeterminada (2001-2002, 2004-2006, 2009, 2011-2012, 2014, 2017), arvejas blancas (2004, 2008), mezcla para ensaladas empacada (2013), cilantro (2013-2015, 2018), ensalada de frutos rojos sospechosa (2013, 2017), lechuga (2014), zanahoria o col verde (2016), cebollín (2017), mezcla de brócoli, coliflor, zanahorias y dip de eneldo (2018), mezcla de lechuga romana y zanahoria (2018)
México	Berros en ensalada (2001)
Nepal	Agua de consumo sospechosa (1989, 1992)
Países bajos	Fuente indeterminada (2001)
Perú	Salsas sospechosas (2004), fuente indeterminada (2005)
Polonia	Agua de consumo sospechosa (2013)
Reino Unido	Fuente indeterminada (2015)
Suecia	Arvejas rojas (2009)
Turquía	Agua de consumo sospechosa (2005), fuente indeterminada (2007)

Adaptado de: Almeria *et al.*, (2019).

VI.4.8 Tratamiento

Es importante identificar la ciclosporiasis para eliminar los síntomas asociados con la enfermedad y prevenir futuras apariciones de los síntomas. El tratamiento para la enfermedad consta del suministro vía oral de una mezcla de los antibióticos trimetoprima y sulfametoxazol (combinación que suele conocerse como cotrimoxazol) en dosis variables dependiendo de la edad del afectado a lo largo de una semana. Para adultos la dosis es de 160 mg de trimetoprima y 800 mg de sulfametoxazol dos veces al día, mientras que en niños la ingesta es de 5 mg por kg de peso de trimetoprima y 25 mg por kg de peso de sulfametoxazol, ambas dos veces al día, aunque este esquema funciona sólo en el 90% de los casos, pudiendo llegar a necesitarse dosis más altas y un tratamiento más prolongado en personas con VIH (SINAVE y SUIVE, 2015). Además, también se ha probado el uso de ciprofloxacino, sin embargo, no es tan efectivo como la combinación antes mencionada, pero puede ser empleada en personas con alergia al sulfametoxazol (Ortega y Robertson, 2017).

Dado que ciprofloxacino no es tan eficaz en el tratamiento de la ciclosporiasis, se ha probado el uso de nitaxozanida en pacientes alérgicos al sulfametoxazol que no responden al tratamiento con ciprofloxacino después de siete días de tratamiento (Almeria *et al.*, 2019).

VI.4.9 *C. cayetanensis* en México

En México se han realizado muy pocos estudios relacionados con este parásito, a pesar de que se han tenido registros de la presencia de *C. cayetanensis* en productos exportados a otros

países, y en viajeros que visitan el país. En la Figura 6 podemos apreciar una línea del tiempo que resume los estudios relacionados con el parásito en México.

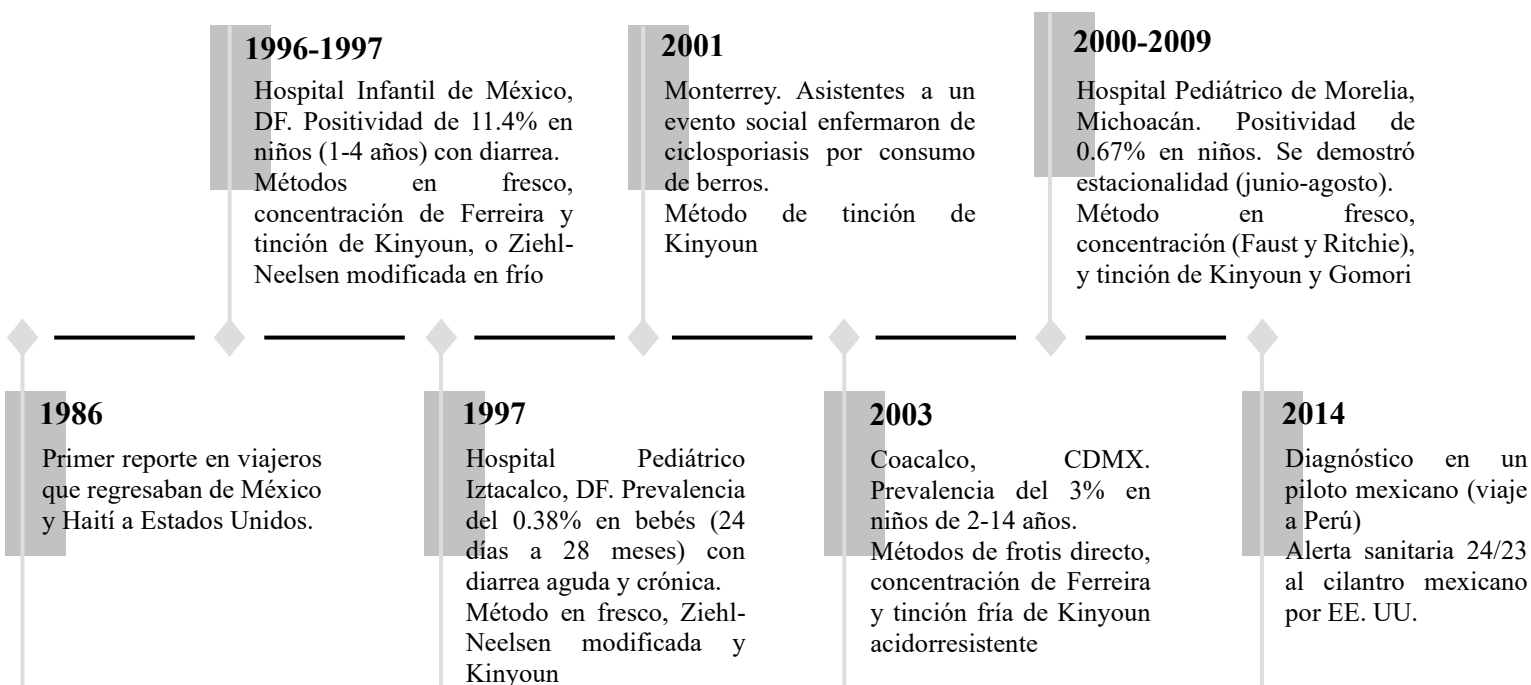


Figura 6. Línea de tiempo de las publicaciones de *C. cayentanensis* en México

El primer reporte registrado se remonta a 1986 en donde cuatro viajeros estadounidenses que regresaban de México y Haití presentaron el cuadro clínico típico de ciclosporiasis (SINAVE y SUIVE, 2015; Ynés R. Ortega y Sanchez, 2010).

Posteriormente, entre enero de 1996 y diciembre de 1997 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, en el entonces Distrito Federal, se analizaron 541 muestras de pacientes de 1 a 4 años que presentaban diarrea, variando entre heces blandas, muy blandas y líquidas, las cuales fueron procesadas con las técnicas de coproparasitoscópico (CPS) directo (requiere 20 mg de heces, una solución salina isotónica y solución de Lugol para ser observada en microscopio óptico), CPS de concentración por flotación Ferreira, y la tinción de Kinyoun, encontrado que había una positividad de 11.4% en la muestras, además, las muestras positivas se confirmaron mediante la inducción de la esporulación con un tratamiento con dicromato de potasio al 3.5% manteniendo las muestras a 37°C por un periodo de 10 a 12 días, desencadenando la fase esporogónica del parásito, así como la formación de dos

esporoquistes en cada ooquiste. Por otro lado, también se buscó la autofluorescencia de los ooquistes al ser observados en el microscopio de luz ultravioleta empleando una longitud de onda de 365 nm. Además, haciendo uso de anticuerpos policlonales en técnicas de captura de antígeno en heces conservadas a 4°C se diferenciaron los resultados positivos entre *C. parvum* y *C. cayetanensis* gracias al ensayo inmunoenzimático (ELISA) con peroxidasa/tetra-metilbencida (TNB) (Bernal Redondo *et al.*, 1998).

En otro estudio publicado en 1997, en el Hospital Pediátrico Iztacalco, se analizaron las muestras coprológicas de pacientes pediátricos que tenían una edad de entre 28 días y 24 meses, de los cuales 522 presentaban diarrea aguda y 197 diarrea crónica, encontrando que había una presencia muy baja de *C. cayetanensis* (0.38%), en comparación de la reportada en fechas cercanas en Perú (10.9%) y Katmandú (11.0%). Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el examen coproparasitoscópico en fresco, y de concentración por sedimentación, tras lo cual se realizaron frotis que fueron teñidos empleando las técnicas de Ziehl-Neelsen modificado, Kinyoun, Giemsa y tropocromática, lo que permitió observar la morfología típica de los ooquistes de *C. cayetanensis* (Vázquez Tsuji *et al.*, 1997).

Por otra parte, en 2001 se registró el primer brote de ciclosporiasis en México, el cual estuvo relacionado con dos eventos sociales en Monterrey los cuales se ofrecieron en un centro social de la ciudad. El primero de ellos un bautizo que se realizó a mediodía, y el segundo una boda por la noche, llegando a tener entre ambos una asistencia estimada de 300 personas, las cuales consumieron una ensalada de berros. Posteriormente, varios de los asistentes presentaron diarrea, lo que permitió trazar el origen a dichos eventos, así como una oportuna detección de la enfermedad (lo cual contribuyó a disminuir el tiempo de la enfermedad), hecho que sirvió para identificar que las personas infectadas y que accedieron al estudio tuvieron en promedio un periodo de incubación de 8.2 días, con un cuadro diarreico que se dio en dos etapas: la primera y la más severa con un aproximado de 10.3 evacuaciones al día por un periodo de 3.8 días; posterior a esto, se observó la segunda etapa en la cual la diarrea era de menor intensidad, pero que causaba astenia, adinamia y pérdida de peso no cuantificada. La metodología empleada para la detección del parásito fue hacer una tinción de Kinyoun en búsqueda de *Cryptosporidium*, tras lo cual se observó la morfología típica de

C. cayetanensis, su capacidad de auto fluorescencia en 55 de las 70 muestras que se tomaron. No se realizaron estudios moleculares (Ayala-Gaytán *et al.*, 2004).

Uno de los estudios más importantes de *C. cayetanensis* en México, es el realizado el Hospital Pediátrico de Morelia el cual comprende un periodo de tiempo entre 2000 y 2009, lo que permitió analizar 8,877 muestras fecales de niños para exámenes parasitarios. Durante dicho estudio se empleó el método de observación al microscopio en fresco, así como una concentración siguiendo el método estándar de Faust y Ritchie. Además, las muestras concentradas se tiñeron siguiendo las técnicas de Kinyoun y de Tricromo de Gomori, para posteriormente resguardar las muestras positivas al parásito en una solución de 2.5% de dicromato de potasio a $20 \pm ^\circ\text{C}$ antes de analizarse empleando la técnica molecular de PCR. Siguiendo esta metodología se logró detectar el parásito en 0.67% de los pacientes, además, por los resultados se logró establecer que la ciclosporiasis es más frecuente en niños de edad escolar (6 a 11 años) y preescolar (3 a 5 años), así mismo, se encontró que, en este estudio en particular, el 75% de los casos positivos tenían la infección en ausencia de otros parásitos, 13% estaban infectados además con parásitos comensales, y el 10% con parásitos patógenos. Finalmente, se demostró que las infecciones por ciclosporiasis se presentaban en una marcada estacionalidad que coincidía con el temporal de lluvia, que comprende los meses de junio a agosto, meses en los cuales se registraban temperaturas diarias mínimas de $12 ^\circ\text{C}$ y máximas de $27\text{-}29 ^\circ\text{C}$ (Martínez-Loya *et al.*, 2014).

En 2003 se publicó un estudio que buscaba evaluar la eficacia y tolerancia de nitazoxanida como antiparasitario de amplio espectro en niños con infecciones parasitarias mixtas de protozoos y helmintos. La población seleccionada fueron 272 niños en un rango de edad de los 2 a los 14 años, provenientes de Coacalco de Berriozabal en la Ciudad de México. Las muestras fecales se colectaron de marzo de 1997 a enero de 1998, y se procesaron mediante el frotis en fresco, concentración por Ferreira (1:10), y la tinción de Kinyoun, tras lo cual el 3% de los niños resultaron positivos a *C. cayetanensis*, además se les realizó un examen físico en donde se demostró que presentaban los siguientes síntomas variables: dolor abdominal, acumulación de gases, flatulencias, anorexia, irritabilidad, diarrea, náuseas, comezón anal, pérdida del apetito, y debilidad, destacando que los síntomas eran menos frecuentes en niños menores de 6 años, y más comunes en el grupo de edad de 6 a 12 años. Posteriormente, los

pacientes se sometieron a tratamiento con nitazoxanida, se colectaron muestras fecales y se sometieron a evaluación con las técnicas mencionadas, encontrando que en el caso particular de *C. cayetanensis* es resistente a este antiparasitario, aunque funciona adecuadamente para eliminar otros parásitos (Díaz *et al.*, 2003).

Finalmente, en 2014 se presentó un caso de estudio relacionado con un piloto de 26 años originario de la Ciudad de México, el cual presentó un cuadro clínico de episodios de diarrea sin moco, sin pus y sin sangre, con dolor abdominal, pero con antecedentes de dolor abdominal de tipo cólico periumbilical, inflamación, acumulación de gases, debilidad muscular extrema, cansancio, dolor de cabeza moderado, mareos, náuseas sin vómito, y unas recurrentes ganas de defecar y orinar con dificultad para hacerlo acompañada de dolores, todo esto por un periodo de 14 días después de un viaje de 5 días en la ciudad de Lima, Perú. Posteriormente, los síntomas empeoraron notoriamente, llegando incluso a presentar trazas de sangre en las heces, por lo que tras seis meses de estos síntomas persistentes y tras diagnósticos negativos a diversos análisis en el sector privado (incluido VIH/SIDA), el paciente asistió al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), donde se realizó un análisis de muestras fecales usando el método de sedimentación y flotación de Faust, una coproparasitoscópica serial, y una tinción de Ziehl-Neelsen, lo que permitió diagnosticar exitosamente al paciente con ciclosporiasis, brindándole un tratamiento adecuado que logró aliviar los síntomas incluso desde el segundo día de tratamiento (Sánchez-Vega *et al.*, 2014).

Además, también en 2014, se estableció la alerta sanitaria 24/23 de la cual ya hemos hablado anteriormente, la cual se derivó de los brotes de ciclosporiasis asociados con cilantro exportado de Puebla, México (Almeria *et al.*, 2019; CNN Español, 2015; Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b).

VI.5 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *C. CAYETANENSIS*

Como se mencionó con anterioridad, la rápida identificación del agente que causa la ETA es importante para la disminución de la morbilidad y mortalidad, y el impacto económico que conlleva, sobre todo en casos en donde se originan brotes. En este sentido, la metodología descrita para la identificación de *C. cayetanensis* debe abordarse con detenimiento para poder establecer un diagnóstico certero y un futuro tratamiento, sobre todo al considerar que no se

tienen métodos disponibles para la propagación in vitro de este parásito (Qvarnstrom *et al.*, 2015), así que las técnicas empleadas deben ser lo suficientemente sensibles para detectarlo.

Además, el control de los microorganismos causantes de ETA, por parte tanto de las autoridades sanitarias como de las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección (González Flores y Rojas Herrera, 2005).

De acuerdo con el CDC, (2016a), la infección por *C. cayetanensis* se diagnóstica examinando muestras fecales, aunque resulta complicado debido a que es posible que no se liberen los suficientes ooquistes para que sean fácilmente detectables en las pruebas de laboratorio, las cuales incluyen métodos por microscopía, tinción, y técnicas moleculares.

VI.5.1 Método por microscopía óptica

Generalmente la microscopía es la técnica más empleada para la detección de ooquistes de *C. cayetanensis*, pudiendo identificarse mediante microscopía de contraste de fases o microscopía de campo claro, para dicho análisis las muestras deben almacenarse entre 23-30°C por 7-15 días, de forma que el parásito será visible en su forma de ooquiste esporulado que tiene en su interior dos esporoquistes (Figura 7. A). Además, debido a que los ooquistes son auto fluorescentes, se pueden visualizar azules o verdes empleando un microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta (UV) sobre un trasfondo negro a 330-365 nm o 450-490 nm (Figura 7. B) (CDC, 2016a; Ynés R. Ortega y Sanchez, 2010).

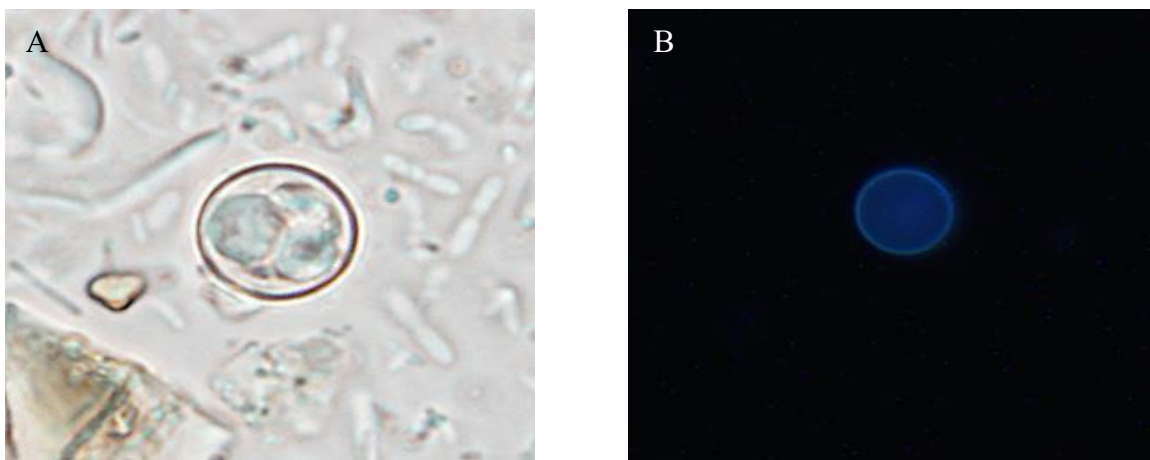


Figura 7. (A) Ooquistes de *C. cayetanensis* teñidos con tinción acidorresistente modificada. Obsérvese la variabilidad de la tinción en los cuatro ooquistes. (B) Dos ooquistes de *C. cayetanensis* teñidos con la tinción ácido resistente modificada. Ambos ooquistes. Fuente (CDC, 2019).

VI.5.2 Métodos de microscopía asistida con tinción

VI.5.2.1 Tinción de Ziehl-Neelsen modificada o Kinyoun

También conocida como técnica acidorresistente modificada, esta tinción es útil para la visualización de quistes protozoarios intestinales que tienen precisamente la propiedad de ser ácido-alcohol resistentes, de ahí que se le conozca como técnica acidorresistente. Para llevarla a cabo se realiza una extensión de la muestra fecal en un portaobjetos, se fija con calor o metanol y se cubre con fucsina fenicada por un periodo de 5 minutos. Transcurrido el tiempo se debe lavar con agua, decolorar con alcohol-ácido por 20-30 s, lavar con agua nuevamente, cubrir con azul de metileno por 30 s, y realizar un último lavado con agua. Los quistes acidorresistentes no se decoloran, por lo tanto, permanecerán de un color rojo a fucsia sobre un fondo azul (Figura 8. A), la visualización se realiza en microscopio (Enlace Hispano Americano de Salud *et al.*, 2012).

Sin embargo, los ooquistes de *C. cayetanensis* son acidorresistentes variables, por lo que es posible que no sean teñidos (Figura 8. B), o que tomen coloraciones que van del rosa claro hasta el rojo/fucsia característico, por lo que se dificulta el diagnóstico de la presencia de ooquistes (CDC, 2016a).

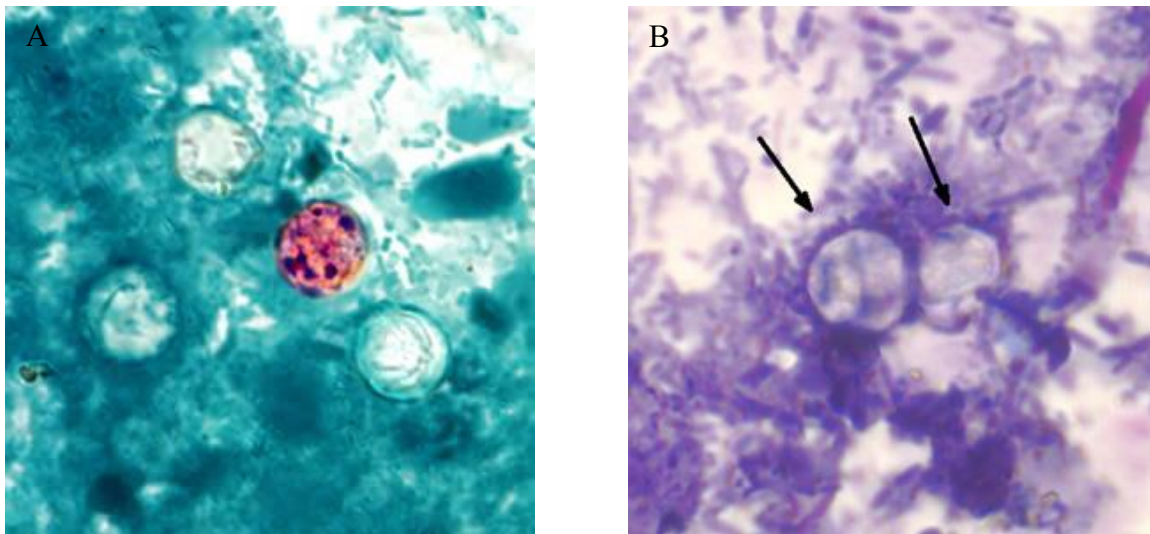


Figura 8. (A) Ooquistes de *C. cayetanensis* teñidos con tinción acidorresistente modificada. Obsérvese la variabilidad de la tinción en los cuatro ooquistes. (B) Dos ooquistes de *C. cayetanensis* teñidos con la tinción ácido resistente modificada. Ambos ooquistes. Fuente (CDC, 2019).

VI.5.2.2 Tinción de safranina modificada (“en caliente”)

Esta técnica fue descrita en un inicio para la observación de ooquistes de *Cryptosporidium* por Baxby *et al.*, (1984), el método consiste en tomar la muestra de materia fecal y colocarla en un portaobjetos con un grosor más grande del empleado en los exámenes de rutina, tras lo cual se debe fijar a la flama y posteriormente con ácido clorhídrico 3% en metanol al 100% por un periodo de 3 a 5 minutos; se lava con agua y se tiñe con safranina acuosa al 1%, este paso es importante y es el motivo por el cual se conoce como un método “en caliente”, ya que se requiere que la muestra entre en ebullición y, de ser necesario, añadir más colorante hasta que aparezca vapor (se probó safranina ácida, alcalina alcohólica y carbol, pero no se tuvo éxito sin emplear calor), sí no se observa la liberación de vapor es muy posible que no se retenga la coloración. Una vez realizado el paso anterior se debe lavar con agua, secar y observar al microscopio.

Esta técnica fue usada posteriormente para la observación de ooquistes de *Cyclospora* por Visvesvara *et al.*, (1997), sin embargo, mencionan que calentar la muestra con safranina directo en la flama puede no teñir de manera uniforme los ooquistes, por lo que sustituyeron este paso empleando intervalos de calentamiento en un horno de microondas, obteniendo los mejores resultados al calentar los frotis por 30 a 60 s con la safranina acuosa al 1% y con pH de 6,5 con más del 98% de los ooquistes teñidos.

Los ooquistes de *C. cayetanensis* siguiendo esta técnica se tiñen de forma uniforme de un color naranja rojizo brillante, como se aprecia en la Figura 9 (CDC, 2016a).

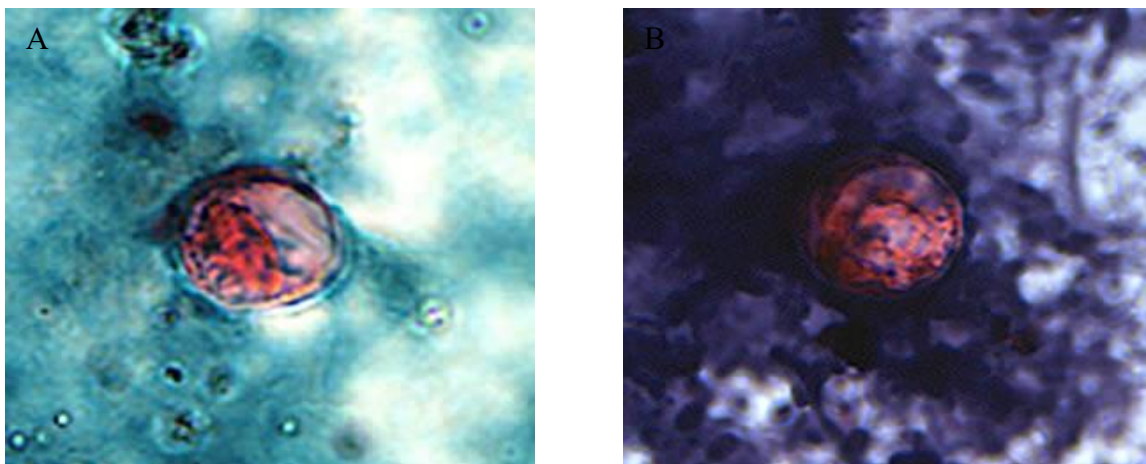


Figura 9. (A) Ooquiste de *C. cayetanensis* teñido con safranina. (B) Ooquiste de *C. cayetanensis* teñido con safranina. Fuente: (CDC, 2019)

VI.5.3 Métodos moleculares

Las técnicas moleculares fueron uno de los principales avances en los ensayos de detección de patógenos presentes en los alimentos (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014), debido a que los métodos convencionales de cultivo son laboriosos y requieren de mucho tiempo para obtenerse un resultado. Por este motivo y con la finalidad de buscar más eficiencia, sensibilidad y rapidez en los resultados comienza a optarse por técnicas de detección molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual puede completarse en un periodo de 2-3 horas (Hernández Porras *et al.*, 2017; Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014). Por otro lado, hay quienes utilizan las técnicas moleculares solo como un paso confirmatorio de los resultados obtenidos por microscopía (SINAVE y SUIVE, 2015).

Sin embargo, es importante señalar que este método permite la identificación del ADN del parásito, por lo que podría dar resultados más confiables dada la baja liberación de ooquistes que se puede dar en los pacientes con ciclosporiasis (CDC, 2016).

VI.5.3.1 Polimerasa Chain Reaction (PCR)

La PCR entra dentro de los métodos moleculares de identificación de *C. cayetanensis*, esta técnica tiene diferentes aplicaciones o métodos de acuerdo con el objetivo de la investigación, por lo cual es importante conocer qué tipo de información necesitamos para elegir o diseñar la estrategia que más convenga para el objetivo de la investigación.

VI.5.3.1.1 Tipos de PCR

VI.5.3.1.1.1 PCR de punto final

La reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica fundamental en biología molecular (Domingues, 2017), y la más empleada dado a su alta sensibilidad y especificidad en la detección de los organismos. Además, la obtención de los resultados es muy rápido y de fácil uso (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

La técnica de PCR, descrita de forma sencilla, consiste en una amplificación selectiva de una secuencia de ADN específica o “blanco”, utilizando una secuencia de ADN sintético de 15 a

30 polinucleótidos conocidos como iniciadores, cebadores o, inclusive, bajo el término en inglés *primers* (González Flores y Rojas Herrera, 2005).

La PCR se basa en la capacidad de la ADN-polimerasa purificada para sintetizar *in vitro* ADN de doble cadena a partir de un molde de ADN de cadena sencilla y un oligonucleótido, es decir, se sintetizan copias de una secuencia específica de ADN de interés, emulando la actividad enzimática que en las células se produce de forma natural. Esto se logra mediante el uso de los cebadores en las hebras del ADN tanto delantera como reversa, lo que permite amplificar segmentos selectivos a partir de mezclas de ácidos nucleicos extremadamente complejas (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021; Schmitz *et al.*, 2022).

Este proceso actualmente se lleva a cabo en equipos denominados termocicladores, que se caracterizan por usar ciclos de temperatura que a su vez generan ciclos repetitivos de síntesis de ácidos nucleicos con el único objetivo de obtener grandes cantidades del ácido nucleico sintetizado en proporción a la cantidad original del ADN molde. Estas cadenas se amplifican mediante los ciclos repetitivos de dos o tres pasos de temperaturas que incluyen 1) desnaturalización por calor de la doble cadena de ADN en dos cadenas sencillas, lo cual se logra empleando calor durante algunos segundos (p.e. 94-95°C/15-30 s), ocasionando que los enlaces de hidrógeno entre las bases del ADN se rompan y como consecuencia se tienen las dos cadenas de ADN sencillas, 2) alineamiento o anillamiento de los cebadores en las cadenas simples de ADN molde, en esta etapa la temperatura se disminuye (p.e. 50-65°C/10-30 s) para permitir que los cebadores se adhieran a las cadenas de ADN monocatenario mediante enlaces de hidrógeno y 3) extensión o elongación de los cebadores por la ADN polimerasa, donde se aumenta la temperatura (p.e. 72°C/1 min) y la Taq polimerasa construye la hebra complementaria, se adhiere al primer y luego agrega bases de ADN a la hebra individual, esto en dirección 5' a 3'. Estos ciclos se repiten desde 20 hasta 40 veces, de ahí que el nombre del equipo sea “termociclador”. Los nuevos fragmentos de ADN que se generan sirven a su vez como plantillas a las que la polimerasa puede unirse y comenzar a generar más ADN (Domingues, 2017; Jiménez Moraleda *et al.*, 2021; Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

Sin embargo, para que la PCR funcione se requiere seguir una metodología bien establecida, que puede ser resumida en 3 etapas: 1) procesamiento de la muestra y extracción, 2)

amplificación del segmento de interés, y 3) detección o caracterización del producto amplificado. Cada una de las etapas puede realizarse por distintos procesos a su vez, por ejemplo, para la extracción puede emplearse centrifugación, filtración o perlas magnéticas; para la amplificación puede buscarse la replicación de ADN por los diferentes tipos de PCR (en tiempo real, digital, cuantitativa); y finalmente, para la detección puede utilizarse fluorescencia, cromogénesis o quimioluminiscencia, detección electroquímica, detección por propiedades ópticas, electroforesis (o visualización directa), secuenciación, CRISPR, espectrofotometría de masas, o una amplificación por detección (Schmitz *et al.*, 2022).

VI.5.3.1.1.2 PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

Su principio se basa en la PCR de punto final, con la diferencia de que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, siendo así que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Además, es cuantitativa porque mediante la detección por fluorescencia se puede medir la cantidad de ADN o ARN sintetizado, ya que la emisión de fluorescencia producida es proporcional a la cantidad del material genético amplificado, de forma que esta variante garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia en menor tiempo que la PCR de punto final (Cubillos *et al.*, 2008; Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

Además, se diferencia de la PCR de punto final en que las reacciones de la qPCR se caracterizan por indicar el ciclo en el que se detecta por primera vez la amplificación de un gen diana, en lugar de reportar la cantidad de copias acumuladas tras un número fijo de ciclos. Por lo que al final, cuanto mayor sea el número de copias iniciales del gen objetivo, antes se observará el aumento significativo de la fluorescencia, mientras que en PCR de punto final se mide la cantidad de copias acumuladas hasta finalizar los ciclos de reacción (Thermo Fisher Scientific - MX, s. f.-a), es por esto por lo que se optó por utilizar esta técnica molecular para la realización de este proyecto, por lo que más adelante se detallará más sobre ella.

VI.5.3.1.1.3 PCR digital

Al igual que en la PCR en tiempo real, se añaden colorantes fluorescentes, pero la cuantificación se consigue sin necesidad de valores de PCR CT ni curvas estándar, sino que la reacción de amplificación se divide en miles de particiones independientes usando placas

de micropocillos, capilares, emulsiones oleosas o matrices, por lo que lo ideal es que cada mezcla de reacción individual contenga una única molécula diana, o ninguna. Se amplifica hasta el punto final y se contabiliza el número de particiones positivas y negativas, calculando así el número de copias de interés en la muestra. Se puede emplear la Ley de Poisson para calcular con precisión el número de dianas de ADN por partición y el número de copias en la muestra original (Kuypers y Jerome, 2017).

VI.5.3.1.1.4 PCR de células viables

En este caso se realiza un paso previo a la amplificación de los ácidos nucleicos, en el cual la muestra se somete a una neutralización del material genético “libre” en la suspensión, es decir, el procedente de células dañadas o muertas, por lo que los resultados de la PCR van a evidenciar solo la presencia de células vivas presentes en la muestra, de ahí que se le conozca a la técnica bajo el nombre de PCR de células viables (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

VI.5.3.1.1.5 PCR inversa

Usada para clonar regiones desconocidas de un ADN que están situadas junto a secuencias diana conocidas, por lo que se amplifica la región externa que flanquean los cebadores. Se requiere cortar el ADN a ambos lados de la región diana mediante una enzima de restricción, de forma que los extremos cohesivos resultantes puedan hibridar entre sí, formando una molécula circular, la cual es cerrada por una ligasa y, posteriormente, se realiza la PCR con cebadores que hibridan los extremos 5' de la secuencia conocida, ocasionando que la elongación se extienda alrededor del círculo generando copias de ADN delimitado (Cubillos *et al.*, 2008).

VI.5.3.1.1.6 PCR anidada

Aumenta la especificidad al realizar una segunda ronda de amplificación con dos pares de cebadores (cebadores internos) diferentes a los usados en la primera ronda (cebadores externos), que hibridan dentro del fragmento diana amplificado en la primera ronda de amplificación, es decir, el producto de la primera ronda de PCR se utiliza como molde para la segunda PCR, lo que permite la obtención de productos más cortos y específicos (Cubillos *et al.*, 2008; Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

VI.5.3.1.1.7 PCR con adaptadores

Esta variación permite amplificar una región de ADN de secuencia desconocida, ligando oligonucleótidos sintéticos con extremos cohesivos compatibles con los generados en la muestra. En este caso, los cebadores son específicos para las secuencias 3' de los adaptadores, entonces con esto se permite la amplificación del conjunto de adaptadores y secuencia diana (Cubillos *et al.*, 2008).

VI.5.3.1.1.8 PCR in situ

En esta se marca una hebra monocatenaria de material genético denominada sonda, la cual se busca que se empareje o alinee con su secuencia complementaria en los ácidos nucleicos presentes en una muestra. La sonda se marca con una sustancia trazadora química o radiactiva, de forma que la unión puede ser visualizada (Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

VI.5.3.1.1.9 PCR asimétrica

Es la variante de PCR más simple, en la cual se busca generar copias monocatenarias de ADN mediante la adición de diferentes concentraciones de ambos cebadores, por lo que tras los primeros ciclos de PCR uno de ellos terminará agotándose y dejando disponibles suficientes copias del ADN diana, mientras tanto, el cebador más abundante seguirá amplificándose (Cubillos *et al.*, 2008).

VI.5.3.1.1.10 PCR múltiple

Se tiene como objetivo amplificar de forma simultánea y en el mismo tubo distintas secuencias específicas, pero amplificando diferentes secuencias diana del material genético, por lo que deben emplearse varias parejas de cebadores, lo cual implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada segmento amplificado y no inhibir la de las demás (Cubillos *et al.*, 2008; Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

VI.5.3.1.1.11 PCR larga

El objetivo de esta variante es superar los límites de la PCR convencional para amplificar con fidelidad regiones diana de gran tamaño, es decir, regiones de entre 5 y 40kb, las suficientes para que esta técnica pueda emplearse para amplificar genomas virales, intrones, ADN mitocondrial y grupos de genes (Cubillos *et al.*, 2008).

VI.5.3.1.1.12 RT-PCR

También conocida como PCR con transcripción inversa. Es una técnica con dos procesos, en donde a partir de ARN diana se genera ADN complementario (ADNc) empleando transcripción inversa, para posteriormente realizarse una PCR, por lo que con esta técnica pueden amplificarse genes que estaban expresados en el momento del estudio o almacenaje de ADNc (Cubillos *et al.*, 2008; Jiménez Moraleda *et al.*, 2021).

VI.5.3.1.2 Material necesario para la técnica de PCR

Como mencionan Jiménez Moraleda *et al.*, en su artículo “Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica”, (2021), para poder llevar a cabo una PCR se requiere contar con lo siguiente:

- **Una plantilla de ADN:** la cual consta del ADN que se busca copiar y que, generalmente se extrae y purifica de la sangre, tejidos, o en el caso de investigación de patógenos, de muestras alimentarias o de heces fecales.
- **Cebadores, iniciadores (*primers*) u oligonucleótidos monocatenarios:** la longitud suele variar, pero todos se unen a la plantilla de ADN por los extremos y a partir de ahí la polimerasa inicia la reacción para sintetizar el material genético. Se requieren dos cebadores que deben ser complementarios a la cadena de ADN que buscamos amplificar, delimitando la zona de amplificación; como consecuencia de esta complementariedad, van en sentido opuesto de forma que existen los *primers* directo e inverso.
- **ADN polimerasa:** empleada para la síntesis del ADN, generalmente se emplea la polimerasa Taq proveniente de bacterias, esta puede resistir temperaturas superiores a los 90°C, por lo que no se desnaturaliza con el calor generado en la etapa de desnaturalización de la cadena doble de ADN.
- **dNTP o trifosfatos de desoxirribonucleótidos:** son los 4 nucleótidos básicos del ADN, compuestos por 4 bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina).
- **Solución buffer o tampón:** es un regulador de pH que imita las condiciones de acidez o alcalinidad en las que se produce la síntesis del material genético.
- **Solución de sal de cloruro de magnesio:** lo que nos interesa es la disociación de esta sal, ya que los iones de Mg^{+2} se usan como cofactores de la polimerasa.

- **Termociclador:** como ya se había mencionado, es el equipo el cual está programado para alterar la temperatura de la reacción en ciclos específicos para permitir la desnaturalización y síntesis del ADN.

VI.5.3.1.3 Ventajas y limitaciones de la PCR

Como mencionan Palomino-Camargo y González-Muñoz, (2014), La identificación de los patógenos de transmisión alimentaria mediante métodos moleculares se ha vuelto cada vez más popular en aspectos de calidad y seguridad, y en la producción de alimentos debido a que estas técnicas suelen ofrecer muchas ventajas, sin embargo, estas no están exentas de presentar ciertas desventajas o limitaciones, tal y como podemos apreciar en la Tabla 5.

Tabla 5. Ventajas y limitaciones de la PCR

Ventajas	Limitaciones
<p>Presentan rapidez, tienen un buen límite de detección, especificidad y sensibilidad, son de fácil automatización y tienen capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras.</p> <p>Además, no requiere condiciones anaeróbicas en comparación con los métodos de cultivo clásico; y puede emplearse para identificar microorganismos que no pueden ser estudiados por técnicas convencionales o que no pueden cultivarse en sustratos artificiales.</p>	<p>Las técnicas no están ampliamente incorporadas en los métodos estandarizados para detección de patógenos, por lo que resultan inadecuados en algunos casos, además, sí se contempla la calidad variable de equipos y reactivos, la metodología tiene dificultades para pasar de expertos a usuarios finales de los laboratorios.</p> <p>Requieren equipos y reactivos costosos (en comparación a los empleados en los métodos de cultivo); son técnicas relativamente complicadas que requieren de experticia, y utilizan productos químicos peligrosos, por lo que el análisis rutinario de muchas muestras puede resultar poco práctico. De igual forma, las muestras pueden contener sustancias que podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre la reacción, por lo que se puede tener falsos negativos o una contabilización errónea de la carga presente en la muestra.</p>

Fuente: (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014)

VI.6 PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

Los inicios de esta técnica se remontan a 1992 cuando Higuchi y colaboradores, grabaron en tiempo real la adición de bromuro de etidio a la reacción de PCR de punto final bajo luz UV durante cada ciclo. Desde ese momento, el objetivo de la qPCR ha sido detectar y cuantificar las secuencias diana de material genético empleando fluorescentes en la reacción. Así, al referirnos a este PCR como “en tiempo real” hacemos alusión a que la detección de los productos amplificados se realiza en cada ciclo de la reacción, mientras que al emplear el término “cuantitativa” (que es la otra forma en que se conoce a esta PCR) nos

referimos a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR de punto final, en la que no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia diana. Sin embargo, existe diferencia en la nomenclatura de la técnica dependiendo del ADN del que partimos para realizarla, así si empleamos ADN genómico entonces nos referimos a la técnica como qPCR (o *quantitative* PCR), pero si en su lugar empleamos ADNc, entonces será una RT-qPCR (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

VI.6.1 Material necesario para la qPCR

De forma general, se requieren los mismos materiales utilizados en la PCR de punto final, es decir que se requieren una plantilla de ADN, cebadores, la enzima ADN polimerasa, dNTP's, Mg⁺, el buffer y un termociclador, no obstante, en este caso también se requiere de sondas que detecten las señales de fluorescencia que se producen en cada ciclo de la reacción (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Thermo Fisher Scientific, s. f.).

VI.6.2 Sistemas de detección de la fluorescencia en la qPCR

De acuerdo con Tamay de Dios *et al.* (2013) y Costa (2004), las sondas que detectan la fluorescencia que se produce en cada ciclo de la reacción, se pueden clasificar en:

1. Métodos específicos: estos parten de principios distintos, pero todos convergen en que la fluorescencia emitida se detecta por un concepto llamado “transferencia de energía en resonancia fluorescente” (o FRET, por sus siglas en inglés), y básicamente se basa en transferir la energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o “*quencher*”, en la Tabla 6 se aprecian las principales moléculas fluorescentes empleadas en la qPCR.

Los métodos específicos se dividen a su vez en:

- a. Pruebas basadas en hidrólisis o TaqMan: Constan de oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' (que emite fluorescencia al ser excitado) y un aceptor en el extremo 3' (que absorbe la fluorescencia liberada por el donador), los cuales se encuentran estrechamente unidos mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Además, el espectro de emisión de la molécula donadora se ha de solapar con el espectro de absorción de la aceptor. Mientras la sonda permanezca intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor, pero al

amplificar el ADN diana la sonda se hibrida con su cadena complementaria, por lo que ocurren cambios en su conformación, lo que permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa la unión entre el reportero y el *quencher*, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo.

- b. Métodos por hibridación: consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que se encuentra en una estrecha proximidad con un aceptor fluorescente que está unido a otra sonda. En este caso, tanto el reportero como el aceptor cuentan con un espectro de excitación y de emisión similar, de forma que cuando las dos sondas se hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, lo que genera un incremento en fluorescencia.
 - c. Molecular beacons: Son sondas parecidas a las de hidrólisis, en las que una molécula donadora está unida en el extremo 5' y una receptora en el extremo 3', sólo que éstas además contienen una estructura secundaria en forma de asa, en la que se encuentra la secuencia de unión específica con el ADN diana. En este caso, los extremos se encuentran plegados mientras la sonda no está hibridada, por lo que donador y aceptor están muy cerca el uno del otro. Con este tipo de sondas, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo, pero al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose así el donador y aceptor, y como consecuencia la fluorescencia puede ser detectada.
 - d. Sondas FRET: en este tipo de sistema se emplean dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN objetivo. Una de las sondas tiene unido un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en 5'. Cuando las sondas están hibridadas, ambos fluorocromos se encuentran próximos. Cuando ocurre la excitación, el donador transfiere su energía al aceptor, por lo que este último termina emitiendo fluorescencia que es detectada por el lector del equipo.
2. Métodos no específicos o de agentes intercalantes: estos se basan en el uso de moléculas intercalantes, es decir, de fluorocromos que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al oxidarse generan una señal fluorescente que es capturada en la

etapa de extensión de cada ciclo y que, como se mencionó antes, es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena que se obtienen en cada ciclo de la reacción. Este tipo de sondas tienen la ventaja de ser más económicas y, además, su optimización en cuanto a las condiciones de la reacción es muy fácil, pero por desgracia, tienen una especificidad baja, ya que se unen de forma indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores.

Tabla 6. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR en tiempo real

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascada blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	4911	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green 1	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
TET	522	550
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojos de Tejas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

Fuente: (Costa, 2004)

Cualquiera que haya sido el método de detección de los productos amplificados, este tipo de PCR necesita un termociclador especial, que dista del empleado en la PCR de punto final en que este requiere de la tecnología para excitar al donador, capturar la señal de emisión de fluorescencia, y realizar el análisis cuantitativo. Dentro de la variedad de equipos que se ofrecen, la principal diferencia es la fuente de energía que utilizan para la excitación, pero de forma general suelen emplear como fuentes lámparas de luz, diodos de emisión de luz

(mayormente conocidos como LED por sus siglas en inglés), y láseres. Además, estos equipos cuentan con un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente a la emisión de fluorescencia para que así llegue a un fotodetector que captura la información proveniente de la muestra para analizarla en el software del equipo, como consecuencia, el termociclador necesita a su vez de una computadora con un software que interpreta los datos, generando entonces gráficos en donde se muestran los datos de la reacción (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

VI.6.3 Entendiendo la qPCR

Una vez comprendida la técnica, hay algunos conceptos que debemos tener en consideración para poder comprender la forma en que se interpretan los resultados, para lo cual nos apoyaremos del Manual de PCR en tiempo real de Thermo Fisher Scientific (s. f.).

Línea base: se refiere al nivel de señal de fluorescencia durante los ciclos iniciales de la PCR, que puede ir de los ciclos 3 a 15, que son en los que se presentan pocos cambios en la señal. De esta forma, la señal debajo de este nivel de la línea base se puede atribuir como el fondo o “ruido” de la reacción. Esta se determina de forma empírica para cada reacción, ya sea por el usuario o de forma automática con el gráfico de amplificación, aunque en cualquiera de estos casos, la línea debe tener en cuenta los suficientes ciclos de amplificación sin incluir los ciclos en los que la señal comienza a elevarse por encima del fondo.

Umbral: este es el nivel de señal que refleja un aumento estadísticamente significativo con respecto a la señal de referencia calculada. Este umbral se establece para distinguir la señal de fondo de la señal de amplificación, y por lo general, el software de los instrumentos la fija automáticamente como 10 veces la desviación estándar del valor de fluorescencia de la línea base, aunque la posición de este umbral puede fijarse en cualquier punto de la fase exponencial de la PCR.

Ciclo umbral (Ct): es el ciclo en el cual la señal fluorescente de la reacción logra cruzar el umbral. Este se utiliza para calcular el número inicial de copias de ADN, ya que el valor de Ct está inversamente relacionado con la cantidad inicial de ADN diana.

Fases de una curva típica de qPCR

Dado que el resultado de la qPCR que se logra visualizar gracias al software es, en parte, una gráfica, resulta necesario comprender las fases que expresa, así como ubicar los conceptos que se mencionaron con anterioridad (Figura 10). Las fases de una curva típica son (Medicinal Genomics, 2024):

- **Fase exponencial:** Durante esta fase, el ADN diana se duplica con cada ciclo (suponiendo una eficacia de la reacción del 100%). La amplificación exponencial se produce porque todos los reactivos están frescos y disponibles, y la cinética de la reacción la empuja a favorecer la duplicación.
- **Lineal (alta variabilidad):** En este punto, los reactivos empiezan a escasear y el producto de la PCR no se duplica en cada ciclo.
- **Meseta (Punto final: detección de gel para los métodos tradicionales):** Cuando la línea se estabiliza, la reacción se ha detenido y no se generan más productos de PCR. Aquí es donde se mide el punto final de la PCR. Sin embargo, incluso las reacciones con la misma concentración inicial de ADN se estabilizarán en un punto diferente, debido a la diferente cinética de reacción de cada muestra.

PCR Reaction Phases

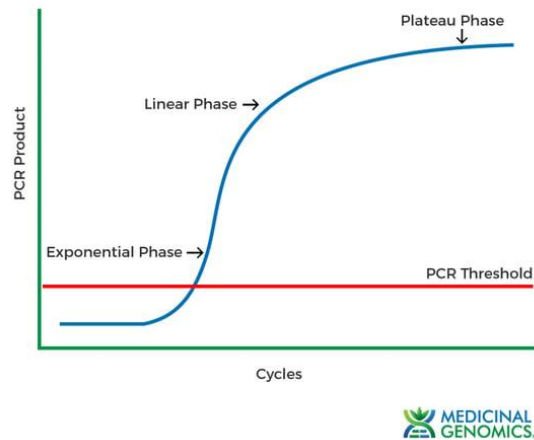


Figura 10. Curva típica de una qPCR

VII METODOLOGÍA

En la Figura 11 se muestra el Plan de investigación utilizado para el desarrollo de la metodología de esta tesis.

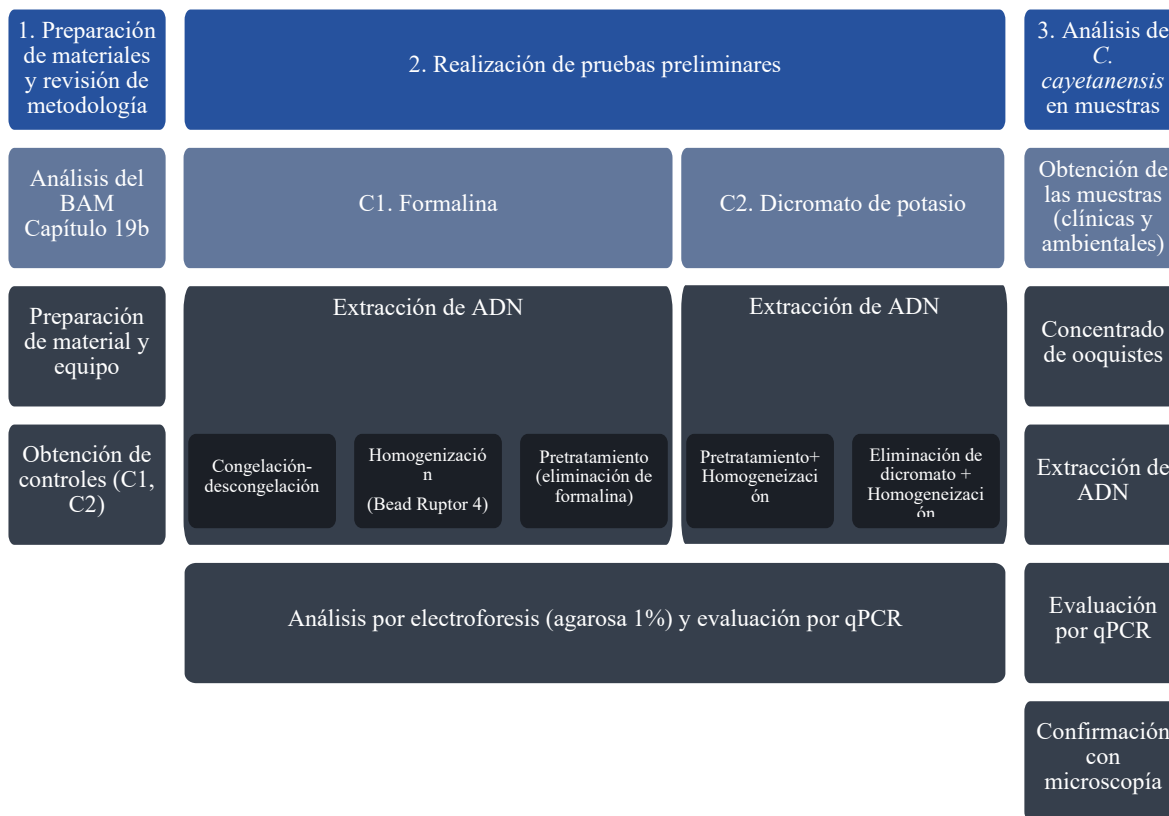


Figura 11. Esquema de la metodología general dividida en las etapas de la investigación

En la actualidad existen metodologías estandarizadas para la detección de *C. cayetanensis* mediante técnicas moleculares tanto para matrices alimentarias como para muestras fecales, es importante adecuar dichos procedimientos a las condiciones en cada sitio de trabajo. Lo anterior debido a que las metodologías validadas hacen uso de kits y equipos específicos, motivo por el cual dentro de dichas técnicas se recomienda sustituir los equipos por cualquiera que sea equiparable. En este sentido, se vuelve necesario “re estandarizar” las metodologías para validar que los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sean confiables, para ello las adaptaciones que se realicen a las técnicas deben ser reproducibles, es decir, deben ser capaces de repetirse y obtener los mismos resultados.

Es por esto por lo que la técnica que propone la FDA para la detección de *Cyclospora cayetanensis*, se modificó para adecuarla a las condiciones dentro de los laboratorios del

Centro de Detección Biomolecular de la BUAP. Las adaptaciones se realizaron a partir del “capítulo 19b Detección de *Cyclospora cayetanensis* en productos frescos usando PCR en tiempo real”, del Manual de Análisis Bacteriológico publicado en el sitio oficial de la FDA, para lo cual, se siguió el plan de trabajo que se marca en la Figura 11, en donde se incluye la metodología que se siguió a lo largo del proyecto.

VII.1 ETAPA 1. PREPARACIÓN DE MATERIALES Y REVISIÓN DE METODOLOGÍA

VII.1.1 Resumen del método BAM capítulo 19b para la detección de *C. cayetanensis*

Dado que los brotes reportados en Estados Unidos de América están asociados en su mayoría con productos frescos de hoja verde y bayas, el BAM capítulo 19b está enfocado sobre todo en la implementación de la técnica para estos grupos de alimentos, aunque destacan que puede aplicarse en otros productos frescos. Además, en este se brinda una recomendación para el aislamiento del parásito en muestras líquidas.

Los pasos generales para la detección incluyen 1) el lavado del producto (donde se concentran los ooquistes), 2) aislamiento de *Cyclospora* a partir de los lavados (en donde se lleva a cabo la extracción del ADN) y, 3) Análisis por qPCR (Figura 12). Sin embargo, dentro de esta metodología se incluyen materiales, reactivos y equipo que limitan la reproducción en laboratorio si no se tiene acceso a éstos ya sea por falta de recursos, por la dificultad derivado de la logística de exportación, o bien por una posible discontinuación de los reactivos, tal y como sucedió con el anterior kit validado, es decir el QuantiFast Multiplex PCR (Murphy *et al.*, 2022).

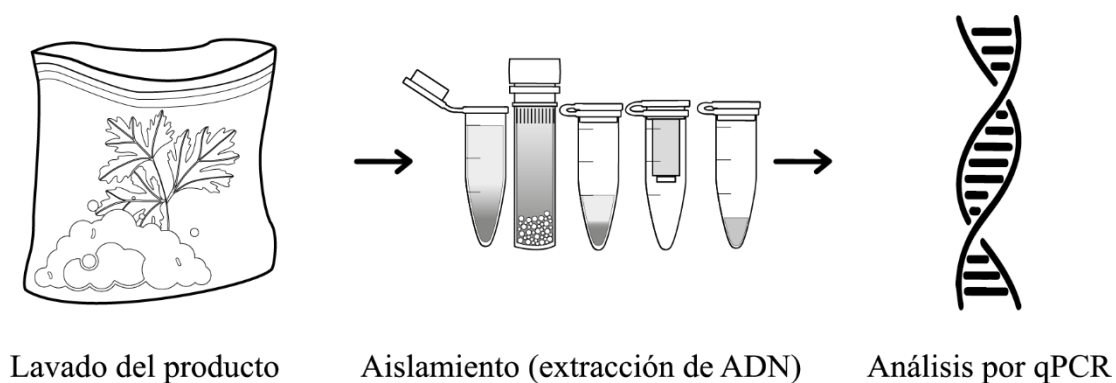


Figura 12. Etapas generales para la detección de *C. cayetanensis* indicadas en el BAM capítulo 19b

En este sentido, un paso fundamental para lograr implementar una técnica basada en el BAM capítulo 19b, fue comprender las limitaciones con las que cuenta el laboratorio donde se desee realizar la técnica, y fue justo en ellas en donde se realizaron las modificaciones a la técnica que se plantean en la etapa 2.

VII.1.2 Obtención del control positivo

Se obtuvieron dos controles positivos de diferentes distribuidores. El primero consistía en 5 viales de 2 mL cada uno que contenían una suspensión de ooquistes de *C. cayetanensis* en formalina. Estos ooquistes fueron adquiridos del grupo PACAL (Programa de Aseguramiento de la Calidad) S. de R.L. de C.V., aunque, dichos viales contenían una cantidad variable no conocida de ooquistes.

Por otro lado, el segundo control fue donado por la Dra. Guadalupe Erendira Orozco Mosqueda, gracias a una vinculación entre la BUAP y el Hospital de pediatría de Morelia. Los ooquistes procedían de una muestra fecal humana que previamente había sido confirmada como positiva, por microscopía, para *C. cayetanensis*. Dicho control fue conservado en una solución de dicromato de potasio al 2.5%, transportado y almacenado a 4°C hasta su uso.

VII.2 ETAPA 2. IMPLEMENTACIÓN (PRUEBAS PRELIMINARES)

Las siguientes secciones hacen referencia a las pruebas que se realizaron para obtener ADN que fuera óptimo para el subsecuente análisis por PCR en tiempo real, por lo tanto, a partir de los controles que contenían ooquistes de *C. cayetanensis*, se procedió a realizar la extracción de ADN directo (sin una etapa de lavado), siendo en la etapa de aislamiento o extracción de ADN donde se realizaron las mayores modificaciones a la técnica validada por la FDA.

VII.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN, a partir de los controles, se realizó con dos diferentes kits. El primero corresponde al recomendado en el BAM capítulo 19b, FastDNA™ Spin kit for Soil (MP Biomedicals®), el segundo es el DNeasy® PowerSoil® Pro (Qiagen®). Las etapas de extracción del ADN comprenden: preparación de las muestras, homogenización (lisis), unión de ADN, lavado, y elución de ADN. En este trabajo, para el proceso de extracción de ADN

se realizaron modificaciones en las primeras dos etapas con relación a la técnica propuesta por el BAM capítulo 19b, es decir, durante la preparación de la muestra y la homogenización o lisis, las cuales se indican en la Figura 13.

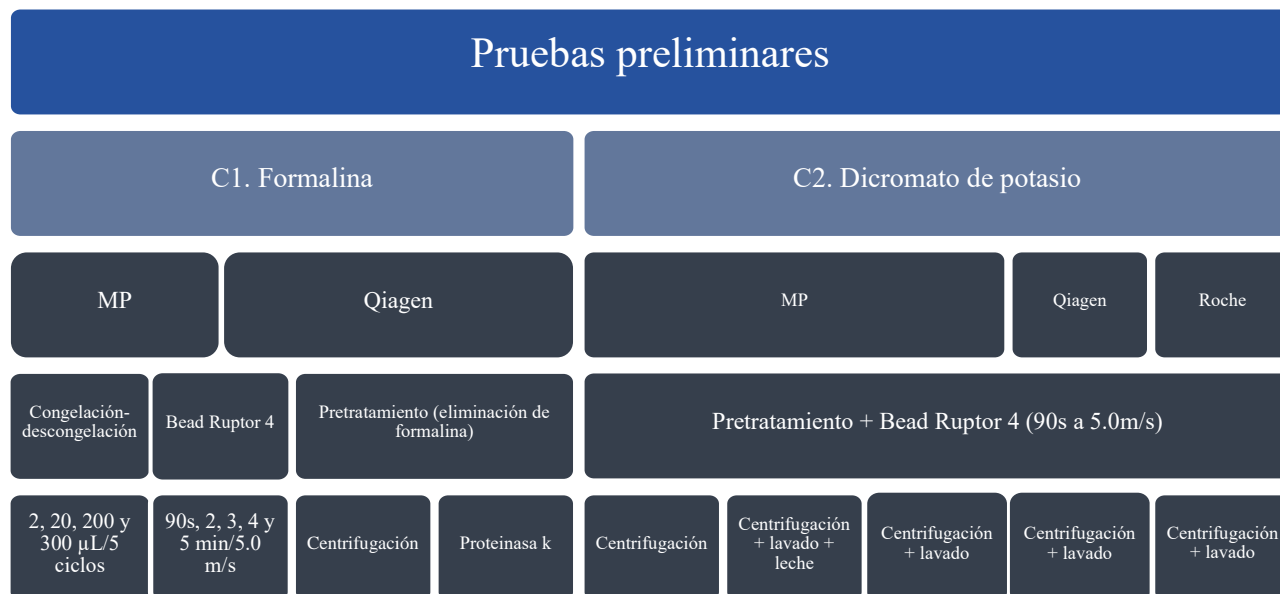


Figura 13. Resumen de las pruebas preliminares para la extracción de ADN de *C. cayetanensis* a partir de los controles positivos

VII.2.1.1 Extracción de ADN del control positivo conservado en formalina

VII.2.1.1.1 Preparación de la muestra

La información respecto de este control adquirido de PACAL no incluyó datos sobre la concentración de los ooquistes, la única información disponible fue que se encontraban conservados en formalina. Al respecto, diversos reportes indican que la formalina es un compuesto que se emplea con regularidad para la conservación de muestras biológicas, pero para análisis de detección basados en ADN provoca la disminución en la calidad de este, por lo que no es ideal como conservador para análisis moleculares (Lee *et al.*, 2019)

Basado en lo anterior, se procedió a eliminar la formalina, con algunas modificaciones a la técnica propuesta por Lee *et al.* El procedimiento consistió en concentrar 2 mL del vial por centrifugación a 13,300 r.p.m./5 min, el sobrenadante fue descartado y al pellet se le añadieron 400 µL de alcohol etílico absoluto y se centrifugó a 13,300 r.p.m./5 min. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de etanol 70%, centrifugándolo en las mismas condiciones, se desechó completamente el sobrenadante y el tubo con el pellet se dejó secar

mediante la evaporación a temperatura ambiente. Posteriormente, se inhibió la actividad de la DNasa añadiendo 400 μL de EDTA 5.0 M y se incubó a 55 $^{\circ}\text{C}$ / 1 h. El EDTA se eliminó centrifugando el tubo a 13,300 r.p.m./2 min, por consiguiente, se desechó el sobrenadante. Enseguida, se añadió 20 μL de proteinasa K [20 mg] para remover proteínas, se calentó el tubo a 55 $^{\circ}\text{C}$ /2 h, y transcurrido el tiempo se procesó con normalidad para la extracción del ADN de acuerdo con la técnica propuesta.

VII.2.1.1.2 Lisis con ciclos de congelación-descongelación

Se sometieron a extracción de ADN diferentes volúmenes del control de PACAL: 2, 20, 200 y 300 μL , los cuales fueron re suspendidos en 50 μL de PBS 1X. Como control negativo de extracción (CNE) se procesaron 50 μL de PBS 1X. Los tubos con alícuotas del control y el CNE fueron re suspendidos en un vortex (Genie 2), y posteriormente se sometieron a 5 ciclos de congelación-descongelación.

Los ciclos consistieron en incubar los tubos durante 1 min en hielo y, posteriormente a 95 $^{\circ}\text{C}$ /1 min en una placa de calentamiento. Finalmente, el proceso de extracción se continuó con los kits de MP y Qiagen.

VII.2.1.1.3 Lisis con homogeneizador

En este caso, se sustituyó el homogeneizador FastPrep[®]-24 (de ahora en adelante FastPrep) de la marca MP Biomedicals, recomendado dentro del BAM capítulo 19b, por el equipo Bead Ruptor 4 (de ahora en adelante Bead Ruptor) de la marca OMNI International[®]. El procedimiento recomendado para la lisis de *C. cayetanensis* con el equipo FastPrep se realiza a una velocidad de 6,5 m/s por un período de 60 s, mientras que la velocidad máxima que alcanza el Bead Ruptor es de 5,0 m/s, por lo que se requirió utilizar distintos tiempos para hacer equiparable el procesamiento de las muestras.

En este sentido, se probaron distintos tiempos de lisis, en todos los casos se emplearon 2 ciclos de homogeneización-enfriamiento. Los tiempos de homogeneización fueron 90 s, 2, 3, 4 y 5 min, a 5,0 m/s, mientras que para el enfriamiento se requirieron 3 min en hielo en todos los casos. Finalmente, el proceso de extracción se continuó con los kits de MP y Qiagen.

VII.2.1.2 Extracción del ADN del control positivo conservado en dicromato de potasio

VII.2.1.2.1 Preparación de la muestra

En este caso, 5 alícuotas de 200 μL del control positivo obtenido de la Dra. Orozco Mosqueda, fueron sujetas a diversos procesos, los cuales se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Tratamientos utilizados para la preparación de muestra para la extracción de ADN del control positivo con dicromato de potasio

Muestra	Eliminación de Dicromato de potasio	Adición de una matriz (leche)	Kit empleado
Control 1	Solo centrifugación	No	MP Biomedicals®
Control 2	Centrifugación + 2 lavados con PBS 1 X	Sí, 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	MP Biomedicals®
Control 3	Centrifugación + 2 lavados con PBS 1 X	No	MP Biomedicals®
Control 4	Centrifugación + 2 lavados con PBS 1 X	No	Qiagen®
Control 5	Centrifugación + 2 lavados con PBS 1 X	No	Roche®

De manera general las alícuotas del control fueron concentradas por centrifugación a 10,000 r.p.m./5 min, el sobrenadante fue eliminado y solo el control 1 fue procesado directamente para extracción de ADN. Las pastillas de los 4 controles restantes fueron re suspendidos en 1,000 μL de PBS 1X, tras lo cual se sometió de nueva cuenta a centrifugación en las mismas condiciones, y se decantó el sobrenadante (Figura 14).

Al pellet resultante del control 2 se le añadieron 75 μL de leche desnatada y se procedió al paso de extracción de ADN. Mientras que las pastillas de los controles 3, 4 y 5 fueron sometidos a extracción de ADN con los kits que se indican en la Tabla 7.

VII.2.1.2.2 Lisis con homogeneizador

Para esta etapa de homogeneización del control positivo conservado con dicromato de potasio sólo se realizó utilizando el equipo Bead Ruptor.



Figura 14. Comparación de dos alícuotas de control en dicromato de potasio: sometida a lavados con PBS 1X y centrifugación (izquierda), y solo centrifugada (derecha)

VII.2.1.3 Etapas de unión, lavado y elución de AND con el kit FastDNA™ Spin for Soil

Según el manual provisto, el kit se puede emplear para extraer de manera rápida y eficiente ADN genómico para usarse directamente en la PCR, digestión con enzimas de restricción, electroforesis y cualquier otra aplicación deseada, gracias al efecto mecánico combinado entre el instrumento FastPrep® provistos por la propia marca, y los tubos Lysing Matrix E que incluyen en el kit. Pudiendo procesar muestras de tejidos vegetales y animales, bacterias, algas, esporas de hongos u otros que puedan encontrarse en suelo, logrando su lisis gracias a la mezcla de microesferas de cerámica y sílice que contienen los tubos en los que se adicionan las muestras (tubos Lysing Matrix E).

Sin embargo, de acuerdo con la información provista en el BAM capítulo 19b, *Cyclospora* demostró ser un microorganismo resistente a la lisis debido a su membrana bicapa, por lo que se requiere modificar la técnica presentada dentro del kit, la cual ha sido adaptada a las condiciones dentro del CDB-BUAP tal y como se detalla a continuación.

Concentrados de ooquistes obtenidos en la etapa de preparación de muestras fueron re suspendidos con 978 μ L de PBS 1X y 122 μ L del buffer MT. Los tubos se sometieron a 2 ciclos de homogenización-enfriamiento, para lo cual se empleó el equipo Bead Ruptor 4 (OMNI International ®) configurado a 5.0 m/s por 90 s para romper el ooquiste (Figura 15), seguido de un reposo de 3 min en un baño de hielo para evitar el



Figura 15. Muestras siendo homogeneizadas en el equipo Bead Ruptor 4 de OMNI International®

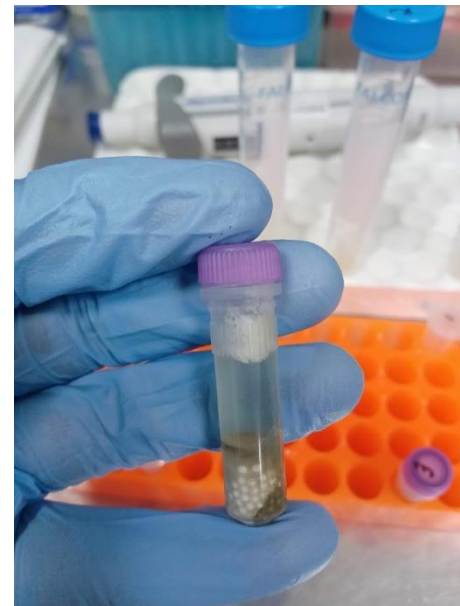


Figura 16. Tubos Lysing Matrix E con muestra ambiental, homogeneizados y centrifugados

sobrecalentamiento de la muestra. Una vez pasado el segundo ciclo, los tubos se sometieron a centrifugación 13,300 r.p.m./20 min (Figura 16).

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL, se le adicionaron 250 μ L de PPS y se mezcló por inversión 10 veces, posteriormente se centrifugó a 13,300 R.p.m./8 min y se separó el sobrenadante.

VII.2.1.3.1 Unión de ADN

El sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 mL, se añadió 1 mL de la solución Binding Matrix y se mezcló por inversión por 2 min, y en un mezclador de placa (Thermo scientific®) por 3 min, posteriormente fueron centrifugados a 5,000 r.p.m./1 min.

Se descartaron 1.4 mL del sobrenadante, y con el volumen restante (~700 μ L) se re suspendió el contenido del tubo, el cual se transfirió a tubos spin filter. Los cuales se centrifugaron a 13,300 r.p.m./2 min y se descartó el contenido del tubo de desecho. Sí el tubo de 15 mL todavía contenía solución de ADN se debía repetir este paso hasta acabar completamente con el contenido, ya que 700 μ L es la capacidad máxima de las columnas contenidas en los tubos spin filter.

VII.2.1.3.2 Lavado del ADN

El lavado del ADN se realizó añadiendo 500 μ L de la solución SEWS-M a los tubos spin filter, se re suspendió el contenido de los tubos y se centrifugaron a 13,300 r.p.m./2 min, los tubos de desecho fueron descartados, se intercambiaron por tubos nuevos y se centrifugaron en las mismas condiciones para eliminar el líquido remanente. Los tubos spin filter se dejaron abiertos para secar a temperatura ambiente por 5 min.

VII.2.1.3.3 Elución del ADN

Para eluir el ADN, las columnas de los tubos spin filter se insertaron en tubos de 1.5 mL y se añadieron 75 μ L de la solución DES Elution, se re suspendió el contenido de las columnas y se incubaron a 55 °C/5 min en una placa térmica. Posteriormente, se centrifugaron a 13,300 r.p.m./2 min, el ADN eluido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

VII.2.1.4 Etapas de unión, lavado y elución de ADN con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro

Por otro lado, el kit DNeasy® PowerSoil se recomienda para el aislamiento de ADN genómico microbiano de muestras ambientales de todo tipo de suelos, así como compostas, sedimentos y estiércol. Este kit combina una Tecnología de Eliminación de Inhibidores® (IRT, por sus siglas en inglés) de segunda generación, junto con la acción mecánica de microesferas combinando una lisis mecánica y química que producen como resultado ADN de alta calidad que puede utilizarse inmediatamente en aplicaciones posteriores como la PCR, qPCR y secuenciaciones de nueva generación.

En esta investigación, se realizó la técnica de extracción de ADN de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, añadiendo unas modificaciones de acuerdo con las posibilidades del CDB-BUAP (Figura 17). Cabe señalar que este kit sustituyó no sólo el empleado en el BAM capítulo 19b, sino que modificó completamente la etapa de extracción de ADN. Dicha metodología se detalla a continuación.

Los tubos PowerBead Pro fueron centrifugados a 8,000 r.p.m./1 min para concentrar las microesferas en el fondo del tubo. 200 µL de concentrados de ooquistes obtenidos en la etapa de preparación de muestras fueron adicionados a estos tubos y mezclados con 800 µL de la solución CD1, los tubos se vortexearon y se sometieron a homogenización en el equipo Bead Ruptor 4 (OMNI International ®) configurado a 5.0 m/s por 90 s para romper los ooquistes, seguido de un reposo de 3 min en un baño de hielo (Figura 18) para evitar el sobrecalentamiento de la



Figura 17. Muestra ambiental siendo procesada con DNeasy® PowerSoil® Pro kit de Qiagen®



Figura 18. Muestras clínicas en cama de hielo durante la etapa de homogeneización

muestra. Una vez terminados dos ciclos, los tubos se centrifugaron a 13,300 r.p.m./2 min, los sobrenadantes resultantes se transfirieron a tubos de microcentrífuga limpios de 2 mL y se les añadieron 200 μ L de solución CD2, mismos que se homogenizaron en un vórtex por 5 s y se centrifugaron a 13,300 r.p.m./2 min. Los sobrenadantes fueron procesados para la etapa de unión del ADN.

VII.2.1.4.1 Unión del ADN

En esta etapa se transfirieron \sim 700 μ L de los sobrenadantes a tubos limpios de microcentrífuga de 2 mL (el volumen del sobrenadante puede variar ligeramente de una extracción a otra) y se añadieron 600 μ L de solución CD3, los tubos se vortexearon por 5 s y 650 μ L fueron transferidos a una columna MB Spin. Las columnas se centrifugaron a 13,300 r.p.m./2 min, se desechó el líquido del tubo de recolección y el proceso fue repetido hasta procesar todo el lisado.

VII.2.1.4.2 Lavado del ADN

Las columnas MB Spin se transfirieron cuidadosamente a tubos de recolección nuevos, y se añadieron 500 μ L de solución EA, para posteriormente centrifugarlos a 13,300 r.p.m./2 min, tras lo cual se desechó el líquido del tubo de recolección.

Se adicionaron 500 μ L de solución C5 en el centro de las columnas, y se centrifugaron a 13,300 r.p.m./2 min. Las columnas lavadas se transfirieron a tubos de recolección nuevos y se centrifugaron a 13,300 r.p.m./4 min para eliminar cualquier resto de la solución C5, ya que al contener etanol podría afectar el uso del ADN en aplicaciones como la PCR y la electroforesis.

VII.2.1.4.3 Elución del ADN

Las columnas se transfirieron a tubos limpios de 1.5 mL (incluido en el kit) y se añadieron 75 μ L de la solución de elución C6 (previamente calentada a 55°C) cuidadosamente en el centro de la membrana de las columnas. Los tubos con las columnas se incubaron a 55°C/5 min en una placa de calentamiento, posteriormente se centrifugaron a 10,000 r.p.m./3 min, se desecharon las columnas vacías, y el ADN eluido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

VII.2.2 Análisis de la integridad y cuantificación del ADN

VII.2.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

Para evaluar la integridad del ADN extraído se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual se preparó a partir de una solución de Tris-Acetatos-EDTA (TAE) 50X y agarosa, de forma que se tenía que realizar el cálculo de la solución, por lo que era necesario hacer una dilución del TAE 50X para tenerlo en una concentración de 1X, los componentes de este buffer quedan en las siguientes concentraciones: 40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA. Así, la ecuación que se empleó para este fin se muestra a continuación.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

En donde:

C_1 , corresponde a la concentración de la solución madre (TAE 50X),

C_2 , es la concentración final de trabajo (TAE 1X),

V_1 , representa el volumen necesario de TAE 50X, y

V_2 , es el volumen para preparar de TAE 1X.

De forma que, tras realizar el cálculo, se añadía el volumen indicado tras el despeje de V_1 y se completaba el volumen deseado de TAE 1X con agua tridestilada filtrada, y se homogeneizaba la disolución.

Por otra parte, para el cálculo de la masa necesaria para tener una concentración de agarosa al porcentaje deseado se empleaba la ecuación siguiente, en donde el porcentaje se expresa en unidades de masa/volumen, dado que la agarosa se encuentra en forma de un polvo, mientras que el tampón empleado (TAE 1X) es un líquido.

$$\% \left(\frac{\text{masa}}{\text{volumen}} \right) = \frac{\text{g de soluto}}{\text{mL de disolución}} \times 100$$

En donde se conocen las variables

$\% (m/v)$, que es el porcentaje de agarosa que se desea,

mL de solución , que representa el volumen esperado de la disolución de agarosa, y que es cubierto con la disolución previa de TAE 1X, y

100, que es una constante.

Así, tras despejar los gramos de soluto, se pesó la masa deseada de agarosa, se colocó en un matraz Erlenmeyer y se adicionó TAE 1X. La mezcla fue sometida a calentamiento para disolver por completo la agarosa.

Una vez hecho lo anterior, se preparó el gel con la agarosa en una bandeja o molde con los peines de carga. El ADN para analizar se mezcló con colorante para corrida de ADN y se cargó en el gel, a la par de una alícuota de marcador de peso molecular 1kb plus y como control positivo de corrida ADN de *Escherichia coli* entero patógena (EPEC) (Figura 19), provisto por la Dra. Cristina Lara Ochoa.

La electroforesis se realizó a 70 V/2 h y el gel se tiñó con bromuro de etidio. La visualización del ADN se realizó con un equipo transiluminador que expone al gel a luz UV, o bien, con un fotodocumentador.

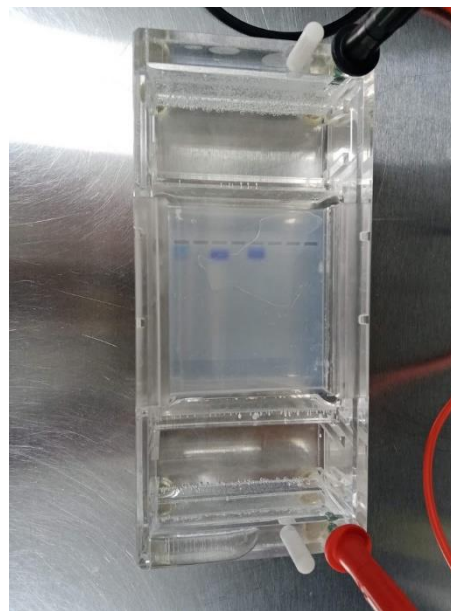


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1%. De izquierda a derecha, pocillos con marcador, extracción de ADN de *C. cayetanensis*, y ADN de EPEC

VII.2.3 Evaluación de *C. cayetanensis* empleando PCR en tiempo real (qPCR)

La técnica de PCR en tiempo real se realizó de acuerdo con el procedimiento basado en el protocolo de la FDA (BAM capítulo 19b) con algunas modificaciones, el cual ofrece el aumento en la sensibilidad, especificidad, manejo y una significativa reducción en el tiempo de la obtención de los resultados (Murphy *et al.*, 2022).

En este trabajo, el método que se implementó es un ensayo de qPCR basado en el gen Mit1C el cual hace uso de cebadores y una sonda que son dirigidos a la subunidad mitocondrial del citocromo C oxidasa, una región del genoma mitocondrial de *C. cayetanensis*, y que varía en otros organismos que podrían estar relacionados con *Cyclospora*; lo que hace que se genere un mayor número de copias de este gen en comparación con otras dianas moleculares, además que brinda especificidad mejorada, pudiendo detectar con precisión y sensibilidad analítica desde 5 ooquistes por muestra (Zhu *et al.*, 2023).

El BAM capítulo 19b recomienda que para la detección de *C. cayetanensis* por qPCR se amplifique el gen diana 18S rRNA, mientras que en este trabajo con base a lo propuesto por la propia FDA en “otros métodos analíticos de interés para el programa alimentario”, utilizamos la secuencia del gen mitocondrial Mit1C para la detección, dicha secuencia comprende la región 4325 pb - 4569 pb (Genbank: KP231180.1) de *C. cayetanensis*. Además, contiene mutaciones rastreables (T4385A y T4386A) dentro del amplicón generado que pueden estar sujetos a secuenciación de ADN posterior (FDA, 2024).

Para realizar esta técnica se emplearon oligonucleótidos, sondas y ADN sintético que fueron provistos por la Dra. Sonia Almeria (FDA) en colaboración interinstitucional. En las tablas Tabla 8 y Tabla 9 se indican las secuencias de los oligonucleótidos y sondas utilizadas.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en la qPCR

Tipo de cebador	Nombre	Secuencia
Amplifican el gen mitocondrial Mit1C de <i>C. cayetanensis</i>	Mit1C-F	5'-TCTATTTTCACCATTCTTGCTCAC-3'
	Mit1C-R	5'-TGGACTTACTAGGGTGGAGTCT-3'
Amplifican el control interno IAC	dd-IAC-F	5'-CTAACCTTCGTGATGAGCAATCG-3'
	dd-IAC-R	5'-GATCAGCTACGTGAGGTCCTAC-3'

Adaptado de (FDA, 2024)

Tabla 9. Sondas empleadas en la qPCR

Característica	Sonda para <i>C. cayetanensis</i>	Sonda para IAC
Nombre	Mit1P-FAM	dd-IAC-Cy5
Secuencia	5'- AGGAGATAGAATGCTGGTGTATGCACC - 3'	5'- AGCTAGTCGATGCACTCCAGTCCTCCT- 3'
5' Code	/56-FAM/	/Cy5/
3' Quencher	ZEN-3' Iowa Black® FQ	3' Iowa Black® RQ-Sp
3' Code	/3IABkFQ/	/3IAbRQSp/

Adaptado de (FDA, 2024)

De igual forma, se emplearon controles sintéticos, uno de ellos amplifica un fragmento del gen Mit1C y es utilizado como el control positivo de *C. cayetanensis*, otro corresponde a un fragmento que se utiliza como un control de amplificación interno de la qPCR (IAC), para monitorear que las reacciones de qPCR no arrastren inhibidores de las etapas de extracción de ADN (Gonzalez-Escalona *et al.*, 2009).

Las secuencias de estos controles internos se indican en la Tabla 10.

Tabla 10. Controles sintéticos para la qPCR

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)
HMultra13 0-synIAC	TACAGCACCTAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACGTGAGGTCCTAC GACGATCGCCAAGCATGCCCTAGCTAAGATGCATCGATTGCTCATCA CGTACGTTAGGTGACTAGGAGGACTGGAGTGCATCGACTAGCTAA GATGGTTCGATTGCTCATCACGAAGGTTAGGTGACTACGAACGAGT CGTATTGCAGGTT	200
Mit1AA gblock: Control positivo sintético	ACAGTTGGTTTTCTATTTTCACCATTCTTGCTCACTGTATTAGTATTAT TTAATTTTACTAATAGAGAAGTTGGTACTACATCAGCTTCTCTGGTTT CATCAATTTGTTTAGGTGTTATTAGTACTGAGTACTACTATTTGTTA GCTTCTTCTGGGGTGCATACACCAGCATTCTATCTCCTAGTTATGTAA CAGACTCCACCCTAGTAAGTCCAAGTGGTCTTGTAAGTATCTCT AGTAG	245

Adaptado de (FDA, 2024)

Los oligonucleótidos, sondas y controles fueron mezclados como se indica en la

Tabla 11 y almacenados en tubos de microcentrífuga a -20°C (Figura 20).



Figura 20. Tubos de microcentrífuga conteniendo las sondas para el gen Mit1C, el control IAC y el control positivo sintético de *C. cayetanensis*

Tabla 11. Mezcla de reactivos para la evaluación de *C. cayetanensis* por qPCR

Reactivo	Volumen	Concentración final (en reacción)
OTS Mit1C (20X)	8.0 µL 500 µM Mit1C-F	0.4 µM
	8.0 µL 500 µM Mit1C-R	0.4 µM
	25.0 µL 100 µM Mit1P-FAM	0.25 µM
	459 µL TE	
TOTAL 500 µL		
OTS synIAC (20X)	8.0 µL 500 µM dd-IAC-f	0.4 µM
	8.0 µL 500 µM dd-IAC-r	0.4 µM
	25.0 µL 100 µM dd-IAC-Cy5	0.25 µM
	10 µL 1E6 copias/µl HMu130-synIAC	1E3 copias
	449 µL TE	
TOTAL 500 µL		

Adaptado de (FDA, 2024)

Finalmente, se empleó el kit Applied Biosystem – TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific®), la cual es una mezcla comercial que contiene ADN polimerasa AmpliTaq Fast, uracilo-N glicosilasa (UNG), dNTPs con dUTP, colorante ROX (referencia pasiva) y tampón optimizado para la qPCR.

VII.2.3.1 Protocolo de qPCR para la detección de *C. cayetanensis*

Para preparar la placa para la qPCR se preparó una mezcla denominada *Master Mix* con los componentes que se indican en la Tabla 12.

Tabla 12. Componentes de la *Master Mix* empleada en la qPCR

Reactivo	µL/Rx
OTS Mit1C (20X)	1.0
OTS IAC (20X)	1.0
Master Mix (2X)	10.0
Agua	5.0
ADN	3.0

Además, por cada corrida se añadió un control positivo en las mismas condiciones, añadiendo 2.0 µL del control positivo sintético, y un control negativo (sin material genético)

denominado NTC, de forma que para la preparación de la *Master Mix* se siguió la ecuación siguiente.

$$n \text{ de Rxn} = NTC + n \text{ de muestras} + CP + 1$$

En donde:

n de Rxn, es el número de reacciones a preparar,

NTC, es el control negativo, también conocido como *No Template Control*,

n de muestras, es la cantidad de muestras de ADN a procesar en la corrida de qPCR,

CP, es el control positivo sintético, y

1, es una constante añadida para reducir el nivel de error en el pipeteo.



Figura 21. Equipo *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System*, con la PC destinada al equipo.

La qPCR se corrió en el equipo *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* (Figura 21), con las siguientes condiciones establecidas: 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C/3 min, 45 ciclos de hibridación a 95 °C/15 s, y 1 ciclo de extensión a 61 °C/1 min.

VII.2.3.2 Guía para interpretación de resultados

Los resultados de las muestras, tras el análisis de qPCR, deben interpretarse de acuerdo con la siguiente guía adaptada del BAM capítulo 19b de la FDA (Murphy *et al.*, 2022):

- **Muestras positivas:** las muestras sólo se consideran positivas para la presencia de *C. cayetanensis* si en la prueba inicial o en la repetición de la prueba, una (1) o más réplicas de la muestra producen un resultado positivo con $Ct \leq 38,0$ para la reacción diana Mit1C y la reacción diana IAC es “Negativa” o “Positiva”.

Sólo una réplica de una muestra desconocida o ¼ de dilución de esa muestra necesita ser positiva para el objetivo Mit1C para considerar positiva una muestra.

- **Muestras para análisis adicionales:** Cualquier muestra que produzca una (1) o más réplicas para la reacción diana Mit1C que cruce el umbral con $Ct(s) > 38,0$ y la reacción diana IAC es Negativa o Positiva

Vuelva a analizar la muestra una vez en 1X y dilución ¼.

- **Muestras negativas:** si una reacción diana Mit1C de alguna muestra produce todas las réplicas con Ct indeterminado o ninguna réplica con $Ct \leq 38,0$ y la reacción diana IAC de la muestra produce un valor Ct medio que no es más de 3 ciclos superior en comparación con el NTC: La muestra es NEGATIVA, no hay más acciones.
- **Resultados no válidos:**
 - Si una (1) o más reacciones réplicas de la muestra NTC o de la muestra control de extracción de ADN Mit1C produce un resultado positivo que cruza el umbral, la corrida experimental es inválida y debe repetirse.
 - Si tras la repetición de una serie experimental no válida, el control de extracción de ADN produce repetidamente un resultado positivo y la muestra NTC es negativa, es probable que el procedimiento de extracción de ADN estuviera contaminado. El procedimiento de extracción de ADN debe repetirse para todo el conjunto de muestras utilizando muestras adicionales de alimentos lavados, si se dispone de ellas.
 - Si una (1) o más repeticiones de la reacción diana Mit1C de la muestra de control positivo sintético es indeterminada, la ejecución experimental no es válida y debe repetirse.
- **Resultados no concluyentes:** si en la prueba inicial (o tras la repetición de la prueba si es necesario), una muestra objetivo Mit1C no produce ninguna repetición con $Ct \leq 38,0$ y la muestra objetivo IAC es indeterminada o produce un valor Ct medio más de 3 ciclos superior en comparación con el NTC: Debe realizarse una concentración del ADN.

VII.3 ETAPA 3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

En este trabajo se evaluaron diferentes tipos de muestras para la búsqueda de *C. cayetanensis*

VII.3.1 Obtención de las muestras

VII.3.1.1 Muestras de heces

La recolección de muestras fecales se realizó en colaboración con el Hospital Universitario Puebla (HUP) perteneciente a la BUAP, entre marzo y mayo del 2023, de manera que se logró obtener un total de 172 muestras. Estas fueron recolectadas de derechohabientes que

acudieron por análisis coprológicos, sin importar el sexo y la edad. Dentro de las instalaciones del HUP se realizó la detección de *C. cayetanensis* mediante técnicas microscópicas por parte del personal del área clínica. Sin embargo, el análisis por métodos moleculares se realizó de forma indistinta a todas las muestras sin importar el resultado presuntivo de microscopía.

Las muestras fecales fueron concentradas (por personal del HUP) para una mejor recuperación de los ooquistes. Esto se logró tras la filtración de 1 a 2 mL de las heces con una gasa que retuvo la nuez de materia fecal en un tubo de centrifuga, con un posterior lavado con agua destilada haciendo pasar el tubo por centrifugación a 1,500 r.p.m./5 min hasta que se obtuvo un sobrenadante limpio. A este sedimento se le añadió la solución de Sheather hasta el borde del tubo para posteriormente mezclarlo suavemente con una varilla de vidrio y dejarlo reposar por 3 minutos o centrifugarlo a 1,500 r.p.m./1 min. Una vez transcurrido este tiempo se tomaron de 1 a 2 gotas de la película superficial con un asa de alambre y se re suspendieron en 1 mL de regulador de fosfatos salino (PBS 1X). Los ooquistes concentrados se transportaron al Centro de Detección Biomolecular y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

VII.3.1.2 Muestras ambientales

Se recolectaron 3 tipos de muestras ambientales: 1) Aguas residuales empleadas para el riego, 2) Suelo procedente de las parcelas de cultivo, y 3) producto (cilantro y acelga, cultivos que se encontraban a nivel del suelo). Todas las muestras se recolectaron en diciembre de 2023 de la localidad de Palmarito Tochapan (Figura 22), la cual pertenece al municipio de Quecholac, Puebla, uno de los principales sitios productores de cilantro. A

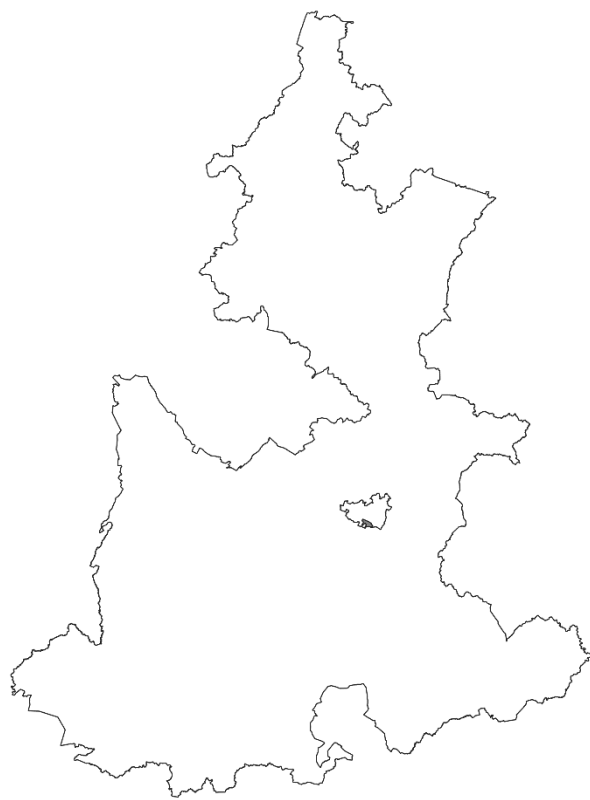


Figura 22. Mapa de Palmarito Tochapan, perteneciente al municipio de Quecholac, Puebla

continuación, se describe la metodología que se empleó para la recolección de los diferentes tipos de muestras ambientales.

VII.3.1.2.1 Suelo

Se colectaron muestras de acuerdo con un diseño estratificado de suelo tanto de cultivo de cilantro como de acelga (Figura 24), para lo cual se emplearon guantes estériles con los cuales se recolectó una porción de suelo de tres diferentes puntos hasta completar aproximadamente 50 g. Los puntos de recolección fueron de ambas orillas de las parcelas, así como una del centro, como se muestra en la Figura 23, en donde se señalan los puntos de colecta de muestra con una “X”.

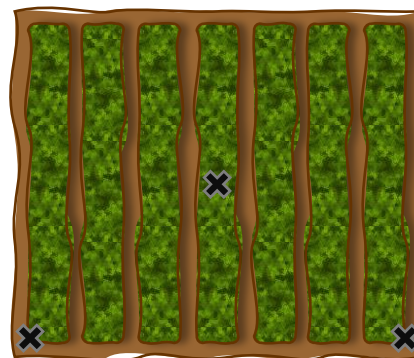


Figura 23. Puntos de muestreo en las parcelas

Las muestras se etiquetaron y resguardaron a temperatura de refrigeración hasta su procesamiento.

VII.3.1.2.2 Agua

Se colectó el agua empleada para riego de un sistema colector ubicado junto a la parcela de acelga que fue muestreada, en donde se ubicaba el equipo de bombeo para distribuir el agua, la cual provenía del sistema de drenaje público, hecho que se encuentra en discordancia con las Buenas Prácticas Agrícolas. En este caso, se recolectó el agua en recipientes estériles de 5 L, primero sumergiendo el recipiente, al ser agua corriente se muestreo dejando correr el flujo durante un tiempo, y posteriormente se llenó el recipiente, el cual se etiquetó y se resguardó hasta su procesamiento.

VII.3.1.2.3 Producto

Se recolectó cilantro y acelga (de cultivos a nivel de suelo, Figura 24), para lo cual se utilizaron guantes estériles para la toma de la muestra, la cual fue depositada en bolsas Ziploc® hasta coleccionar aproximadamente 50 g de muestra. Estas se tomaron de 3 diferentes puntos, tal y como se realizó con el muestreo de suelo (Figura 23).



Figura 24. Parcelas de cultivo donde se realizó el muestreo de suelo y producto. Izquierda: Parcela de acelga, Derecha: parcela de cilantro

VII.3.2 Procesamiento de las muestras (concentración de ooquistes)

Los distintos tipos de muestras fueron procesadas de acuerdo con sus características, por lo que fue necesario establecer una metodología para cada caso, la cual se detallará a continuación. Estas técnicas son el equivalente a la etapa de lavado de producto que se presenta en el BAM capítulo 19b, que se encuentra disponible en la página de la FDA.

VII.3.2.1 Muestras ambientales

Previo al procesamiento de las muestras se preparó una solución de detergente, en la cual se sustituyó el Alconox® por jabón Roma® en polvo, de forma que se disolvieron 0.12 g en 120 mL de agua tridestilada filtrada.

Se procesaron un total de 38 muestras ambientales, de las cuales: 8 fueron de agua de riego, 7 de acelga, 15 de cilantro, y 8 de suelo de las parcelas (4 de cilantro y 4 de acelga), de acuerdo con las metodologías que se describen en las secciones siguientes.

VII.3.2.1.1 Agua

El agua colectada se filtró empleando filtros mini Sawyer para la recuperación de los ooquistes. Posteriormente, haciendo uso de la solución jabonosa se realizó un lavado del filtro, con el flujo en sentido contrario a como se realizó la filtración previa del agua.

En seguida, el filtrado se transfirió a tubos falcón de 15 mL y se llevó a centrifugación a 3000 r.p.m./25 minutos (Figura 25), tras lo cual se retiró casi todo el sobrenadante (~14 mL), por ello se dejó aproximadamente 1 mL para re suspender el sedimento y así facilitar su posterior transferencia a tubos Eppendorf de 2 mL.

Los tubos se almacenaron a 4°C hasta la etapa de extracción del ADN.



Figura 25. Centrifugación de las muestras ambientales. Del lado izquierdo se observa la centrifuga empleada, del lado derecho se observa una muestra centrifugada

VII.3.2.1.2 Suelo

En este caso se colocaron 10 g de suelo en tubos Falcon a los cuales se agregaron 20 mL de la solución de detergente en cada uno de los tubos. Para posteriormente mezclarlos suavemente por inversión durante 1 minuto, de manera que se cuidó de no generar burbujas, tras dicho proceso se dejaron reposar 20 minutos. Transcurrido el tiempo se transfirió el sobrenadante a otro tubo Falcon, filtrándolo con ayuda de un filtro de separación celular de 70 μm .

Se repitió el proceso de lavado de suelo con la solución de detergente, reposo y filtrado 2 veces tal cual se describió en el párrafo anterior. Adicional a esto, en una tercera ocasión, se repitió el proceso añadiendo solo 10 mL de solución detergente.

Finalmente, los tubos se centrifugaron a 3000 R.P.M./25 min. Una vez terminado el proceso de centrifugación, se le retiró casi todo el sobrenadante, aunque se cuidó de conservar aproximadamente 1 mL para re suspender el sedimento, y así facilitar su posterior transferencia a tubos Eppendorf de 2 mL.

Los tubos se almacenaron a 4°C hasta la etapa de extracción del ADN.

VII.3.2.1.3 Producto

Para el aislamiento de los ooquistes de cilantro y acelga se probó la siguiente modificación al BAM capítulo 19b:

Se pesaron 25 g de producto dentro de una bolsa de cierre hermético reutilizable (bolsas Ziploc®). Posteriormente, se le añadieron 50 mL de la solución detergente y con cuidado se retiró el exceso de aire dentro de la bolsa antes de cerrarla.

En seguida, con ayuda de las manos, se masajeó vigorosamente las bolsas por un tiempo de 5 minutos, aunque se cuidó de no abrirlas, y después se dejaron reposar 5 minutos. El proceso se repitió 3 veces hasta tener un total de 15 minutos de masajeo para cada bolsa, y 15 minutos de reposo (durante dichos tiempos de reposo se dispersaba la espuma creada y se sedimentaban partículas que se desprendían del producto).

El sobrenadante se transfirió a tubos Falcon de 15 mL con pipetas Pasteur de plástico de 2 mL, de tal forma que se cuidó de no transferir restos de materia vegetal. Los tubos se centrifugaron a 3000 R.P.M./25 min, tras lo cual, se les retiró casi todo el sobrenadante, y al igual que en los casos anteriores, se resguardó aproximadamente 1 mL para re suspender el pellet.

Una vez que el pellet fue re suspendido, se transfirió 1.5 mL del sedimento re suspendido a tubos Eppendorf de 2 mL. En caso de exceder el volumen, el restante se transfirió a otro tubo y, si este no alcanzó el volumen esperado (1.5 mL), se añadió agua tridestilada filtrada hasta completar el volumen.

Los tubos se almacenaron a 4°C hasta la etapa de extracción del ADN.

VII.3.3 Extracción de ADN de las muestras

VII.3.3.1 Muestras clínicas

Un total de 25 muestras se seleccionaron al azar, 20 se lisaron con ciclos de congelación-descongelación y se procesaron con el kit FastDNA™ Spin for soil. Mientras que las otras 5 muestras seleccionadas se procesaron con el homogeneizador Bead Ruptor para la lisis y se procesaron tanto con el kit FastDNA™ Spin for Soil, como con DNeasy® PowerSoil® Pro.

VII.3.3.2 Muestras ambientales

De las 38 muestras procesables, se seleccionaron aleatoriamente 3 de cada grupo, es decir, 3 de agua de riego, 3 de suelo de ambas parcelas, y 3 de ambos productos de forma que en total se sometieron a extracción de ADN 15 muestras, siguiendo las metodologías que se proponen para ambos kits indicadas en las secciones VII.2.1.3 y VII.2.1.4.

VII.3.4 Evaluación de *C. cayetanensis* empleando PCR en tiempo real (qPCR)

La evaluación por qPCR se realizó tal cual se describió anteriormente en la sección VII.2.3.1.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 ETAPA 1. PREPARACIÓN DE MATERIALES Y REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA

Se encontraron las condiciones adecuadas para llevar a cabo las pruebas preliminares desarrolladas en la etapa 2, proponiendo adaptaciones en el concentrado de ooquistes provenientes de muestras biológicas y ambientales, la lisis de los ooquistes y el uso del kit DNeasy® PowerSoil® Pro para la extracción del ADN, además del kit recomendado por la FDA. Así mismo, se logró la obtención de los controles positivos de *C. cayetanensis*, uno conservado en formalina y otro en dicromato de potasio al 2,5 %.

VIII.2 ETAPA 2. REALIZACIÓN DE PRUEBAS PRELIMINARES

VIII.2.1 Extracción de ADN del control positivo de *C. cayetanensis* conservado en formalina

VIII.2.1.1 Lisis mediante ciclos de congelación-descongelación

En las primeras etapas para la estandarización de la detección de *C. cayetanensis*, se procesó el control positivo adquirido de PACAL, inicialmente en la etapa de lisis se utilizó el método de congelación-descongelación que se describe la metodología. Se emplearon 5 ciclos de congelación-descongelación partiendo de diferentes alícuotas del control positivo, pero no se logró obtener ADN viable ni degradado mediante análisis por electroforesis (Figura 26), ni mediante el análisis por qPCR (Figura 27), por lo que no se recomienda utilizar esta técnica para el procesamiento de ooquistes de *C. cayetanensis*, esto pese a que se tienen reportes de que la técnica logra ser un coadyuvante en el rompimiento de los ooquistes, tal y como lo presentan Qvarnstrom *et al.* (2018). Sin embargo, al momento de realizar esta técnica no se consideró que la solución conservante del control PACAL consistía en formalina, por lo que la congelación-descongelación no debería descartarse en estudios posteriores.

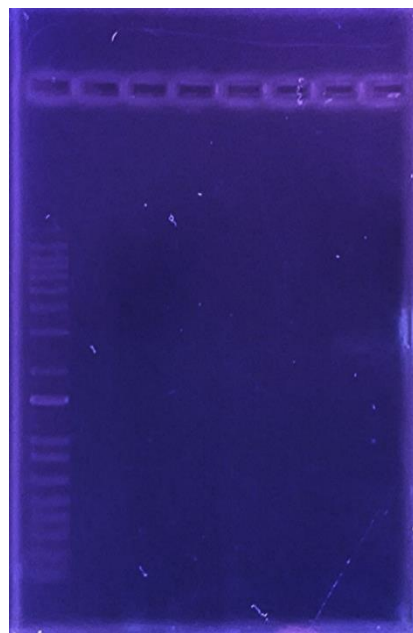


Figura 26. Gel de agarosa 1% después de la electroforesis, en donde sólo se observa el marcador de peso molecular 1 kb. No hay evidencia de extracción de ADN.

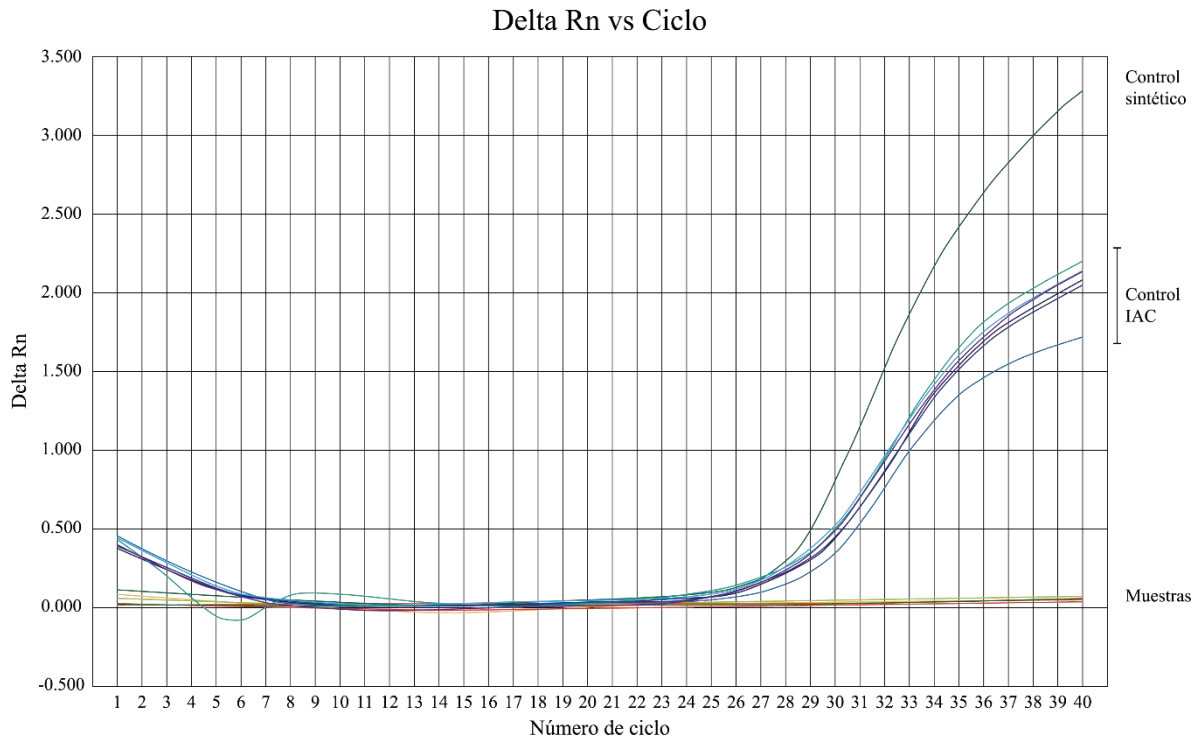


Figura 27. Gráfica de la amplificación por qPCR del control positivo de *C. cayetanensis* conservado en formalina, ciclos de congelación-descongelación como método de lisis de los ooquistes

Al respecto reportes indican que menos del 10% de los ooquistes muestran disrupción tras someterse a 5 ciclos de congelación y descongelación, siendo necesarios hasta 25 ciclos, aunque el rendimiento de extracción de ADN con esta cantidad de ciclos es apenas de entre el 10 y el 30% del ADN genómico total teóricamente presente (Qvarnstrom *et al.*, 2018). Contrario a lo que reportan Manore *et al.* (2019) en la extracción de ADN de *Cryptosporidium parvum* y *Toxoplasma gondii*, ya que ellos encontraron que el aumento de los ciclos no lograba mejorar la extracción de ADN de los ooquistes de los parásitos ya mencionados, y más bien lograba una degradación de los ácidos nucleicos, aunque esto quizá se deba a la diferencia en resistencia entre los ooquistes.

No obstante, hay que tener en consideración que el uso de hielo seco vuelve la técnica dependiente de la disponibilidad de encontrar este producto.

VIII.2.1.2 Lisis con homogeneizador

El siguiente método de lisis que se empleó fue la homogeneización con dos ciclos de procesamiento en el equipo Bead Ruptor 4. Tras el proceso de extracción de ADN, este se analizó por qPCR, añadiendo la muestra sin diluir (1X), y una dilución 1/4X, para corroborar

que no hubiera compuestos que inhibieran la reacción tras el procesamiento, y para determinar la presencia de material genético viable del parásito. Así, se comprobó con los resultados mostrados en la Tabla 13 y en la Figura 28, que si bien no había ADN de *Cyclospora*, tampoco se inhibía la reacción, ya que no hay registro de un ciclo umbral para las muestras en el gen Mit1C, lo que significa que no hubo amplificación en la señal de fluorescencia que lograra sobrepasar la línea base, y el control interno de inhibición IAC logró amplificar sin alejarse demasiado del valor de Ct para el control negativo NTC, y el control positivo (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Thermo Fisher Scientific, s. f.).

Tabla 13. Resultados de qPCR de las muestras procesadas con diferente tiempo en equipo Bead Ruptor 4 (90 s, 3, 4 y 5 min), sin diluir y dilución 1/4.

MUESTRA	Sin diluir			Dilución 1/4X		
	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	24.2138	Negativo	-	-	-
90 s	Indeterminado	23.9336	Negativo	Indeterminado	23.8666	Negativo
2 min	Indeterminado	24.011	Negativo	Indeterminado	24.2021	Negativo
4 min	Indeterminado	23.9771	Negativo	Indeterminado	24.1097	Negativo
5 min	Indeterminado	24.1342	Negativo	Indeterminado	23.4233	Negativo
CNE	Indeterminado	23.988	Negativo	Indeterminado	24.4441	Negativo
CPCC	27.3674	24.2559	Positivo	-	-	-

NTC: Control No Templado, CNE: control negativo de extracción, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

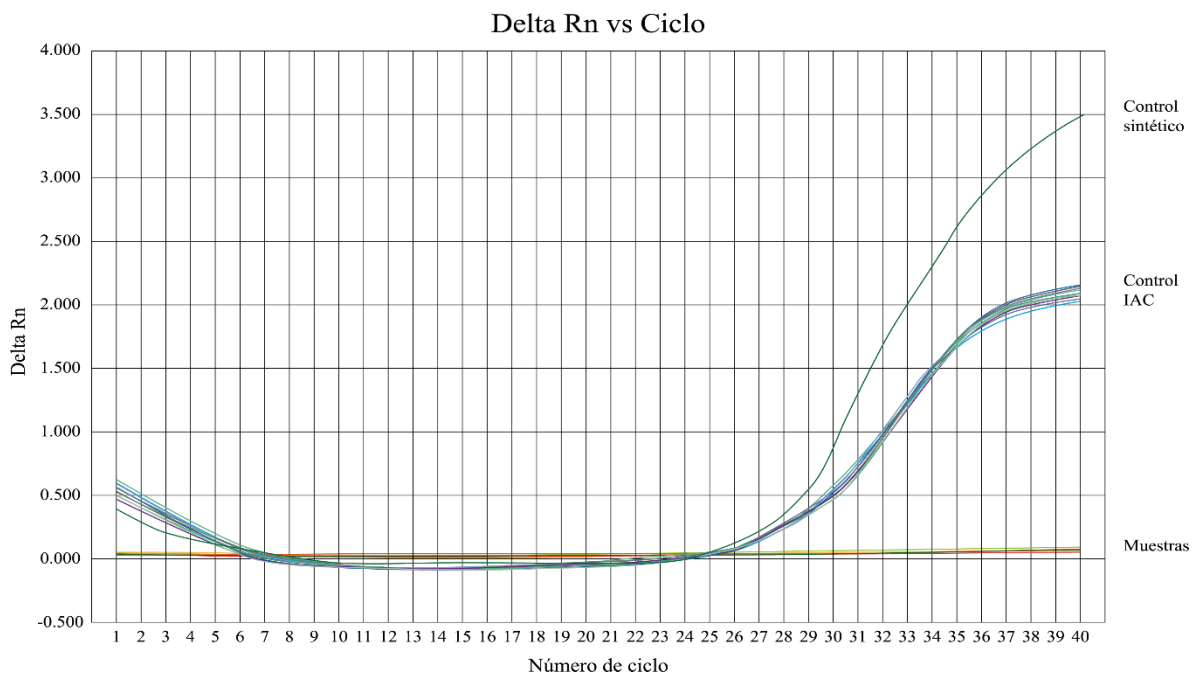


Figura 28. Gráfica de la amplificación por qPCR del control positivo de *C. cayetanensis* conservado en formalina, homogenizado como método de lisis de los ooquistes

Posteriormente, se repitió el análisis procesando esta vez alícuotas del control positivo de PACAL a 90 y 120 s (usando MP Biomedicals como kit de extracción de ADN), además, debido a la posible contaminación con compuestos orgánicos resultado de la conservación del control en formalina, se le realizó una precipitación con glucógeno y etanol a las muestras de ADN, para concentrar el material genético previamente obtenido, debido a que este carbohidrato favorece de forma significativa la recuperación de ácidos nucleicos al ser insoluble en etanol y formar un precipitado que retiene los ácidos nucleicos (Thermo Fisher Scientific, 2024). De forma que tras la concentración se sometió las muestras al análisis por qPCR, donde se observó que nuevamente no hubo inhibición de la reacción, ya que el control interno IAC logró amplificar en todos los casos (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados de qPCR de las muestras procesadas con diferente tiempo en equipo Bead Ruptor 4 (90 y 120 s), sin diluir

Muestras	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	31.057	Negativo
90 s	Indeterminado	30.6874	Negativo
120 s	Indeterminado	30.6134	Negativo
CNE	Indeterminado	31.4137	Negativo
CPCC	26.2998	30.4327	Positivo

NTC: Control No Templado, CNE: control negativo de extracción, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Sin embargo, sabiendo que aparentemente no hay alguna inhibición durante la PCR, este hecho puede significar que las técnicas de extracción de ADN presentadas no fueron las causantes de la presencia de estos contaminantes orgánicos, de tal forma que se asume que el hecho de procesar ooquistes conservados en una solución con formalina no es apto para la extracción de ADN viable para técnicas moleculares. Esto puede deberse en gran medida a que la formalina (que básicamente es formaldehído al 37%) se transforma gradualmente en ácido fórmico lo que ocasiona entrecruzamientos (o *cross-linkage*) entre ácidos nucleicos y proteínas, además de que hidroliza puentes fosfodiéster del ADN (Carlos *et al.*, 2014).

Como consecuencia de esto, y con la finalidad de extraer el material genético a partir del control con formalina, las alícuotas del control de PACAL se concentraron con centrifugación y posteriormente se realizó el análisis por qPCR para verificar si al aumentar la cantidad de ooquistes se lograba obtener material genético viable para dicha reacción. Sin embargo, no

se observó una amplificación significativa del gen diana, ya que el equipo no tuvo registro de un incremento en la fluorescencia que lograra sobrepasar la línea base, ni en la reacción sin diluir (1X) ni en la dilución 1/4X. Aunque tampoco se mostraron indicios de haber existido una inhibición de la reacción, ya que se obtuvieron valores similares en el control IAC (

Tabla 15).

Tabla 15. Resultados de qPCR de las muestras procesadas con pretratamiento de extracción de ADN, sin diluir y diluido 1/4.

Muestra	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	31.057	Negativo
Sin diluir	Indeterminado	30.5827	Negativo
Diluido 1/4X	Indeterminado	30.7229	Negativo
CPCC	26.2998	30.4327	Positivo

NTC: Control No Templado, MP: muestra procesada con el kit FastDNA™ Spin for Soil, Q: muestra procesada con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Otros de los tratamientos utilizados para la extracción del ADN viable para su amplificación en la qPCR, fue someter el control positivo preservado en formalina a la acción de la proteínasa K, modificando la técnica propuesta por Lee *et al.* (2019), dado que hay evidencia reportada de que el material genético que se extrae al usar este tipo de tratamientos para la eliminación de formalina mejora notablemente la pureza y permite obtener ADN viable para PCR convencional y electroforesis (Carlos *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019). Una vez extraído el ADN, se decidió en esta ocasión valorar la presencia de ADN con electroforesis, para lo cual se añadió marcador de peso molecular y ADN de *E. coli* EPEC, ya que la electroforesis se recomienda para evaluar la integridad del material genético, porque permite visualizar los ácidos nucleicos utilizando un tinte intercalante fluorescente como lo es el bromuro de etidio (Berthold Technologies GmbH & Co.KG, 2024).

Sin embargo, como se observa en la Figura 29, no se evidenció la presencia de material genético del parásito *C. cayetanensis*, ya que no se observa tinción alguna en el carril correspondiente al parásito (enmarcado en un

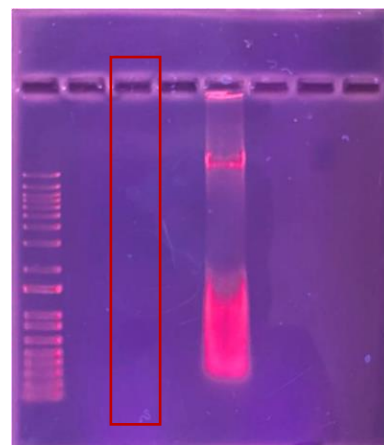


Figura 29. Gel agarosa 1% tras la electroforesis, de izquierda a derecha: carril con marcador de peso molecular 1kb, vacío, intento de extracción de ADN de *C. cayetanensis*, vacío, ADN de *E. coli* EPEC

recuadro), ni siquiera de alguna mancha degradada o bandas de bajo peso molecular, que podrían ser indicativo de la degradación de material genético (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020; Berthold Technologies GmbH & Co.KG, 2024).

Dado lo anterior, es razonable asumir que para la determinación de *C. cayetanensis* por técnicas moleculares a partir de muestras clínicas, lo ideal es no conservar las muestras en soluciones con formalina (Enlace Hispano Americano de Salud *et al.*, 2012), esto pese a que algunos de los métodos para concentrar las heces más empleados son los de formalina-éter o formalina-acetato de etilo, además de que el formaldehído se utiliza como conservante para muestras biológicas, y por ende, es muy usado en parasitología (Grupo Axioma S.A.S, 2022).

VIII.2.2 Extracción de ADN del control positivo de *C. cayetanensis* conservado en dicromato de potasio

Se sometieron a extracción de ADN 5 alicuotas del control positivo de *C. cayetanensis* conservado en dicromato de potasio, en donde el control 1 (procesado con MP Biomedicals) sólo se centrifugó, mientras que a los controles 2-5 se les realizó un lavado con PBS 1X, destacando que el control 2 y 3 se procesaron con el kit de MP Biomedicals, añadiendo leche desnatada al control 2; los controles 4 y 5 fueron procesados con Qiagen y Roche, respectivamente. Los 5 controles se sometieron a homogeneización como método de lisis de los ooquistes, en las condiciones establecidas en la metodología.

VIII.2.2.1 Evaluación por qPCR de ADN del control positivo a *C. cayetanensis* conservado en dicromato de potasio

En una primera reacción se incluyeron las muestras control 4 y 5, es decir, las que fueron procesadas con el kit de Qiagen® y Roche®, tras lo cual se observó que no había amplificación del gen objetivo Mit1C con ninguno de los kits y no parecía haber inhibición de la reacción al amplificar el control interno (Tabla 16).

(Continúa)

Tabla 16. Resultados de qPCR de los controles 4 y 5 de extracción de ADN, sin diluir

Muestras	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	26.9774	Negativo
Control 4-Q	Indeterminado	26.9774	Negativo
Control 5-R	Indeterminado	27.0421	Negativo
CPCC	27.7885	27.0178	Positivo

NTC: Control No Templado, Q: muestra procesada con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, R: muestra procesada con el kit de Roche®, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Mientras que con los controles 1-3, tampoco se observó respuesta en la qPCR (Tabla 17). De acuerdo con los resultados obtenidos se consideraron tres explicaciones posibles: 1) los métodos de extracción no estaban logrando extraer ADN viable, 2) el ADN se encontraba muy concentrado y por ende no lograba amplificar, o 3) el ADN necesitaba ser concentrado o lavado (MP Biomedicals, 2021; Qiagen, 2023).

Tabla 17. Resultados de qPCR de los controles 1-3 de extracción de ADN, sin diluir

Muestras	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	27.0675	Negativo
Control 1-MP	Indeterminado	27.3725	Negativo
Control 2-MP	Indeterminado	27.0722	Negativo
Control 3-MP	Indeterminado	27.2826	Negativo
CPCC	27.6002	27.001	Positivo

NTC: Control No Templado, MP: alicuota procesada con el kit FastDNA™ Spin for Soil, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Atendiendo a lo anterior, y sabiendo que al ser muestras que provenían de un control positivo de ooquistes de *C. cayetanensis*, se optó por realizar una concentración con glucógeno, y después se procedió nuevamente con la qPCR, considerando el ADN diluido y sin diluir, los resultados se muestran en la Tabla 18, y en la Figura 30.

(Continúa)

Tabla 18. Resultados de qPCR de los controles 1-5 de extracción de ADN, sin diluir y dilución 1/4

MUESTRA	Sin diluir			Dilución 1/4		
	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	26.768	Negativo			
Control 1-MP	Indeterminado	27.3638	Negativo	38.9777	27.2434	Reanalizar
Control 2-MP	Indeterminado	26.903	Negativo	39.8792	26.2265	Reanalizar
Control 3-MP	Indeterminado	27.0201	Negativo	29.2724	25.9422	Positivo
Control 4-Q	Indeterminado	27.5773	Negativo	30.3049	26.5805	Positivo
Control 5-R	Indeterminado	27.4197	Negativo	Indeterminado	26.8993	Negativo
CPCC	26.1734	26.9662	Positivo			

NTC: Control No Templado, MP: muestra procesada con el kit FastDNA™ Spin for Soil, Q: muestra procesada con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, R: muestra procesada con el kit de Roche®, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Se, pudo evidenciar que el control 3 (kit MP Biomedicals procesado solo con centrifugación y lavado con PBS) y el control 4 (kit Qiagen procesado solo con centrifugación y lavado con PBS) lograron tener un resultado positivo a la presencia de *C. cayetanensis*, al obtener valores de Ct < 38 en su dilución 1/4. Mientras que por los resultados de Ct de los controles 1 y 2 se requiere someter a más análisis ambos controles, de acuerdo con la guía de interpretación de resultados del BAM capítulo 19b (Murphy *et al.*, 2022).

Además, podemos observar en la Figura 31, que, si bien el control 3 tiene un valor de Ct menor en comparación al resto, no es el que más amplifica, esto pese a que en teoría un valor de Ct menor debería significar que hay mayor cantidad de ADN, aunado a lo anterior, en una situación ideal se supone que la PCR funciona con una eficiencia del 100%, por lo que la cantidad de producto se duplicaría perfectamente durante cada ciclo, sin embargo el control 3 no amplificó más que el resto a pesar del valor de Ct. Por lo anterior, hay que señalar que el ciclo Ct no es más que una medida relativa de la concentración de ADN diana en la reacción, y que el valor absoluto de Ct puede estar influenciado por diversos factores, además de la concentración del gen diana (Thermo Fisher Scientific - MX, s. f.-b).

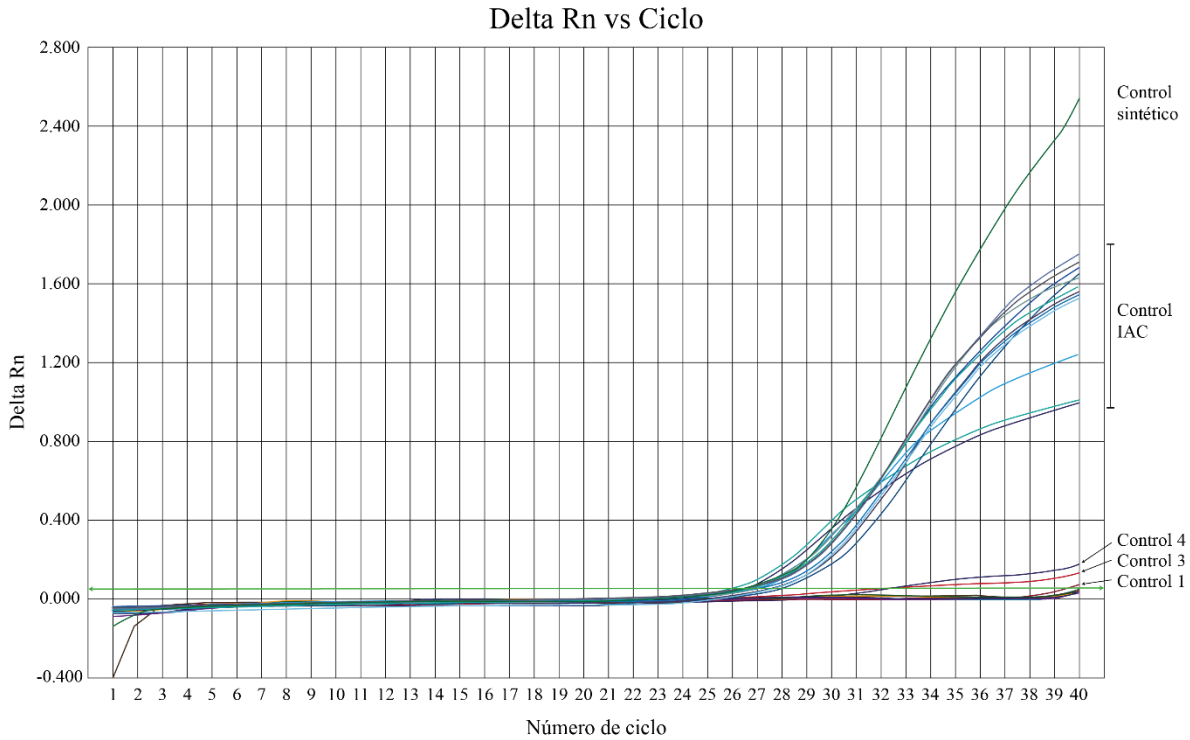


Figura 30. Gráfica de la amplificación por qPCR del control positivo de *C. cayetanensis* conservado en dicromato de potasio 2.5%, homogenizados como método de lisis de los ooquistes y concentrados con glucógeno

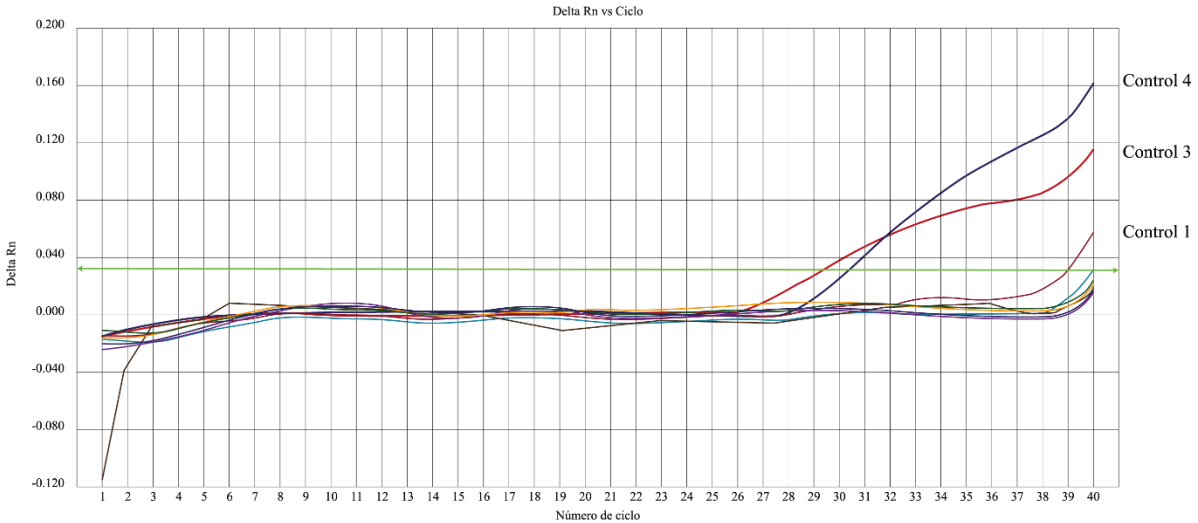


Figura 31. Gráfica de la amplificación por qPCR del control positivo de *C. cayetanensis* conservado en dicromato de potasio 2.5%, homogenizados como método de lisis de los ooquistes y concentrados con glucógeno. Sin la curva del control sintético para una mayor visibilidad de la amplificación

Hay que tener en consideración que no podemos aventurarnos a establecer que un kit es mejor que el otro a partir de sus valores obtenidos en el Ct, ya que este tipo de suposiciones podrían ser válidos solo cuando los instrumentos, reactivos y ensayos son completamente

equiparables, y en esta investigación los reactivos empleados difieren en ambos kits, la comparación del valor de Ct no puede arrojar alguna hipótesis sobre cual kit es mejor para el procesamiento de las muestras (Thermo Fisher Scientific - MX, s. f.-b), de ahí que sólo podamos dilucidar que empleando ambos kits se logró la extracción de ADN de *C. cayetanensis* viable para su análisis por PCR en tiempo real.

A partir de lo mostrado anteriormente, podemos establecer finalmente que la metodología para la extracción de ADN de *C. cayetanensis* viable para análisis moleculares dentro del CDB-BUAP debe involucrar, en el caso de controles positivos suspendidos en dicromato, lavados con PBS 1X en la etapa de preparación de la muestra. Mientras que de forma general el uso del homogeneizador Bead Ruptor 4 en dos ciclos configurados a 5.0 m/s por 90 s cada uno con su respectivo enfriamiento en hielo por 3 min, es suficiente para la ruptura de los ooquistes, por lo que se logró establecer una técnica para la detección de este parásito, usando tanto el kit recomendado por la FDA, como el de la marca Qiagen®, tal y como se aprecia en la Figura 33.

Aunado a los análisis realizados en este proyecto de investigación, la Ing. Gasca Corona realizó una observación en microscopio electrónico de los ooquistes de *C. cayetanensis* provenientes del control positivo, los cuales se aprecian en la Figura 32.

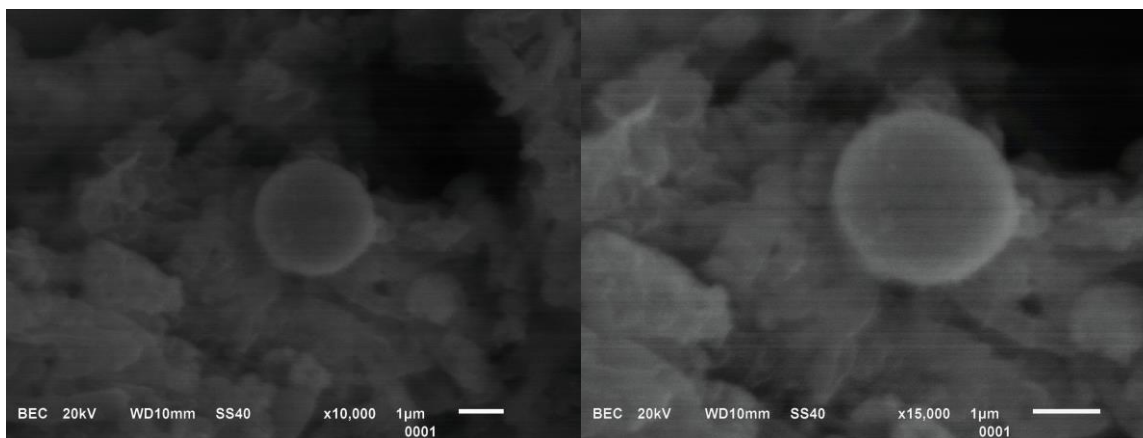


Figura 32. Observaciones en microscopio electrónico del control positivo a *C. cayetanensis* a 10,000X y 15,000X. Fuente: Gasca Corona, 2024.

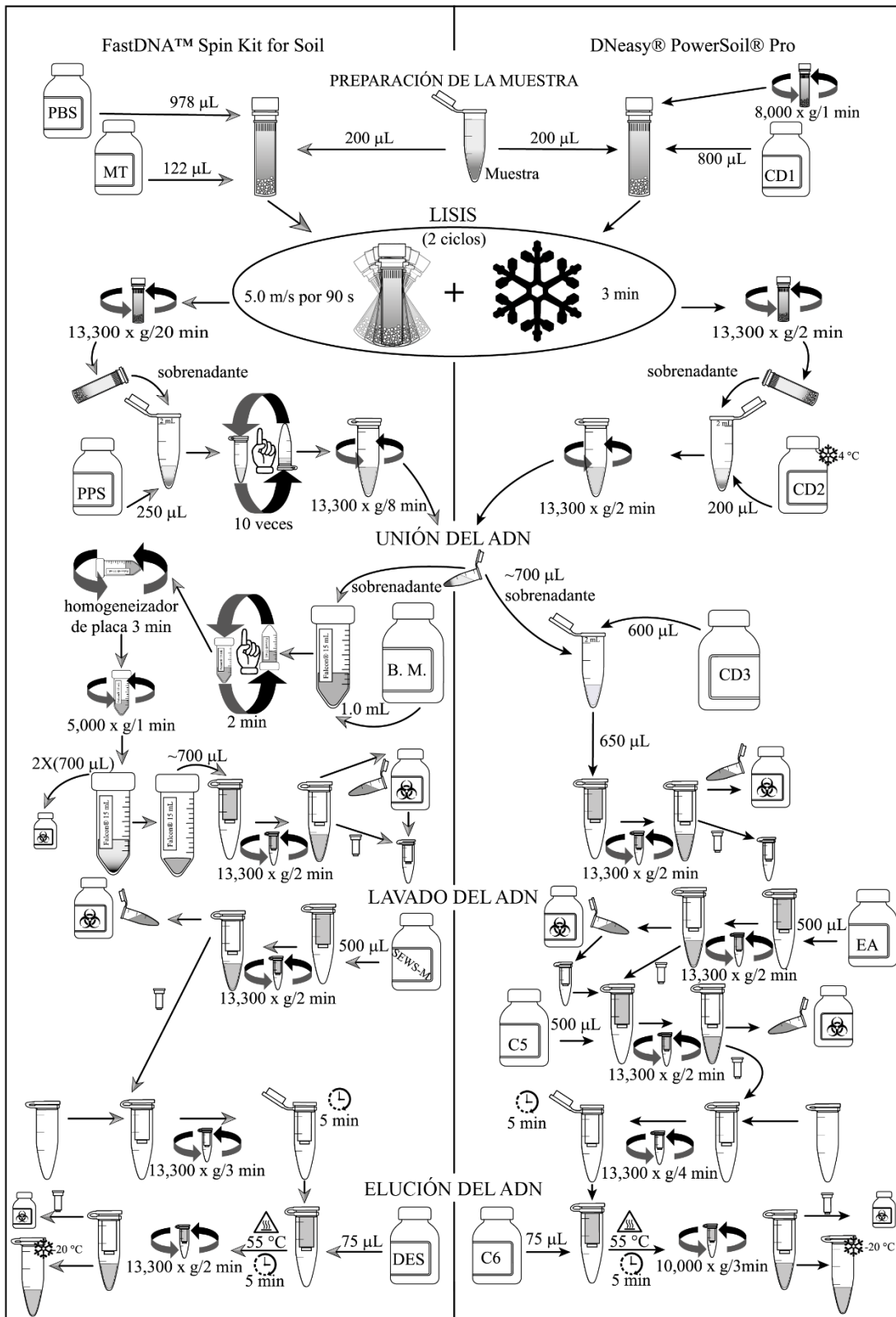


Figura 33. Metodología de extracción de ADN empleando FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedics®) y DNeasy® PowerSoil® Pro (Qiagen®). Fuente: Elaboración propia

VIII.3 ETAPA 3. DETECCIÓN DE *C. CAYETANENSIS* EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

VIII.3.1 Identificación de *C. cayetanensis* en muestras biológicas

Se procesaron un total de 25 muestras clínicas, seleccionadas al azar, de las cuales 20 se sometieron a ciclos de congelación-descongelación como método de lisis, y 5 se procesaron con el homogeneizador Bead Ruptor. Estas últimas se procesaron para extracción de ADN con los kits FastDNA™ Spin kit for Soil y DNeasy® PowerSoil® Pro.

En ambos casos, los resultados de la qPCR mostraron que no hubo amplificación para *C. cayetanensis*, por lo que podemos asumir que las muestras eran negativas a este parásito, tal y como se había observado por microscopía en los laboratorios del HUP, ya que el control interno IAC logró amplificar sin problema (Figura 34). Sin embargo, las muestras clínicas provenían de adultos y adultos mayores, resaltando el hecho de que la ciclosporiasis parece ser más común en niños en los países en donde *C. cayetanensis* se presume como endémica, aunque se ha visto que con frecuencia los niños son asintomáticos o bien presentan síntomas relativamente leves (Chacín Bonilla y Vielma, 2018).

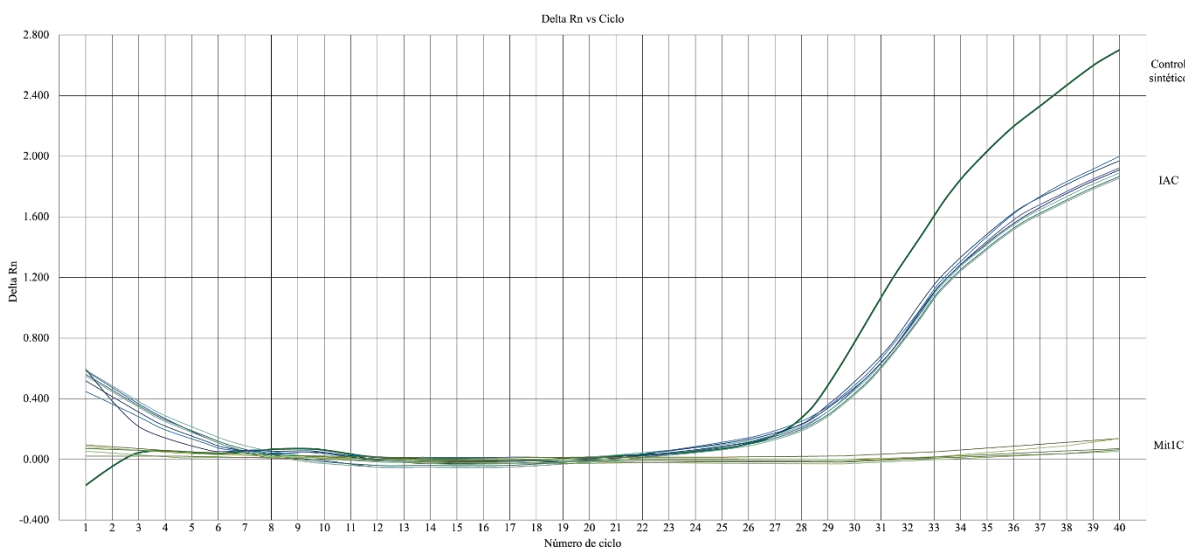


Figura 34. Gráfica de la amplificación por qPCR de muestras biológicas

VIII.3.2 Identificación de *C. cayetanensis* en muestras ambientales (agua, suelo y productos agrícolas)

Tras el proceso de extracción de ADN se obtuvieron un total de 30 muestras listas para la evaluación de *C. cayetanensis* mediante PCR en tiempo real, sin embargo, recordemos que

estas provienen de las mismas 15 muestras ambientales, las cuales fueron procesadas con ambos kits. Una vez comprendido lo anterior podemos continuar.

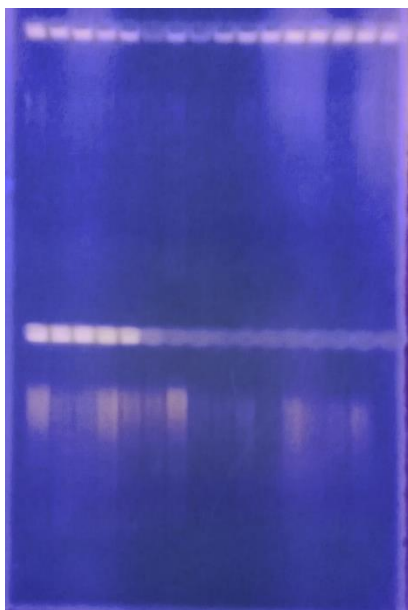


Figura 35. Gel de agarosa 1% tras la electroforesis. Arriba: muestras procesadas con FastDNA™ Spin Kit for Soil, abajo: muestras procesadas con DNeasy® PowerSoil® Pro kit

Las 30 muestras se corrieron tanto en electroforesis como en qPCR. En cuanto a la electroforesis, esta se realizó en un gel de agarosa 1%, tras la cual las muestras parecían mostrar ADN parcialmente viable, ya que si bien no se observaban bandas definidas, si se apreciaba una ligera banda difusa que parecía teñirse en la parte superior del gel (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020), este fenómeno se presentó más en las muestras extraídas con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, en comparación al kit de la marca MP Biomedicals®, tal y como se aprecia en la Figura 35. Además, estas bandas pueden explicarse gracias al exceso de ADN, ya que, si bien se busca *Cyclospora*, durante la extracción no se obtiene sólo material genético de este parásito, sino que se extrae ADN de todo el material biológico que se encuentre presente en las muestras (UAH y Herráez, 2021).

Por esto último, no es de extrañar que al correr la qPCR se logró observar la amplificación de 4 muestras (Figura 36), las cuales corresponden a agua y acelga: MH2O1-MP, MH2O1-Q, MA1.3-Q, y MA1.5-Q. No obstante, de estas sólo las muestras que corresponden al agua de riego se pueden presumir como positivas, ya que el Ct fue menor a 38.0 para la reacción objetivo Mit1C (tal y como se muestra en la Tabla 19). Por otro lado, para las muestras de acelga, fue necesario reprocesarlas, debido a que, si bien lograron amplificar, tenían un valor de Ct que sobrepasaba el ciclo 38.0 que marca la guía del BAM capítulo 19b de la FDA (Murphy *et al.*, 2022).

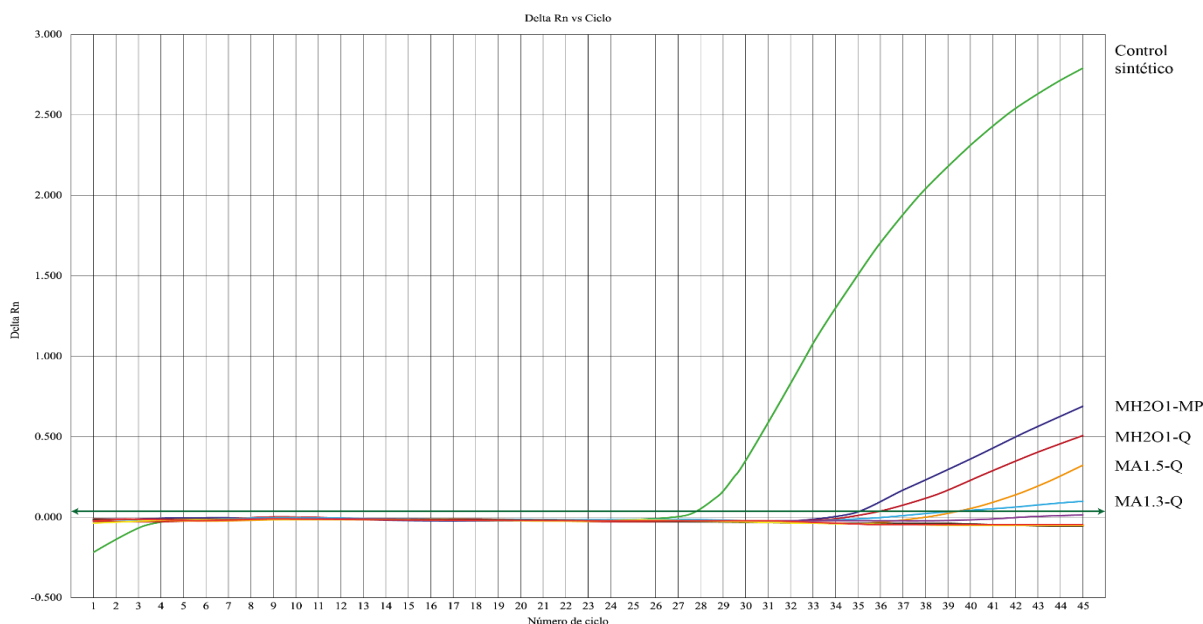


Figura 36. Gráfica de la amplificación por qPCR de muestras ambientales. MH2O: muestras de agua, MA: muestras de acelga, MP: muestra procesada con el kit FastDNA™ Spin for Soil, Q: muestra procesada con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro

Tabla 19. Resultados de qPCR de las muestras ambientales procesadas con ambos kits

MUESTRA	MP BIOMEDICALS®			QIAGEN®		
	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO	Ct	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	26.8746	Negativo			
MC1.1-1	Indeterminado	26.885	Negativo	Indeterminado	27.0091	Negativo
MC3.1	Indeterminado	28.4347	Negativo	Indeterminado	26.8615	Negativo
MC4.1	Indeterminado	26.8985	Negativo	Indeterminado	26.7569	Negativo
MA1.1	Indeterminado	27.4772	Negativo	Indeterminado	26.8582	Negativo
MA1.3	Indeterminado	27.4353	Negativo	38.335	26.8402	Reanalizar
MA1.5	Indeterminado	27.3713	Negativo	39.5545	27.0135	Reanalizar
MH2O1	36.8315	27.3123	Positivo	36.5782	27.0287	Positivo
MH2O2	Indeterminado	26.9631	Negativo	Indeterminado	26.8187	Negativo
MH2O3	Indeterminado	27.1273	Negativo	Indeterminado	26.9009	Negativo
MSA1	Indeterminado	27.8114	Negativo	Indeterminado	26.9552	Negativo
MSA2	Indeterminado	27.5763	Negativo	Indeterminado	26.7621	Negativo
MSA3	Indeterminado	27.843	Negativo	Indeterminado	26.9031	Negativo
MSC1	Indeterminado	27.2301	Negativo	Indeterminado	26.8906	Negativo
MSC2	Indeterminado	27.5118	Negativo	Indeterminado	26.9066	Negativo
MSC3	Indeterminado	27.6135	Negativo	Indeterminado	26.8411	Negativo
CPCC	26.8689	26.8041	Positivo			

NTC: Control No Templado, MC: muestra de cilantro, MA: muestra de acelga, MH2O: muestra de agua, MSA: muestra de suelo del cultivo de acelga, MSC: muestra de suelo del cultivo de cilantro, MP: muestra procesada con el kit FastDNA™ Spin for Soil, Q: muestra procesada con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Dado que la qPCR mostró evidencia de al menos una muestra positiva extraída con los dos kits, y dos muestras distintas que necesitaban reanalizarse, las 30 muestras se sometieron de nuevo a electroforesis en las mismas condiciones que el anterior, pero dejándolo teñir por un periodo de tiempo mayor. Además, se le añadió un marcador de peso molecular 1 Kb plus para ADN para corroborar que la electroforesis estaba corriendo adecuadamente. No obstante, el resultado era muy similar al anterior (Figura 37), reafirmando que las bandas presentaban ese aspecto por el exceso de ADN y no por la degradación de los ácidos nucleicos.

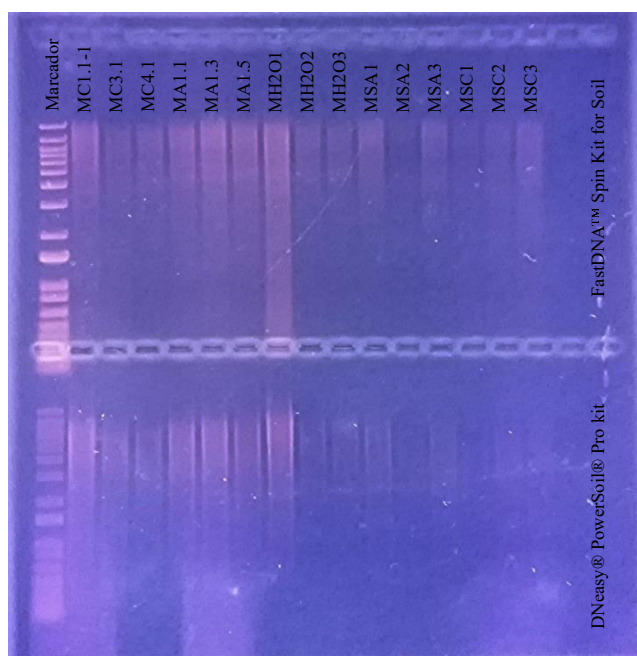


Figura 37. Gel de agarosa 1% tras la electroforesis. Arriba: muestras procesadas con FastDNA™ Spin Kit for Soil, abajo: muestras procesadas con DNeasy® PowerSoil® Pro kit. MC: muestra de cilantro, MA: muestra de acelga, MH2O: muestra de agua, MSA: muestra de suelo del cultivo de acelga, MSC: muestra de suelo del cultivo de cilantro.

Por otro lado, en cuanto a la qPCR de las muestras que había que reanalizarse, se procesaron no solo las muestras de acelga, sino que también se añadieron las muestras de agua que resultaron positivas y muestras aleatorias que resultaron negativas, de forma que se procesaron las muestras: MH2O1-MP, MH2O1-Q, MH2O2-MP, MA1.3-Q, MA1.5-Q, y MSA2-Q, a las cuales se les realizó una dilución 1:4 tal y como lo recomienda la guía para interpretación de resultados del BAM capítulo 19b (Murphy *et al.*, 2022). Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de qPCR de las muestras ambientales, segundo análisis.

MUESTRA	1X		RESULTADO	Dilución ¼		
	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)		Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indet.	26.968	Negativo			
MH2O1-MP	35.9806	27.5871	Positivo	Indeterminado	27.0744	Negativo
MH2O1-Q	34.6601	26.8975	Positivo	Indeterminado	26.941	Negativo
MA1.3-Q	38.7763	26.9836	Reanalizar	Indeterminado	26.8809	Negativo
MA1.5-Q	Indeterminado	26.7762	Negativo	Indeterminado	26.953	Negativo
MH2O2-MP	Indeterminado	27.0648	Negativo	39.2642	26.9585	Reanalizar
MSA2-Q	Indeterminado	26.7813	Negativo	39.5545	26.9336	Reanalizar
CPCC	27.7226	26.8414	Positivo			

NTC: Control No Templado, MH2O: muestra de agua, MA: muestra de acelga, MP: muestra procesada con el kit FastDNA™ Spin for Soil, Q: muestra procesada con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Sin embargo, podemos apreciar que, contrario a lo que menciona la guía, es probable que el problema no sea la cantidad excesiva de ADN (MP Biomedicals, 2021; Murphy *et al.*, 2022; Qiagen, 2023), sino que exista muy poca cantidad de ooquistes en las muestras, ya que al diluir las muestras el valor de Ct no sólo no disminuye, sino que presenta un valor indeterminado, dado que no hubo amplificación de ADN. Quizá, que haya muy poco material genético no debería ser de extrañar, debido a que se reporta que la liberación de ooquistes es muy baja, siendo tal que incluso en el diagnóstico de ciclosporiasis en muestras clínicas, la liberación tiende a ser tan baja que los pacientes sintomáticos no liberan los suficientes ooquistes en una deposición, por lo que se recomienda realizar estos análisis en una muestra mezclada a partir de deposiciones colectadas en diferentes días (CDC, 2016a).

Dado esta desventaja para la detección de la presencia de *C. cayetanensis*, no es de extrañar que debido a la falta de un método de enriquecimiento (junto a la baja cantidad de ooquistes en las muestras que ya se mencionó) a menudo no se logra detectar la contaminación en las muestras ambientales o alimentarias, pese a haber utilizado técnicas de concentración antes de intentar la detección (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017a).

En este sentido, y asumiendo que, por la posible baja cantidad de ooquistes en las muestras, y por la matriz de la muestra que puede llegar a dificultar la detección de este parásito, se realizó una tercera reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real buscando observar un cambio significativo en la amplificación del gen objetivo, por lo que se corrió una tercera qPCR incrementando el volumen de ADN de las muestras de 2 µL a 3 µL, y procesando las

muestras: MH2O1-MP, MH2O1-Q, MA1.3-MP, MA1.3-Q, MA1.5-MP, y MA1.5-Q (Tabla 21).

Tras dicho análisis, se observaron resultados inconclusos, ya que no parece haber una notoria mejoría ni al diluir ni al aumentar la cantidad de muestra, ya que en algunos casos aumentó el valor de Ct, mientras que en otros casos se logró disminuir, por lo que quizá sería ideal replantear otros factores que afectan la eficiencia de la qPCR (Thermo Fisher Scientific - MX, s. f.-b), y durante este estudio no se tomó en cuenta modificaciones a estos factores, como la preparación de la Master mix, el diseño de los cebadores, la configuración del termociclador, la calidad de la muestra, y la matriz. Esta variación en cuanto a la técnica validada por la FDA, en la que el valor del Ct no mejora tras la dilución, podría explicarse en parte gracias a que los datos obtenidos hasta el momento acerca del uso de un único marcador genético para la detección de *C. cayetanensis* puede llegar a ser insuficiente, debido a que puede haber una probable recombinación genética entre distintas variables aisladas en diferentes localidades y aunque para algunas variedades este marcador demostró una alta resolución, para algunas otras no fue posible obtener información útil de algunos amplicones, además que algunos brotes fueron ocasionados por varias poblaciones diferentes de *C. cayetanensis* (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b).

Tabla 21. Resultados de qPCR de las muestras ambientales, tercer análisis

Muestras	Ct (Mit1C)	Ct (IAC)	RESULTADO
NTC	Indeterminado	26.8989	Negativo
MH2O1-MP	38.3677	27.554	Reanalizar
MH2O1-Q	35.8501	27.026	Positivo
MA1.3-Q	35.4129	26.9196	Positivo
MA1.5-Q	Indeterminado	26.8627	Negativo
MA1.3-MP	43.8147	27.5486	Reanalizar
MA1.5-MP	Indeterminado	27.5406	Negativo
CPCC	27.0857	26.9538	Positivo

NTC: Control No Templado, MH2O: muestra de agua, MA: muestra de acelga, MP: muestra procesada con el kit FastDNA™ Spin for Soil, Q: muestra procesada con el kit DNeasy® PowerSoil® Pro, CPCC: control positivo sintético de *C. cayetanensis*.

Ya que, por otra parte, si bien pueden existir falsos negativos ocasionados por la presencia de compuestos que inhiban la reacción, introducidos por errores técnicos y/u operarios, o bien por la degradación del material genético en la muestra, el control interno IAC que se añade en cada pocillo debería ser capaz de detectar estos errores aleatorios, ya que el control

interno analiza durante la corrida de la PCR alguna inhibición generada por estos errores, y si este control no amplificara, sería un claro indicador de que alguno de estos inconvenientes está presente (Nolan y Bustin, 2013).

Finalmente, se le realizó una electroforesis al ADN amplificado con la intención de tener mayor ADN y poder visualizarlo en un gel de agarosa 1%. Sin embargo, solo fue posible visualizar con claridad las bandas que identifican al gen Mit1C e IAC del control positivo sintético, tal y como se muestra en la Figura 38. Gracias a esto, pudimos corroborar el tamaño esperado del gen, comparándolo con el marcador genético 1kb plus, que concuerda con lo esperado de acuerdo con la longitud de las pares de bases que se describieron en el capítulo de la metodología, es decir, 200 pb para el control positivo sintético (carril 9, banda inferior), y 245 pb para el control interno IAC (carril 9, banda superior).

Además, esto confirma que el utilizar la PCR en tiempo real es mejor que utilizar su versión de punto final, ya que la primera es más sensible en comparación a la segunda (Cubillos *et al.*, 2008; Jiménez Moraleda *et al.*, 2021), hecho que se aprecia tras correr la electroforesis del material genético ya amplificado, puesto que no se aprecia la concentración del ADN incluso en aquellas pruebas que se saben positivas.

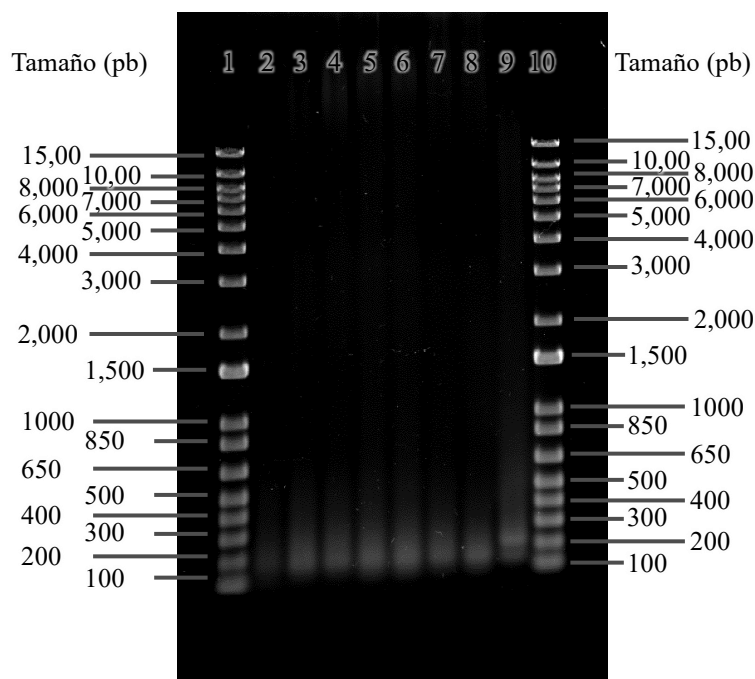


Figura 38. electroforesis en agarosa 1%. Carril 1 y 10 con marcador de peso molecular 1 kb plus, de izquierda a derecha (carriles 2-3): H2O1-MP, H2O1-Q, A1.3-Q, A1.5-Q, A1.3-MP, A1.5-MP, Control positivo sintético.

Sin embargo, se recomienda que, para lograr una mejor visualización del material genético en aquellos casos en los que no sea posible correr la prueba en tiempo real, se realice la electroforesis en un gel de agarosa 1.5%, ya que la concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia siendo lo que determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN, así, se recomienda dicha concentración debido a que esta tiene un rango de separación de 200-4,000 pb (Thermo Fisher Scientific - MX, 2008).

Como forma de comprobar los resultados obtenidos por qPCR, nos apoyamos de la Ing. Gasca Corona, quién realizó observaciones de las muestras positivas en microscopio óptico, pudiendo verificar la presencia de los ooquistes de *C. cayetanensis* en la muestra de agua que resultó positiva en qPCR, y de una muestra de acelga que arrojó resultados inconclusos en la qPCR (Figura 39).

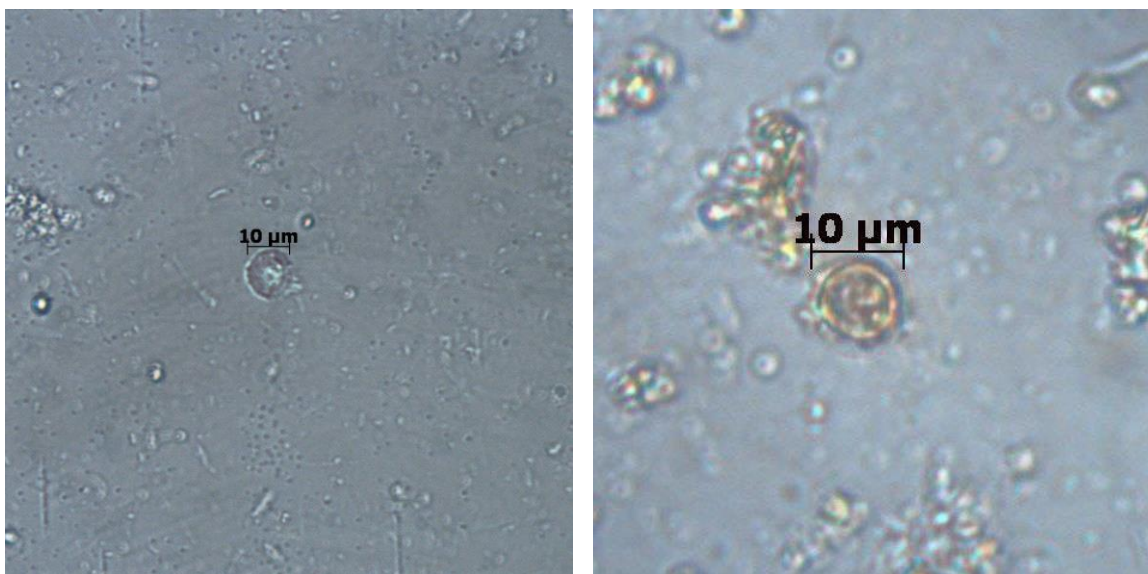


Figura 39. Ooquistes de *C. cayetanensis* observados en microscopio electrónico, en fresco. A la izquierda, ooquiste encontrado en muestra de agua, a la derecha, ooquiste encontrado en muestra de acelga.

De esta forma, se logró comprobar que ooquistes del parásito *C. cayetanensis* se encontraron en muestras de agua destinadas al riego de cultivos, hecho que se suma a los más de 20 estudios que examinan la prevalencia del parásito en agua (Almeria *et al.*, 2019; Totton *et al.*, 2021). En este sentido, dado que los ooquistes necesitan un vehículo de transmisión para diseminarse, el agua se convierte en una importante fuente de contaminación, ya que se usa en diferentes etapas de la producción y preparación de alimentos, de forma que se torna de

suma importancia la ocurrencia de *C. cayetanensis* en agua, en vistas de que el contacto de los alimentos con agua contaminada puede volver alimentos inocuos en un nuevo vehículo de transmisión latente de una enfermedad que se cree tiene una dosis infectiva muy baja (Naganathan *et al.*, 2022; Totton *et al.*, 2021; Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b).

Por lo tanto, como puntualizan Naganathan *et al.* (2022), en un análisis de los estudios que investigan *C. cayetanensis* en agua, el agua de riego presenta el índice de prevalencia más alto, por lo que el agua de riego contaminada podría ser la fuente de ciclosporiasis por el consumo de alimentos más común. Sumado a esto, el hecho de que los cultivos se rieguen con aguas residuales incrementa este riesgo.

Así, como consecuencia del uso de aguas residuales para el riego de los cultivos, fue que se logró detectar la presencia de *C. cayetanensis* en producto en una muestra tomada en el mes de diciembre, inclusive fuera de la estacionalidad de ciclosporiasis, por lo que se refuerza el hecho de que es necesario realizar investigaciones que permitan establecer si, al igual que en los casos de ciclosporiasis, hay una estacionalidad en cuanto a la contaminación superficial de los alimentos, así como estudios que tomen en cuenta condiciones como la humedad de la región (Smith, 2007).

Por otra parte, este parásito ya se ha encontrado en distintos productos frescos de hoja verde, pese a que los primeros indicios de ciclosporiasis se relacionaron con bayas, se ha encontrado que es más fácil la detección de ooquistes en productos que son más robustos, por lo que, si bien las bayas pueden estar contaminadas, actualmente se encuentran más casos asociados con productos que son más robustos como los vegetales de hoja verde (Ynés R. Ortega y Robertson, 2017b). En este sentido, esto podría explicar por qué *C. cayetanensis* se encontró en acelga en este proyecto, ya que esta es más robusta que el cilantro y permitió un lavado de producto más vigoroso. No obstante, harían falta más estudios que contemplen este factor en la detección de *Cyclospora* en diferentes matrices alimentarias.

Por último, de acuerdo con los datos obtenidos, parece ser que el kit de Qiagen® funciona mejor para la detección de *C. cayetanensis* en matrices alimentarias, en comparación al kit de MP Biomedicals®, esto gracias a que se logró la amplificación de muestras de acelga con el primero, mientras que con el segundo no hubo amplificación, esto pese a provenir de

exactamente la misma muestra. Aunque hacen falta más análisis al respecto para poder validar esto.

IX CONCLUSIONES

Tras culminar este proyecto de investigación, y de acuerdo con los resultados obtenidos en cada etapa, podemos concluir lo siguiente:

- Para la lisis de ooquistes de *C. cayetanensis*, emplear 5 ciclos de congelación-descongelación con hielo seco y una placa de calentamiento no son suficientes para extraer ADN de *C. cayetanensis*. Mientras que la lisis de los ooquistes mediante homogeneización, en dos ciclos de 90s a 5.0 m/s y 3 min en hielo, si fueron favorables para la extracción.
- Las muestras clínicas que pretendan evaluarse con técnicas moleculares para la presencia de *C. cayetanensis* necesitan preservarse en dicromato de potasio, o en soluciones que no contengan formaldehído, ya que la presencia de este impide la extracción de ADN.
- La extracción de ADN de *C. cayetanensis* fue satisfactoria tanto con el kit FastDNA™ Spin Kit for Soil de la marca MP Biomedicals®, como con el DNeasy® PowerSoil® Pro kit de la marca Qiagen.
- Se logró implementar una técnica de detección de *C. cayetanensis* para muestras biológicas y ambientales por qPCR dentro de los laboratorios del Centro de Detección Biomolecular de la BUAP.
- Las 25 muestras clínicas analizadas fueron negativas a la presencia del parásito por qPCR, confirmando los resultados obtenidos por microscopía en los laboratorios del Hospital Universitario Puebla de la BUAP.
- Se detectó ADN de *C. cayetanensis* por qPCR en una muestra de agua de riego proveniente de aguas residuales y en una muestra de acelga, las cuales fueron obtenidas de las parcelas de Palmarito Tochoapan en diciembre de 2023.
- Se confirmó la presencia de *C. cayetanensis* en el mes de diciembre, aun exponiéndose el parásito a una temperatura ambiental de -5°C, y en producto fuera de alerta sanitaria. Con lo cual se confirma la posibilidad que el parásito puede

prevalecer fuera de su periodo de estacionalidad, en condiciones ambientales adversas, y fuera del periodo de la alerta sanitaria.

- Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportado en la literatura, en donde se menciona que se han encontrado ooquistes de *C. cayetanensis* tanto en aguas residuales, como en productos frescos de hoja verde como lo es la acelga.
- Se sugiere hacer más análisis para comprobar si el kit de Qiagen® funciona mejor en diferentes alimentos.

Además, se recomienda que

- Se sugiere que se continúe la colaboración interinstitucional para la investigación de *C. cayetanensis*.
- Se realice una campaña de divulgación tanto para personas especializadas como público en general en temas referentes a *C. cayetanensis*.
- Se siga investigando *C. cayetanensis* para mejorar las técnicas de detección existentes, así como continuar con la investigación del genoma del parásito, ya que al hacerlo se podría resolver el uso de un solo marcador genético para su identificación, disminuyendo la posibilidad de falsos negativos.
- Se complemente este proyecto haciendo un análisis de eficacia, sensibilidad y precisión a las técnicas de extracción aquí propuestas.
- Se prueben las técnicas de extracción de ADN propuestas haciendo uso de diferentes matrices alimentarias.
- Se sentaron las bases para que el CDB-BUAP pueda ofrecer un servicio de detección de *C. cayetanensis* en muestras tanto clínicas como ambientales a productores y a la población general, convirtiéndose así en el primer laboratorio del estado en ofrecer dicho servicio.

X BIBLIOGRAFÍA

- Agricultura Puebla. (2017, 4 de abril). *NO EXISTE PROHIBICIÓN DE CILANTRO A ESTADOS UNIDOS: SENASICA-SAGARPA | Representación AGRICULTURA Puebla | Gobierno | gob.mx*. Blog Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura/puebla/articulos/no-existe-prohibicion-de-cilantro-a-estados-unidos-senasica-sagarpa?idiom=es>
- Almeria, S., Assurian, A. y Shipley, A. (2021). Modifications of the U.S. food and drug administration validated method for detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts in prepared dishes: Mexican-style salsas and guacamole. *Food Microbiology*, 96, 103719. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103719>
- Almeria, S., Cinar, H. N. y Dubey, J. P. (2019). *Cyclospora cayetanensis* and Cyclosporiasis: An Update. *Microorganisms*, 7(9), 317. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090317>
- Almeria, S. y Shipley, A. (2021). Detection of *Cyclospora cayetanensis* on bagged pre-cut salad mixes within their shelf-life and after sell by date by the U.S. food and drug administration validated method. *Food Microbiology*, 98, 103802. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103802>
- Associated Press Spanish. (2015, 28 de julio). *EEUU prohíbe cilantro mexicano por contaminación con heces – Chicago Tribune*. Chicago Tribune. <https://www.chicagotribune.com/hoy/ct-hoy-8456989-eeuu-prohibe-cilantro-mexicano-por-contaminacion-con-heces-story.html>
- Ayala-Gaytán, J. J., Díaz-Olachea, C., Riojas-Montalvo, P. y Palacios-Martínez, C. (2004). Cyclosporidiosis: clinical and diagnostic characteristics of an epidemic outbreak. *Revista de gastroenterología de México*, 69(4), 226-229.
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN. En *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos* (Número 2, pp. 1-10). Universidad de Salamanca. https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-
- Baxby, D., Blundell, N. y Hart, C. A. (1984). The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *Epidemiology & Infection*, 93(2), 317-323. <https://doi.org/10.1017/S0022172400064858>
- Bernal Redondo, R., Hernández Sánchez, G., Ramírez Hernández, E. C., Gámez Aranda, A. y Martínez Méndez, L. G. (1998). Protozoos emergentes. Comparación de tres métodos de identificación. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 45(4), 193-200. https://books.google.com.mx/books?id=53IDftFsl6AC&lpg=PT10&as_pt=MAGAZINES&hl=es&pg=PT10&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true
- Berthold Technologies GmbH & Co.KG. (2024). *INFLUENCIA DE LA PUREZA DEL DNA EN SU CUANTIFICACIÓN*. Cuantificación de DNA. <https://www.berthold.com/es/bioanalitica/aplicaciones/cuantificacion-dna/pureza/>
- Carlos, D., Javier, G., Jorge, R. y Valentina, R. (2014). EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE TEJIDO MUSCULAR FIJADO EN FORMALDEHIDO DE CADÁVERES NO IDENTIFICADOS. *Revista Med*, 22(1), 42-49. <http://www.scielo.org.co/pdf/med/v22n1/v22n1a06.pdf>
- CDC. (2016a, 18 de octubre). *Diagnostico de la ciclosporiasis*. Parasites Home. https://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/es/health_professionals/dx.html
- CDC. (2016b, 18 de octubre). *Parásitos - Ciclosporiasis (infección por Cyclospora)*. Parásitos. <https://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/es/index.html>
- CDC. (2019, 10 de abril). *Cyclosporiasis*. DPDx- Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. <https://www.cdc.gov/dpdx/cyclosporiasis/index.html>

- CDC. (2021a, 4 de marzo). *Síntomas de intoxicación alimentaria*. Seguridad alimenticia | CDC. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/symptoms-es.html>
- CDC. (2021b, 16 de julio). *Personas con mayor riesgo de presentar intoxicación alimentaria*. Página de seguridad alimentaria | CDC. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/people-at-risk-food-poisoning.html>
- CDC. (2022, 4 de enero). *Acerca de los parásitos*. Parasites home. <https://www.cdc.gov/parasites/es/about.html>
- Chacín Bonilla, L. y Vielma, J. R. (2018). Ciclosporiasis: distribución, prevalencia y control. *Investigación Clínica*, 59(1), 67-93. <https://doi.org/10.22209/IC.v59n1a07>
- Chacín-Bonilla, L. y Barrios, F. (2011). Cyclospora cayetanensis: biología, distribución ambiental y transferencia. *Biomédica*, 31(1), 132. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.344>
- Chávez Ruvalcaba, F., Benavides Haro, D. E., Bañuelos Melero, V., Rodríguez Rodríguez, A. M., Millán Orozco, J., Millán Orozco, J. y Chávez Ruvalcaba, M. I. (2021). Enfermedades Parasitarias y Causas por Toxinas Presentes en Alimentos. *Congreso Internacional de Investigación Academia Journals*, 13(10), 550-555. <https://edss.bibliotecabuap.elogim.com/eds/detail/detail?vid=1&sid=4f196b09-9987-4156-b343-2dbf572f3651%40redis&bdata=Jmxhbm9ZXMmc210ZT11ZHMtbGl2ZQ%3d%3d#AN=161293619&db=fap>
- CNN Español. (2015, 28 de julio). *¡Cuidado con el cilantro que comes! Podría tener heces humanas* | CNN. CNN. <https://cnnespanol.cnn.com/2015/07/28/cuidado-con-el-cilantro-que-comes-podria-tener-heces-humanas/>
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)
- Cubillos, K., Pinilla MSC, G. y Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *NOVA*, 6(9), 75. <https://doi.org/10.22490/24629448.397>
- Díaz, E., Mondragon, J., Ramirez, E. y Bernal, R. (2003). Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 68(4), 384-385.
- Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pollari, F. y Farber, J. (2013). Detection of Cyclospora, Cryptosporidium, and Giardia in Ready-to-Eat Packaged Leafy Greens in Ontario, Canada. *Journal of Food Protection*, 76(2), 307-313. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-282>
- Domingues, L. (Ed.). (2017). *PCR. Methods in Molecular Biology* (1.^a ed.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5>
- Dooley, E. E. (2013). Clasificación de las fuentes de enfermedades transmitidas por los alimentos. *Instituto Nacional de Salud Pública*. <https://pwebebsco.bibliotecabuap.elogim.com/ehost/detail/detail?vid=1&sid=b7de99eb-e11a-4b7b-b897-b70e6b38c5fd%40redis&bdata=JnNpdGU9ZW9ZWhvc3QtG1Z2ZQ%3d%3d#AN=EPTOC97294391&db=mdl>
- Enlace Hispano Americano de Salud, Ministerio de asuntos exteriores y de cooperación, CAECID, Pontificia Universidad Católica del Perú, Universidad Rey Juan Carlos y ciberimaginario. (2012). Procesamiento de muestras para diagnóstico de parásitos intestinales. En *Enlace Hispano Americano de Salud* (pp. 7-8). <http://www.telemicroscopia.ahas.org/assets/diagnostico-parasitos-intestinales.pdf>
- FDA. (2024). Standard Operation Procedure Molecular Detection of Cyclospora cayetanensis in Fresh Produce Using Real-Time PCR. *Other Analytical Methods of Interest to the Foods Program*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/other-analytical-methods-interest-foods-program>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations y World Health Organization. (2014). Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites : report of a joint FAO/WHO expert meeting,

- 3-7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy. En *Microbiological Risk Assessment Series* (Número 23, p. 302). FAO/WHO. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/>
- González Flores, T. y Rojas Herrera, R. A. (2005). Diseases transmitted by food and PCR: Prevention and diagnosis. *Salud Publica de Mexico*, 47(5), 388-390. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342005000500010>
- Grupo Axioma S.A.S. (2022, 27 de julio). *Sistema automatizado de mezcla de formalina para laboratorios de histopatología*. El Hospital. <https://www.elhospital.com/es/informacion-comercial/sistema-automatizado-de-mezcla-de-formalina-para-laboratorios-de>
- Guo, Y., Li, N., Ortega, Y. R., Zhang, L., Roellig, D. M., Feng, Y. y Xiao, L. (2018). Population genetic characterization of *Cyclospora cayetanensis* from discrete geographical regions. *Experimental Parasitology*, 184, 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.12.006>
- Guzmán Uribe, E. (2021, 14 de octubre). *Puebla produce 750 mil toneladas de hortalizas; BUAP apoya sector*. Ángulo 7. <https://www.angulo7.com.mx/2021/uncategorized/puebla-produce-750-mil-toneladas-de-hortalizas-exporta-20/389129/>
- Hernández Porras, E. E., Rosero Torres, L. E., Parra Barrera, E. L., Guerrero Montilla, J. A., Gómez Rubio, A. L. y Moreno Castañeda, J. E. (2017). Brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos estudiados mediante técnicas moleculares. *Revista de Salud Pública*, 19(5), 671-678. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n5.52317>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2023). *Censo Agropecuario (CA) 2022*. Programas de información. <https://www.inegi.org.mx/programas/ca/2022/#documentacion>
- Jiménez Moraleda, B., Fuentes Martín, M. D., Sabanza Belloso, M., Miguel Molinos, A. C. y Ciprian Negru, G. (2021). Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. *Revista Sanitaria de Investigación*. <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/diagnostico-y-tipos-de-pcr-revision-bibliografica/>
- Kuypers, J. y Jerome, K. R. (2017). Applications of digital PCR for clinical microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 1621-1628. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17/ASSET/FA4DE8FB-C337-4CD4-BE25-B6D5A0619BB1/ASSETS/GRAPHIC/ZJM9990954900001.JPEG>
- Lee, M. F., Lindo, J. F., Auer, H. y Walochnik, J. (2019). Successful extraction and PCR amplification of *Giardia* DNA from formalin-fixed stool samples. *Experimental Parasitology*, 198, 26-30. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.01.010>
- Manore, A. J. W., Harper, S. L., Aguilar, B., Weese, J. S. y Shapiro, K. (2019). Comparison of freeze-thaw cycles for nucleic acid extraction and molecular detection of *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental matrices. *Journal of Microbiological Methods*, 156, 1-4. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2018.11.017>
- Marie, C. y Petri, W. A. (2021 de junio). *Introducción a las infecciones parasitarias*. Manual MSD versión para público general. <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/infecciones-parasitarias-introducci%C3%B3n/introducci%C3%B3n-a-las-infecciones-parasitarias>
- Marie, C. y Petri, W. A. (2022 de junio). *Ciclosporiasis - Enfermedades infecciosas*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-intestinales-y-microsporidias/ciclosporiasis>
- Marin Mendez, M., Rodríguez Julian, A. R., Minier Pouyou, L., Zayas Tamayo, E. y Soler Santana, R. (2020). Caracterización de agentes bacterianos aislados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *MEDISAN*, 24(2), 235-251. <https://pwebebsco.bibliotecabuap.elogim.com/ehost/detail/detail?vid=1&sid=37fd8e21-b1f8-4bf3-aa10-dd6407dedc85%40redis&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#AN=142874021&db=asn>

- Martínez-Loya, O. A., Ortega, Y. R. y Orozco-Mosqueda, G. E. (2014). *Cyclospora cayetanensis* in a Pediatric Hospital in Morelia, México. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 537-540. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0535>
- Medicinal Genomics. (2024). *Why is Real-time PCR is superior to end-point PCR?* Medicinal Genomics. <https://help.medicinalgenomics.com/en/qpcr-vs-end-point-pcr>
- MP Biomedicals. (2021). FastDNA™ SPIN Kit for Soil user manual. En *mpbio.com*. https://www.mpbio.com/media/document/file/manual/dest/f/a/s/t/d/FastDNA_SPIN_Kit_for_Soil_UM_2021_WEB.pdf
- Murphy, H. R., Almeria, S. y da Silva, A. J. (2022, 2 de mayo). *BAM Chapter 19b: Molecular Detection of Cyclospora cayetanensis in Fresh Produce Using Real-Time PCR | FDA*. Bacteriological Analytical Manual (BAM). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-19b-molecular-detection-cyclospora-cayetanensis-fresh-produce-using-real-time-pcr>
- Naganathan, T., O'Connor, A., Sargeant, J. M., Shapiro, K., Totton, S., Winder, C. y Greer, A. L. (2022). The prevalence of *Cyclospora cayetanensis* in water: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and Infection*, 150(e15), 1-9. <https://doi.org/10.1017/S0950268821002521>
- Nolan, T. y Bustin, S. A. (2013). PCR Technology: Current Innovations. En *PCR Technology: Current Innovations, Third Edition* (3.ª ed.). Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/b14930-8>
- OMS. (2020, 30 de abril). *Inocuidad de los alimentos*. Centro de Prensa. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], Acción Contra el Hambre [ACH] y Cooperazione Internazionale [COOP]. (2011). Producción de hortalizas. En *Ayuda Humanitaria de Asistencia y Recuperación para Comunidades Afectadas por la Sequía en el Chaco*. <https://www.fao.org/3/as972s/as972s.pdf>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) y Organización Mundial de la Salud (OMS). (s. f.). *Enfermedades transmitidas por alimentos*. Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud. Recuperado 9 de marzo de 2023, de <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-transmitidas-por-alimentos>
- Ortega, Ynés R. y Robertson, L. J. (2017a). Approaches to Detecting *Cyclospora cayetanensis*: From Diagnostics to Detection in Different Food Matrices. En *Cyclospora cayetanensis as a Foodborne Pathogen. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition* (pp. 21-30). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53587-6_4
- Ortega, Ynés R. y Robertson, L. J. (2017b). *Cyclospora cayetanensis as a Foodborne Pathogen*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53587-6>
- Ortega, Ynés R. y Robertson, L. J. (2017c). Introduction to *Cyclospora cayetanensis*: The Parasite and the Disease. En *Cyclospora cayetanensis as a Foodborne Pathogen. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition*. (pp. 1-7). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53587-6_1
- Ortega, Ynés R. y Sanchez, R. (2010). Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 218-234. <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-09/ASSET/8B22B0E2-D15A-459C-9143-E40CE3E98720/ASSETS/GRAPHIC/ZCM0011023070002.JPEG>
- Ortega, Ynés R., Sterling, C. R. y Gilman, R. H. (1998). *Cyclospora cayetanensis*. En J. r. Baker (Ed.), *Advances in parasitology. Opportunistic Protozoa in humans* (3.ª ed., Vol. 40, pp. 399-418). Academic Press.
- Palomino-Camargo, C. y González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535-546. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2014.313.93>

- Paz Lemus, C. (2020). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA'S)*. SOMEICCA. <https://someicca.com.mx/enfermedades-transmitidas-por-alimentos-etas/>
- Qiagen. (2023 de junio). *DNeasy PowerSoil Pro Kit Handbook*. Kit Handbooks. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=9bb59b74-e493-4acb-b6c1-f660852e8d97&lang=en>
- Qvarnstrom, Y., Wei-Pridgeon, Y., Li, W., Nascimento, F. S., Bishop, H. S., Herwaldt, B. L., Moss, D. M., Nayak, V., Srinivasamoorthy, G., Sheth, M. y Arrowood, M. J. (2015). Draft Genome Sequences from *Cyclospora cayetanensis* Oocysts Purified from a Human Stool Sample. *Genome Announcements*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01324-15>
- Qvarnstrom, Y., Wei-Pridgeon, Y., Van Roey, E., Park, S., Srinivasamoorthy, G., Nascimento, F. S., Moss, D. M., Talundzic, E. y Arrowood, M. J. (2018). Purification of *Cyclospora cayetanensis* oocysts obtained from human stool specimens for whole genome sequencing. *Gut Pathogens*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13099-018-0272-7>
- Rahi, A. A., Abed Al-Saadi, I. N. y Abed Al-Saadi, Y. N. (2021). Detection of *Cyclospora cayetanensis* by PCR in Wasit Province, Iraq. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 15(4), 520-525. <https://doi.org/10.37506/ijfimt.v15i4.16754>
- Representación AGRICULTURA Puebla. (2017, 23 de febrero). *PUEBLA CON AMPLIAS POSIBILIDADES DE INCREMENTAR EXPORTACIONES DE HORTALIZAS*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura%7Cpuebla/articulos/puebla-con-amplias-posibilidades-de-incrementar-exportaciones-de-hortalizas>
- Sánchez-Vega, J. T., Cabrera-Fuentes, H. A., Romero-Olmedo, A. J., Ortiz-Frías, J. L., Sokolina, F. y Barreto, G. (2014). Case report: *Cyclospora cayetanensis*: This emerging protozoan pathogen in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 351-353. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0782>
- Schmitz, J. E., Stratton, C. W., Persing, D. H. y Tang, Y. W. (2022). Forty Years of Molecular Diagnostics for Infectious Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(10). <https://doi.org/10.1128/JCM.02446-21/ASSET/446F2FF4-45AA-49C3-BB25-F34364875F97/ASSETS/IMAGES/LARGE/JCM.02446-21-F002.JPG>
- Secretaría de Salud. (2023). *Veinte principales causas de enfermedad en Puebla, por grupos de edad*. Anuario de Morbilidad 1984 - 2021. https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2021/principales/estatal_grupo/pue.pdf
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2024). *Estadística de Producción Agrícola*. Datos abiertos. http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2024). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. Gobierno de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Sistema Único de Información. (2015). Ciclosporiasis: una enfermedad transmitida por alimentos. *Vigilancia Epidemiológica*, 32(30), 1-7. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/10329/sem30.pdf>
- Smith, H. V. (2007). *Cyclospora*. En *Foodborne Diseases* (pp. 277-301). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-501-5_10
- Soto Martínez, M. (2021). *La agricultura: el motor de nuestra economía*. TecScience. <https://tecscience.tec.mx/es/divulgacion-ciencia/la-agricultura-el-motor-de-nuestra-economia/>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78. www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx

- Thermo Fisher Scientific. (s. f.). Real-time PCR handbook. En *AppliedBiosystems*. Recuperado 23 de marzo de 2024, de https://www.fishersci.es/content/dam/fishersci/en_EU/lifescience/16419_NEW_Minisite/PCR/RT_PCR_Handbook.PDF
- Thermo Fisher Scientific. (2024). *Thermo Scientific™ Glucógeno, calidad de ARN 2 x 0,1 ml | Fisher Scientific*. Fisher Scientific. <https://www.fishersci.es/shop/products/fermentas-rna-grade-glycogen/11873933>
- Thermo Fisher Scientific - MX. (s. f.-a). *Essentials of Real-Time PCR*. Ciencias de la Vida. Recuperado 23 de marzo de 2024, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
- Thermo Fisher Scientific - MX. (s. f.-b). *Real-Time PCR: Understanding Ct*. Ciencias de la vida. Recuperado 24 de marzo de 2024, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>
- Thermo Fisher Scientific - MX. (2008, 11 de noviembre). *UltraPure™ Agarose*. DNA Analysis Protocols. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-protocol/ultrapure-agarose.html>
- Tibaduiza-Roa, V., Huerta-de la Peña, A., Morales-Jiménez, J., Hernández-Anguiano, A. M. y Muñoz-Reyes, É. (2018). Sistema de producción del cilantro en Puebla y su impacto en la inocuidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(4), 773-786. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/1395/1228>
- Totton, S. C., O'connor, A. M., Naganathan, T., Martinez, B. A. F., Vriezen, E. R., Torrence, M. E. y Sargeant, J. M. (2021). A scoping review of the detection, epidemiology, and control of *Cyclospora cayetanensis* with an emphasis on produce, water, and soil. *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268821000200>
- UAH y Herráez, A. (2021). *Resolución de problemas*. Biomodel. <https://biomodel.uah.es/an/plasmido/0/probl.htm>
- Vázquez Tsuji, O., Jiménez Domínguez, R., Martínez Barbabosa, I., Ruiz Hernández, A. y García Yáñez, Y. (1997). Frecuencia de *Cryptosporidium*, *Cyclospora* y *Enterocytozoon*. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 44(2), 79-84. <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=16162>
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Kovacs-Nace, E., Wallace, S. y Eberhard, M. L. (1997). Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. *Journal of clinical microbiology*, 35(3), 730-733. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.3.730-733.1997>
- Zambrano, J. (2022, 6 de octubre). *BUAP: Puebla es tercer productor de hortalizas en el país - Grupo Milenio*. Milenio. <https://www.milenio.com/politica/comunidad/buap-puebla-es-tercer-productor-de-hortalizas-en-el-pais>
- Zhu, H., Kim, B. J., Spizz, G., Rothrock, D., Yasmin, R., Arida, J., Grocholl, J., Montagna, R., Schwartz, B., Trujillo, S. y Almeria, S. (2023). Development and Evaluation/Verification of a Fully Automated Test Platform for the Rapid Detection of *Cyclospora cayetanensis* in Produce Matrices. *Microorganisms*, 11(11), 2805. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11112805>