

**OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA RECUPERACIÓN DE  
OOQUISTES Y DETECCIÓN DE ADN DE *Cyclospora cayetanensis* EN  
*Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) POR  
PCR**

**Autor:**

**Estefanía Buitrago López B.Sc**

**Tutora:**

**Fabiana María Lora Suárez Lic. Biol. Msc. PhD.**

**Co-Tutor:**

**Jorge Enrique Gómez Marín MD. PhD.**

**“Trabajo de grado de Maestría presentado como requisito parcial para  
optar al título de Magister en Ciencias Biomédicas”**

**Universidad del Quindío**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Maestría en Ciencias Biomédicas**

**Julio 2022**

## RESUMEN

La infección por *Cyclospora cayetanensis* es una causa emergente e importante de diarrea endémica y epidémica en niños y adultos en el mundo. La epidemiología de la infección no es del todo conocida. Los humanos parecen ser los únicos hospedadores naturales de *Cyclospora cayetanensis*; actualmente no existen evidencias de transmisión zoonótica y permanece sin determinar el papel que desempeñan los animales como reservorios naturales. Hasta la fecha *Cyclospora cayetanensis* se considera como un coccidio transmitido por agua y alimentos. Sin embargo, no se conoce la importancia relativa de las diferentes fuentes y rutas de transmisión de este parásito.

Existen técnicas que se utilizan para la detección de parásitos en alimentos, las cuales varían considerablemente en la recuperación. Un método debe permitir liberar los parásitos sin destruirlos y hacer posible su identificación por morfología y pruebas moleculares. El **objetivo** de este trabajo fue optimizar una prueba molecular para la detección de ADN de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) (lechuga y repollo). **Materiales y métodos:** se realizó previamente un conteo de 5, 10 y 50 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* con el fin de inocular las muestras de *Lactuca sativa* & *Brassica oleracea* por triplicado. A continuación, se llevó a cabo el método de recuperación de los ooquistes a través de una agitación mecánica y del uso de dos extractantes: Glicina 1M pH: 5,5 y Solución de lavado pH: 3,5 posteriormente se realizó una coloración *Ziehl-Neelsen* modificada a cada una de las muestras recuperadas y se observaron por microscopía. Finalmente, para establecer el límite de detección de la prueba molecular por PCR se realizaron inoculaciones a las muestras vegetales a partir de una mínima concentración de ooquistes hasta lograr la detección de ADN de *Cyclospora cayetanensis* en estas matrices vegetales. **Resultados:** se obtuvieron los porcentajes de recuperación para cada una de las muestras inoculadas a diferentes concentraciones de

ooquistes, *Lactuca sativa* a partir de 5 ooquistes: 60%; a partir de 10 ooquistes: 53,3%; a partir de 50 ooquistes: 41,3% y en *Brassica oleracea* a partir de 5 ooquistes: 33,3%; a partir de 10 ooquistes: 33,3% y a partir de 50 ooquistes: 28%. Finalmente se estableció el límite de detección de la prueba por PCR en las muestras vegetales a partir de 10 ooquistes cuando estas fueron inoculadas experimentalmente. **Conclusión:** se optimizó un método eficiente para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) (lechuga y repollo), además se establecieron las mejores condiciones para la detección de ADN de *Cyclospora cayetanensis* a través de la técnica molecular PCR.

Palabras clave: *Cyclospora cayetanensis*, PCR, lechuga, repollo.

### Abstract

*Cyclospora cayetanensis* infection is an emerging and important cause of endemic and epidemic diarrhea in children and adults worldwide. The epidemiology of the infection is not fully understood. Humans appear to be the only natural hosts for *Cyclospora cayetanensis*; There is currently no evidence of zoonotic transmission and the role of animals as natural reservoirs remains undetermined. To date, *Cyclospora cayetanensis* is considered to be a waterborne and foodborne coccidia. However, the relative importance of the different sources and routes of transmission of this parasite is not known.

There are techniques that are used to detect parasites in food, which vary considerably in recovery. A method should allow parasites to be released without destroying them and make their identification possible by morphology and molecular tests. The **objective** of this work was to optimize a molecular test for the detection of *Cyclospora cayetanensis* DNA in plant samples of *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) (lettuce and cabbage). **Materials and methods:** 5, 10 and 50 oocysts of *Cyclospora cayetanensis* were previously counted in order to inoculate the *Lactuca sativa* & *Brassica oleracea* samples in triplicate. Next, the oocyst recovery method was carried out through mechanical stirring and the use of two extractants: Glycine 1M pH: 5.5 and Washing solution pH: 3.5, subsequently, a Ziehl-Neelsen modified staining was carried out. To each of the recovered samples and observed by microscopy. Finally, to establish the detection limit of the molecular test by PCR, plant samples were inoculated from a minimum concentration of oocysts until the detection of *Cyclospora cayetanensis* DNA in these plant matrices. **Results:** the recovery percentages were obtained for each of the samples inoculated at different concentrations of oocysts, *Lactuca sativa* from 5 oocysts: 60%; from 10 oocysts: 53.3%; from 50 oocysts: 41.3% and in *Brassica oleracea* from 5 oocysts: 33.3%; from 10 oocysts: 33.3% and from 50 oocysts: 28%. Finally, the detection limit of the PCR test was

established in plant samples from 10 oocysts when these were experimentally inoculated. **Conclusion:** An efficient method for the recovery of *Cyclospora cayetanensis* oocysts in plant samples of *Lactuca sativa* var. Iceberg (L) & *Brassica oleracea* var. Capitata (L) (lettuce and cabbage), in addition, the best conditions were established for the detection of *Cyclospora cayetanensis* DNA through the molecular PCR technique.

Keywords: *Cyclospora cayetanensis*, PCR, lettuce, cabbage.

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero que estas cortas líneas sirvan para expresar mis más profundos agradecimientos a mi madre Gloria Inés López Doncel por ser la responsable de mis éxitos, por haberme dado el mejor ejemplo de tenacidad, confianza y fortaleza, con su esfuerzo constante y sus consejos ha conseguido mantenerme en pie, luchando y perseverando para lograr alcanzar mis metas y enseñarme a ser una mujer íntegra. Sin olvidar a todos los miembros que conforman mi familia por ser las personas que me han brindado todo su amor y apoyo.*

*Quiero agradecer sinceramente a las personas que compartieron su conocimiento conmigo durante el desarrollo de esta maestría, a mis docentes que hicieron posible la conclusión de esta tesis y a mis compañeros que hicieron parte importante en este caminar. A mi tutora Fabiana María Lora Suarez y al Doctor Jorge Enrique Gómez Marín quienes fueron mi guía a lo largo de esta investigación, además de haberme brindado la oportunidad de participar en diferentes proyectos junto a ellos.*

*Ofrezco mis más sinceros agradecimientos a todo el equipo de trabajo del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, al grupo de investigación GEPAMOL y GYMOL, en especial al equipo de trabajo de la línea Protozoos de transmisión alimentaria e hídrica y su presencia en medio ambiente de alta montaña por brindarme las herramientas, el espacio y por todas las sugerencias en todos los procedimientos metodológicos de este trabajo de grado.*

*Extiendo un agradecimiento al Departamento de salud pública de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia, en especial a la Doctora Myriam Consuelo López por la donación de los ooquistes para la realización de todos los ensayos experimentales que se ejecutaron en este proyecto.*

*A mis jurados muchísimas gracias por haber aceptado ser parte de la revisión de esta tesis de grado de maestría.*

*Quiero agradecer también a la Doctora Olga Alicia Nieto quien con su diligencia ha hecho que mi experiencia de estudiante a lo largo de la maestría haya sido excelente además de enriquecedora.*

*Son muchos los colegas que han formado parte de mi vida profesional a los que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía, quiero darles las gracias por formar parte de mí y por sus buenos deseos.*

*Infinitas gracias a mi alma mater la Universidad del Quindío, quien me abrió las puertas desde el momento que me vincule como estudiante y me acogió como un miembro más de la familia unquindiana, brindándome los espacios para hacer lo que nos apasiona tanto en este maravilloso mundo de la ciencia.*

*Finalmente quiero agradecer al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación-MINCIENCIAS, pues a través de su financiación hizo posible el desarrollo y la culminación de este proyecto.*

*A todos ustedes mis más sinceros agradecimientos.*

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Generalidades de la biología de <i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	4
2.2 Ciclo de vida.....	5
2.3 Taxonomía.....	6
2.4 Diagnóstico.....	7
2.5 Prevalencia.....	7
2.6 Distribución ambiental y transmisión.....	7
2.6.1 Agua.....	8
2.6.2 Alimentos.....	9
2.6.3 Suelos.....	10
2.6.4 Aire.....	11
2.7 Importancia Médica.....	11
2.8 Métodos de recuperación en alimentos.....	13
2.9 Detección de ADN de <i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	14
3. ESTADO DEL ARTE.....	16
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo General.....	18
4.2 Objetivos Específicos.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Área de estudio y aspectos bioéticos de la investigación.....	19
5.2 Obtención de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	20
5.2.1 Obtención de muestras vegetales.....	20
5.2.2 Inoculación experimental de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> en muestras vegetales (Lechuga y Repollo).....	21
5.2.3 Método de recuperación para ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> en muestras vegetales (Lechuga y Repollo).....	22
5.2.4 Agitación mecánica.....	22
5.2.5 Concentración de muestras por el método Formol-Éter... ..	22
5.2.6 Tinción <i>Ziehl-Neelsen</i> modificada.....	23
5.2.7 Microscopía óptica.....	24
5.2.8 Fórmula porcentaje de recuperación.....	24
5.3 Extracción de ADN de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	

24	
5.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ..... 27
5.4.1	Diseño de plásmido (control positivo de <i>Cyclospora cayetanensis</i> ) ..... 28
5.4.1.1	Competencia y transformación de <i>E. coli OneShot® Top 10</i> ..... 29
5.4.1.2	Extracción y purificación de plásmido ..... 30
5.5	Límite de detección de la prueba por PCR en las muestras vegetales de <i>Lactuca sativa</i> var. <i>Iceberg</i> (L) & <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> (L) inoculadas experimentalmente ..... 30
6.	RESULTADOS..... 32
6.1	Conteo de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> a partir de la muestra control..... 32
6.2	Inoculación experimental de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> en muestras vegetales (Lechuga y Repollo) ..... 33
6.3	Método de recuperación para ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> en muestras vegetales (Lechuga y Repollo) ..... 34
6.3.1	Detección de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> en <i>Lactuca sativa</i> var. <i>Iceberg</i> (L) (Lechuga)..... 36
6.3.2	Detección de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> en <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> (L) (Repollo) ..... 36
6.3.3	Registro fotográfico de los ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> recuperados en las diferentes muestras ..... 37
6.4	Extracción de ADN de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> ..... 37
6.5	Selección de primers..... 39
6.5.1	Condiciones de temperatura según el Tm del diseño de los primers..... 39
6.5.2	Blast NCBI (Nucleotide)..... 40
6.6	Plásmido (control positivo de <i>Cyclospora cayetanensis</i> ).. 41
6.6.1	Transformación y clonación <i>E. coli One Shot Top10</i> ..... 41
6.6.2	Extracción, purificación y PCR del plásmido control en <i>E. coli One Shot Top 10</i> ..... 43
6.7	Límite de detección de la prueba por PCR en las muestras vegetales de <i>Lactuca sativa</i> var. <i>Iceberg</i> (L) & <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> (L) inoculadas experimentalmente..... 44
6.7.1	Especificidad de la prueba por PCR para <i>Cyclospora</i>

<i>cayetanensis</i> .....	46
7. DISCUSIÓN .....	47
8. CONCLUSIONES .....	52
9. RECOMENDACIONES .....	52
10. SOCIALIZACIÓN EN EVENTOS CIENTÍFICOS .....	53
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
12. ANEXOS .....	62

## Índice de figuras

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Cyclospora cayetanensis*. Ooquistes no esporulados se diferencian dentro de ooquistes esporulados, que se someten al proceso de exquistación. Esporozoítos infectan las células para formar merozoítos de tipo I y éstas forman merozoítos tipo II. El microgametocito fase sexual fertiliza el macrogametocito para convertirse en un cigoto y por lo tanto para diferenciar como un ooquiste esporulado. Tomado de Ortega, 2018.....Página 6
- Figura 2.** Esquema de actividades propuestas para el desarrollo del proyecto.....Página 19
- Figura 3.** Representación gráfica de la inserción de la secuencia en el vector **pUC57**. Plasmid Construct Map. *GeneScript* USA.....Página 29
- Figura 4.** Esquema general de la inoculación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (lechuga y repollo).....Página 34
- Figura 5.** Esquema general del método de recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (lechuga y repollo).....Página 35
- Figura 6.** Ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, teñidos por la coloración *Ziehl-Neelsen* modificada. Observación en microscopio óptico en objetivo 100X posterior al método de recuperación planteado en este trabajo. Se realizó confirmación del registro fotográfico por un experto en parasitología.....Página 37

- Figura 7.** Secuencia del primer *Forward* para la sub unidad ribosomal 5.8S de *Cyclospora cayetanensis*. Homología del 100% específica para esta especie.....Página 40
- Figura 8.** Secuencia del primer *Reverse* para la sub unidad ribosomal 5.8S de *Cyclospora cayetanensis*. Homología del 100% específica para esta especie.....Página 40
- Figura 9.** Esquema de la obtención del plásmido control positivo de *Cyclospora cayetanensis*.....Página 41
- Figura 10 (A).** *E. coli One Shot Top10* para crecimiento y transformación en células competentes **(B).** *E. coli One Shot Top 10* competentes y transformadas.....Página 42
- Figura 11.** Esquema de extracción y purificación del plásmido control de *Cyclospora cayetanensis*.....Página 43
- Figura 12.** Confirmación de la obtención del plásmido control positivo para *Cyclospora cayetanensis*. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 3:** control negativo de la extracción y purificación del plásmido, **Pozo 4:** control negativo de la PCR, **Pozo 5:** producto de extracción y purificación del plásmido (ADN control de *Cyclospora cayetanensis*).....Página 44
- Figura 13.** Las imágenes A, B y C corresponden a geles de agarosa al 1,5%. En cada uno de ellos se corrieron los productos de amplificación de tres PCR realizadas a partir de extracciones de ADN luego de la recuperación de inoculaciones a partir de 10 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras de ***Lactuca sativa var. Iceberg (L)***. Los controles y las condiciones

en que se obtuvieron cada uno de los productos en cada uno de los pozos, son como se indican a continuación. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 2:** control negativo de la PCR, **Pozo 3:** control positivo de la PCR, **Pozo 5:** control negativo de la extracción de ADN. **Pozo 6:** producto de extracción de ADN a partir de la muestra recuperada en este caso de la matriz de Lechuga (inoculación a partir de 10 ooquistes).....Página 45

**Figura 14.** Las imágenes A, B y C corresponden a geles de agarosa al 1,5%. En cada uno de ellos se corrieron los productos de amplificación de tres PCR realizadas a partir de extracciones de ADN luego de la recuperación de inoculaciones a partir de 10 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras de ***Brassica oleracea* var. *Capitata* (L)**. Los controles y las condiciones en que se obtuvieron cada uno de los productos en cada uno de los pozos, son como se indican a continuación. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 2:** control negativo de la PCR, **Pozo 3:** control positivo de la PCR, **Pozo 4:** control negativo de la extracción de ADN. **Pozo 5:** producto de extracción de ADN a partir de la muestra recuperada en este caso de la matriz de Repollo (inoculación a partir de 10 ooquistes).....Página 46

**Figura 15.** Gel de agarosa al 1,5%. Producto de PCR posterior a evaluar reacción cruzada de la técnica molecular para *Cyclospora cayetanensis*. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 4:** control negativo de la PCR, **Pozo 5:** control positivo de la PCR, **Pozo 6:** ADN control de *Cryptosporidium parvum*, **Pozo 7:** ADN control de *Blastocystis* sp, **Pozo 8:** ADN control de *Giardia* sp, **Pozo 9:** ADN control de *Toxoplasma gondii*.....Página 47

**Figura 16.** (1) Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* no esporulado. (2) Posible representación esquemática de las paredes del ooquiste de

*Cyclospora cayetanensis*, **OW**, pared exterior; **IW**, pared interior. Tomado de Lainson & Ortega, 2015.....Página 50

**Figura 17.** Gel de Agarosa 1,5%. Resultado de PCR, diluciones seriadas de ADN control de *Cyclospora cayetanensis*, del pozo **3** al pozo **8** banda de ADN con un amplificado de 116 pb. **Pozo 1:** marcador de peso, **Pozo 2:** control negativo de la PCR, **Pozo3:** amplificado dilución correspondiente a 100.000 copias de ooquistes, **Pozo 4:** amplificado dilución correspondiente a 10.000 copias de ooquistes, **Pozo 5:** amplificado dilución correspondiente a 1.000 copias de ooquistes, **Pozo 6:** amplificado dilución correspondiente a 100 copias de ooquistes, **Pozo 7:** amplificado dilución correspondiente a 10 copias de ooquistes, **Pozo 8:** amplificado dilución correspondiente a 5 copias de ooquistes, **Pozo 9:** amplificado dilución correspondiente a 1 copia de ooquiste.....Página 64

## Índice de tablas

- Tabla 1.** Ensayos basados en la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales.....Página 14
- Tabla 2.** Ensayos basados en la detección y caracterización molecular por PCR de *Cyclospora cayetanensis*.....Página 15
- Tabla 3.** Condiciones estandarizadas durante la etapa de lisis mecánica de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.....Página 25
- Tabla 4.** Componentes de mezcla para la implementación de la técnica molecular PCR.....Página 27
- Tabla 5.** Condiciones evaluadas para la técnica molecular PCR para la amplificación de ADN control de *Cyclospora cayetanensis* (Lalonde *et al.*, 2008).....Página 27
- Tabla 6.** Conteo de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* a partir de la muestra control.....Página 32
- Tabla 7.** Volúmenes específicos de la muestra control para la inoculación de las formas parasitarias en las muestras vegetales a partir de las diferentes concentraciones de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.....Página 33
- Tabla 8.** Comparación de las condiciones optimizadas para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales de *Lactuca sativa* & *Brassica oleracea*.....Página 35
- Tabla 9.** Porcentajes de recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* a partir de las muestras vegetales inoculadas en diferentes concentraciones.....Página 37

**Tabla 10 (A).** Cuantificaciones obtenidas a partir de la extracción de ADN de **10 ooquistes** de *Cyclospora cayetanensis* (cuantificación y pureza de ADN: 260nm/280nm).....Página 38

**Tabla 10 (B).** Cuantificaciones obtenidas a partir de la extracción de ADN de **50 ooquistes** de *Cyclospora cayetanensis* (cuantificación y pureza de ADN: 260nm/280nm).....Página 38

**Tabla 11.** Síntesis de las condiciones seleccionadas para la lisis mecánica de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* durante las extracciones de ADN.....Página 39

**Tabla 12.** Secuencia de primers de la región ribosomal 5.8S de *Cyclospora cayetanensis*. **Gene Length: 116 pb**.....Página 39

## Índice de anexos

- Anexo 1:** Diluciones seriadas de ADN control de *Cyclospora cayetanensis*,  
**Anexo 1.1** Tamaño del genoma de *Cyclospora cayetanensis*, **Anexo 1.2**  
Calculo de la masa del ADN por genoma (*Cyclospora cayetanensis*).....Página 62
- Anexo 2:** para la confirmación de las formas parasitarias de *Cyclospora cayetanensis* que se evidenció durante el registro fotográfico cuando se realizaron las recuperaciones de las muestras de alimentos reportadas en el desarrollo de esta investigación, se tuvo la oportunidad de participar en el Curso de Actualización en Identificación de Parásitos en Alimentos y Muestras Ambientales dirigido por la Doctora Ynes Ortega. De esta manera se determinó la presencia de los ooquistes recuperados en cada muestra reportada.....Página 65
- Anexo 3:** participación de resultados en muestras de campo, para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* y su detección de ADN en matrices vegetales.....Página 66

### Lista de abreviaciones

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**IFA:** test de diagnóstico rápido por inmunofluorescencia.

**EPTA:** enfermedades parasitarias transmitidas por alimentos.

**EPA:** Environmental protection agency (EE.UU)

## 1. INTRODUCCIÓN

Generalmente, los vegetales se consumen crudos, proporcionando mayor cantidad de vitaminas, minerales y fibra dietética, por lo que se han considerado un grupo importante para el mantenimiento de la salud humana, pero también se ha demostrado que constituyen un vehículo de transmisión de una amplia gama de parásitos, entre los cuales se encuentran protozoarios y helmintos (1). Los vegetales pueden ser contaminados durante su producción si son regados con agua residual no tratada y utilizando como fertilizante el estiércol, que es una práctica común en algunas regiones de los países en desarrollo (2). Otro motivo por el cual se ve favorecida la aparición de protozoos parásitos en alimentos, es mediante el cambio en los hábitos alimenticios, el comercio mundial de alimentos, los cambios en los sistemas de producción de alimentos y el aumento del número de personas sensibles (3).

La seguridad de los vegetales crudos depende de las condiciones y medidas tomadas durante la pre-cosecha, cosecha y post-cosecha, lo que contribuye sumado a las técnicas de desinfección y manipulación a la calidad final de las ensaladas crudas preparadas con éstos. Un factor elemental relacionado con la calidad final de los vegetales preparados son las técnicas utilizadas de lavado y de desinfección. Si no se realizan adecuadamente, las formas viables de los parásitos intestinales pueden persistir y llegar hasta el consumidor. Ahora bien, varios estudios internacionales, han dado a conocer la presencia de formas viables de parásitos intestinales en los vegetales crudos (4) que se encuentran disponibles para el consumo en mercados y otros establecimientos, así como también se ha comprobado, a través del análisis de indicadores de contaminación fecal (5), la existencia frecuente de contaminación en ensaladas de ventas callejeras, cafeterías, restaurantes de comida rápida y hospitales (6).

Las infecciones parasitarias transmitidas por alimentos más frecuentes que producen diarrea son la ciclosporiasis, criptosporidiosis y la giardiasis. Sin embargo, otros protozoos parásitos que se transmiten a través de estos alimentos y que causan infecciones en humanos son *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli*, *Blastocystis hominis*, *Balantidium coli*, *Acanthamoeba* spp., *Sarcocystis* spp. y *Naegleria* spp. Entre el 2004 y 2016, se publicaron 199 informes de brotes de parásitos protozoarios transmitidos por alimentos, de los cuales *Cyclospora cayetanensis* es responsable del 20,2% (6).

La ciclosporiasis es una enfermedad intestinal causada por el parásito microscópico *Cyclospora cayetanensis*. Las personas que viven en países donde la ciclosporiasis es endémica o que viajan a esos lugares pueden tener un riesgo mayor de infección. El tiempo que tarda una persona en enfermarse después de infectarse es generalmente cerca de una semana. Los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* llegan hasta las células epiteliales del tracto gastrointestinal y suele causar diarrea muy líquida. Las principales vías de transmisión incluyen el consumo de agua y alimentos contaminados como las frutas y vegetales frescos, de persona a persona y a través de la vía fecal-oral (7).

Hasta la fecha se ha esclarecido que las técnicas empleadas para la determinación de parásitos en vegetales son costosas, por lo que se aplican generalmente en países desarrollados (8). Estas técnicas demuestran un aumento en la sensibilidad y especificidad, como el desarrollo de un método estándar para el lavado mediante la sonicación y observación de quistes u ooquistes mediante inmunofluorescencia (IFA) y el uso de anticuerpos monoclonales. No obstante, autores como Robertson y otros consideran que aun estas técnicas no son óptimas puesto que no son reproducibles en las diferentes matrices vegetales; y describen un método mejorado donde incluyen el proceder inmunomagnético durante el lavado (9).

Por lo tanto, es necesario contar con métodos de detección alternos, económicos, prácticos y fiables para el seguimiento de los productos alimenticios que ayudarán a la prevención de enfermedades parasitarias asociadas con la producción de estos alimentos en las diferentes partes del mundo.

Sin embargo el diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis* depende básicamente de la identificación del microorganismo en muestras coprológicas de individuos humanos; no obstante, se ha demostrado que la microscopía no es suficiente para la detección de protozoos en muestras ambientales, debido a su bajo porcentaje de recuperación, es por ello que en esta investigación se plantea la necesidad de diseñar métodos más sensibles como la técnica molecular PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para su detección y diagnóstico.

## 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de la biología de *Cyclospora cayetanensis*

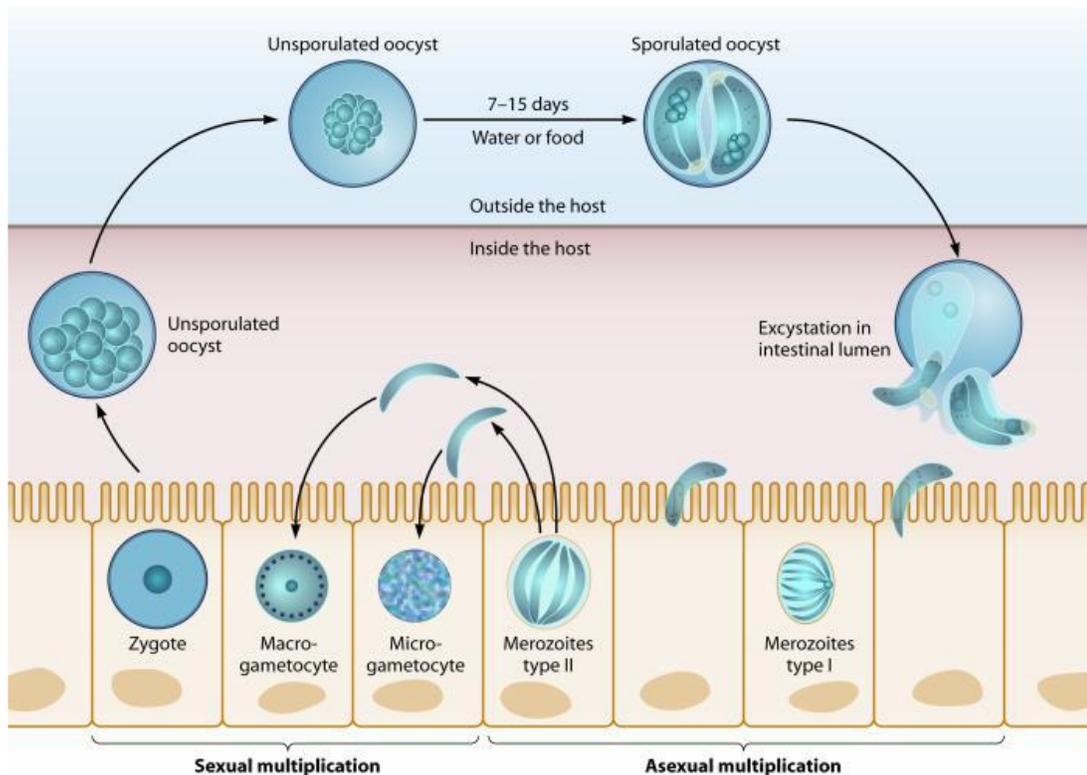
La ciclosporiasis es una enfermedad gastroentérica emergente causada por el parásito intestinal *Cyclospora cayetanensis*. Se considera una enfermedad emergente para la salud pública principalmente en los países desarrollados donde ha sido identificado como la causa de varios brotes de diarrea en Norte América y Europa (10). En estos países la transmisión de esta enfermedad ha estado relacionada principalmente por alimentos importados que dependen del comercio de productos agrícolas. La epidemiología, biología y ecología de *Cyclospora cayetanensis* permanecen poco conocidas. Su ciclo de vida no está totalmente caracterizado y parece requerir un huésped único, el humano para completarse. El papel que los animales puedan desempeñar como reservorios naturales del parásito permanece sin determinar. Se tiene poca información sobre la distribución ambiental de *Cyclospora cayetanensis* y los vehículos de transmisión del ambiente a los humanos (11).

El agua, los alimentos y los suelos contaminados pueden actuar como vehículos de diseminación del coccidio. Por tanto, permanecen incertidumbres significativas sobre el parásito, que reflejan la necesidad de continuar con esfuerzos de investigación en diversas áreas, incluyendo su biología básica y distribución ambiental (11). Los estudios basados en la población general indican altos porcentajes de infecciones asintomáticas, lo cual sugiere inmunidad al desarrollo de la enfermedad por exposición persistente al coccidio. Para comprender la epidemiología compleja de la ciclosporiasis humana y poder tomar medidas de prevención y control de la infección, es de suma importancia el conocimiento de los rasgos biológicos de *Cyclospora cayetanensis* (12). *Cyclospora cayetanensis* difiere en forma significativa de las otras especies de *Cyclospora* descritas, no sólo en su huésped específico, sino también en la morfología de sus ooquistes, que son más pequeños y

esféricos en lugar de la forma sub esférica que tienen los ooquistes de las otras especies conocidas (13).

## 2.2 Ciclo de vida

El ciclo vital es complejo y sigue el modelo de desarrollo de otros coccidios entéricos, el cual involucra un ciclo merogónico con dos generaciones de merontes, un ciclo gametogónico con macrogametos, micro-gametos y cigotos, y un ciclo esporogónico. La **Figura 1** representa el esquema del ciclo vital de *Cyclospora cayetanensis*, de acuerdo con el *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, de Estados Unidos. Éste comienza con la ingestión del estado infeccioso, transmisible, el ooquiste esporulado, que se desenquista en el intestino y libera cuatro esporozoítos. Éstos invaden las células epiteliales del intestino delgado y generan varios merozoítos que infectan una nueva célula. Éstos mediante división asexual por merogonia, forman los merontes que contienen los merozoítos. Se originan dos tipos de merontes. El de tipo I, que contiene de 8 a 12 merozoítos, los cuales penetran las células epiteliales y forman los merontes de tipo II, que contienen cuatro merozoítos. Una vez liberados, estos penetran otras células y comienza la fase sexual mediante la diferenciación en estados masculinos (microgametocitos) o femeninos (macrogametocitos) (14) (15) (16).



**Figura 1.** Esquema del ciclo vital de *Cyclospora cayetanensis*, de acuerdo con el *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, de Estados Unidos. Ooquistes no esporulados se diferencian dentro de ooquistes esporulados, que se someten al proceso de excystation. Esporozoítos infectan las células para formar merozoítos de tipo I y éstas forman merozoítos tipo II. El microgametocito fase sexual fertiliza el macrogametocito para convertirse en un cigoto y por lo tanto para diferenciar como un ooquiste esporulado. Tomado de Ortega, 2010.

### 2.3 Taxonomía

El género *Cyclospora* pertenece al phylum Apicomplexa, clase *Sporozoa*, subclase Coccidia. Está relacionado taxonómicamente a otros cuatro géneros de coccidias que han sido descritos como patógenos en humanos: *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Toxoplasma* y *Sarcocystis*. La especie *Cyclospora cayetanensis* fue sugerida por Ortega (14) (15) (16).

## 2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de ciclosporiasis se basa en la búsqueda directa de ooquistes en muestras de materia fecal por medio de examen directo, concentración con formol éter, coloración de *Zielh Neelsen* modificada y auto fluorescencia empleando filtros dicromáticos de 365 nm y 450 a 490 nm, para observar la fluorescencia azul o verde, respectivamente (16) (17).

## 2.5 Prevalencia

Aunque no existe un estudio de prevalencia de ciclosporiasis en el mundo, en Perú ha sido informada en el 18 % de los niños menores de dos años, Nepal 3 al 7 % en población general y en Haití 11 % de los pacientes VIH positivos. Además, se han documentado casos en Alemania, Brasil, Cuba, Venezuela, Estados Unidos, Canadá e Indonesia, entre otros, asociados a fuentes de infección como abastecimientos de agua, frambuesas, frutas, verduras y moluscos. Hasta la fecha en Colombia solo se han informado casos aislados y no se conocen estudios sistemáticos con relación a brotes epidémicos causados por este parásito (18) (19).

## 2.6 Distribución ambiental y transmisión

Se tiene muy poca información sobre la distribución ambiental de *Cyclospora cayetanensis* y los vehículos de transmisión del coccidio del ambiente a los humanos. El agua, los alimentos y los suelos pueden actuar como vehículos de transporte de este parásito (19).

En áreas endémicas, los factores de riesgo asociados con la infección incluyen el agua o alimentos contaminados, contacto con suelo o animales, tipo de saneamiento y nivel socioeconómico bajo. Las infecciones relacionadas con el contacto con el suelo brindan razones para creer que esta ruta de propagación puede ser más común que la realizada en entornos comunitarios desfavorecidos. *Cyclospora cayetanensis* es una causa importante de diarrea y numerosos brotes de origen alimentario asociados con la globalización del

suministro de alimentos (19) (20).

La implementación de medidas para prevenir o controlar la propagación de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en el medio ambiente es fundamental. En áreas endémicas, los pasos más importantes para prevenir la infección son mejorar el saneamiento ambiental y la educación para la salud. Sin embargo, quedan interrogantes significativos en nuestra comprensión de la epidemiología de la ciclosporiasis humana que destacan la necesidad de continuar la investigación en varios aspectos sobre esta especie (19) (20).

### **2.6.1 Agua**

En relación con el ecosistema acuático, se ha detectado el coccidio en varias regiones. En áreas rurales de Guatemala, se investigó la presencia de *Cyclospora cayetanensis* en varias fuentes de agua usadas para el consumo público. En tres de cinco muestras de agua, se confirmó la presencia del parásito mediante la técnica de PCR. En Perú, el coccidio se identificó en fuentes de agua no tratada. En Nepal, Asia, se observaron ooquistes de *Cyclospora* spp. en agua de consumo, lo cual se asoció a una epidemia de la infección en soldados extranjeros. En Vietnam, el parásito se describió en agua de consumo y en un 63,6 % de muestras de ríos y lagos estudiadas. En Egipto y África, el coccidio fue aislado, en cinco áreas residenciales, de varias fuentes de agua usadas para el consumo, tales como un drenaje, un canal de irrigación, aguas subterráneas y agua almacenada en toneles. Las altas densidades de los ooquistes en las aguas indicaron contaminación por aguas para consumo humano y reflejan la alta contaminación ambiental por *Cyclospora cayetanensis* en el área. En otro estudio, el parásito se identificó en 0,24 % de 840 muestras de agua potable de siete distritos (21). En Alejandría, el coccidio se identificó en diferentes fuentes de agua, incluyendo piscinas (22) (23).

Los papeles que desempeñan el ecosistema marino y las aguas provenientes

de la tierra en la presencia y el mantenimiento de este parásito en huéspedes marinos, no se conocen. Sin embargo, la presencia del coccidio en bivalvos sugiere que el uso del mar para fines recreativos es un factor de riesgo potencial para la ciclosporiasis (23).

En el mundo industrializado, se han reportado algunas epidemias de la infección asociadas con el agua (23). *Cyclospora cayetanensis* ha sido el agente causal de 1,8 % (6/325) de las epidemias en el mundo ocasionadas por protozoarios.

### **2.6.2 Alimentos**

En el mundo *Cyclospora cayetanensis* se ha descrito en frutas y alimentos frescos; en 1,8 % de las muestras de vegetales estudiadas de mercados en Perú, en lechugas de mercados de productos agrícolas de Costa Rica y Venezuela (24). En Egipto, *Cyclospora cayetanensis* se aisló de lechugas y bivalvos (25) obtenidos de mercados de Alejandría. En un estudio de viajeros a áreas endémicas, afectados de diarrea, las fresas, la leche de búfala y el seviche se identificaron como factores de riesgo para la infección en cuatro casos (26). En Indonesia, México y Guatemala (27), se han descrito epidemias de ciclosporiasis relacionadas con el consumo de frutas, vegetales y jugos de frambuesas.

La creciente globalización de productos alimenticios frescos y de los viajes internacionales y la tendencia a comer fuera del hogar, han contribuido a la diseminación del parásito de regiones endémicas a las no endémicas. En los Estados Unidos y Canadá, han ocurrido numerosas epidemias de ciclosporiasis de alto perfil, debidas al consumo de frambuesas contaminadas importadas de Guatemala (28). Otras epidemias en estos países y en Europa se han relacionado con el consumo de lechugas, albahaca, vegetales verdes y guisantes (29). En los Estados Unidos, el 90% de los casos de ciclosporiasis se han asociado con el consumo de alimentos (30).

### 2.6.3 Suelos

No se han realizado estudios para determinar la presencia de *Cyclospora cayetanensis* en los suelos. Sin embargo, el contacto con éstos se ha señalado como un factor de riesgo para la infección, tanto en los países industrializados como en aquéllos en desarrollo. En los primeros, en un estudio de una epidemia de ciclosporiasis en Florida, Estados Unidos, los trabajos de jardinería se asociaron con la infección, lo cual sugiere el contacto con la tierra como un factor de riesgo (31). En Alemania, una epidemia se relacionó con lechugas provenientes de granjas francesas e italianas. Se consideró que los ooquistes pudieron haber sido transmitidos por trabajadores oriundos de áreas endémicas, por medio del contacto con el suelo local o con el agua (32). En áreas endémicas, el notorio aumento de la densidad de la población y la migración masiva de áreas rurales a urbanas en las últimas décadas, han significado la construcción de centros urbanos sin ninguna planificación, lo cual ha traído como consecuencia el hacinamiento, falta de saneamiento ambiental, disposición inadecuada de basuras y poca educación sanitaria. En estos ambientes, la contaminación de los suelos por prácticas inadecuadas de defecación podría ser un factor determinante para la infección, como fue el caso en una comunidad isleña venezolana (33). En este estudio diseñado para determinar las fuentes de infección de *Cyclospora cayetanensis* en la isla de San Carlos y estado Zulia, el modelo de regresión logística multivariable implicó significativamente varios factores: vivir en áreas de extrema pobreza, residir en ranchos, defecar en un área del patio de la residencia y tener contacto con suelos contaminados con heces humanas ( $p < 0,01$ ). El hallazgo más importante de este estudio fue la alta correlación de la ciclosporiasis con ambientes conducentes a la contaminación ambiental con heces humanas ( $p < 0,01$ ), lo cual sugiere que los suelos contaminados son un importante vehículo de diseminación de la infección en esta área, que la tierra puede ser una fuente significativa de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en comunidades paupérrimas y que la ciclosporiasis, como las otras infecciones

transmisibles, afecta principalmente a las familias que viven en residencias con características por debajo del estándar.

#### **2.6.4 Aire**

La presencia de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en el aire y la posibilidad de su diseminación por medio de este vehículo se desconoce. Sin embargo, la identificación de los ooquistes en el esputo de dos pacientes con síntomas respiratorios, uno con antecedentes de tuberculosis (34) y otro con la enfermedad (35), sugiere la probabilidad de que el aire pudiera actuar como transporte del coccidio. Habría que determinar con qué frecuencia y bajo cuáles circunstancias ocurre.

No se conoce si *Cyclospora cayetanensis* está ampliamente distribuida en el ecosistema mundial. Sin embargo, todos estos hallazgos sugieren que el parásito tiene una amplia diseminación ambiental en el mundo en desarrollo, contaminando con frecuencia el agua, los alimentos y los suelos, y que posee el potencial de transmitirse por medio de la tierra y del consumo de alimentos frescos y agua, incluyendo la clorada, las aguas de recreación y las aguas servidas.

#### **2.7 Importancia Médica**

Los rasgos biológicos de *Cyclospora cayetanensis* son relevantes para su epidemiología y transmisión determinando su importancia médica y en salud pública:

- Si el parásito tiene especificidad de huésped, siendo los humanos los únicos huéspedes; carece de potencial zoonótico.
- Los ooquistes son eliminados con las heces al exterior en forma inmadura, no esporulados, lo que significa que la transmisión directa de persona a persona es improbable.
- Los ooquistes necesitan esporular en el medio ambiente para hacerse infectivos, por lo que requieren de un vehículo de transmisión.

- La dispersión ambiental de estos organismos puede contaminar el ecosistema acuático, los cultivos de alimentos y los suelos, lo cual conduciría a su diseminación amplia y su transmisión a los humanos por medio de estos vehículos.
- Al parecer, la dosis infecciosa es baja, lo cual implica que la infección se adquiere con facilidad.
- Los ooquistes son pequeños y resistentes al cloro, a las dosis usadas para el tratamiento del agua, lo que implica que son difíciles de filtrar y que se pueden transmitir en el agua clorada de consumo y en las piscinas.
- La notoria estacionalidad de la ciclosporiasis sugiere que los ooquistes son muy resistentes y que pueden sobrevivir por largos períodos en el ambiente.

Hemos visto que las Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Alimentos (EPTA) son las que se originan debido a la ingestión de alimentos y/o agua que contengan agentes parasitarios en cantidades tales como para afectar la salud del consumidor, tanto a nivel individual como grupal. Surgen como consecuencia de diversos fenómenos entre los cuales se incluyen: la urbanización de las poblaciones con saneamiento ambiental insuficiente, la difusión de culturas particulares en relación con los alimentos, las migraciones humanas con desplazamiento de comunidades, la oferta de servicios públicos de venta de alimentos, y esto vinculado con la higiene y el control de quienes preparan los mismos. Todo esto enmarcado en un determinado ambiente ecológico, económico, cultural y epidemiológico (36).

En la actualidad se ha dado mayor importancia al análisis bacteriológico de alimentos, sin embargo, diversos vegetales que generalmente se consumen crudos como el apio, la lechuga, el repollo y otros han sido asociados con brotes epidémicos de diarrea, así también con contaminación de huevos de parásitos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura*, quistes de *Entamoeba*

*histolytica*, *Giardia lamblia*, y virus como hepatitis A, Nolvalk y rotavirus. Otro factor de riesgo de contaminación microbiológica en los vegetales, es el tiempo de supervivencia de los microorganismos patógenos que varía de semanas a meses (37).

Ahora bien, las ensaladas han formado por años parte de la dieta del ser humano, estas consisten en la mezcla de uno o varios vegetales crudos o cocidos, por lo que pueden actuar como vehículo de agentes patógenos (bacterias, helmintos, protozoos y virus), que pueden causar o no una patología (38).

### **2.8 Métodos de recuperación en alimentos**

Las frutas y vegetales frescos constituyen un motivo de preocupación con respecto a la seguridad alimentaria. Existen riesgos biológicos asociados, como contaminantes que se establecen a través de malas prácticas de producción y manipulación, provenientes del suelo, de la aplicación de abono orgánico sin tratar, uso de agua de riego contaminada con materia fecal o la presencia de animales en el campo (39).

Entre los patógenos humanos presentes en los vegetales se encuentran los parásitos, que por la baja dosis infectante y la alta resistencia de las formas quísticas al medio ambiente y a los desinfectantes en las concentraciones habituales que se utilizan para eliminar las bacterias, resaltan la importancia del uso de técnicas eficientes para la determinación de parásitos en los vegetales.

Estudios previos demuestran aumento en la sensibilidad y especificidad para la detección de formas quísticas en muestras de alimentos, sin embargo, muchos de estos procedimientos reportados no son reproducibles en las diferentes matrices vegetales, como bien se mencionaba con anterioridad estas técnicas describen un método donde se incluye procedimientos inmunomagnéticos durante el lavado (40). Además de generar costos muy

altos para el alcance de estas técnicas.

En la **Tabla 1** se reportan los ensayos basados en la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* que hasta la fecha se han notificado en diferentes matrices vegetales. Sin embargo, también se ha demostrado que la recuperación de los ooquistes puede verse interferida por los diferentes extractantes que se utilizan a la hora de la recuperación y remoción de los ooquistes dado que hacen imposible la visualización de los ooquistes, es por esto que la técnica molecular por PCR se convierte en una alternativa viable para la detección de ADN de estos parásitos.

**Tabla 1.** Ensayos basados en la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales.

Referencia	Tipo de muestra:	Tamaño de Muestra:	[ ] Ooquistes:	Solución Extractante:	% Recuperación:
<b>Bartosova et al, 2021 USA</b>	Vegetales verdes	25 gr	Muestras de campo	Detergente: Alconox® 1%	18%
<b>Murphy et al, 2017 USA</b>	Mezcla Vegetales (Lechuga / Repollo)	25 gr	Inoculación experimental (100)	Detergente: Alconox® 1%	20%
<b>Lalonde 2016 Canadá</b>	Mezcla Vegetales (Lechuga)	200 gr	Muestras de campo	Glycine 1M pH: 5.5	1%
<b>Giangasper 2015 Italy</b>	Mezcla Vegetales (Lechuga)	100 gr	Muestras de campo	Tween-80 0.1% Sodium dodecyl sulphate 0.1%	9%
<b>Chandra et al, 2014 Georgia</b>	Albahaca	25 gr	Muestras de campo	Glycine 1M pH: 5.5	44.4%

## 2.9 Detección de ADN de *Cyclospora cayetanensis*

Considerando lo anterior, nace el interés de evaluar la detección de ADN control de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales tales como lechuga y repollo, para esto se requiere de optimizar la técnica molecular PCR que permita la amplificación de la secuencia específica del gen del parásito. En

esta investigación hemos seleccionado un blanco de amplificación: Subunidad ribosomal 5.8S dado que esta secuencia se encuentra reportada como un blanco de amplificación específico para *Cyclospora cayetanensis*.

Lalonde et al. 2008 reportaron que esta secuencia era altamente específica de *Cyclospora cayetanensis* cuando realizaron una comparación con *Eimeria* e *Isospora*, estos dos protozoos presentan una homología con *Cyclospora cayetanensis*, sin embargo, la investigación de estos autores demostró una amplificación única en este protozoo de interés (*Cyclospora cayetanensis*). Además de realizar un alineamiento de estas secuencias con otras especies del género de *Cyclospora* encontrando que solamente la secuencia de la subunidad reportada amplificaba la especie *Cyclospora cayetanensis*.

Una investigación reportada por Jaco et al. 2014 demostró la detección de *Cyclospora cayetanensis* mediante diferentes variaciones de la técnica molecular PCR (ver **Tabla 2**).

**Tabla 2.** Ensayos basados en la detección y caracterización molecular por PCR de *Cyclospora cayetanensis*.

Espece	Método de amplificación	Detección del método	Blanco de amplificación	Tipo de muestra	# de Muestra	% de especificidad y sensibilidad
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Multiplex <i>nested</i> PCR	Electrophoresis	SSU Rdna	Coprológica	1	95% / 95%
	PCR	Electrophoresis	ITS2	Muestras inoculadas artificialmente	5	95% / 95%
	PCR anidada	Electrophoresis	SSU Rdna	Espinaca	1	73% / 73%
	PCR anidada	Electrophoresis	SSU Rdna	Rúcula	1	73% / 73%
	PCR anidada	Electrophoresis	SSU Rdna	Frambuesa	1	95% / 95%

### 3. ESTADO DEL ARTE

La contaminación de alimentos por parásitos es un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en América Latina. Esta región se caracteriza por ser una de las principales fuentes de distribución de frutas y vegetales, dado que distribuye considerables cantidades de estos alimentos a diferentes países del mundo. En Colombia, se ha logrado evidenciar algunos brotes por consumo de alimentos contaminados por protozoos como *Toxoplasma gondii*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium spp*, *Trypanosoma cruzi*, *Cyclospora cayetanensis* y *Entamoeba histolytica*. Sin embargo, también se ha establecido que cuando el agente etiológico implicado es un parásito al presentarse eventos de transmisión alimentaria, es evidente la falta de reportes o la ejecución de diagnósticos tempranos. Por tal motivo se evidencia la gran falencia que presenta este aspecto en la salud pública (41).

Desde su primera descripción en 1986, a *Cyclospora cayetanensis* se le ha relacionado con brotes diarreicos en diversos países en los que el principal vehículo de transmisión han sido alimentos que se ingieren crudos, especialmente fresas, frambuesas, lechuga y albahaca. Desde 1990 y hasta la fecha al menos 11 brotes de ciclosporiasis asociados a alimentos se han reportado en los Estados Unidos y Canadá, en donde se han visto afectadas aproximadamente 3.600 personas. En estos casos una de las principales hipótesis asocia el agua de riego como el principal vehículo de contaminación de las frutas y vegetales involucrados; sin embargo, no existe hasta el momento datos publicados que lo confirmen, sumado a esto la resistencia demostrada por los coccidios, incluyendo *Cyclospora cayetanensis*, a varios desinfectantes, entre ellos el cloro en los niveles utilizados para el tratamiento de las aguas, aumentan la posibilidad de transmisión a través de este vehículo y ponen de manifiesto la necesidad de ejercer un control y un proceso de vigilancia en los suministros utilizados para el consumo humano y para el riego de cultivos en el campo de la agricultura (42).

El procedimiento de análisis de muestras de alimentos para determinar la presencia de *Cyclospora cayetanensis* es relativamente reciente. Actualmente se realiza por medio de microscopía y análisis molecular por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para lograr esta detección en diferentes matrices vegetales o muestras ambientales, se requiere de ampliar estudios que permitan evaluar la composición biológica de los ooquistes y el comportamiento de estos mismos en la naturaleza (42).

Las técnicas moleculares han sido la herramienta funcional para la detección o presencia de estos microorganismos en las fuentes de interés, sin embargo, una de las falencias con estas muestras de campo ha sido lograr métodos de extracción de ADN que permitan obtener cantidad y pureza de estos ooquistes, es por ello que el reto siempre ha estado en cuanto a generar métodos de recuperación de estas formas parasitarias de las diferentes muestras en campo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

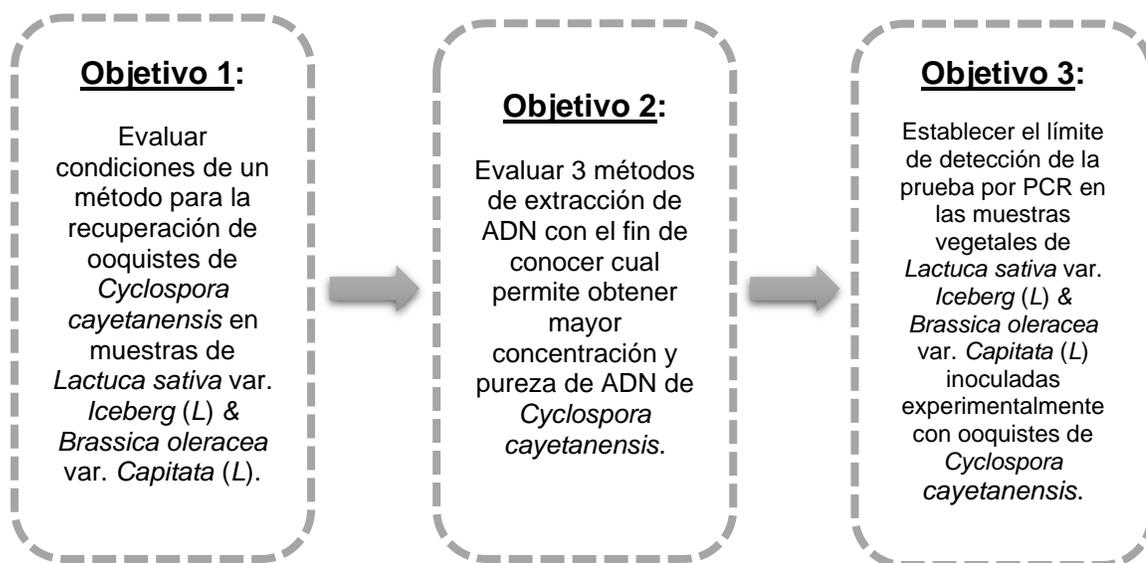
- Optimizar un método para la recuperación de ooquistes y una prueba molecular para la detección de ADN de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) (lechuga y repollo).

### 4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar las condiciones de un método para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L).
- Evaluar 3 métodos de extracción de ADN con el fin de conocer cual permite obtener mayor concentración y pureza de ADN de *Cyclospora cayetanensis*.
- Establecer el límite de detección de la prueba por PCR en las muestras vegetales de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) inoculadas experimentalmente con ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología realizada en este trabajo se sintetiza en el siguiente esquema con base en los objetivos planteados (**Figura 2**):



**Figura 2.** Esquema de actividades propuestas para el desarrollo del proyecto.

### 5.1 Área de estudio y aspectos bioéticos de la investigación

El desarrollo de esta investigación contó con la normatividad, las instalaciones y los equipos necesarios para la culminación de este estudio. Así mismo el proyecto se realizó con el respaldo del grupo de investigación en parasitología molecular (GEPAMOL) que cuenta con más de 15 años de experiencia en el área científica, específicamente en el campo de Parasitología molecular e Inmunología, lo cual aseguró la calidad técnica y científica del proyecto.

En todos los procedimientos realizados durante el desarrollo del proyecto de investigación se tuvieron en cuenta las normas de bioseguridad establecidas en el laboratorio que aseguraron la integridad de los investigadores y del medio ambiente, estas incluyeron el uso de cabinas de flujo laminar tipo II para el manejo de los ooquistes inactivados de *Cyclospora cayetanensis*, así mismo

los residuos con riesgo biológico se descartaron en bolsas rojas, los químicos fueron inactivados utilizando todos los elementos de protección personal.

## **5.2 Obtención de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis***

La muestra control fue donada por el Departamento de salud pública de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Esta consistía en ooquistes conservados con formol-éter al 10% a temperatura ambiente en tubo eppendorf, y fue enviada al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, al grupo GEPAMOL en la línea de investigación *Protozoos de transmisión alimentaria e hídrica y su presencia en medio ambiente de alta montaña*. La muestra fue considerada con riesgo mínimo según el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. Para el transporte y manipulación de la muestra se utilizaron los materiales y equipos necesarios teniendo en cuenta todas las normas de bioseguridad.

### **5.2.1 Obtención de muestras vegetales**

Las muestras de lechuga variedad *Iceberg* y repollo variedad *Capitata*, se adquirieron en supermercados locales; a estas muestras se les realizó un lavado inicial (descartando 3 de sus hojas más externas, respectivamente) introduciendo las muestras en bolsas de polipropileno estériles y sumergiéndolas en 1 litro de solución salina estéril al 0,9% hasta quedar totalmente cubiertas, realizando movimientos periódicos de agitación manual. Esto con el fin de retirar las impurezas que pudieran interferir en los resultados. Se dejó reposar la muestra durante 1 hora a temperatura ambiente corroborando la efectividad del lavado de las muestras. Se trabajó con 200 gr como peso inicial, según el peso representativo para trabajar con muestras de alimentos estimado por el INVIMA, como se indica:

*“Cortar o separar porciones de alimentos con cuchillo esterilizado u otro implemento, si es necesario. Recoger asépticamente por lo menos 200 gr de muestra con un implemento esterilizado y transferir a una bolsa de plástico o*

a un frasco de vidrio de boca ancha esterilizados. Tomar diferentes muestras de arriba al centro y de otros lugares según se considere necesario. Refrigerar, congelar o mantener a temperatura ambiente según sea el caso” (Instructivo para toma de muestras y análisis de productos alimenticios y bebidas, 2003).

De acuerdo con los resultados obtenidos al procesar las muestras con ese peso (presentando dificultades al procesar una muestra tan grande), éste se redujo hasta llegar a 35 gr, teniendo en cuenta los pesos referenciados en la literatura y realizando un promedio de ellos.

### **5.2.2 Inoculación experimental de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (Lechuga y Repollo)**

Las muestras vegetales (Lechuga y Repollo) previamente pesadas, se inocularon a partir de 5, 10 y 50 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* mediante un pipeteo en cruz y por último en el centro dispersando su volumen para garantizar homogeneidad, en 50 ml de solución salina 0.9% en un tubo falcon estéril. Se adicionó éste volumen en sentido horizontal a la bolsa que contenía la muestra empapando las hojas vegetales con la solución contaminada. Este procedimiento se realizó por triplicado en cada una de las diferentes concentraciones de ooquistes (5, 10 y 50). Se dejó reposar la muestra a una temperatura que oscilaba entre 4 a 8°C en nevera durante 18 horas. Cada uno de los ensayos realizados contó con su respectivo control negativo. Éstos, se procesaron de igual manera que las contaminadas artificialmente, exceptuando la etapa de inoculación para establecer que las muestras no estuvieran contaminadas desde su adquisición. Esta metodología fue tomada de Hernández-Arango et al. 2019 (Detection of *Giardia* spp. with formalin/ether concentration in *Brassica oleracea* (cabbage) and *Lactuca sativa* (lettuce)).

### **5.2.3 Método de recuperación para ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (Lechuga y Repollo)**

Posterior a la inoculación experimental de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en las muestras vegetales (Lechuga y Repollo), se utilizaron dos tipos de soluciones como extractantes: Glicina 1M pH: 5.5 y solución de lavado (Tween 80 0.1%, PBS 1X y Ácido Sulfámico) pH: 3.5, se adicionaron 200 ml del extractante a cada una de las muestras. Los ooquistes se eluyeron sellando la bolsa de polipropileno durante 30 segundos y posteriormente se transfirieron al equipo BagMixer® 400 W, *Interscience for microbiology* Ref. 022 230, para realizar la agitación mecánica de las muestras. Esta metodología fue tomada de Hernández-Arango et al. 2019 (Detection of *Giardia* spp. with formalin/ether concentration in *Brassica oleracea* (cabbage) and *Lactuca sativa* (lettuce)).

### **5.2.4 Agitación mecánica**

Se realizó una agitación de 5 ciclos durante 30 segundos. Utilizando el equipo BagMixer®, de manera cualitativa por golpes: “low” y de manera cuantitativa a una velocidad: 3 (de 4 velocidades que maneja el equipo) y una separación de las palancas agitadoras de 14 (de 20 que presenta el equipo) variables establecidas para las muestras de Repollo (*Brassica oleracea*). Finalmente para el proceso de recuperación a partir de las muestras de Lechuga (*Lactuca sativa*) se utilizó una velocidad de 3 y una separación con respecto a las palancas del equipo de 12.

### **5.2.5 Concentración de muestras por el método Formol-Éter**

Se removieron los restos vegetales de las bolsas de polipropileno, respectivamente, tratando de recuperar la mayor cantidad de líquido (50 ml solución salina contaminada + 200 ml extractante); éste, se dividió en tubos falcon de 50 ml (aproximadamente 5) y éstos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Hermle modelo Z 446 K (*Hermle*

*Labor Technik GmbH, Wehingen, Alemania).*

Se descartó el sobrenadante de cada falcon, posteriormente se agitó en vórtex cada tubo y se concentró el volumen en un tubo final, alcanzando aproximadamente un volumen total de 40 ml. Se centrifugó este tubo nuevamente a 3500 rpm durante 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se completó el sedimento hasta 7.5 ml. Se empleó la prueba de formalina/éter para concentrar los ooquistes recuperados en las muestras de alimentos, según el procedimiento reportado por Lora-Suárez et al. 2016 (43). A continuación, se adicionó 7.5 ml de solución de formol salino al 10% y 3 ml de éter dietílico al 99% (Sigma, EE.UU.). Se selló el tubo, se agitó vigorosamente para lograr poner en contacto el éter dietílico con todas las partes del sedimento y se realizó una nueva centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Se formaron tres capas diferentes: (i) un sedimento en el fondo, (ii) solución salina e impurezas orgánicas y (iii) éter dietílico en la parte superior. Se decantaron las dos capas superiores de manera que sólo quedaba el sedimento en el tubo. Se obtuvo un volumen final entre 500 µl – 1 ml aproximadamente para la visualización al microscopio óptico (Tomando como referencia el protocolo descrito en el método de la EPA EE.UU. *Environmental Protection Agency* 1623).

#### **5.2.6 Tinción Ziehl-Neelsen modificada**

Se adicionó en portaobjetos un volumen de ~20 µl del volumen final de cada muestra recuperada. Se esperó que la muestra estuviera totalmente seca en el portaobjetos. A continuación, se realizó la tinción (coloración para diagnóstico de microorganismos que tienen la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido). Cuando la muestra estaba completamente seca se adicionó el colorante Fucsina fenicada ZN durante 10 minutos. Posteriormente se lavó el portaobjetos con abundante agua, retirando por completo el colorante. Luego se adicionó a la muestra Alcohol ácido ZN

durante 3 minutos, esto con el fin de retirar por completo la coloración. Se retiró el decolorante con abundante agua y posteriormente se adicionó a la muestra Azul de metileno al 1% durante 3 minutos, seguidamente se lavó la muestra con abundante agua y finalmente se esperaba que la muestra estuviera totalmente seca y se observaba al microscopio óptico.

### 5.2.7 Microscopía óptica

Se realizó la visualización de las muestras mediante el microscopio óptico Olympus CX 31 bajo el objetivo de 100x con aceite de inmersión.

### 5.2.8 Fórmula porcentaje de recuperación

Para cada observación se aplicó la siguiente fórmula; así lograr calcular el porcentaje de recuperación de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* por cada muestra.

$$\%R = \frac{\text{Número de ooquistes observados en la muestra recuperada} \times 100\%}{\text{Ooquistes inoculados}}$$

**%R:** porcentaje de recuperación por muestra.

### 5.3 Extracción de ADN de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*

Previamente a la extracción de ADN; como se describió con anterioridad en la metodología del conteo de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, se obtuvo el promedio de las formas parasitarias presentes en la muestra control que contenía un volumen final de 1 mL. Posteriormente se realizaron diferentes cálculos con el fin de iniciar las extracciones de ADN a partir de un gran número de ooquistes hasta llegar a una mínima concentración de ooquistes logrando la amplificación del ADN control de *Cyclospora cayetanensis*. Para ello se realizaron diferentes concentraciones de ooquistes a partir de 5, 10 y 50 ooquistes. Seguidamente se realizaron lavados a los ooquistes con una solución de PBS al 1X llevando a centrifugar esta muestra

control a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C con el fin de reducir impurezas.

La extracción de ADN para los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* se llevó a cabo utilizando el kit de extracción de *QIAGEN* (QIAamp DNA Mini Kit - Ref. 60404) con algunas modificaciones. Se realizó paso a paso las etapas del Kit de extracción *QIAGEN* agregando a la muestra control 20 µl de Proteinasa K, luego se adicionó el *Lysis Buffer* como indica el estuche y a continuación se llevó la muestra a baño maría sometiendo la muestra a choques térmicos durante 15 minutos y seguidamente se llevó la muestra al *Thermoblock* durante 20 minutos a 150°C. Se dejó reposar la muestra en hielo durante 10 minutos y se llevó a incubar en hibridizador durante 1 hora y 40 minutos. Posteriormente se adicionaron las perlas de silicato de circonio a la muestra y se llevó el tubo eppendorf al equipo *Minibead-Beater* realizando una agitación mecánica (ver **Tabla 3**). Es de anotar que durante cada ciclo mecánico de dejó reposar la muestra en hielo durante 1 minuto.

**Tabla 3.** Condición optimizada durante la etapa de lisis mecánica de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

Condición:	Perlas Circonio		Agitación Mecánica
	Diámetro	Cantidad	Tiempo
	1 mm	0,2 g	30s+30s+30s+30s+30s+30s+30s+30s

Posterior a la etapa de lisis mecánica se transfirió la muestra gentilmente llevando a cabo la separación de las perlas de silicato de circonio. Se adicionó Etanol al 96% y se llevó todo el contenido de la muestra a los tubos de columna y tubo colector que trae el kit. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto a 23°C, descartando el tubo colector y transfiriendo el tubo de la columna a un nuevo tubo. Durante este paso se adicionó a la muestra *Wash Buffer*, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos a 23°C. En este procedimiento se separa gentilmente el tubo de la columna y se transfiere a un nuevo tubo eppendorf, seguidamente se adicionó *Elution Buffer* y se dejó

reposar la muestra durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto a 23°C descartando el tubo de la columna y cuidadosamente se conserva el tubo eppendorf que contiene la purificación final de la extracción de ADN. Todos los productos fueron cualificados en un espectrofotómetro *EPOCH de BioTeckTM*, y se tuvieron en cuenta las relaciones 260/280 para descartar impurezas con proteínas y 260/230 para descartar contaminación con fenoles, carbohidratos y compuestos aromáticos. Las muestras se procesaron por triplicado. Adicionalmente durante cada ensayo se procesó una muestra sin ooquistes, con el fin de determinar una muestra control de contaminación durante el proceso de extracción de ADN.

Durante la etapa de lisis de membrana de los ooquistes en la extracción de ADN se realizó a través de un método físico en este caso con la utilización del equipo Sonicador, un método mecánico a través del *Minibead-Beater* y un método químico cuando solamente se realizaron las extracciones a través del QIAamp DNA Mini kit (*QIAGEN*). Esto con la finalidad de poder conocer a partir de estos tres métodos cual permitiría obtener mayor concentración y pureza de ADN de *Cyclospora cayetanensis*.

#### **Selección de *primers*:**

Para la selección de los primers se llevó a cabo una revisión en la literatura y en la base de datos PubMed *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), realizando un análisis de secuencias para determinar los criterios de selección del blanco, en este caso la secuencia que codifica la sub unidad ribosomal 5.8S del genoma de *Cyclospora cayetanensis* con un amplificado de 116 pb (44) (siendo específica de esta especie y altamente conservada; se realizó un *BLAST Nucleotide (NCBI)* para determinar la especificidad de los mismos.

#### 5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Posterior a la extracción de ADN se evaluaron las condiciones de la técnica de la PCR optimizando dicha prueba molecular hasta lograr una amplificación de una banda de 116 pb.

A continuación, se realizó una PCR convencional, con el estuche *GoTaq Green Master Mix*, siguiendo las recomendaciones del fabricante en el equipo Termociclador *Veriti 96-Well* de *Applied Biosystems* (ver **Tabla 4 y 5**).

**Tabla 4.** Componentes de mezcla para la implementación de la técnica molecular PCR.

Reactivo	Volumen (µl)
GoTaq	12,5
Primers 10 µM c/u	1
BSA	0,5
Agua	6
ADN	4
Volumen total	25

**Tabla 5.** Condiciones evaluadas para la técnica molecular PCR para la amplificación de ADN control de *Cyclospora cayetanensis* (Lalonde *et al.*, 2008):

		PCR		
		Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
<b>Condiciones</b>	<b>Denaturalización</b>		95	2 min
			95	30 seg
	<b>Hibridación</b>	40	<b>59</b>	30 seg
			72	30 seg

---

<b>Extensión</b>	72	5 Min
------------------	----	-------

---

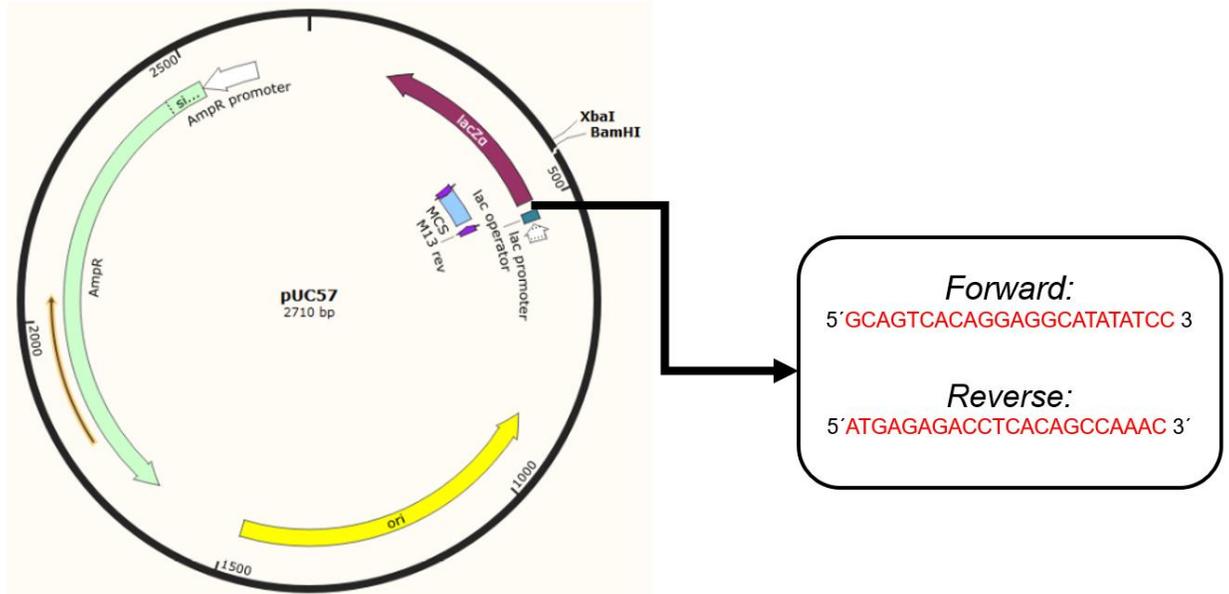
Cada PCR tuvo un control negativo de la reacción, el cual consistió en agregar todos los componentes de la mezcla excepto el ADN, con el fin de analizar posibles agentes contaminantes. Para el control positivo en este caso no se contaba con dicho control dado que en el laboratorio ni en la línea de investigación donde se ejecutó este proyecto, no se tenían aislados puros, es decir, cultivo de ADN de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*. Es por esta razón que surgió la necesidad de obtener a través de la técnica de clonación, un constructo a través de un plásmido control positivo con la secuencia del gen de interés en este caso la sub unidad ribosomal 5.8S del genoma de *Cyclospora cayetanensis*. Finalmente, durante estos ensayos experimentales de PCR se utilizó ADN control de especies emparentadas con *Cyclospora cayetanensis*, en este caso con ADN de *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis sp*, *Giardia sp*, y *Toxoplasma gondii*, con el fin de descartar alguna posibilidad de reacción cruzada. Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1,5 %.

#### **5.4.1 Diseño de plásmido (control positivo de *Cyclospora cayetanensis*)**

Para llevar a cabo el desarrollo de un plásmido control de *Cyclospora cayetanensis*, se contactó a la empresa *GenScript (Make Research Easy)* en Estados Unidos, para lograr finalmente la obtención de este constructo como se observa en la **Figura 3**. Este, fue diseñado con la secuencia blanco de interés que codifica para el gen de la sub unidad ribosomal 5.8S. Como se describe con anterioridad en la metodología de la selección de los primers, ya se había corroborado la fidelidad filogenética de las secuencias.

Posteriormente a la obtención del plásmido control, este fue resuspendido e hidratado en un *Buffer* siguiendo paso a paso las instrucciones del fabricante.

Seguidamente se describe la metodología de competencia y transformación de *E. coli* OneShot® Top10 bacterias diseñadas genéticamente para clonar plásmidos.



**Figura 3.** Representación gráfica de la inserción de la secuencia en el vector **pUC57**.  
Plasmid Construct Map. *GeneScript* USA.

#### 5.4.1.1 Competencia y transformación de *E. coli* OneShot® Top 10

El proceso de transformación se realizó con el estuche *OneShot*® TOP10 Competent *E. coli* (*Life technologies*, Catálogo C4040-10), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Para la obtención de las células transformadas, estas se resuspendieron en medio LB (*Luria Broth-Probiotek*) sólido suplementado con ampicilina a 150 µg/ml y se incubaron durante toda la noche a 37°C, se revisaron los cultivos para seleccionar las células que habían incorporado el vector. La selección se realizó teniendo en cuenta que el vector poseía una secuencia que le daba resistencia a la ampicilina a la célula, por lo tanto, las células transformadas se visualizaron como puntos blancos en el medio sólido, se tomaron dos

colonias de las que habían crecido teniendo en cuenta tomar las que estuvieran más alejadas unas de otras.

Posteriormente se llevaron las colonias transformadas por separado a tubos falcon de 50 ml con agar LB (*Luria Broth-Probiotek*) suplementado con ampicilina a 150 µg/ml y se incubaron durante cinco horas en agitación constante hasta que se obtuvo una densidad óptica de OD: 0,3 a 600nm (leída en espectrofotómetro), posteriormente fueron criopreservadas en medio para criopreservación (LB líquido+glicerol en proporción 1:1). Consecutivamente se realizó la extracción y purificación del plásmido.

#### **5.4.1.2 Extracción y purificación de plásmido**

Finalmente se procedió a realizar la extracción y purificación del plásmido (**pUC57**) con ayuda del estuche *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* de (*Life Technologies*, Catálogo K2100-10) según las especificaciones del proveedor y se cuantificó por espectrofotometría. Posteriormente se realizó una PCR confirmatoria sobre el producto de la purificación, utilizando el mismo programa descrito con anterioridad en la metodología de PCR para *Cyclospora cayetanensis*. Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% visualizados en transiluminador.

#### **5.5 Límite de detección de la prueba por PCR en las muestras vegetales de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) inoculadas experimentalmente**

Previamente en la descripción de la metodología de la inoculación experimental de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en las muestras vegetales de interés en este proyecto, se puntualizó paso a paso el procedimiento para lograr la inoculación de estos ooquistes en estas matrices vegetales. Es por ello que posterior a la optimización de la técnica molecular por PCR para *Cyclospora cayetanensis*, se debía establecer finalmente la

mínima concentración de ooquistes que detecta la PCR sobre las matrices vegetales de interés. En ese orden de ideas se realizaron varios ensayos de inoculación a partir de una concentración de 5, 10 y 50 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*. Así se estableció la sensibilidad de la prueba por PCR en estas matrices blanco de interés. Posteriormente a la inoculación experimental de las muestras, se realizó las respectivas extracciones de ADN a cada uno de estos ensayos y finalmente se llevó a cabo la detección por PCR logrando establecer el límite de detección. Cada ensayo se realizó por triplicado.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Conteo de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* a partir de la muestra control

Se realizó el conteo de las formas parasitarias presentes en la muestra control. Los resultados están reportados en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Conteo de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* a partir de la muestra control.

Conteo:	Número de ooquistes observados:
# 1	15
# 2	16
# 3	14
# 4	15
# 5	13
# 6	14
# 7	13
# 8	12
# 9	11
# 10	11
<b>Total:</b>	<b>134</b>

**Promedio:**  $134 / 10 = 13$

*Nota:* durante la realización del conteo de los ooquistes presentes en la muestra control se tuvo 2 observadores como mínimo.

- fórmula para calcular aproximadamente el número de ooquistes presentes en 1 ml de la muestra control:

$$13 / 4 \times 2 \times 10.000 = \mathbf{65.000 \text{ ooquistes.}}$$

## 6.2 Inoculación experimental de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (Lechuga y Repollo)

Una vez se estableció el volumen en micro litros que permitió la concentración exacta de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* para las tres condiciones de concentración que se evaluaron en este trabajo (ver **Tabla 7**), se continuó con las inoculaciones en las muestras vegetales.

**Tabla 7.** Volúmenes específicos de la muestra control para la inoculación de las formas parasitarias en las muestras vegetales a partir de las diferentes concentraciones de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

Concentración de ooquistes	Volumen de la muestra control
[ ] 5	2.5 $\mu$ l
[ ] 10	6 $\mu$ l
[ ] 50	23 $\mu$ l

Como se describe en la metodología se realizó el lavado de las muestras con solución salina estéril al 0.9% y posteriormente se pesaron 35 gr por cada muestra vegetal hasta completar los 200 gr (Instructivo para toma de muestras y análisis de productos alimenticios y bebidas, 2003). Finalmente fueron transferidas a las bolsas de polipropileno. Por tanto se llevó a cabo la inoculación de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en las muestras de lechuga y repollo. Este procedimiento se realizó para cada concentración de ooquistes establecida: [ ] 5, [ ] 10 y [ ] 50 (**Figura 4**). Posteriormente se dejaron las muestras en un periodo de reposo durante 18 horas a 4°C.



**Figura 4.** Esquema general de la inoculación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (lechuga y repollo).

### 6.3 Método de recuperación para ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (Lechuga y Repollo)

- ✓ El extractante **Glicina 1M pH: 5.5** fue utilizado para la recuperación de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en las muestras de *Lactuca sativa* (lechuga).
- ✓ Mientras que la **Solución de Lavado (Tween 80 0.1%, PBS 1X y Ácido Sulfámico) pH: 3.5** fue empleada para la recuperación de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en las muestras de *Brassica oleracea* (repollo).

Posterior a la adición de los extractantes en las muestras vegetales correspondientes cada uno con una solución específica como se menciona en el procedimiento anterior, se realizó la agitación mecánica a través del equipo BagMixer® (**Figura 5**), el cual permitió simular los movimientos peristálticos del estómago, esto con el fin de remover las formas parasitarias adheridas a la matriz vegetal y finalmente se recuperó el contenido por cada muestra en las diferentes concentraciones de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en tubos falcon de 50 ml.

## Agitación mecánica:

Stomacher (BagMixer® 400 W, Interscience for microbiology Ref. 022 230, Colombia)



**Figura 5.** Esquema general del método de recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales (lechuga y repollo).

### Modificación de variables en la etapa de agitación mecánica:

**Tabla 8.** Comparación de las condiciones optimizadas para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras vegetales de *Lactuca sativa* & *Brassica oleracea*.

Condiciones: Hernández-Arango et al. 2019		Condiciones: <u>Optimizadas en este trabajo</u>	
<i>Lactuca Sativa</i>	<i>Brassica Oleracea</i>	<i>Lactuca Sativa</i>	<i>Brassica Oleracea</i>
Speed: 2	Speed: 3	Speed: <u>3</u>	Speed: 3
Gap: 8	Gap: 10	Gap: <u>12</u>	Gap: <u>14</u>
Ciclos: 5 / Tiempo: 30 seg		Ciclos: 5 / Tiempo: 30 seg	
Equipo: <b>BagMixer</b> ®		Equipo: <b>BagMixer</b> ®	

Se llevó a cabo la centrifugación de las muestras recuperadas a 3500 rpm durante 10 minutos hasta obtener un volumen final aproximadamente entre 500 µl a 1 ml y posteriormente el volumen total de la muestra se le realizó la coloración *Ziehl-Neelsen* donde se observó al microscopio en un objetivo de 100X, de esta manera establecer el porcentaje de recuperación por cada

muestra inoculada a diferentes concentraciones de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

### **6.3.1 Detección de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) (Lechuga)**

Se registró una efectiva recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, con un porcentaje en promedio del  $60\% \pm 20$  cuando se inocularon 5 ooquistes en la muestra problema. Para la recuperación a partir de 10 ooquistes en la muestra de lechuga se obtuvo un porcentaje de recuperación en promedio del  $53,3\% \pm 11,5$  y finalmente se obtuvo en promedio un porcentaje de recuperación del  $41,3\% \pm 11$  cuando se inocularon las muestras a partir de 50 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* (ver **Tabla 9**).

### **6.3.2 Detección de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) (Repollo)**

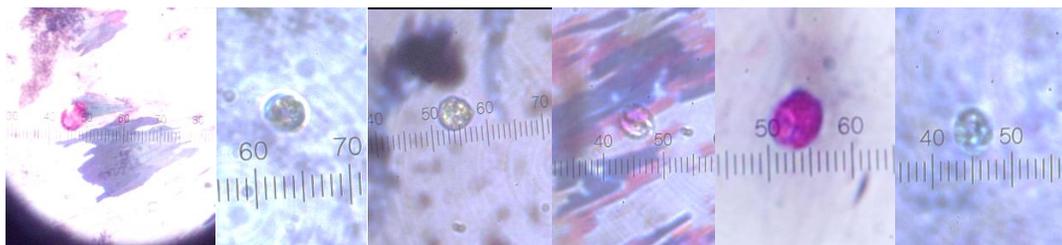
Para las muestras de repollo, se obtuvo un porcentaje de recuperación en promedio del  $33,3\% \pm 11,5$  cuando dichas muestras de repollo fueron inoculados a partir de 5 ooquistes, cuando se trabajó bajo una concentración de 10 ooquistes para la muestra problema, el porcentaje de recuperación en promedio fue del  $33,3\% \pm 5,7$  y finalmente cuando las muestras fueron inoculadas a partir de 50 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* el porcentaje de recuperación fue en promedio del  $28\% \pm 5,2$  (ver **Tabla 9**).

**Tabla 9.** Porcentajes de recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* a partir de las muestras vegetales inoculadas en diferentes concentraciones.

Muestra	% de recuperación a partir de 5 ooquistes:	% de recuperación a partir de 10 ooquistes:	% de recuperación a partir de 50 ooquistes:
<i>Lactuca sativa</i> var. <i>Iceberg</i> (L)	Ensayo 1: 80% Ensayo 2: 60% Ensayo 3: 40%	Ensayo 1: 60% Ensayo 2: 40% Ensayo 3: 60%	Ensayo 1: 34% Ensayo 2: 36% Ensayo 3: 54%
<b>Promedio ± SD*</b>	<b>60% ± 20</b>	<b>53,3% ± 11.5</b>	<b>41,3% ± 11.01</b>
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> (L)	Ensayo 1: 40% Ensayo 2: 20% Ensayo 3: 40%	Ensayo 1: 30% Ensayo 2: 40% Ensayo 3: 30%	Ensayo 1: 24% Ensayo 2: 26% Ensayo 3: 34%
<b>Promedio ± SD*</b>	<b>33,3% ± 11,5</b>	<b>33,3% ± 5,7</b>	<b>28% ± 5,2</b>

SD\*: desviación estándar.

### 6.3.3 Registro fotográfico de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* recuperados en las diferentes muestras



**Figura 6.** Ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, teñidos por la coloración Ziehl-Neelsen. Observación en microscopio óptico en objetivo 100X posterior al método de recuperación planteado en este trabajo. Se realizó confirmación del registro fotográfico por un experto en parasitología.

### 6.4 Extracción de ADN de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*

Al analizar las cuantificaciones obtenidas a partir de los tres métodos de extracción de ADN de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* (**Tabla 10 A y B**), se encontró que, el mejor método que permitió obtener mayor concentración y pureza de ADN de *Cyclospora cayetanensis*, se logró a partir de la optimización de las perlas de silicato de circonio más el choque térmico como se describió en la metodología. Logrando así inferir que la etapa de lisis mecánica debía ser la clave para el rompimiento de la pared quística.

**Tabla 10 (A).** Cuantificaciones obtenidas a partir de la extracción de ADN de **10 ooquistes** de *Cyclospora cayetanensis* (cuantificación y pureza de ADN: 260nm/280nm).

Observación	Lisis	[ADN]	Pureza
1	Perlas + Choque térmico	4,7125 ng/μl	2,155
2	Perlas + Choque térmico	3,8705 ng/μl	2,0395
3	Perlas + Choque térmico	4,8615 ng/μl	2,1735
1	Sonicador	0,903 ng/μl	1,4745
2	Sonicador	0,807 ng/μl	1,516
3	Sonicador	0,755 ng/μl	0,753
1	QIAamp DNA Mini kit	1,0525 ng/μl	1,393
2	QIAamp DNA Mini kit	0,7955 ng/μl	0,728
3	QIAamp DNA Mini kit	0,6495 ng/μl	1,3

**Tabla 10 (B).** Cuantificaciones obtenidas a partir de la extracción de ADN de **50 ooquistes** de *Cyclospora cayetanensis* (cuantificación y pureza de ADN: 260nm/280nm).

Observación	Lisis	[ADN]	Pureza
1	Perlas + Choque térmico	16,232 ng/μl	2,201
2	Perlas + Choque térmico	12,198 ng/μl	2,099
3	Perlas + Choque térmico	9,654 ng/μl	1,701
1	Sonicador	0,9 ng/μl	1,985
2	Sonicador	0,71 ng/μl	2,798
3	Sonicador	3,12 ng/μl	4,624
1	QIAamp DNA Mini kit	0,922 ng/μl	0,305
2	QIAamp DNA Mini kit	1,621 ng/μl	0,814
3	QIAamp DNA Mini kit	0,955 ng/μl	0,011

**Tabla 11.** Síntesis de las condiciones seleccionadas para la lisis mecánica de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* durante las extracciones de ADN.

Ciclo de la Etapa	Condiciones Optimizadas
Choque térmico	Proteinasa <i>K</i> + <i>Buffer</i> ( <i>Qiagen</i> ) + Baño maría, T°: superior a los 100°C durante 15 minutos
Acondicionamiento de los ooquistes en el <i>Thermoblock</i>	T°: 150°C durante 20 minutos
Periodo de incubación	1 hora y 40 minutos
<i>Minibead</i>	8 ciclos durante 30 segundos, muestra en reposo durante 1 minuto en hielo posterior a cada ciclo

## 6.5 Selección de primers

**Tabla 12.** Secuencia de primers de la región ribosomal 5.8S de *Cyclospora cayetanensis*. **Gene Length: 116 pb.** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493149/pdf/0032-08.pdf>).

Primers seleccionados	
<u>Forward</u>	<u>Reverse</u>
5'GCAGTCACAGGAGGCATATATCC 3'	5'ATGAGAGACCTCACAGCCAAAC 3'

### 6.5.1 Condiciones de temperatura según el Tm del diseño de los primers

**Forward:**  $T_m = (7+4) * 2 + (6+6) * 4 = 70^\circ\text{C}$

**Reverse:**  $T_m = (9+2) * 2 + (4+7) * 4 = 66^\circ\text{C}$

## 6.5.2 Blast NCBI (Nucleotide)

BLAST® » blastn suite Home Recent Results Saved Strategies Help

Standard Nucleotide BLAST

blastn | blasto | blastx | tblastn | tblastx

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#) Reset Page Bookmark

Enter Query Sequence Clear Query subrange

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) From To

GCAGTCCACAGGAGCATATATCC

BLAST results will be displayed in a new format by default New

**Forward:**

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 99 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis isolate IQ-4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, an	46.1	46.1	100%	0.010	100.00%	MH588143.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis isolate IQ-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, an	46.1	46.1	100%	0.010	100.00%	MH588142.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis isolate IQ-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, an	46.1	46.1	100%	0.010	100.00%	MH588141.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis isolate IQ-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, an	46.1	46.1	100%	0.010	100.00%	MH588140.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	46.1	46.1	100%	0.010	100.00%	AF301391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	46.1	46.1	100%	0.010	100.00%	AF301386.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP20 clone 23 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	42.1	42.1	91%	0.16	100.00%	AF303964.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 68 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	42.1	42.1	91%	0.16	100.00%	AF303960.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 66 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	42.1	42.1	91%	0.16	100.00%	AF303959.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 65 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	42.1	42.1	91%	0.16	100.00%	AF303958.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 45 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	42.1	42.1	91%	0.16	100.00%	AF303956.1

Figura 7. Secuencia del primer *Forward* para la sub unidad ribosomal 5.8S de *Cyclospora cayetanensis*. Homología del 100% específica para esta especie.

BLAST® » blastn suite Home Recent Results Saved Strategies Help

Standard Nucleotide BLAST

blastn | blasto | blastx | tblastn | tblastx

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#) Reset Page Bookmark

Enter Query Sequence Clear Query subrange

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) From To

ATGAGAGGCTCCACAGC

BLAST results will be displayed in a new format by default New  
You can always switch back to the

**Reverse:**

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

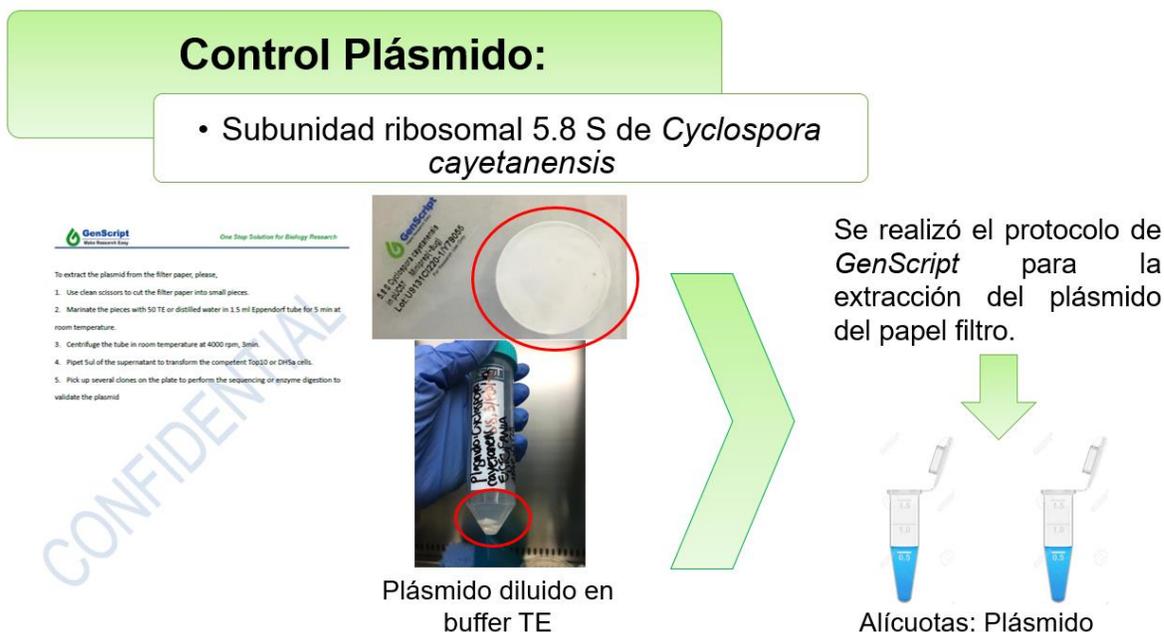
select all 98 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP20 clone 29 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303965.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP20 clone 23 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303964.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP20 clone 17 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303963.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP20 clone 1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303961.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 68 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303960.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 66 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303959.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 65 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303958.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 46 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303957.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis strain NP21 clone 45 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF303956.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF301391.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF301390.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF301386.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF301388.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cyclospora cayetanensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	44.1	44.1	100%	0.027	100.00%	AF301387.1

Figura 8. Secuencia del primer *Reverse* para la sub unidad ribosomal 5.8S de *Cyclospora cayetanensis*. Homología del 100% específica para esta especie.

## 6.6 Plásmido (control positivo de *Cyclospora cayetanensis*)

El plásmido control fue extraído del papel filtro como indicaba el protocolo del fabricante, en este caso por la empresa *GenScript*. USA (**Figura 9**). Siguiendo paso a paso las recomendaciones para una óptima extracción y posteriormente se llevó a *E. coli One Shot Top 10* competentes.

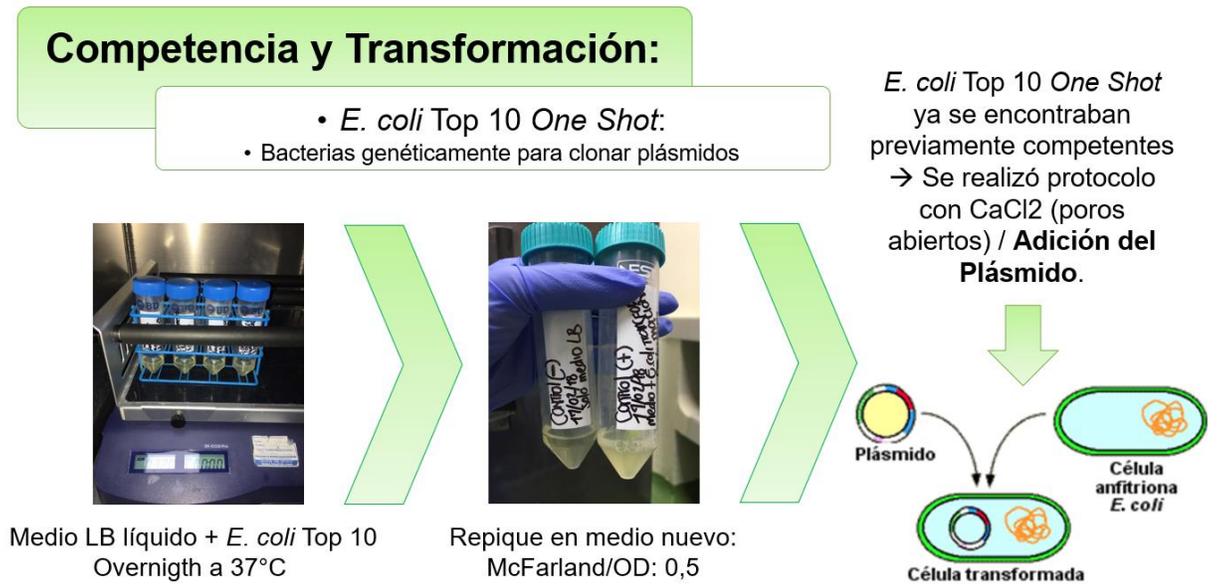


**Figura 9.** Esquema de la obtención del plásmido control positivo de *Cyclospora cayetanensis*.

### 6.6.1 Transformación y clonación *E. coli One Shot Top10*

La transformación se llevó a cabo a partir de células competentes del estuche *OneShot*® TOP10 *Competent E. coli* que fueron sembradas en medio de cultivo LB (*Luria Broth*) sólido suplementado con ampicilina a 150 µg/ml y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se revisaron los cultivos para seleccionar las colonias que habían incorporado el vector (**Figura 10 (A) y (B)**), lo cual nos indicaba que se había dado el proceso de transformación y clonación satisfactoriamente. Seguidamente se tomaron y se sembraron las colonias en medio LB líquido suplementado con ampicilina 150

$\mu\text{g/ml}$  para obtener una mayor cantidad de las mismas y lograr un buen amplificado en la PCR para la confirmación de la extracción y purificación del plásmido.



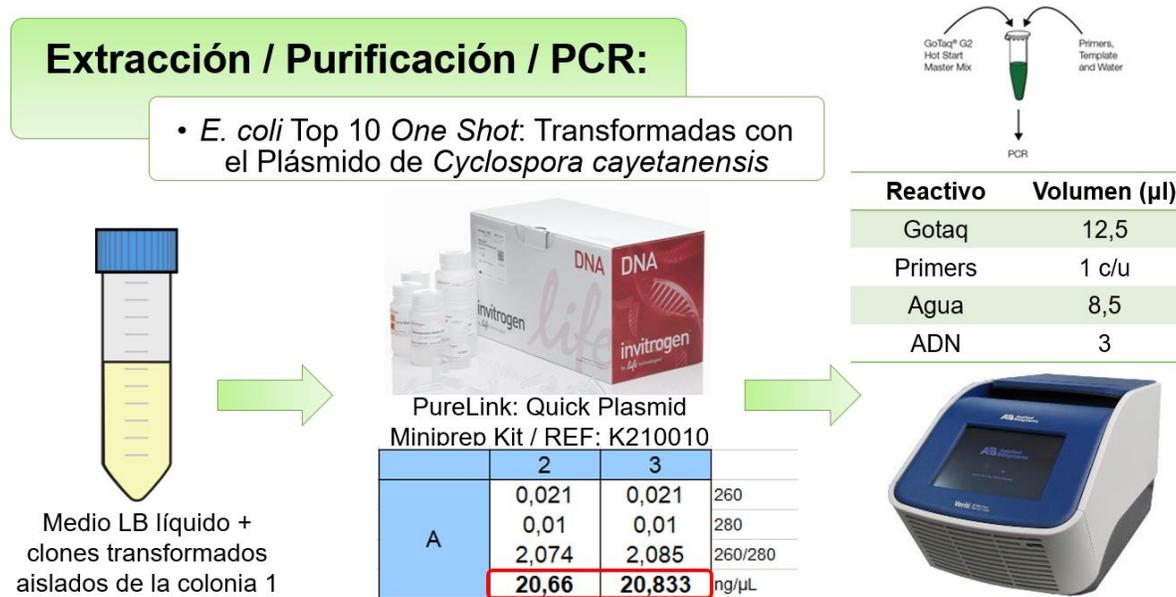
**Figura 10 (A).** *E. coli* One Shot Top10 para crecimiento y transformación en células competentes.



**Figura 10 (B).** *E. coli* One Shot Top 10 competentes y transformadas.

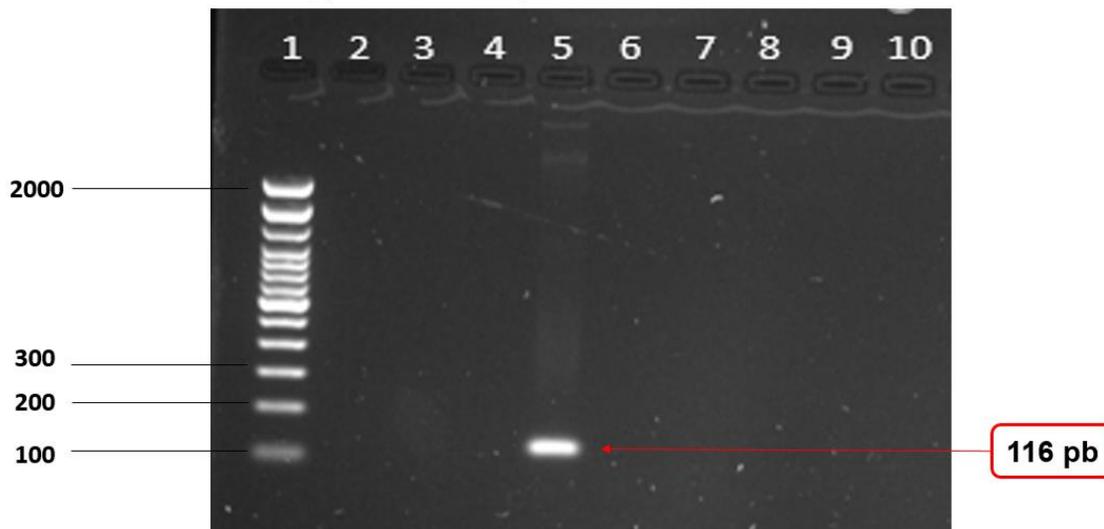
### 6.6.2 Extracción, purificación y PCR del plásmido control en *E. coli* One Shot Top 10

Se realizó la extracción y purificación del plásmido control de la muestra obtenida del proceso de clonación de la colonia seleccionada en el procedimiento anteriormente mencionado. Esta prueba molecular se realizó con ayuda del estuche *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Life technologies), posteriormente se cuantificó con ayuda del espectrofotómetro *Epoch* obteniendo una concentración final de 20,75 ng/μl y una pureza de 2,07 (Figura 11). Seguidamente se realizó la técnica molecular por PCR para confirmar la obtención del control positivo de ADN de *Cyclospora cayetanensis*, obteniendo una banda de 116pb en el peso esperado (Figura 12). Este procedimiento confirmó que la secuencia se encontraba en el plásmido.



**Figura 11.** Esquema de extracción y purificación del plásmido control de *Cyclospora cayetanensis*.

## Gel de Agarosa 1,5%: Producto de PCR

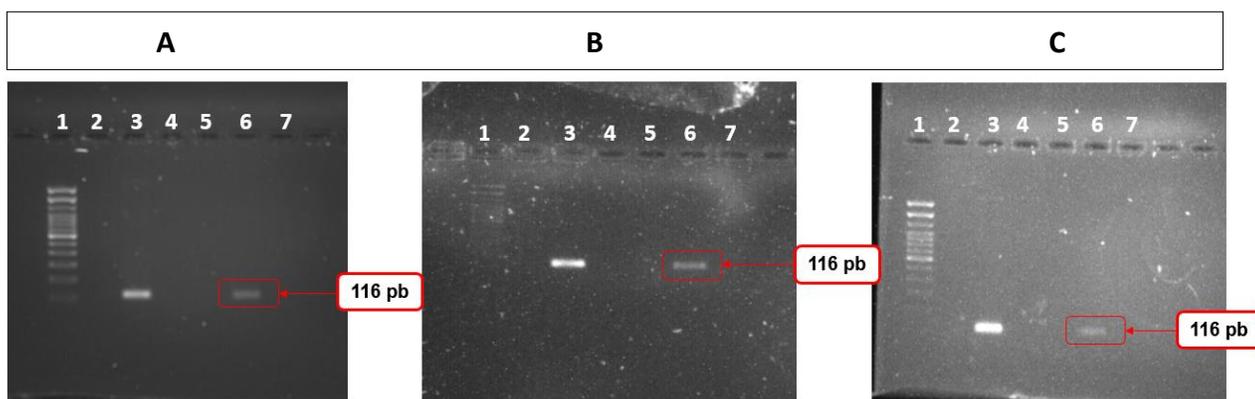


**Figura 12.** Confirmación de la obtención del plásmido control positivo para *Cyclospora cayetanensis*. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 3:** control negativo de la extracción y purificación del plásmido, **Pozo 4:** control negativo de la PCR, **Pozo 5:** producto de extracción y purificación del plásmido (ADN control de *Cyclospora cayetanensis*).

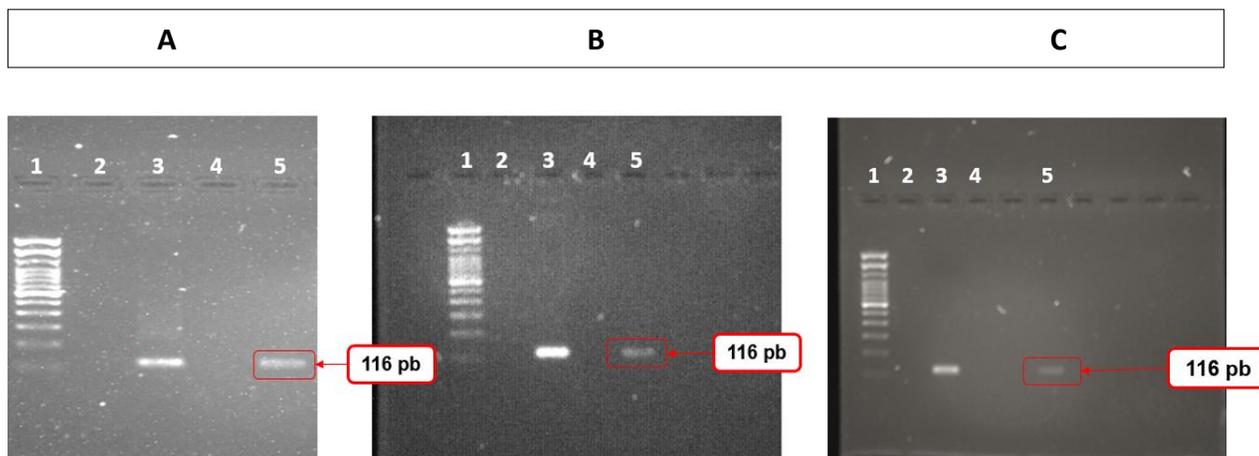
### 6.7 Límite de detección de la prueba por PCR en las muestras vegetales de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) inoculadas experimentalmente

Con la optimización de las mejores condiciones para la extracción de ADN de *Cyclospora cayetanensis* y una detección por PCR convencional de ADN de ooquistes de esta especie, se procedió finalmente a establecer el límite de detección de esta prueba molecular en las muestras vegetales cuando estas fueron sometidas experimentalmente a la inoculación de ooquistes y a la aplicación del método de recuperación, reportado en este proyecto. Encontrando entonces que la prueba por PCR tuvo una sensibilidad a partir de 10 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* tanto para *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L).

En las Figuras 13 y 14 se observan las amplificaciones de ADN en electroforesis de agarosa al 1,5% obtenidas a partir de la inoculación de los 10 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en estas matrices vegetales respectivamente. Es de anotar que cada ensayo de inoculación, extracción, PCR y amplificación se realizó por triplicado con su respectivo control negativo para ambas muestras vegetales.



**Figura 13.** Las imágenes A, B y C corresponden a geles de agarosa al 1,5%. En cada uno de ellos se corrieron los productos de amplificación de tres PCR realizadas a partir de extracciones de ADN luego de la recuperación de inoculaciones a partir de 10 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras de ***Lactuca sativa var. Iceberg (L)***. Los controles y las condiciones en que se obtuvieron cada uno de los productos en cada uno de los pozos, son como se indican a continuación. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 2:** control negativo de la PCR, **Pozo 3:** control positivo de la PCR, **Pozo 5:** control negativo de la extracción de ADN. **Pozo 6:** producto de extracción de ADN a partir de la muestra recuperada en este caso de la matriz de Lechuga (inoculación a partir de 10 ooquistes).

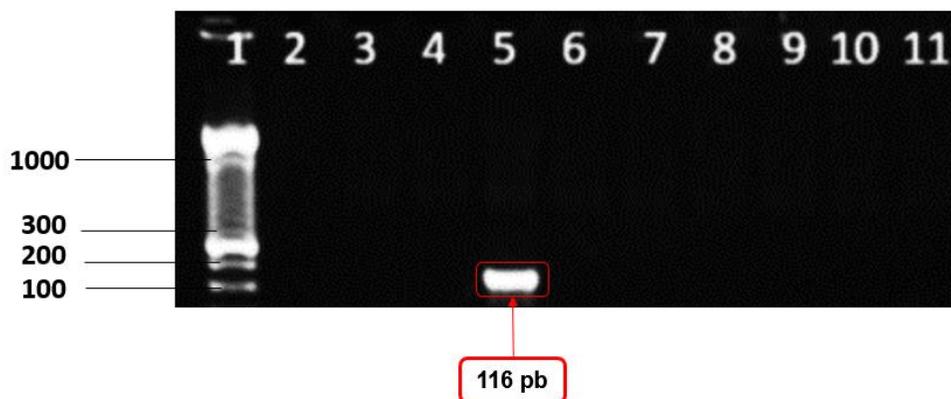


**Figura 14.** Las imágenes A, B y C corresponden a geles de agarosa al 1,5%. En cada uno de ellos se corrieron los productos de amplificación de tres PCR realizadas a partir de extracciones de ADN luego de la recuperación de inoculaciones a partir de 10 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras de *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L). Los controles y las condiciones en que se obtuvieron cada uno de los productos en cada uno de los pozos, son como se indican a continuación. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 2:** control negativo de la PCR, **Pozo 3:** control positivo de la PCR, **Pozo 4:** control negativo de la extracción de ADN. **Pozo 5:** producto de extracción de ADN a partir de la muestra recuperada en este caso de la matriz de Repollo (inoculación a partir de 10 ooquistes).

### 6.7.1 Especificidad de la prueba por PCR para *Cyclospora cayetanensis*

Como se describió con anterioridad en la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa, se realizaron ensayos de PCR con ADN control de diferentes parásitos que puedan estar genéticamente emparentados con *Cyclospora cayetanensis*, dicho ensayo experimental se llevó a cabo con el fin de lograr establecer la especificidad de la PCR convencional que se optimizó en el desarrollo de este trabajo (ver **Figura 15**).

## Gel de Agarosa 1,5%: Producto de PCR



**Figura 15.** Gel de agarosa al 1,5%. Producto de PCR posterior a evaluar reacción cruzada de la técnica molecular para *Cyclospora cayetanensis*. **Pozo 1:** marcador de peso molecular, **Pozo 4:** control negativo de la PCR, **Pozo 5:** control positivo de la PCR, **Pozo 6:** ADN control de *Cryptosporidium parvum*, **Pozo 7:** ADN control de *Blastocystis sp*, **Pozo 8:** ADN control de *Giardia sp*, **Pozo 9:** ADN control de *Toxoplasma gondii*.

## 7. DISCUSIÓN

Los ensayos realizados para las muestras de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) (lechuga) utilizando el extractante Glicina 1M bajo un pH específico de 5,5 es el método más óptimo y específico en conjunto con la agitación mecánica realizada mediante el equipo BagMixer®. A diferencia para las muestras de *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) (repollo), el extractante solución de lavado compuesta de Tween 80 0,1%, PBS 1X y Ácido Sulfámico a un pH específico de 3,5 en adición del procedimiento de la agitación mecánica es el método que permitió recuperar los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

De acuerdo con la literatura Lucio et al 2012, reportan un método de detergentes para la recuperación de quistes de protozoos, el cual presentó el menor rendimiento en la prueba, afirmando que la solución de detergentes se considera de bajo costo pero esta técnica es ligeramente más compleja dado que la manipulación de los quistes es más difícil debido a la cantidad de

espuma generada durante el proceso, lo cual explicaría la pérdida de algunos quistes, es por ello que en nuestro trabajo se tuvo como factores de exclusión detergentes y soluciones jabonosas reportados en diferentes trabajos internacionales que muestran bajos porcentajes de recuperación de formas parasitarias. Sin embargo, cabe resaltar que la solución de lavado que estuvo compuesta de Tween 80 0,1% no tuvo interferencias a la hora de la recuperación de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en las muestras de *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L), esto puede deberse a la interacción de los demás reactivos que componen la solución de lavado (Alarcón 2005) y el pH específico que ayudo a acidificar el medio, dado que se debía garantizar que el método de recuperación no obstruyera la pared celular de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*. A diferencia con el extractante Glicina 1M bajo un pH de 5,5 (recomendado) no generó daños a nivel morfológico de los ooquistes, de esta manera se garantizó una visualización óptima de los ooquistes posterior a la coloración parasitológica de *Ziehl-Neelsen* descrita en la metodología de este proyecto. Estas mismas condiciones de trabajo para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en estas matrices vegetales fueron descritas y empleadas en la realización de un trabajo publicado por la línea de investigación por Muñoz-Sánchez et al. 2019: (*Food protozoa safety assessment and risk in school restaurants in Armenia, Colombia*), (45) en el cual se llevó a cabo este trabajo de maestría, a portando al conocimiento, donde aún en ese momento no se tenía ningún reporte en Colombia, sobre la presencia de protozoos patógenos en comedores escolares de la ciudad de Armenia, donde se procesaron alimentos para el consumo de la población escolar.

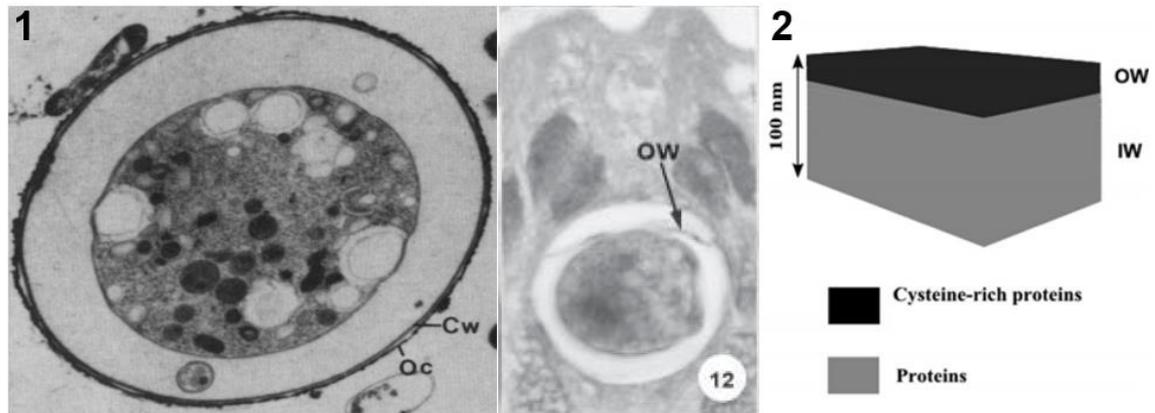
La funcionalidad del método de recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* sumado a la metodología establecida para la agitación mecánica de las muestras procesadas, demostraron el aporte que añadió la realización de este trabajo, en el artículo que se publicó (**Anexo 3**) donde se describe la

ejecución de dicha investigación hasta la fecha.

Respecto a las condiciones mencionadas, la etapa de agitación mecánica descrita por Hernández-Arango et al. 2019 (46) fueron analizadas a la hora de optimizar la metodología de recuperación para los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, dado que se tienen muy pocos trabajos con estos ooquistes en estas matrices vegetales específicamente (*Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L)). Con relación a lo anterior a la hora de establecer la funcionalidad del equipo BagMixer® era esencial tener en cuenta que otros equipos reportados para la agitación mecánica como el sonicador fueron descartados dado que su acción desintegra la membrana de los ooquistes y por ende no permite la visualización de estas formas parasitarias, aunque en otros estudios ha sido utilizado como fuente para la obtención de ADN de parásitos intestinales como *Giardia* y *Cryptosporidium* para análisis moleculares. Su eficiencia presenta efectos negativos al realizar la visualización bajo el microscopio.

Se ha reportado que los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* presentan una pared celular doble que le confiere a estos ooquistes un papel clave en la formación de una barrera altamente resistentes a un amplio conjunto de factores de estrés físico-químico y al mismo tiempo, que exhibe propiedades de la superficie que participan en las interacciones parásito-partículas (47). Los cuatro esporozoítos infecciosos de *Cyclospora cayetanensis* están protegidos por una pared multicapa complejo de 80 a 100 nm de espesor. La pared de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* está construida principalmente con materiales liberados secuencialmente por diferentes subconjuntos de orgánulos específicos que se encuentran en el citoplasma del macrogameto, los denominados cuerpos formadores de pared (**Figura 16**). Estas son algunas de las características de la biología de estos ooquistes que le han conferido a estos microorganismos el éxito de proliferar diversos ambientes aún en condiciones de estrés.

## Pared celular: *Cyclospora cayetanensis*



**Figura 16.** (1) Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* no esporulado. (2) Posible representación esquemática de las paredes del ooquiste de *Cyclospora cayetanensis*, **OW**, pared exterior; **IW**, pared interior. Tomado de Lainson & Ortega, 2015.

Una de las variantes que se decidió emplear para la concentración de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en ambas matrices vegetales fue la técnica de formol/éter que en esencia es un método de sedimentación por centrifugación, obteniendo resultados favorecedores en cuanto a la recuperación de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*. Este método ha sido reportado con frecuencia para análisis clínicos en heces y en menor proporción para la detección de protozoos parásitos en vegetales (48).

Para la confirmación de los ooquistes que se observaron por microscopia, se realizó un registro fotográfico el cual fue revisado y aprobado por un experto en microbiología, donde se logró observar características morfológicas de diagnóstico de los ooquistes como: tamaño entre 8 a 10  $\mu\text{m}$ , esféricos con doble pared celular y en algunos casos la coloración permitía observar la presencia de los dos esporoquistes dentro de cada ooquiste de *Cyclospora cayetanensis*.

Un método de detección estándar para la recuperación de microorganismos debe ser relativamente simple (conteniendo el menor número de pasos),

reproducible, rápido y fiable. Muchos métodos publicados para detectar las etapas transmisoras de parásitos protozoarios en los alimentos son principalmente modificaciones de métodos previamente publicados que utilizan pasos y reactivos ideados para otros fines (por ejemplo, la concentración de quistes de protozoarios y ooquistes de agua). Eficiencias de recuperación que van de 1 al 85% se han documentado (49).

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten dilucidar que la variable extractante en conjunto con la agitación mecánica, tienen relación directa con la obtención de los ooquistes inoculados y su interacción potencia la recuperación de éstos, es lo que se logró analizar en la optimización del método para las dos muestras vegetales. Por tanto, el objetivo de este trabajo siempre estuvo enmarcado en encontrar las mejores condiciones que permitieran una sensibilidad y especificidad de la técnica molecular por PCR convencional logrando detectar la mínima concentración de ADN de *Cyclospora cayetanensis* en matrices vegetales para este caso en *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) cuando estas fueron inoculadas experimentalmente con los ooquistes. Subsecuentemente al hallar los porcentajes de recuperación se logró establecer un método suficientemente sensible, asequible y económico para investigaciones a futuro complementando la efectividad del método a través del diagnóstico por PCR. Con base a lo reportado en cuanto al límite de detección de ADN de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* se determinó la sensibilidad de la técnica bajo las condiciones de lo anteriormente mencionado, con lo que respecta la biología de esta especie, es decir, de las formas parasitarias de *Cyclospora cayetanensis* y la naturaleza de estas matrices vegetales (50).

## 8. CONCLUSIONES

- La optimización del método desarrollado en este estudio para ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* permitió establecer en promedio un porcentaje entre el 28 – 60% de recuperación en las muestras de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L).
- Se establecieron las condiciones de un método de extracción de ADN para la amplificación de *Cyclospora cayetanensis* por PCR.
- Finalmente se determinó el límite de detección de la prueba por PCR en las muestras vegetales de *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L) a partir de una mínima concentración de 10 ooquistes.

## 9. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en muestras de campo donde se pueda ampliar y abordar un número de muestras significativo.
- Utilizar otras metodologías como inmunofluorescencia, así como también llevar a cabo repeticiones de los ensayos realizados, con el fin de ampliar el conocimiento relacionado con la adherencia de este microorganismo en las diferentes matrices vegetales.
- Analizar el comportamiento biológico de adherencia de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en las estructuras vegetales, de esta manera comprender los porcentajes de recuperación más bajos en muestras de campo.

## 10. SOCIALIZACIÓN EN EVENTOS CIENTÍFICOS

-Ponencia Oral presentada en el **LIV Congreso Nacional & V Internacional de Ciencias Biológicas**, titulada: Optimización de un método para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en *Lactuca sativa* var. *Iceberg* (L) & *Brassica oleracea* var. *Capitata* (L).



**ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**LIV CONGRESO NACIONAL & V INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

*Hace constar que el trabajo titulado*

**ACCB-0090 OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA RECUPERACIÓN DE OOQUISTES DE *Cyclospora cayetanensis* EN *Lactuca sativa* & *Brassica oleracea***

**Por los investigadores:**

Estefanía Buitrago López, Deicy Muñoz Sánchez, Fabiana Lora Suarez, Jorge Enrique Gómez Marín

Fue presentado en el marco del LIV CONGRESO NACIONAL & V INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, realizado en el Centro de Convenciones de Montería, del 20 - 24 de mayo 2019.

Jesús Ballesteros Correa, PhD.  
Presidente del Congreso

-Presentación en modalidad de póster. Trabajo anexo a esta investigación, en el Simposio **OMIC: Technologies for Research on Infectious Diseases**, titulado: In silico identification and description of hypothetical proteins related with adhesion in intestinal parasites: *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Giardia assemblage A and B*.



Santiago de Cali, septiembre 12 de 2017

Estefanía Buitrago  
Universidad del Quindío  
Armenia

**Asunto: Participación en Simposio "Omic Technologies for Research on Infectious Diseases"**

Estimada Estefanía,

Fue muy grato para nosotros contar con su participación en el I Simposio: "*Omic Technologies for Research on Infectious Diseases*", el cual tuvo lugar el pasado 6 y 7 de septiembre de 2017 en el Hotel Spiwak en Cali.

También, agradecemos la presentación realizada en modalidad poster del trabajo "*In silico identification and description of hypothetical proteins related with adhesion in intestinal parasites: Cyclospora cayetanensis, Cryptosporidium parvum, and Giardia assemblage A and B.*" durante el segundo día del Simposio, estamos seguros fue de interés de los asistentes.

Esperamos que este Simposio haya sido una oportunidad para ampliar su conocimiento en las tecnologías ómicas aplicadas a las enfermedades infecciosas, conocer lo que se está haciendo en el país en este ámbito y relacionarse con otros investigadores.

Atentamente,

Luis Enrique Vacafior  
Gerente de Proyecto  
CIDEIM

María Adelaida Gómez PhD  
Coordinadora Unidad de Bioquímica y Biología  
Molecular  
CIDEIM



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Shahnazi M., Jafari-Sabet M. Prevalence of Parasitic Contamination of Raw Vegetables in Villages of Qazvin Province, Irán, Foodborne Pathogens and Disease. 2010;7(9): 1025-1030
- (2) Oliveira C. A., Thomaz-Soccol V., Paulino R. C., Alcántara de C. E. Effect of vinegar on the viability of *Giardia duodenalis* cysts, International Journal of Food Microbiology. 2009; 128: 510-512.
- (3) Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. J. Parasitol. 2018; 80: 625-629.
- (4) Shields JM, Olson BH. *Cyclospora cayetanensis*: A review an emerging parasitic coccidian. Int J Parasitol. 2003; 33: 371-91.
- (5) Pérez-Cordón, G., Rosales, M. J., Valdez, R. A., Vargas-Vásquez, F., & Cordova, O. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2008; 25(1), 144-148.
- (6) CDC, 2016. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites-Cyclosporiasis (*Cyclospora* Infection) Outbreak Investigations and updates. CDC, 2017. Centers for Disease Control and Prevention, 2017. Parasites-Cyclosporiasis (*Cyclospora* Infection) Outbreak Investigations and Updates.
- (7) Chacin-Bonilla, L., 2017. *Cyclospora cayetanensis*. In: Rose, J.B., Jiménez-Cisneros, B. (Eds.), Global Water Pathogens Project, (R. Fayer and W. Jakubowski, (eds) Part 3 Protists) Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
- (8) Casillas SM, Bennett C and Straily A. Notes from the field: multiple cyclosporiasis outbreaks – United States, 2018. American Journal of Transplantation 18, 3072–3074

- (9) Robertson, L. J., and B. Gjerde. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. *J. Food Prot.* 2000; 63:775–778.
- (10) Junqiang Li, Zhaohui Cui, Meng Qi & Longxian Zhang. Advances in Cyclosporiasis Diagnosis and Therapeutic Intervention. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2020; 10: 43
- (11) Di Genova BM and Tonelli RR. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. *Frontiers in Microbiology.* 2016; (7), 256.
- (12) Karaman U, Daldal N, Ozer A, Enginyurt O and Erturk O., 2015 Epidemiology of *Cyclospora* species in humans in Malatya Province in Turkey. *Jundishapur Journal of Microbiology.*
- (13) Kłodkowska M, Pielok L, Frąckowiak K and Paul M., 2017. Intestinal coccidian parasites as an underestimated cause of travellers' diarrhoea in Polish immunocompetent patients. *Acta Parasitologica* 62, 630–638.
- (14) Ortega, Y. R., C. R. Sterling, R. H. Gilman, V. A. Cama, and F. Diaz. *Cyclospora* species—a new protozoan pathogen of humans. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328:1308–1312.
- (15) Ortega, Y. R., R. H. Gilman, and C. R. Sterling. A new coccidian parasite (Apicomplexa: *Eimeriidae*) from humans. *J. Parasitol.* 1994; 80:625–629
- (16) Ortega Y. R and Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, Food-Borne and Waterborne Parasite. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2010, p. 218–234.

- (17) Li J, Wang R, Chen Y, Xiao L, Zhang L. *Cyclospora cayetanensis* infection in humans: biological characteristics, clinical features, epidemiology, detection method and treatment. *Parasitology*. 2019; 1–11
- (18) Almeria S., Cinar H.N and Dubey J.P. *Cyclospora cayetanensis* and Cyclosporiasis: An Update. *Microorganisms*. Review, 2019; 7(9), 317
- (19) Chacín-Bonilla L. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic áreas. *Acta Tropica* (115). Review, 2010; 181–193
- (20) Hadjilouka A. and Tsaltas D. *Cyclospora Cayetanensis*—Major Outbreaks from Ready to Eat Fresh Fruits and Vegetables. MDPI. *Foods*. Review. 2020; 1-17.
- (21) Elshazly AM, Elsheikha HM, Soltan DM, Mohammad KA, Morsy TA. Protozoal pollution of surface water sources in Dakahlia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*. 2007;37:51-64.
- (22) Blans MCA, Ridwan BU, Verweij JJ, RozenbergAroka M, Verhoef J. Cyclosporiasis outbreaks, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis*. 2005; 1453-1455.
- (23) Ortega YR, Roxas CR, Gilman RH, Miller NJ, Cabrera L, Taquiri C, et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Perú. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 57:683-6.
- (24) Devera R, Blanco Y, González H, García L. Parásitos intestinales en lechugas comercializadas en mercados populares y supermercados de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2006; 26:100-7.
- (25) Nimri LF. *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites associated with diarrhea in a rural area of Jordan. *Int Microbiol*. 2003;6:131-5.

- (26) Gascón J, Álvarez M, Valls EM, Bordas MJ, Jiménez TM, Corachan M. Cyclosporiasis: A clinical and epidemiological study in travelers with imported *Cyclospora cayetanensis* infection. *Med Clin (Barc)*. 2001;116:451-64.
- (27) Chandra, V., Torres, M., Ortega, Y.R., 2014. Efficacy of wash solutions in recovering *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Toxoplasma gondii* from basil. *J. Food Protect.* 77, 1348–1354.
- (28) Doller PC, Dietrich K, Filipp N, Brockmann S, Dreweck C, Vonthein R, et al. Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg Infect Dis.* 2015;8:922-94.
- (29) Hoang LM, Fyfe M, Ong C, Harb J, Champagne S, Dixon B, et al. Outbreak of cyclosporiasis in British Columbia associated to imported Thai basil. *Epidemiol Infect.* 2005;133:23-37.
- (30) Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 2015;5:607-25.
- (31) Wang K-X, Li CP, Wang J, Tian Y. *Cyclospora cayetanensis* in Anhui, China. *World J Gastroenterol.* 2002;15:1144-8.
- (32) Di Gliullo AB, Cribari MS, Bava AJ, Cicconetti JS, Collazos R. *Cyclospora cayetanensis* in sputum and stool samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42:115-7.
- (33) Yai LEO, Bauab AR, Hirschfeld MPM, de Oliveira ML, Damaceno JT. The first two cases of *Cyclospora* in dogs, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018;39:177-9.

- (34) Hussein EM, Abdul-Manaem AH, el-Attary SL. *Cyclospora cayetanensis* oocysts in sputum of a patient with active pulmonary tuberculosis, case report in Ismailia, Egypt. J Egypt Soc Parasitol. 2005;35:787-93.
- (35) Turgay N, Yolasmaz A, Erdogan DD, Zeyrek FY, Uner A. Incidence of cyclosporiasis in patients with gastrointestinal symptoms in western Turkey. Med Sci Monit. 2007;13:34-39.
- (36) Azim A, Ahmed S, Paul SK, Nasreen SA, Sarkar SR, Ahmed MU, et al. Prevalence of intestinal parasites in raw vegetables consumed by inhabitants of Mymensingh City. Mymensingh Med J. 2018;27:440–4
- (37) Bennett J, Branchman P. (2009). Hospital Infections. 3 edición. Estados Unidos. Brown and Company. 641-646 pp.
- (38) Rivas L. (2003). Presencia de Parásitos Intestinales en Hortalizas que se Consumen Crudas en el Mercado Central de la Ciudad de Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 7-25 pp.
- (39) Puac S. (2003). Control Microbiológico de Ensaladas Elaboradas en el Servicio de Alimentos del Hospital General San Juan de Dios. Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 3-10:18-26 pp.
- (40) Longree B. Técnicas Sanitarias del Manejo de Alimentos. México. Editorial Doyma.1997. 40-45 pp.
- (41) OMS, 2002: Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). En: Guías para la calidad del agua potable, 2.<sup>a</sup> ed. Apéndice: Microbiological agents in drinking-water. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud, págs. 70–118.

- (42) Nascimento FS, Barta JR, Whale J, Hofstetter JN, Casillas S, Barratt J, Talundzic E, Arrowood MJ and Qvarnstrom Y., 2019. Mitochondrial junction region as genotyping marker for *Cyclospora cayetanensis*. *Emerging Infectious Diseases* 25, 1314–1319.
- (43) Lora-Suarez, F., Rivera, R., Triviño-Valencia, J., & Gomez-Marin, J. E. (2016). Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. *Water Research*, 100, 377–381.
- (44) Lalonde LF and Gajadhar AA. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74, 4354–4358.
- (45) Gloria Deicy Muñoz-Sánchez, Natalia Hernández-Arango, Estefanía Buitrago-López, Jorge Gómez-Marín (2019). Food protozoa safety assessment and risk in school restaurants in Armenia, Colombia. *Food Safety (Wiley)* 1-8.
- (46) Natalia Hernández-Arango, Valeria Pinto, Gloria Deicy Muñoz-Sánchez, Jorge Gómez-Marín (2019). Detection of *Giardia* spp. with formalin/ether concentration in *Brassica oleracea* (cabbage) and *Lactuca sativa* (lettuce). *Heliyon* 1-6.
- (47) Giangaspero A, Marangi M, Koehler AV, Papini R, Normanno G, Lacasella V, et al. Molecular detection of *Cyclospora* in water, soil, vegetables and humans in southern Italy signals a need for improved monitoring by health authorities. *Int J Food Microbiology*. 2015;211:95–100.
- (48) Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:218–34.

(49) Li J, Wang R, Chen Y, Xiao L, Zhang L (2019). *Cyclospora cayetanensis* infection in humans: biological characteristics, clinical features, epidemiology, detection method and treatment. *Parasitology* 1–11.

(50) Bilung LM, Tahar AS, Yunos NE, Apun K, Lim YA, Nillian E and Hashim HF (2017) Detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora* oocysts from environmental water for drinking and recreational activities in Sarawak, Malaysia. *BioMed Research International*.

## 12. ANEXOS

**Anexo 1:** Diluciones seriadas de ADN control de *Cyclospora cayetanensis*:

Se realizaron diluciones a través de la concentración de ADN control del protozoo, los cuales fueron realizados con base al protocolo de *Applied Biosystems* titulado Creación de curvas estándar con ADN genómico Plásmidos ADN para uso en PCR.

**Anexo 1.1** se identificó el tamaño del genoma de *Cyclospora cayetanensis*:

**n: 45 Mb** (45.000.000 pb)

**Anexo 1.2** se calculó la masa del ADN por genoma (*Cyclospora cayetanensis*):

m: [n] [1.096e<sup>-21</sup>g/pb]

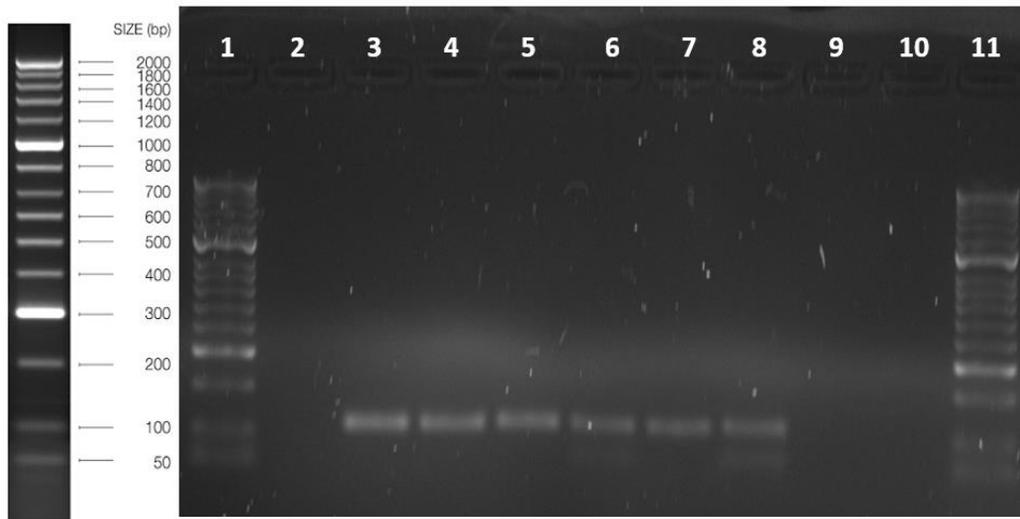
m: (45.000.000) x (1.096e<sup>-21</sup>g/pb)

**m: 4,932 x 10<sup>-14</sup> g**

**1 fg: 1 x 10<sup>-15</sup> g**

**m: 49,3 fg (1 ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* equivale a 49,3 fg)**

Dilución #	gDNA por Dilución	[ ] inicial (fg/μl) <b>C1</b>	Volumen de gDNA (μl) <b>V1</b>	Volumen en Diluyente (μl)	Volumen final (μl) <b>V2</b>	[ ] final dilución (fg/μl) <b>C2</b>	Resultado # de Copias
1	Stock	6.676.000	12,3	37,7	50	1643333,3	<b>100.000</b>
2	Dilución 1	164.333,3	5	45	50	164333,3	<b>10.000</b>
3	Dilución 2	16433,3	5	45	50	16433,3	<b>1000</b>
4	Dilución 3	1643,3	5	45	50	1643,3	<b>100</b>
5	Dilución 4	164,3	5	45	50	164,3	<b>10</b>
6	Dilución 5	82,16	25	25	50	82,16	<b>5</b>
7	Dilución 6	16,43	10	40	50	16,43	<b>1</b>



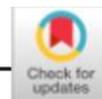
**Figura 17.** Gel de Agarosa 1,5%. Resultado de PCR, diluciones seriadas de ADN control de *Cyclospora cayentanensis*, del pozo 3 al pozo 8 banda de ADN con un amplificado de 116 pb. **Pozo 1:** marcador de peso, **Pozo 2:** control negativo de la PCR, **Pozo3:** amplificado dilución correspondiente a 100.000 copias de ooquistes, **Pozo 4:** amplificado dilución correspondiente a 10.000 copias de ooquistes, **Pozo 5:** amplificado dilución correspondiente a 1.000 copias de ooquistes, **Pozo 6:** amplificado dilución correspondiente a 100 copias de ooquistes, **Pozo 7:** amplificado dilución correspondiente a 10 copias de ooquistes, **Pozo 8:** amplificado dilución correspondiente a 5 copias de ooquistes, **Pozo 9:** amplificado dilución correspondiente a 1 copia de ooquiste.

**Anexo 2:** para la confirmación de las formas parasitarias de *Cyclospora cayetanensis* que se evidenció durante el registro fotográfico cuando se realizaron las recuperaciones de las muestras de alimentos reportadas en el desarrollo de esta investigación, se tuvo la oportunidad de participar en el Curso de Actualización en Identificación de Parásitos en Alimentos y Muestras Ambientales dirigido por la Doctora Ynes Ortega. De esta manera se determinó la presencia de los ooquistes recuperados en cada muestra reportada.



**Anexo 3:** participación de resultados en muestras de campo, para la recuperación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* y su detección de ADN en matrices vegetales.

Received: 17 August 2019 | Revised: 18 September 2019 | Accepted: 20 September 2019  
DOI: 10.1111/jfs.12714



ORIGINAL ARTICLE

Journal of  
Food Safety

WILEY

## Food protozoa safety assessment and risk in school restaurants in Armenia, Colombia

Gloria Deicy Muñoz-Sánchez<sup>1</sup> | Natalia Hernández-Arango<sup>1</sup> |  
Estefanía Buitrago-Lopez<sup>1</sup> | Julio César Luna<sup>1,2</sup> | Alejandro Zamora<sup>1</sup> |  
Fabiana Lora-Suarez<sup>1</sup> | Jorge Enrique Gómez-Marín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Parasitology Group (GEPAMOL, for the term in Spanish), Biomedical Research Center, Faculty of Health Sciences, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

<sup>2</sup>Faculty of Agro-industrial Sciences, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

### Correspondence

Jorge E. Gómez-Marín, Biomedical Research Center, Faculty of Health Sciences, Universidad del Quindío, Avenida Bolívar 12N Armenia, Quindío Colombia.  
Email: gepamo2@uniquindio.edu.co

### Abstract

This work assessed the risk of protozoa in 10 school restaurants in Armenia (Quindío, Colombia) by analyzing the presence of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, *Blastocystis*, and *Cyclospora cayetanensis* DNA in the food, water, and living and inert surfaces of school restaurants and in stools of children who ate at these restaurants. Of the 213 food, water, and surface samples, 6.6% were positive using PCR to test DNA for *Blastocystis*; 3.8% for *Cryptosporidium* spp; 0.9% for *G. duodenalis*; and 0% for *C. cayetanensis*. In 187 stool samples analyzed via microscopy from children who attended the restaurants, 40 (21.4%) were positive for *Blastocystis* and 21 (11.2%) were positive for *Giardia* spp. Via PCR, 20 (10.7%) were positive for *Cryptosporidium* and 0 (0%) for *C. cayetanensis*. A higher positivity in children's stools for *Blastocystis* spp was correlated with lower compliance in property conditions and for higher positivity of *Giardia* spp in children's stool was related to lower knowledge by food manipulators. Inspection scores can identify restaurants with higher risk for protozoa infection.