



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**ESTUDIO *In silico* DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL
GENOMA MITOCONDRIAL DE *Cyclospora cayetanensis* PARA
LA TRAZABILIDAD DE BROTES DE CICLOSPORIASIS**

Por:

Carmen Yazmín Pelayo Ayón

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRICOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Carmen Yazmin Pelayo Ayón, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestra en ciencias



Dra. Nohelia Castro del Campo
Directora de tesis



Dr. Luis Fernando Lozano-Aguirre Beltrán
Co-director de tesis



Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Integrante del comité de tesis



Dr. José Andrés Medrano Félix
Integrante del comité de tesis

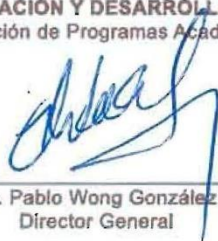
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Estudio *in silico* de la Variabilidad Genética del Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* para la Trazabilidad de Brotes de Ciclosporiasis” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Carmen Yazmín Pelayo Ayón, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado para el estudio del posgrado.

Asimismo, agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Coordinación Culiacán, por aceptarme como estudiante de su programa de posgrado y por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación

También, al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), por el apoyo técnico-científico brindado para llevar a cabo el cumplimiento del proyecto de investigación.

Agradezco de todo corazón a la Dra. Nohelia Castro del Campo por ser mi guía, durante la realización de este proyecto y motivarme a seguir siempre adelante. Además, ser mi apoyo incondicional y mostrar ser una persona muy empática hacia sus estudiantes. Gracias por su paciencia, disponibilidad, comprensión y amistad.

Agradezco a mi co-director de tesis el Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán, por su valiosa asesoría y por estar siempre dispuesto a compartir sus conocimientos. Muchas gracias por su amabilidad, sencillez y apoyo que brindo siempre, hacia mí y Estefanía durante nuestra estancia académica.

Al Dr. Andrés Medrano Félix, quien siempre estuvo dispuesto a ayudarnos ante cualquier situación que se nos presentara. Muchas gracias por su paciencia y todos sus conocimientos que me ayudaron a crecer profesionalmente.

Al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, por permitirme formar parte del gran equipo de trabajo, que es LANIIA. Por inculcarnos siempre el amor hacia la ciencia, el trabajo en equipo y a hacer las cosas de la mejor manera.

A la técnica de laboratorio QFB Célida Isabel Martínez Rodríguez, quien siempre nos apoyó y estuvo al pendiente de todo lo que necesitáramos para nuestro proyecto.

A la IBQ. Lesli Flores Díaz por su asistencia en biblioteca y su gran apoyo en la adquisición de material de consulta. Así como a M.E. Verónica Araiza, quien siempre se mostró amable y me apoyo en trámites escolares. También, agradezco en general a todo el personal de CIAD Culiacán, ya que cada uno de ellos contribuyó de diferente manera en mi formación profesional.

A mi compañera, amiga y hermana, Gpe. Estefanía Alarcón Fabela, con quien inicie esta aventura llamada *Cyclospora*. Muchas gracias por estar siempre conmigo y hacer mejores mis días.

A mis amigos Hilary, Manuel, Ángel, Jean Pierre, Bere, Rosalía, Edén y Lenin con quienes compartí experiencias y momentos agradables, pero sobre todo por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de laboratorio Grecia, Irvin, Vianey, Alondra, Belia, Cynthia, Roberto y Mónica.

A mis padres Carlos y Carmen a quien les debo todo lo que soy y que admiro profundamente por su amor infinito no obstante, les agradezco por enseñarme a ser una persona responsable y honesta.

A mis hermanas Perla, Ángeles por ser mi apoyo e impulsarme a seguir esforzándome. Así como a mis sobrinos Brittany y Emir por su gran cariño.

Por ultimo a mi novio Jesús Antonio Calderón Arévalo por siempre creer en mí y hacerme crecer como persona. Gracias por formar parte de mi vida.

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y familia

Por ser el soporte que me mantiene siempre de pie

¡Gracias!

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	6
CONTENIDO.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Epidemiología de Ciclosporiasis.....	15
2.1.1 Distribución Geográfica y Prevalencia	15
2.1.2 Transmisión de <i>Cyclospora cayetanensis</i> a Través de Alimentos.....	16
2.1.3 Transmisión de <i>Cyclospora cayetanensis</i> por Suelo.....	17
2.1.4 Transmisión de <i>Cyclospora cayetanensis</i> por Animales.....	18
2.1.5 Transmisión de <i>Cyclospora cayetanensis</i> por Agua de consumo, Riego y Residual.....	19
2.2 Taxonomía y Morfología de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	20
2.3 Biología, Mecanismos de Patogenicidad y Manifestaciones Clínicas.....	21
2.4 Organelos Extranucleares de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	24
2.4.1 Genoma Mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	24
2.4.2 Características del ADN Mitocondrial.....	25
2.5 Detección de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	26
2.5.1 Métodos de Detección Convencionales de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	26
2.5.2 Métodos de Detección Moleculares de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	26
2.6 Genotipificación y Análisis Filogenético.....	27
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo General.....	31
4.2 Objetivos Específicos	31

CONTENIDO (Continuación)

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1. Análisis <i>in silico</i>	32
5.1.1. Descarga de Secuencias Mitocondriales de la Base de Datos.....	32
5.1.2. Descargar de Secuencias del Genoma Completo de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	32
5.1.3. Búsqueda del Contig del Genoma Mitocondrial en los Genomas Completos de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	35
5.1.4. Verificación de los Ensamblajes de las Bases de Datos.....	35
5.1.5. Alineamiento de las Secuencias del Genoma Mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	36
5.1.6. Red de Haplotipos Utilizando las Regiones Repetidas de 15 Nucleótidos del Genoma Mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensi</i>	37
5.1.7. Red de haplotipos Utilizando el Genoma Mitocondrial Completo de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	37
5.1.8. Análisis Filogenético Utilizando el Genoma Mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	38
5.1.9. Filogenia de <i>Cyclospora cayetanensis</i> y <i>Eimeria</i> Spp.....	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1. Verificación de los Ensamblajes del Mitocondriales Obtenidos de Genomas Completos de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	40
6.2. Identificación de Variaciones de un Solo Nucleótidos (VSN) y Regiones Repetidas en el Genoma Mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	43
6.3. Análisis de la Red de Haplotipos Utilizando las Regiones Repetidas del Genoma Mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	50
6.4. Análisis Filogenético de Genomas Mitocondriales de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	51
6.5. Haplotipos del Genoma Mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i> que se Encuentran en las Bases de Datos.....	53
6.6. Comparar las Estrategias Utilizadas para el Análisis de la Variabilidad del Genoma Mitocondrial.....	56
6.7. Filogenia de <i>Cyclospora cayetanensis</i> y <i>Eimeria</i> Spp.....	58
7. CONCLUSIONES.....	61
8. RECOMENDACIONES.....	62
9. REFERENCIAS.....	63
10. ANEXOS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Ciclo biológico de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	22
2 Genes presentes en el genoma mitocondrial de <i>C. cayetanensis</i>	24
3 Comparación realizado del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, CDC:HCTX208:15.....	41
4 Comparación realizado del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CDC: HCTX204:15.....	42
5 Comparación realizado del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CDC:HCTX205:15.....	42
6 Comparación realizado del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CDC:HCTX227:15.....	43
7 Comparación realizado del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CHN_HEN01.....	43
8 Identificación de variaciones en 33 genomas mitocondriales de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	47
9 Identificación de regiones repetidas encontrada en el genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	49
10 Red de haplotipos Median-joning basada en 33 secuencias de las regiones repetidas del genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i> de ocho regiones geografica.....	51
11 Análisis filogenético del genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	53
12 Red de haplotipos Median-joning del genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i> de ocho regiones geograficas.....	56
13 Flujo de trabajo para el análisis de la variabilidad genética de <i>C. cayetanensis</i>	58
14 Secuencias de regiones repetidas de 15 nt presentes en el genoma mitocondrial de <i>C. cayetanensis</i> y ausencia en el genoma mitocondrial de <i>Eimeria</i> Spp.....	59
15 Relación filogenética entre <i>Cyclospora cayetanensis</i> y <i>Eimeria</i> Spp.....	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Resumen de los brotes de ciclosporiasis transmitidos por los alimentos del 2000-2019.....	17
2 Detección de ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> en el agua para el consumo humano.....	20
3 Secuencias mitocondriales de <i>Cyclospora cayetanensis</i> reportada en la base de datos del GenBank utilizadas en este estudio.....	33
4 Número de acceso de las secuencias del genoma completo utilizadas en este estudio y nombre del conting donde se encuentra el genoma mitocondrial.....	34
5 Lecturas del genoma completo en formato FASTQ de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	36
6 Identificación de variaciones de un solo nucleótido (VSN) en el genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	48
7 Haplotipos encontrados en el genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	51
8 Resumen general de la información utilizada para realizar el análisis de haplotipos.....	54
9 Haplotipos encontrados en el genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	55
10 Variaciones encontradas entre los haplotipos generados a partir de 33 secuencias del genoma mitocondrial de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	55

RESUMEN

Cyclospora cayetanensis (*C. cayetanensis*) es un parásito causante de la ciclosporiasis, una enfermedad gastrointestinal en humanos, transmitida por el consumo de alimentos frescos y agua contaminada. En países desarrollados los casos de ciclosporiasis se relacionan con productos frescos importados o viajes a países endémicos, esto último ha asociado a México a casos de esta enfermedad. Sin embargo, no hay ningún vehículo alimentario definitivo que haya sido implicado en la mayoría de los casos notificados durante los brotes. Por esta razón, son necesarios estudios de marcadores de tipificación que puedan identificar muestras genéticamente relacionadas que favorezcan el rastreo de brotes de ciclosporiasis. El genoma mitocondrial proporciona un objetivo atractivo para la búsqueda de marcadores, debido a que no presenta recombinación y se encuentra en un alto número de copias. Este trabajo tuvo como objetivo analizar las variaciones entre los genomas mitocondriales de *C. cayetanensis* reportado en las bases datos de GenBank, que incluyen secuencias relacionadas con México, con el fin de agrupar e inferir el origen geográfico del parásito. Para ello, se realizó un alineamiento múltiple, redes de haplotipos y análisis filogenéticos. Los resultados de este estudio, sugieren que las secuencias de China, Nepal, Massachusetts y Texas (incluye secuencias relacionadas con México) se agrupan dependiendo su origen geográfico. Asimismo, a través de estos análisis, se confirmó la presencia de repeticiones de 15 nucleótidos en el genoma mt que pueden variar de una a seis repeticiones; con respecto a los genomas mt relacionados con México, se encontró tres repeticiones de 15 nucleótidos, por lo que éstas pueden ser una característica de cepas mexicanas. Por otro parte, los genomas mt relacionados con México presentan cuatro variaciones de un solo nucleótido (VSN) en las posiciones 1898, 3974, 6203 y 6205 del genoma mt; estas variaciones forman dos haplotipos, que podrían ser características que permitan la diferenciación de aislamientos a nivel estado. Sin embargo, se necesita un mayor número de secuencias aisladas de México y otros países para establecer marcadores confiables. El conocimiento obtenido contribuye a la búsqueda de marcadores, así como al establecimiento de posibles marcadores característicos de cepas relacionadas con México, las cuales en un futuro se podrán comparar con cepas de origen certero de México, a fin de corroborar o deslindar responsabilidades ante la aparición de brotes.

Palabras clave: *Cyclospora cayetanensis*, genoma mitocondrial, región geográfica, haplotipos

ABSTRACT

Cyclospora cayetanensis (*C. cayetanensis*) is a parasite often transmitted by the consumption of fresh produce and contaminated water. In humans, provoke a gastrointestinal disease called cyclosporiasis. In the US, a great proportion of fresh produce cyclosporiasis outbreaks are originated in overseas growers' fields due to unsafe agricultural practices. However, the lack of sensitive molecular techniques to track the pathogen makes the identification cumbersome. Therefore, molecular typing marker studies are useful tools for tracing cyclosporiasis outbreaks. For example, the mitochondrial genome, which does not recombine and is found in high copy numbers, might be a good marker provider. This work aims to analyze the variations between the mitochondrial genomes of *C. cayetanensis* reported in the GenBank databases, which include sequences related to Mexico, in order to group and infer the geographical origin of the parasite. In addition, compare the use of these variations with the use of the entire mitochondrial genome (mt) to determine if they provide the same or different information for the traceability of *C. cayetanensis*. For this, a multiple alignment, haplotype networks and phylogenetic analysis were carried out. The results of this study suggest that the sequences from China, Nepal, Massachusetts and Texas (including sequences related to Mexico) are grouped depending on their geographic origin. Likewise, we confirmed the presence of repeats of 15 nucleotides in the mt genome that can vary from one to six repeats, with respect to the mt genomes related to Mexico, we found three repeats of 15 nucleotides, so these repeats can be a characteristic of Mexican strains. On the other hand, the mt genomes related to Mexico present four variations of a single nucleotide (VSN) at positions 1898, 3974, 6203 and 6205 of the mt genome; These variations form two haplotypes, which could be characteristics that allow the differentiation of isolates at the state level. However, a larger number of isolated sequences from Mexico and other countries are needed to establish reliable markers. The knowledge obtained contributes to the search for markers, as well as the establishment of possible characteristic markers of strains related to Mexico, which in the future may be compared with strains that will surely be isolated from Mexico, in order to corroborate or define responsibilities before the sprouting.

Key words: *Cyclospora cayetanensis*, mitochondrial genome, geographic region, haplotypes

1. INTRODUCCIÓN

La ciclosporiasis es una enfermedad gastrointestinal causada por el parásito *Cyclospora cayetanensis* (*C. cayetanensis*). La transmisión de *C. cayetanensis* persona-persona es poco probable que suceda, debido a que los ooquistes liberados en las heces no representan la forma infecciosa o transmisible de *C. cayetanensis*; para que el ooquiste se vuelva infeccioso debe someterse a un proceso de maduración de entre 1-2 semanas en el ambiente (Herwaldt, 2000). Esta enfermedad es común en las regiones tropicales y subtropicales en donde se incluye México (Chacín-Bonilla, 2010). Los casos en las regiones templadas a menudo se asocian con viajes a países donde la enfermedad es endémica (Nichols *et al.*, 2015; Diogo *et al.*, 2017; Casillas *et al.*, 2019) o con brotes de alimentos vinculados a varios tipos de productos frescos importados incluyendo frambuesas, albahaca, lechuga y cilantro (Herwaldt, 2000; Ortega and Sanchez, 2010; Abanyie *et al.*, 2015a, 2015b; Buss *et al.*, 2016; Casillas *et al.*, 2018).

En este contexto, durante el periodo de 2011 a 2019 en Estados Unidos se investigaron un total de 11 brotes de ciclosporiasis donde se asociaron vehículos alimenticios como responsables de la infección para al menos seis de los once brotes, de los cuales cinco estaban relacionados con productos importados de México como cilantro (al menos tres brotes), una mezcla de ensalada preempaquetada (un brote) (Casillas *et al.*, 2019) y albahaca (un brote) (CDC, 2019). Sin embargo, la fuente de infección para muchos casos de ciclosporiasis adquirida a menudo no se explica, en parte debido a la falta de métodos de tipificación para vincular los casos entre sí o con alimentos específicos (Casillas *et al.*, 2019).

Los avances recientes en la secuenciación masiva han permitido la obtención de secuencias nucleotídicas completas del parásito *C. cayetanensis*, incluidos sus genomas extranucleares, de los organelos apicoplasto y mitocondria (Qvarnstrom *et al.*, 2015, 2018; Tang *et al.*, 2015; Barratt *et al.*, 2019). Los genomas mitocondriales multicopia ya han sido utilizados para la detección y tipificación molecular en otros parásitos apicomplexas (Preston *et al.*, 2014), por lo que también podrían ser utilizados de igual forma para *C. cayetanensis*.

Como la mayoría de los otros parásitos apicomplexas, *C. cayetanensis* tiene un genoma mitocondrial lineal, el cual presenta un tamaño aproximado de 6.300 pb con aproximadamente 513 copias por cada genoma nuclear (Tang *et al.*, 2015) dispuestas en una estructura concatenada (Cinar

et al., 2015; Tang *et al.*, 2015). Anteriormente, en un estudio desarrollado por Tang *et al.*, (2015) identificaron ocho variantes de un solo nucleótido (SNV) y una variante de múltiples nucleótidos (MNV) de 7 pb entre los genomas mitocondriales de un aislados de *C. cayetanensis* de China y otro de Estados Unidos, así como una región variable en el área de unión entre las copias del genoma mitocondrial. Lo que hace del genoma mitocondrial un marcador potencial para el desarrollo de una herramienta de tipificación. Además, debido al número de copias del genoma mitocondrial de *C. cayetanensis*, las herramientas de diagnóstico molecular dirigidas a las secuencias mitocondriales pueden tener la ventaja adicional, por presentar una cantidad suficiente para ser detectadas con mayor facilidad que las que se dirigen a los genes nucleares (Tang *et al.*, 2015).

En este trabajo se analizaron las variaciones el genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* que se encuentra en las bases de datos del GenBank y Archivo Europeo de nucleótidos (ENA, siglas en inglés) en donde se incluyen cuatro secuencias relacionadas con México, con la finalidad de identificar asociaciones de las secuencias con su lugar de aislamiento, mediante la realización de un árbol filogenético y redes de haplotipos. Además, comparar la utilización de estas variaciones o posibles marcadores, con la utilización de todo el genoma mitocondrial (mt) para determinar la información que brinda cada estrategia, entorno a la trazabilidad de *C. cayetanensis*. Asimismo, identificar características específicas del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* asociadas con aislados de México. El análisis del genoma contribuirá en el conocimiento de la biología de *C. cayetanensis* y facilitará el desarrollo de nuevas herramientas de tipificación para la trazabilidad de *C. cayetanensis* en investigaciones de brotes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epidemiología de Ciclosporiasis

2.1.1 Distribución Geográfica y Prevalencia

La ciclosporiasis es una enfermedad intestinal causada por el parásito *Cyclospora cayetanensis*. Esta enfermedad, ocurre más comúnmente en regiones tropicales y subtropicales (Chacín-Bonilla, 2010). Los casos en regiones templadas a menudo se asocian con viajes a países donde la enfermedad es endémica (Nichols *et al.*, 2015; Casillas *et al.*, 2019) o con brotes de origen alimentario, vinculados con el consumo de productos frescos importados tales como; frambuesas, albahaca, lechuga y cilantro (Herwaldt, 2000; Ortega and Sanchez, 2010; Abanyie *et al.*, 2015a, 2015b; Buss *et al.*, 2016; Casillas, *et al.*, 2018). En áreas donde se ha estudiado la ciclosporiasis, el riesgo de infección es estacional, sin embargo no se ha identificado un patrón consistente con respecto a la época del año o las condiciones ambientales, como la temperatura o la lluvia (Casillas *et al.*, 2019).

La infección por *Cyclospora cayetanensis* se ha reportado en humanos en forma endémica o esporádica en países en vías de desarrollo y principalmente en forma epidémica en naciones desarrolladas. En áreas endémicas, los más susceptibles a la enfermedad son los niños menores de 10 años y los individuos inmunocomprometidos; mientras que en países desarrollados, todos son propensos de padecer la enfermedad (Chacín-Bonilla, 2010; Chacín-Bonilla y Vielma, 2018;). La mayor prevalencia en la población general oscila entre el 2 y el 20 % (la tasa es generalmente más alta en inmunocomprometidos, respecto a inmunocompetentes), particularmente en los países en vías de desarrollo. En los países desarrollados la prevalencia está comprendida entre 0,01 a 0,07 casos por cada 100,000 habitantes en relación directa con la diarrea de viajeros; además, la enfermedad es mayor en pacientes VIH positivos respecto a los negativos (20,4 frente al 1,5 %, respectivamente) (Bastidas *et al.*, 2018). En las personas inmunocompetentes, la ciclosporiasis afecta sobre todo a las personas de países endémicos como China (5.6%), Nepal (9.2%), Turquía

(17.4%), India (22%), Haití (7.9) Brasil (10.8%), Venezuela (22.4%), Perú (41.6%), Egipto (10%), y Sudáfrica (7.25%) (Giangaspero and Gasser, 2019).

En 2014, se publicó un estudio clínico en el hospital pediátrico de Morelia, Michoacán, México, en el que se examinaron 8,877 muestras de heces de niños. Las muestras fueron recolectadas desde el periodo 2000-2009. Los resultados muestran que; sesenta niños (0.67%) resultaron positivos para la presencia de *C. cayetanensis*, de los cuales 90% eran inmunocomprometidos. Además, la mayoría de los reportes sucedieron durante los meses de junio a agosto, meses que coinciden con la época de lluvia en Morelia (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2014). En un estudio posterior desarrollado en habitantes del estado de Jalisco, en 2019, se determinó una baja prevalencia de *C. cayetanensis* (2.9%) en comparación con otros parásitos entéricos como *Entamoeba histolytica* / *E. dispar* / *E. moshkovskii* (37.5%), *Endolimax nana* (44.2%), *Entamoeba coli* (27.9%), *Blastocystis* spp. (49%) y *Cryptosporidium* spp. (7.7%) (Galván-Ramírez *et al.*, 2019).

Por lo tanto, las variaciones en la prevalencia de infecciones por *Cyclospora* pueden estar influenciadas por el diseño del estudio, el área geográfica, la edad y el estado inmunológico de la población estudiada, la variabilidad estacional del parásito y los métodos de detección utilizados (Chacín-Bonilla, 2010).

2.1.2 Transmisión de *Cyclospora cayetanensis* a Través de Alimentos

La diseminación de *Cyclospora* de las áreas endémicas a las no endémicas ha aumentado en los últimos años debido a la creciente globalización en el comercio de alimentos frescos, los viajes internacionales y las tendencias modernas en el consumo de frutas y verduras (Chacín-bonilla and Barrios, 2011; Chacín-Bonilla *et al.*, 2010). Los brotes de ciclosporiasis transmitidos por los alimentos se han reportado en los Estados Unidos desde mediados de la década de 1990 y se han relacionado con varios tipos de productos frescos importados, incluyendo frambuesas, albahaca, arvejas, lechuga y cilantro (Herwaldt, 2000). Los brotes de ciclosporiasis transmitidos por los alimentos en los Estados Unidos del 2000-2019 se muestra en el cuadro 1 (CDC, 2019).

Cuadro 1. Resumen de los brotes de ciclosporiasis transmitidos por los alimentos del 2000-2019

Año	Mes	Jurisdicción (es)	Nº de casos	Vehículo de transmisión
2000	Mayo	Georgia	19	Frambuesas y / o moras (sospecha)
2000	junio	Pensilvania	54	Frambuesas
2001–02	Diciembre enero	Vermont	22	Frambuesas (probable)
2004	febrero	Illinois	57	Albahaca (probable)
2004	Mayo Junio	Pensilvania	96	Guisantes de Nieve de Guatemala
2005	Marzo mayo	Florida	582	Albahaca de Perú
2005	junio	Connecticut	30	Albahaca (sospechoso)
2008	marzo	Wisconsin	4	Guisantes (probable)
2008	julio	California	45	Frambuesas y / o moras (probable)
2013	junio	Iowa y Nebraska	161	Mezcla de ensalada en bolsa de México
2013	Junio-Julio	Texas	38	Cilantro de México
2013	julio	Wisconsin	8	Ensalada de Bayas (sospecha)
2014	Junio-Julio	Texas	26	Cilantro de México
2015	Mayo-julio	Georgia, Texas y Wisconsin	90	Cilantro de México
2016	Junio-Julio	Texas	6	Zanahorias o repollo verde (sospecha)
2018	Julio	MN,WI, WI,IA	237	Lata de vegetales
2018	Septiembre	CT, FL, IA, IL, IN, KY, MI, MN, MO, NE, NY, OH, SD , TN, VA, WI	511	Ensalada
2019	Julio	FL, MN, NY, OH, WI	205	Albaca

Adaptada de CDC, 2019

2.1.3 Transmisión de *Cyclospora cayetanensis* por Suelo

El suelo es una ruta potencial de transmisión de *Cyclospora*, particularmente en los países en desarrollo (Mansfield and Gajadhar, 2004). Koumans *et al.* (1998) refieren un estudio para identificar factores de riesgo de la infección por *Cyclospora* adquirida en Florida en 1995 mediante un análisis univariado, donde el suelo se asoció significativamente con la infección de *Cyclospora* (razón de posibilidades [OR]= 5.4, intervalo de confianza [IC] del 95% = 1.4-20.7). Cabe recalcar que el suelo fue la única exposición no alimentaria asociada significativamente con la infección de *Cyclospora*.

Otro estudio realizado por Chacín-Bonilla *et al.* (2007), determinaron los factores de riesgo de ciclosporiasis en Isla San Carlos, Venezuela. Los modelos de regresión logística univariados implicaron factores de riesgo que incluían vivir en áreas de extrema pobreza (razón de posibilidades [OR] = 1.77, intervalo de confianza [IC] del 95% 1.69-1.84), utilizando un área del patio trasero para la defecación (OR = 2.64, IC del 95% 2.10-3.31) y el contacto con suelo contaminado con heces humanas (OR = 3.32, IC del 95%: 2.55-4.32). Por lo que, la transmisión de infecciones de *Cyclospora* por el suelo en las zonas rurales o agrarias, donde el fecalismo al aire libre puede contaminar el suelo y la falta de instalaciones para el lavado de manos, podría ser una fuente importante de infección. Por esta razón, son necesarias más investigaciones para esclarecer la transmisión de este parásito por el suelo en poblaciones vulnerables. (Chacín *et al.*, 2007; Chacín-Bonilla, 2008; Giangaspero *et al.*, 2019).

2.1.4 Transmisión de *Cyclospora cayetanensis* por Animales

Hasta la fecha, se considera que *Cyclospora cayetanensis* es un protista antroponótico (transmisión de persona a persona). Sin embargo, se especula acerca de un posible papel de las especies animales como reservorios de *C. cayetanensis* (Chacín-Bonilla, 2010; Ortega and Sherchand, 2015a; Bhattachan *et al.*, 2018). En países endémicos, los casos de *Cyclospora cayetanensis* se han asociado con la presencia de animales domésticos (perros, pollos, patos) como un factor de riesgo importante para la diseminación (Bhandari *et al.*, 2015; Almeria *et al.*, 2019). En Perú, un estudio de cohorte en niños (1 mes a 10 años de edad) en un entorno urbano encontraron que el riesgo relativo de la ciclosporiasis era más común en niños en hogares donde había un animal doméstico especialmente, aves (intervalo de confianza [IC]=0.81-1.49), conejillos de indias (IC=0.99-2.44) y conejos (IC=1.23-3.69) (Bern *et al.*, 2002). Asimismo, la identificación de *Cyclospora* se lleva a cabo mediante microscopía y/o herramientas moleculares, por lo cual ha sido posible su aislamiento de heces de terneros en Japón (Yamada *et al.*, 2014), vacas lecheras en china (Li *et al.*, 2007), perros en Brazil (Yai *et al.*, 1997), pájaros en España (Pérez *et al.*, 2009), pollos en México (García *et al.*, 1996), pollos, perros y monos en Nepal (Chu *et al.*, 2004) y primates en Europa (Marangi *et al.*, 2015a). También los invertebrados, como las moscas domésticas (Muñoz and Rodriguez, 2015)

los rotíferos y los nematodos, pueden contribuir a la diseminación de la *Cyclospora* en el medio ambiente (suelo, agua) (Ortega and Sanchez, 2010).

2.1.5 Transmisión de *Cyclospora cayetanensis* por Agua de Consumo, Riego y Residual

La transmisión de *Cyclospora* mediante el agua depende de la probabilidad de que la fuente de agua pueda contaminarse y de que el tratamiento del agua, si lo hubiera, resulte efectivo en la eliminación de los ooquistes del parásito. Los ooquistes de *Cyclospora* son resistentes, por lo que el tratamiento de agua con desinfectantes químicos de rutina o métodos de desinfección es poco probable que elimine al parásito (Nimri, 2003). Los ooquistes de *Cyclospora* se han detectado en el agua para el consumo humano en varios casos (cuadro 2).

En un estudio realizado en Accra, Ghana, se analizaron 27 bolsas que contenían agua potable que se vendieron para consumo humano, donde se identificaron ooquistes de *Cryptosporidium* en 63% de las bolsas, mientras que 59.3% contenían ooquistes de *Cyclospora*, lo que sugiere contaminación fecal (Kwakye *et al.*, 2010). Por otra parte, en 2005, en una aldea cercana a Ismir, Turquía, se notificaron 30 casos de dolor abdominal, diarrea y náuseas en niños en edad escolar, el 5% presentaban infección por *Cyclospora* (el 22,8% menor de 14 años). Se sugirió que las infecciones probablemente se adquirieron por la ingestión de agua contaminada, pero no se realizó el análisis del agua (Aksoy *et al.*, 2007). Otro brote de Ciclosporiasis transmitido por el agua se reportó en Pokhara, Nepal, en el cual 12 de 14 soldados y dependientes británicos desarrollaron enfermedades diarreicas. El agua potable consistía en una mezcla de agua de río y municipal que contenía cloro a una concentración de 0.3 a 0.8 ppm (Rabold *et al.*, 1994).

En junio de 2016, la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América, emitió la alerta de importación #24-23 relacionada con la detección sin examen físico de cilantro fresco proveniente del estado de Puebla. Lo anterior, como consecuencia del registro de brotes recurrentes, durante los años de 2012 a 2015 de ciclosporiasis por el consumo de cilantro de Puebla, en ese país. Como parte del rastreo de la fuente de contaminación microbiana, encontraron fuentes de agua vulnerables a la contaminación debido a que el agua de riego tenía contacto con el suelo y basura, además había la presencia de animales

(Tibaduiza-Roa *et al.*, 2018).

Estos hallazgos en conjunto sugieren que *Cyclospora* tiene el potencial de propagarse por el agua potable, incluida el agua clorada, el agua recreativa o el agua de riego y aguas residuales en áreas endémicas. En este sentido, ooquistes de *Cyclospora* han sido identificados en aguas residuales y constituyen a datos que respaldan la hipótesis de que el agua contaminada con materia fecal puede actuar como un vehículo de transmisión (Mansfield and Gajadhar, 2004). Por lo anteriormente descrito, el agua contaminada utilizada para los cultivos alimentarios que se consumen crudos puede representar una ruta de transmisión; es decir, que los ooquistes transportados por el agua podrían influir en la contaminación de los alimentos (Chacín-Bonilla, 2010).

Cuadro 2. Detección de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en el agua para el consumo humano.

Fecha	País	Número de casos	Vehículo	Fuente del vehículo	Referencia
Julio 1990	Estados unidos (Illinois)	21	Agua del grifo	Estados unidos	(Huang <i>et al.</i> , 1995)
Junio 1994	Nepal (Pokhara)	12	Aguas fluviales y municipales	Nepal	(Rabold Gregory <i>et al.</i> , 1993)
Abril, 2008	Puerto rico	7	Agua Municipal	Puerto rico	(Brunkard <i>et al.</i> , 2011)

2.2 Taxonomía y Morfología de *Cyclospora cayetanensis*

Cyclospora pertenece al subfilo Apicomplexa, la subclase Coccidiasina y la familia Eimeriidae. Este género cuenta con 20 especies (Marangi *et al.*, 2015), las cuales se pueden dividir en dos grupos según la morfología: las especies que infectan a mamíferos insectívoros y roedores, que se caracterizan en ooquistes subesféricos y grandes; y las que infectan a primates, en los cuales se incluyen los humanos, que producen ooquistes esféricos y pequeños (Chacín-bonilla and Barrios, 2011; Eberhard *et al.*, 1999; Marangi *et al.*, 2015). Del último grupo mencionado, cinco especies infectan a primates (*C. papionis*, *C. colobi*, *C. cercopithec*i y *C. macacae*), entre las que se encuentra *C. cayetanensis*, la única descrita en la literatura que causa una infección en humanos (Marangi *et al.*, 2015b). *Cyclospora* mide 8,6 µm aproximadamente de diámetro.

Cuando este parásito se excreta en las heces, es una esfera indiferenciada que contiene una mórula. El ooquiste tiene una pared bicapa formada por una capa externa (predominantemente lipídica) y por una capa interna (glucoproteíca), un cuerpo polar y un residuo de ooquistes. Los ooquistes requieren de días a semanas fuera del huésped, en condiciones ambientales favorables, para esporular y, por lo tanto, volverse infecciosos. Cuando esporula, el ooquiste tiene dos esporoquistes (4 por 6,3 μm), cada esporoquiste contiene dos esporozoitos (1.2 por 9 μm) (Ortega and Sanchez, 2010).

2.3 Biología, Mecanismos de Patogenicidad y Manifestaciones Clínicas

Cyclospora cayetanensis es un parásito intracelular obligado con un ciclo de vida que no está caracterizado completamente (Figura 1). Es un patógeno monoxeno, esto quiere decir que requiere un solo huésped humano para completar todo el ciclo de vida (Sterling and Ortega, 1999). Este protozoo tiene un ciclo de vida intracelular obligado, dentro de vacuolas parasitóforas en las células epiteliales del tracto gastrointestinal; en ellas se lleva a cabo una fase asexual de reproducción (merogonia o esquizogonia) y otra sexual (gametogonia) (Mansfield and Gajadhar, 2004).

El ciclo de vida comienza con la ingestión de agua y alimentos contaminados con ooquistes esporulados. Una vez ingeridos, se da el proceso de desenquistamiento de ooquistes esporulados que ocurre en presencia de bilis, tripsina y otros factores, para la liberación final de 4 esporozoítos que invaden las células epiteliales del intestino delgado (Ortega, 1993).

Los esporozoítos se transforman en trofozoítos, los cuales, mediante división nuclear asexual por merogonia, forman los merontes que contienen los merozoítos. Seguido, 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); el microgametocito forma numerosos microgametos flagelados. El macrogametocito fertilizado se transforma en cigoto, el cual desarrolla una pared gruesa y resistente, y se convierte en un ooquiste que contiene el esporonte (Ortega y Sanchez, 2010).

Los ooquistes inmaduros, no esporulados, salen con las heces al exterior, donde el esporonte, bajo condiciones adecuadas, se divide en dos esporoquistes, cada uno de los cuales contiene dos esporozoítos (Chacín-Bonilla *et al.*, 2010; Chacín-Bonilla and Barrios, 2011; Bastidas-Pacheco *et al.*, 2018). Las condiciones ambientales necesarias y óptimas para la esporulación de los ooquistes, no son del todo conocidas. Dependiendo de las condiciones climáticas, requieren de pocos días a semanas para madurar y transformarse en ooquistes esporulados. Bajo condiciones experimentales, se ha logrado la esporulación de los ooquistes en dicromato de potasio al 2,5 % y ocurre de 7 a 13 días, a temperaturas de 22°C a 32°C. Los estudios de ooquistes procedentes de humanos y monos sugieren que la esporulación óptima ocurre a 20-22°C en 14 días (Ortega y Sanchez, 2010).

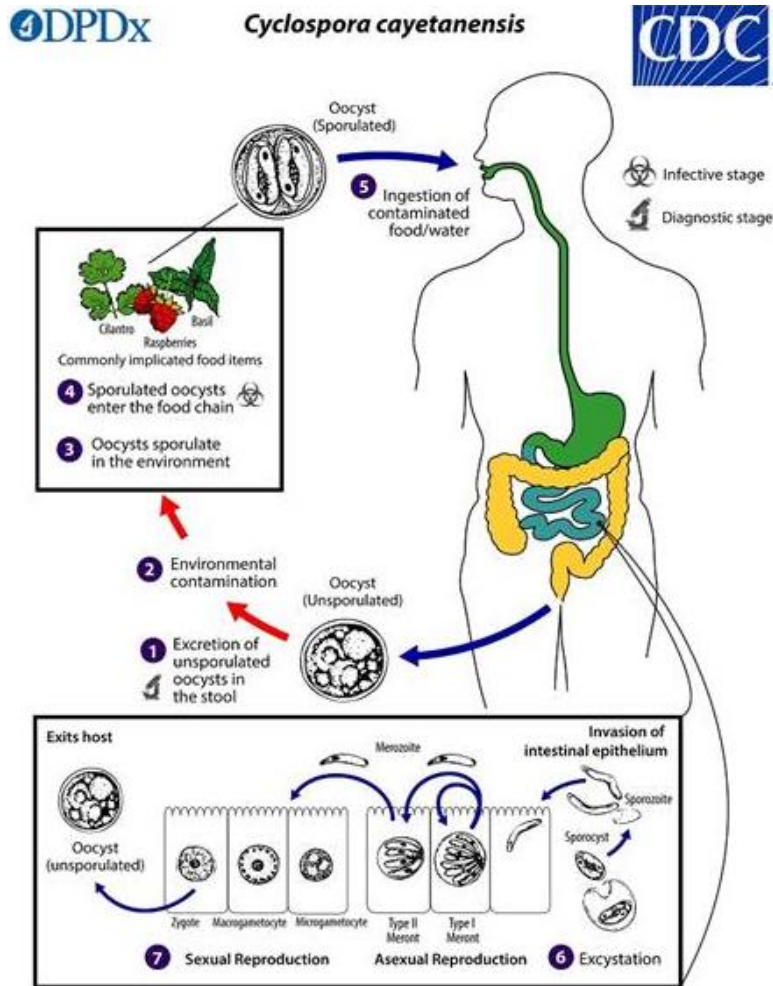


Figura 1. Ciclo biológico de *Cyclospora cayetanensis*. El parásito tiene dos estadios en su ciclo de vida: esporozoíto y ooquiste. La infección inicia por la ingestión de ooquistes presentes en alimentos o agua, seguido por la desenquistación. Posteriormente, lleva a cabo una fase asexual de

reproducción (merogonia o esquizogonia) y otra sexual (gametogonia). Por último, se forman los ooquistes inmaduros, no esporulados, que salen con las heces al exterior (CDC, 2016).

La ciclosporiasis generalmente afecta el intestino delgado de las personas enfermas, aunque pueden aparecer formas extraintestinales de la enfermedad. En el ciclo de vida, durante la etapa de replicación de merogonía (esquizogonía) y en menor medida durante la gametogonía, destruye las células del borde de cepillo intestinal y conduce a una alteración de la arquitectura de la mucosa con un acortamiento y ensanchamiento de las vellosidades intestinales, atrofia, edema de las vellosidades, hiperplasia de las criptas e hiperemia reactiva, con dilatación vascular y congestión de los capilares de las vellosidades.

Los cambios patológicos probablemente resultan en la pérdida de enzimas digestivas unidas a la membrana y disminuyen la superficie del intestino, produciendo diarrea y una disminución en la captación de electrolitos, agua y nutrientes (Mansfield and Gajadhar, 2004; Bastidas-Pacheco *et al.*, 2018). Las personas inmunocompetentes o inmunodeprimidas también pueden desarrollar formas extraintestinales de ciclosporiasis, incluida la enfermedad biliar, como la colecistitis poco profunda; síndrome de artritis reactiva; oligoartritis inflamatoria; inflamación ocular (conjuntivitis, iritis o episcleritis); y uretritis estéril (Archelli y Kozubsky, 2012; Bastidas *et al.*, 2018; Giangaspero y Gasser, 2019).

En las áreas endémicas, las infecciones asintomáticas son más frecuentes. Sin embargo, los niños más pequeños y personas de la tercera edad son los que tienen síntomas clínicos más graves. En entornos endémicos, las infecciones tienden a ser más leves a medida que los niños crecen, ya que la duración de la infección es más corta y la gravedad de la enfermedad disminuye (Ortega and Sanches, 2010; Bhattachan and Munankarmi, 2018). Aunque la ciclosporiasis humana generalmente no es mortal en los países desarrollados, la diarrea prolongada a menudo conduce a la deshidratación particularmente en bebés con mayor riesgo de deshidratación severa y muerte, especialmente si la ciclosporiasis se complica por infecciones con otros patógenos (virales, bacterianos o parasitarios, por ejemplo, *Cryptosporidium* y *Giardia*). Este aspecto debe ser considerado en el contexto que, en el mundo en desarrollo, las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años (Giangaspero y Gasser, 2019).

2.4. Organelos Extranucleares de *Cyclospora cayetanensis*

Cyclospora cayetanensis cuenta con dos importantes organelos, el apicoplasto que es el responsable de las rutas metabólicas, necesarias para la supervivencia de los parásitos apicomplexas y la mitocondria que juegan un rol importante en el metabolismo energético. Estos dos organelos, cuentan con su propio genoma, con un tamaño de 34,155 y 6274 respectivamente (Tang *et al.*, 2015; Cinar *et al.*, 2015). Los genomas del apicoplasto y la mitocondria presentan características interesantes con respecto al genoma nuclear, como la herencia uniparental; por lo que no hay recombinación y la co-herencia de los genomas de apicoplastos y mitocondrias. Por consiguiente, se han utilizado recientemente en el desarrollo de herramientas de códigos de barras para la trazabilidad del origen geográfico de parásitos apicomplexas como *Plasmodium* spp (Preston *et al.*, 2014).

2.4.1 Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

El genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* tiene una longitud de 6274 pb, con un contenido de GC del 33% (Figura 2). Es una molécula lineal concatenada o una topología de mapeo circular, el cual contiene tres genes codificantes de proteínas, citocromo b (*cytb*), citocromdo C oxidasa subunidad 1 (*cox1*) y citocromo C oxidasa subunidad 3 (*cox3*), además de 14 genes de fragmentos de la subunidades grandes (LSU) y nueve genes de fragmentos de la subunidades pequeñas (SSU) del ARN ribosomal (ARNr) (Cinar *et al.*, 2015, 2016).

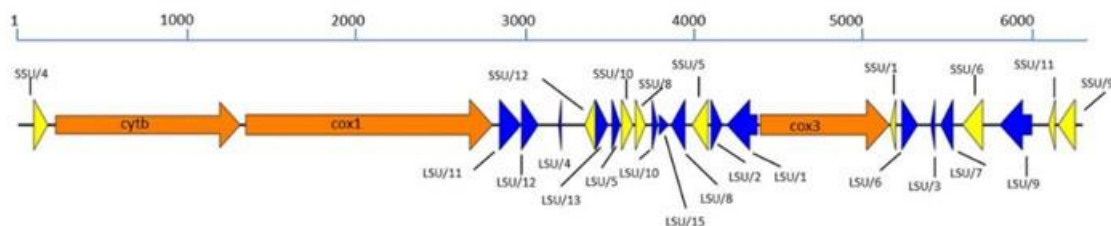


Figura 2. Genes presentes en el genoma mitocondrial de *C. cayetanensis* (Cinar *et al.*, 2015).

2.2 Características del ADN Mitocondrial

El genoma mitocondrial tiene características especiales como es la herencia uniparental, alto número de copias (poliplasmia) y una mayor tasa evolutiva a diferencia del genoma nuclear, (Ballard and Whitlock, 2004; Preuten *et al.*, 2010) por lo que podría ser utilizado para la búsqueda de marcadores que puedan ser complementarios con marcadores nucleares (Ballard and Whitlock, 2004; Jiang *et al.*, 2016).

Una de las particularidades del genoma mitocondrial es la herencia uniparental, la cual podría excluir la recombinación. En otros apicomplexas como *Plasmodium falciparum*, ya se ha usado esta característica para crear un código de barras que sea estable y geográficamente informativo a lo largo del tiempo (Preston *et al.*, 2014; Tyagi *et al.*, 2014; Schmedes *et al.*, 2019).

Por otra parte, el ADN mitocondrial se caracteriza por presentar poliplasmia, es decir tiene un elevado número de copias en cada mitocondria. Para *Cyclospora cayetanensis* se estima 513 copias del genoma mitocondrial por cada genoma nuclear, con base a una proporción relativa de lecturas de secuencias del genoma completo mapeado en cada genoma. No obstante, esta estimación parece alta comparada con el número de copias del genoma mitocondrial en otros parásitos apicomplexas como *Eimeria tenella*, donde el número de copias es 50 veces mayor que el genoma nuclear (Hikosaka *et al.*, 2011). El ADN mitocondrial del parásito causante de la malaria *Plasmodium falciparum*, comprende aproximadamente 20 copias por célula de un genoma de 6 kb y el genoma mitocondrial de *Plasmodium yoelli* presentan 150 copias por genoma nuclear (Vaidya *et al.*, 1989; Preiser *et al.*, 1996). Tal particularidad hace muy recomendable el estudio de ADN mitocondrial en los casos en los que el material genético de partida es muy escaso. Además, pueden tener la ventaja adicional de una mayor sensibilidad de detección que las que se dirigen a los genes nucleares.

A pesar del importante papel que desempeña el genoma mitocondrial en la producción de energía celular, su tasa de evolución es mucho más rápida que la del genoma nuclear (hasta 10 veces). Ello se ha relacionado con las características de este material genético y con el entorno que lo rodea. El ADN mitocondrial no está protegido por proteínas tipo histonas como el ADN nuclear y se ve continuamente expuesto a la acción de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. Además, se ha demostrado que los sistemas genéticos de reparación del ADN mitocondrial son

menos eficientes que los nucleares. Asimismo, la elevada susceptibilidad de este material genético a los efectos de la deriva genética, mecanismo mediante el cual las mutaciones que experimenta tienen elevada probabilidad de fijación (City, 2004; Fourdrilis *et al.*, 2018).

2.5 Detección de *Cyclospora cayetanensis*

2.5.1 Métodos de Detección Convencionales de *Cyclospora cayetanensis*

La detección de ooquistes de *C. cayetanensis* en heces, alimentos y en muestras ambientales, se lleva a cabo mediante microscopía óptica (Ortega and Sanchez, 2010). Algunos ooquistes de *Cyclospora* no se tiñen o lo hacen de forma variable (morado a rosa) mediante la tinción modificada de Ziehl-Neelsen, Kinyoun o tinción con Safranina (Visvesvara *et al.*, 1997); posteriormente, los ooquistes se identifican bajo un microscopio de campo brillante, contraste de fases o fluorescencia (Ortega and Sherchand, 2015). La microscopía de fluorescencia UV es más sensible y específica que la tinción con ácido rápido, pero requiere un microscopio de fluorescencia con un filtro especial que no está disponible comúnmente en los laboratorios de diagnóstico (Wroblewska *et al.*, 2018). Las principales limitaciones de los métodos de microscopia para la detección y cuantificación de *C. cayetanensis* son la baja especificidad y sensibilidad, así como también es una técnica que depende de la experiencia del operario para saber identificar a *Cyclospora* y poder diferenciarla de manera visual de otros microorganismos que se encuentren en la muestra (Mundaca *et al.*, 2008).

2.5.2 Métodos de Detección Moleculares de *Cyclospora cayetanensis*

Los métodos de detección molecular son cada vez más utilizados para el diagnóstico de infecciones humanas y para la detección de parásitos en agua, alimentos y muestras ambientales. Hasta la fecha, se han desarrollado diferentes técnicas moleculares para identificar a *Cyclospora*. Sin embargo, el

éxito de la detección de *Cyclospora* por PCR, al igual que con otros ooquistes de coccidio, depende de varios factores, incluido el método utilizado para extraer el ADN, la preservación de la muestra, la especificidad de los cebadores de PCR utilizados, etc. La efectividad de la extracción de ADN puede verse influenciada por la pared externa resistente del ooquiste, que es resistente a la lisis química y física, y también, la tensión y las condiciones de almacenamiento de los ooquistes (Giangaspero *et al.*, 2019).

Los ensayos moleculares se basan en la amplificación y análisis de los genes 18S rRNA (Sturbaum *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2011; Sulaiman *et al.*, 2014; Hussein *et al.*, 2016), hsp-70 (proteína de choque térmico 70) (Sulaiman *et al.*, 2013), así como ITS1 e ITS-2 (espacios intergénicos ribosomales) (Adam *et al.*, 2000; Giangaspero *et al.*, 2015b; Marangi *et al.*, 2015a). La detección molecular diferencial de *Cyclospora* de otros patógenos no humanos estrechamente relacionados como *Eimeria* spp. se realiza por PCR multiplex anidada dirigida al gen 18S rRNA o en tiempo real dirigidas a los genes 18S rRNA y hsp70 de *C. cayetanensis*, los cuales muestran resultados generalmente similares entre ambas técnicas (Shields *et al.*, 2013). Sin embargo, la amplificación por PCR anidada para la identificación molecular conlleva mucho tiempo, es laborioso y es propenso a producir resultados falsos positivos. Se ha desarrollado un control de amplificación interna altamente versátil que se puede complementar con los métodos de detección de patógenos qPCR y qRT-PCR, lo que reduce en gran medida los efectos de confusión de falsos negativos debido a los inhibidores de PCR sin afectar la detección de patógenos, (Deer *et al.*, 2010).

2.6 Genotipificación y Análisis Filogenético

Las técnicas de genotipificación microbiana, en las que se incluyen patógenos bacterianos y algunos eucariotas; están contribuyendo a la generación de conocimiento sobre su epidemiología. (Pérez-Losada *et al.*, 2018; Payne *et al.*, 2020). Para llevar a cabo estudios epidemiológicos de *C. cayetanensis*, es necesaria la caracterización genética, esta información permite identificar aislamientos de diferentes regiones geográficas. A su vez, contribuye a identificar el origen y la posible ruta de contaminación de los productos alimenticios para realizar intervenciones oportunas y efectivas por parte de las autoridades de salud pública (Cinar *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2016, 2019;

Hofstetter *et al.*, 2019). Para ello, se han realizado estudios filogenéticos del gen 18S del ARNr (Zhou *et al.*, 2011; Sulaiman *et al.*, 2014; Hussein *et al.*, 2016), hsp70 (Sulaiman *et al.*, 2013) y el ITS-1 (Adam *et al.*, 2000). Sin embargo, estos estudios han revelado que el nivel de conservación de la secuencia de nucleótidos no ha permitido la distinción de diferentes genotipos.

Los avances recientes en la secuenciación han permitido la obtención del genoma completo de *C. cayetanensis*, incluidos sus genomas extranucleares de los organelos apicoplasto y mitocondria (Qvarnstrom *et al.*, 2015, 2018; Tang *et al.*, 2015; Barratt *et al.*, 2019). Esto ha favorecido el desarrollo de una herramienta de tipificación de secuencia multilocus (MLST; siglas en inglés) para *C. cayetanensis* basada en 5 locis en el genoma nuclear, para ayudar en la investigación de brotes de ciclosporiasis, sin embargo el éxito para los 5 loci fue del 53% de las muestras (Guo *et al.*, 2016; Hofstetter *et al.*, 2019).

Un método alternativo al enfoque de la herramienta MLST (Multilocus Sequencing Typing, siglas en inglés) ha sido el estudio de organelos extranucleares, como la mitocondria donde se ha identificado variantes de un solo nucleótido (SNV) y una variante de múltiples nucleótidos (MNV) de 7 pb entre dos aislados de *C. cayetanensis* (Tang *et al.*, 2015). Asimismo, se ha identificado una región hipervariable que se encuentra en la región de unión mitocondrial que podría ser útil como un posible marcador que ayude en la investigación de brotes. Lo que hace del genoma mitocondrial un marcador potencial para el desarrollo de una herramienta de tipificación (Tang *et al.*, 2015; Gopinath *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2019).

Los estudios que exploran la variación de la secuencia de ADN a nivel intraespecífico suelen utilizar dos tipos de gráficos para resumirlas relaciones filogenéticas: árboles filogenéticos y redes de haplotipos (Mardulyn, 2012).

Los árboles filogenéticos son diagramas que representan las relación (no forman un ciclo) entre las especies, mediante un proceso de estimación que obtiene la mejor estima posible de las relaciones evolutivas basada en información incompleta (Huson and Scornavacca, 2010; Nakhleh, 2010; Ajawatanawong, 2016). La construcción de árboles filogenéticos puede realizarse a través de métodos de distancias y métodos discretos. Los métodos de distancia convierten los alineamientos de secuencias en una matriz de distancia genética; dos ejemplos de este tipo de algoritmo son el método de Pares No Ponderados Utilizando Media Aritmética (UPGMA; siglas en inglés) y de Unión de Vecinos (UV). En cambio, Los métodos discretos (también llamados basados en caracteres) consideran cada sitio del alineamientos, sin hacer ninguna transformación, los dos

métodos basados en caracteres más utilizados son Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (MV) (Yang and Rannala, 2012; Ajawatanawong, 2016).

Como ya se mencionó, los árboles filogenéticos se utilizan ampliamente para analizar las relaciones evolutivas entre diferentes especies o taxones. Sin embargo La reconstrucción de filogenias a partir de datos intraespecíficos (como la variación del ADN mitocondrial) es frecuentemente una tarea difícil, debido a las pequeñas distancias genéticas entre los individuos (Forster and Ro, 1994). La gran cantidad de árboles resultantes aceptables se expresa mejor mediante una red no enraizada en la que los nodos representan diferentes haplotipos, unidas por bordes (ramas) cuya longitud se define y muestra el número de nucleótidos que difieren entre ellos. Estas redes de haplotipos son construidas mediante el método de Unión Mediana o Parsimonia Estadística a partir de datos de población sin recombinación (Forster and Ro, 1994; Morrison, 2005; Huson and Scornavacca, 2010; Mardulyn, 2012).

3. HIPÓTESIS

Las variaciones de un solo nucleótido y/o regiones repetidas en el genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* aisladas de diferentes regiones permiten agruparse e inferir el origen geográfico mediante la utilización de árboles filogenéticos y redes de haplotipos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar *in silico* las variaciones en genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* de aislados de diferentes regiones que sean útiles para agrupar e inferir el origen geográfico del parásito.

4. 2 Objetivos Específicos

1. Obtener secuencias mitocondriales de *Cyclospora cayetanensis* reportados en las bases de datos.
2. Identificar variaciones de un solo nucleótido (VSN) y regiones repetidas del genoma mitocondrial que sean útil para la trazabilidad y asociación de posibles brotes de *Cyclospora cayetanensis*.
3. Determinar analizar el origen geográfico de *Cyclospora cayetanensis* de diferentes regiones geográficas, mediante la construcción de un árbol filogenético y redes de haplotipos utilizando el genoma mitocondrial.
4. Comparar la utilización de todo el genoma mitocondrial con las regiones repetidas para determinar cuál podría ser la mejor estrategia para analizar la variabilidad.
5. Identificar variaciones únicas de *Cyclospora cayetanensis* en comparación con el genoma mitocondrial de *Eimeria spp.*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Análisis *In silico*

5.1.1 Descarga de Secuencias Mitocondriales de la Base de Datos GenBank

Para obtener las secuencias del genoma mitocondrial completo, se descendieron de la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 26 secuencias de genomas mitocondriales de ocho regiones diferentes, que se encontraban disponibles al momento de hacer la búsqueda. Estas regiones son Texas (12 secuencias), Carolina del Sur (1 secuencia), Massachusetts (6 secuencias), Ohio (1 secuencia), Montana (1 secuencia), Nepal (4 secuencias), Maine (1 secuencia), China (1 secuencia), que se muestran en el cuadro 3.

5.1.2 Descarga de Secuencias del Genoma Completo de *Cyclospora cayetanensis*

Por otra parte, seis secuencias del genoma completo de *Cyclospora cayetanensis* fueron descendidas de la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para a partir de estas, buscar únicamente el genoma mitocondrial. De las seis secuencias anteriores, cuatro secuencias del genoma completo provenían de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis de Texas que estaban relacionadas con México. Se tiene especial interés en las secuencias relacionadas con México, ya que se han reportado brotes de ciclosporiasis en Estados Unidos que estuvieron involucrados con alimentos frescos importados de México, así como viajes a esta región, causando la restricción de producto mexicano. Estas secuencias nos permiten analizar información que sea útil en el conocimiento de presuntas cepas que se encuentren circulando en México. Asimismo, dos secuencias del genoma completo que pertenecen a pacientes con ciclosporiasis de China fueron descendidas, con el interés de tener un mayor número de secuencias de esta región, que contribuyan

a la obtención de resultados que brinden más información con respecto a posibles genotipos de China (cuadro 4).

Cuadro 3. Secuencias mitocondriales de *Cyclospora cayetanensis* reportada en la base de datos del GenBank utilizadas en este estudio.

Número de acceso	Nombre del Aislado	Fuente	Área geográfica	Fecha
1. MN260366	TX_14_CL_6	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
2. MN260365	TX_14_CL_23	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
3. MN260364	TX_14_CL_22	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
4. MN260363	TX_14_CL_21	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
5. MN260362	TX_14_CL_20	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
6. MN260361	TX_14_CL_19	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
7. MN260360	TX_14_CL_18	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
8. MN260359	TX_14_CL_17	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
9. MN260358	TX_14_CL_16	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
10. MN260357	TX_14_CL_15	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
11. MN260356	TX_14_CL_14	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
12. MN260355	TX_14_CL_13	Clínica, heces	USA: Texas	19-sep-19
13. MN260354	SC_14_CL_26	Clínica, heces	USA: Carolina del Sur	19-sep-19
14. MN260353	OH_14_CL_1	Clínica, heces	USA: Ohio	19-sep-19
15. MN260352	MT_14_CL_5	Clínica, heces	USA: Montana	19-sep-19
16. MN260351	ME_14_CL_25	Clínica, heces	USA: Maine	19-sep-19
17. MN260350	MA_14_CL_9	Clínica, heces	USA: Massachusetts	19-sep-19
18. MN260349	MA_14_CL_7	Clínica, heces	USA: Massachusetts	19-sep-19
19. MN260348	MA_14_CL_4	Clínica, heces	USA: Massachusetts	19-sep-19
20. MN260347	MA_14_CL_2	Clínica, heces	USA: Massachusetts	19-sep-19
21. MN260346	MA_14_CL_11	Clínica, heces	USA: Massachusetts	19-sep-19
22. MN260345	MA_14_CL_10	Clínica, heces	USA: Massachusetts	19-sep-19
23. KP231180	CycloAB	Clínica, heces	Nepal	03-Ago-18
24. MG831587	C8	Clínica, heces	Nepal	20-feb-18
25. MG831588	C10	Clínica, heces	Nepal	20-feb-18
27. MG831586	C5	Clínica, heces	Nepal	20-feb-18

Cuadro 4. Número de acceso del ensamblaje del genoma completo de *C. cayetanensis* utilizadas en este estudio que se encuentra en la base de datos del GenBank y nombre del conting donde se encuentra el genoma mitocondrial

Número de acceso del ensamblaje	Conting mt	Nombre del aislado	Fecha	Región geográfica	Fuente
GCA_003057635.1	QBLG01000939	CDC:HCTX205:15	2013	USA: TX	Heces, relacionado con el consumo de cilantro
GCA_002893335.1	PDMM01002259	CDC:HCTX208:15	2015	USA: TX	Heces, viajero a México
GCA_002893365.1	PDMN01001025	CDC:HCTX204:15	2013	USA: TX	Heces, relacionado con el consumo de cilantro
GCA_002893465.1	PDML01000985	CDC:HCTX227:15	2015	USA: TX	Heces, viajero a México
GCA_000769155.2	JROU02001700	CHN_HEN01	2011-07	China	Heces
GCA_002893305.1	PDMJ01000332	CHN_HEN01	2001	China	Heces

5.1.3 Búsqueda del Contig del Genoma Mitocondrial en el Genoma Completo de *Cyclospora cayetanensis*

Una vez descargados los genomas completos de *C. cayetanensis*, se buscaron los genomas mitocondriales utilizando el genoma de referencia KP231180, mediante el programa BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) (versión 2.9.0). Dicho programa, alinea secuencias de nucleótido tipo local, esto quiere decir que alinea secuencias de distintos tamaños, pero que se espera que tengan regiones en común. De esta manera se obtuvo el contig donde se encontraba la secuencia del genoma mitocondrial y se guardó en formato FASTA. Posteriormente, el programa Nucmer (versión 4) fue utilizado para conocer el sentido de las secuencias mitocondriales obtenidas del genoma completo, ya que todas deben tener la misma dirección (5'-3'). Aquellas secuencias que no tenían la misma dirección se les aplicó la reversa complementaria (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html).

5.1.4 Verificación de los Ensamblajes de las Bases de Datos

Los ensamblajes de los genomas mitocondriales obtenidos a partir del genoma completo fueron examinados para conocer si estaban correctamente ensamblados, esto es importante ya que nos permite saber cómo se encuentra el ensamblaje, sobre todo cuando se trabaja a nivel de nucleótidos. Para ello, se realizó un mapeo en el programa de Geneious Prime (versión 2020.1) con el genoma mitocondrial de referencia KP231180 y las lecturas del genoma completo en formato FASTQ de *Cyclospora cayetanensis* que fueran de las secuencias de los genomas completos (cuadro 5). Estas lecturas del genoma completo en formato FASTQ se obtuvieron de la base de datos Archivo Europeo de nucleótidos (ENA; siglas en inglés, <https://www.ebi.ac.uk/>). De esta manera se obtuvieron secuencias consensos o ensamblajes consensos, los cuales se alinearon con sus respectivos ensamblajes de los genomas mitocondriales obtenidos a partir del genoma completo. El alineamiento empleado fue de tipo global utilizando programa Muscle (versión 3.8.1551); el alineamiento global intenta alinear secuencias completas, el cual es útil para secuencias muy

parecidas y de longitud similar. Con lo anterior se pudo observar si los ensamblajes presentaban en mismo porcentaje de identidad

Cuadro 5. Lecturas del genoma completo en formato FASTQ de *Cyclospora cayetanensis*

Número de acceso del experimento	Nombre del Aislado	Fuente	Área geográfica	Fecha de colección	Fuente
SRX3994923	CDC:HCTX205:15	Clínica, heces	USA: TX	2013	Heces, consumo de cilantro
SRX3994915	CDC:HCTX208:15	Clínica, heces	USA: TX	2015	Heces, Viajero a México
SRX3994924	CDC:HCTX204:15	Clínica, heces	USA: TX	2013	Heces, consumo de cilantro
SRX3994918	CDC:HCTX227:15	Clínica, heces	USA: TX	2015	Heces, viajero a México
SRX3994920	CHN_HEN01	Clínica, heces	China	2011	Heces

5.1.5 Alineamiento de las Secuencias del Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

A partir de las 27 secuencias del genoma mitocondrial obtenidos de la base de datos de GenBank y las 6 secuencias del genoma mitocondrial obtenidas del genoma completo, se conformó una base de datos con un total de 33 secuencias con orígenes geográficos de Texas (4 secuencias relacionadas con México), China, Nepal, Maine, Ohio, Massachusetts, Carolina del Sur y Montana. Las variaciones de un solo nucleótido (VSN) y regiones repetidas entre las 33 secuencias del genoma mitocondrial, se buscaron mediante un alineamiento en el programa MUSCLE (versión 3.8.1551), mientras que el programa Geneious Prime (versión 2020.1) fue utilizado para visualizar las variaciones.

5.1.6 Red de Haplotipos Utilizando las Regiones Repetidas de 15 Nucleótidos del Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

Con las regiones repetidas de 15 nucleótidos que se encuentran en la región final de los genomas mitocondrial de *C. cayetanensis* se construyó una red de haplotipos, con el objetivo de estudiar la variabilidad genética de esta región mitocondrial. Para ello, primero se realizó un alineamiento en el programa MUSCLE (versión 3.8.1551) utilizando las regiones repetidas y se introdujo el alineamiento en formato FASTA en el programa DNAsp (versión 6.12.03) para generar los haplotipos (Variaciones de ADN que tienden a ser heredados juntos). El archivo con los haplotipos se introdujo al programa Network versión 5.0 (Fluxus Technology Ltd 2006-2020.) con el algoritmo Median Joining (basado en distancias) para crear la red de haplotipos. El programa de Network a diferencia de otros programas que crean redes de haplotipos, nos permite utilizar secuencias sin eliminar los sitios con huecos denominados gaps (-), que en el caso de las regiones repetidas proveen información con respecto al número de estas secuencias. Ya que, las secuencias con un menor número de repeticiones muestran más gap en la región repetidas de 15 nucleótidos al alinearla con una secuencia de referencia.

5.1.7 Red de Haplotipos Utilizando el Genoma Mitocondrial Completo de *Cyclospora cayetanensis*

El alineamiento en formato FASTA construido con el programa MUSCLE (versión 3.8.1551) con las 33 secuencias con orígenes geográficos de Texas, China, Nepal, Maine, Ohio, Massachusetts, Carolina del Sur y Montana fue utilizado para generar los haplotipos. Los datos de haplotipo fueron almacenados en formato NEXUS. Posteriormente, este archivo fue modificado para relacionar los haplotipos con el lugar de origen. El archivo en formato NEXUS de los haplotipos fue introducido en el programa PopART (versión 1.7) con el algoritmo median-joining (basado en distancias) para generar la red de haplotipos.

5.1.8 Análisis Filogenético Utilizando el Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

El análisis filogenético de las secuencias del genoma mitocondrial se llevó a cabo mediante la construcción de un árbol filogenético en el programa MEGA 7, esto a partir del alineamiento de las 33 secuencias mitocondriales de *Cyclospora cayetanensis*. Para ello, se tomó como base el método Neighbor Joining el cual usa el método de distancia que cuantifica las diferencias entre unidad taxonómica operativa (UTO). Este tipo de método es útil en estudios de código de barras molecular, ya que los individuos pertenecientes a una misma especie formarán grupos aislados debido a su alto nivel de semejanza. El árbol se validó utilizando el método bootstrap creando 500 réplicas. La visualización gráfica y diseño de los árboles se realizó mediante la herramienta iTOL versión 5.

5.1.9 Alineamiento y Filogenia de *Cyclospora cayetanensis* y *Eimeria* spp.

De acuerdo con Tang et al., (2015), *Cyclospora cayetanensis* mostró una similitud del 87-92% en la secuencia del genoma mitocondrial con respecto a la secuencia de los genomas mitocondriales de varias especies de *Eimeria* spp., con una mayor similitud con *E. dispersa* (KJ608416). Debido a lo anterior, es importante analizar si las regiones repetidas de 15 nucleótido del genoma mitocondrial de *C. cayetanensis* son únicas para este parásito o las comparte con *Eimeria* spp. Asimismo, es interesante comprobar la relación filogenética entre *C. cayetanensis* y *Eimeria* spp. Las secuencias del genoma mitocondriales de *Eimeria* spp fueron extraídas de la base de datos del GenBank con los siguientes números de acceso: KJ608418, KJ6084145, KJ608417, HQ702482, HQ702484, KJ608414, KJ608416, KF419217, HQ702481, HQ702480, JN864949, HQ702483 Y HQ702479. Con estas secuencias mitocondriales de *Eimeria* spp y las secuencias mitocondriales de *C. cayetanensis*, se realizó un alineamiento con programa MUSCLE versión 3.8.1551. Este alineamiento nos permite descartar que las variaciones de *Cyclospora cayetanensis* no se encuentren en *Eimeria* spp. ya que están relacionadas filogenéticamente. El programa JModelTest versión 2.1.10 se utilizó para identificar al modelo de mejor ajuste a los datos. El alineamiento de

las secuencias se convirtió en formato phylip (<http://insilico.ehu.es/tophylip/>). La filogenia se realizó con el programa Phym1 versión 3.3.20190321 para calcular árboles. El árbol fue visualizado en TreeDyn en <http://www.phylogeny.fr>.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Verificación de los Ensamblajes del Mitocondriales Obtenidos de Genomas Completos de *Cyclospora cayetanensis*

Los ensamblajes de *C. cayetanensis* que se encuentran en la base de datos del GenBank son de gran utilidad para realizar estudios *in silico*. Sin embargo, cuando se va a trabajar con secuencias a nivel de nucleótidos es necesario corroborar que estos ensamblajes estén bien realizados. Como expresa Heather and Chain (2016), la evolución en la tecnología de secuenciación ha llevado al desarrollo de mejoras continuas en los algoritmos de ensamblaje que pudieran proporcionarnos un resultado más confiable. Para analizar estos ensamblajes se generaron secuencias consensos mediante el mapeo de lecturas con un genoma de referencia que posteriormente fueron comparadas con los ensamblajes del GenBank.

Al comparar las secuencias del genoma mitocondrial PDMM01002259, PDMN010010259 y QBLG01000939 (secuencias relacionadas con México) con sus secuencias consensos (ensamblajes consenso) correspondientes, se encontró un 100 % de identidad (figura 3, 4 y 5). Lo cual significa que, estos tres ensamblajes son confiables y dan la seguridad que las variaciones encontradas en estos genomas mitocondriales, no son debidas por el funcionamiento del ensamblador utilizado.

Respecto a la secuencia PDML01000985 (secuencia relacionada con México), mostró el 99.95% de identidad con la secuencia consenso que se obtuvo en este estudio (figura 6); donde, el nucleótido ubicado en la posición 3140 de la secuencia PDML01000985 se encuentra el nucleótido adenina (A), mientras que la secuencia consenso obtenida a partir de las lecturas presenta un sitio hueco (gap). Al compararla con las otras secuencias del genoma mitocondrial se observó que ninguna contiene ese gap (-), por lo tanto, esto podría deberse a un error del ensamblaje de la secuencia mitocondrial PDML01000985. También, presenta diferencias en los nucleótidos que se encuentran en la posición 6156 y 6158, donde el ensamblaje consenso tiene el nucleótido adenina (A) en igual de timina (T). Por esta razón, el ensamblaje consenso obtenido en este estudio se utilizó para realizar los análisis posteriores y no la secuencia mitocondrial PDML01000985.

Por otra parte, la secuencia mitocondrial JROU02001700 (aislado de China) al compararse con la

secuencia mitocondrial consenso, se obtuvo una identidad del 99.9% (figura 7), presentando variaciones en la posición 5990 donde la secuencia consenso muestra dos gap (-). Al mismo tiempo, en la posición 5999 la secuencia consenso presenta los nucleótidos adenina (A) y citosina (C), mientras que las secuencia JROU02001700 presenta dos gap (-). Al compararlos con otras secuencias que no son de china estas también muestran gap en la posición 5990 y presentan los nucleótidos A y C. Sin embargo, la secuencia PDMJ01000332 (China) no cuenta con las lecturas en formato FASTQ para verificar estas variaciones.

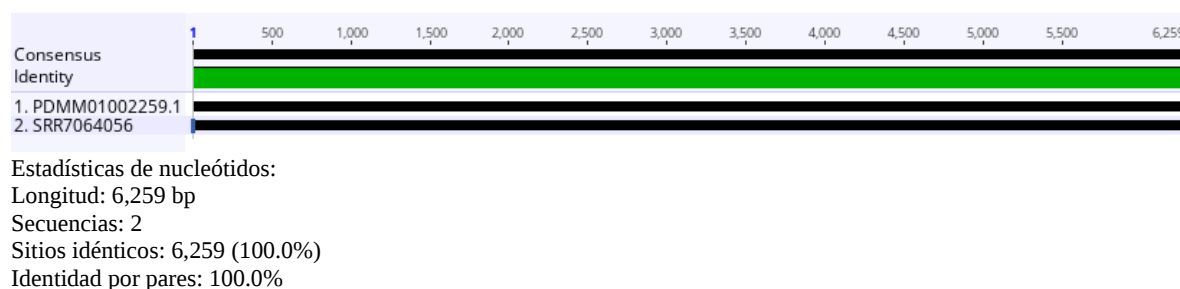


Figura 3. Comparación del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, CDC:HCTX208:15. Alineamiento realizado con MUSCLE del ensamblaje consensos del genoma mitocondrial y el genoma mitocondrial PDM010002259.1 obtenidos a partir de genomas completos de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis que viajaron a México, aislado CDC:HCTX208:15

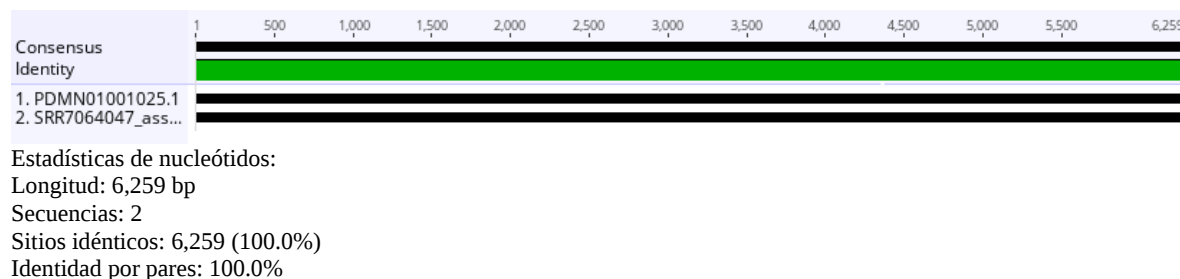
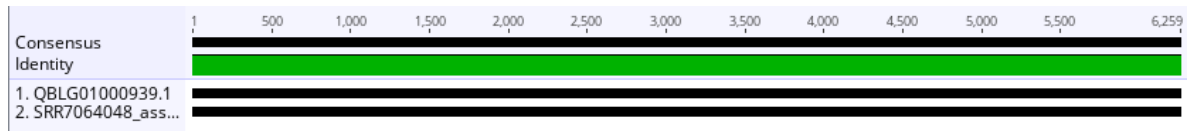


Figura 4. Comparación del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CDC: HCTX204:15. Alineamiento realizado con MUSCLE del ensamblajes consensos del genoma mitocondrial a partir de lecturas y genomas mitocondriales PDMN010001025.1 obtenidos a partir de genomas completos de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis relacionadas con el consumo de cilantro importado de México.



Estadísticas de nucleótidos:

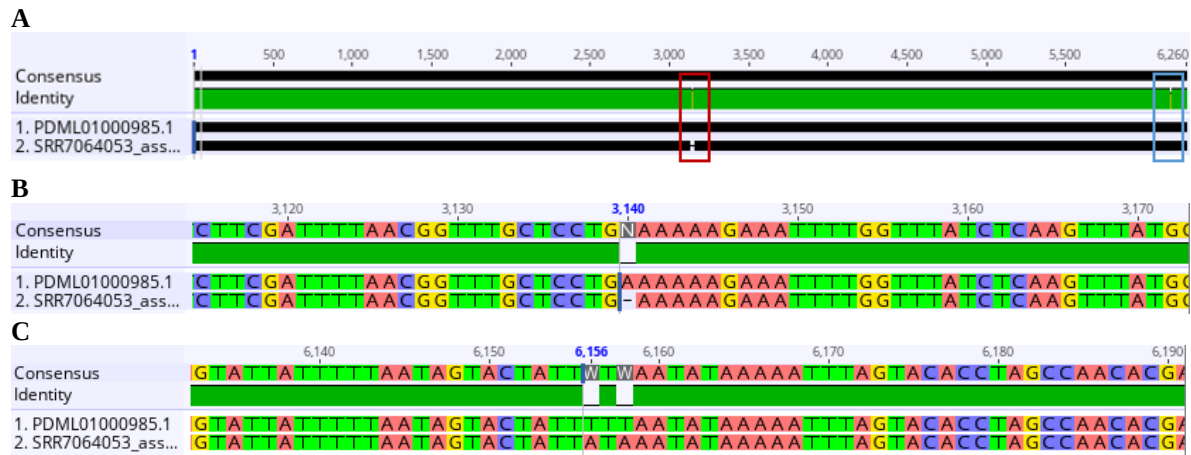
Longitud: 6,280 bp

Secuencias: 2

Sitios idénticos: 6,259 (100%)

Identidad por pares: 100%

Figura 5. Comparación del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CDC:HCTX205:15. Alineamiento realizado con MUSCLE del ensamblajes consensos del genoma mitocondrial a partir de lecturas y genomas mitocondriales QBLG01000939.1 obtenidos a partir de genomas completos de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis relacionadas con el consumo de cilantro importado de México, aislado CDC:HCTX205:15.



Estadísticas de nucleótidos:

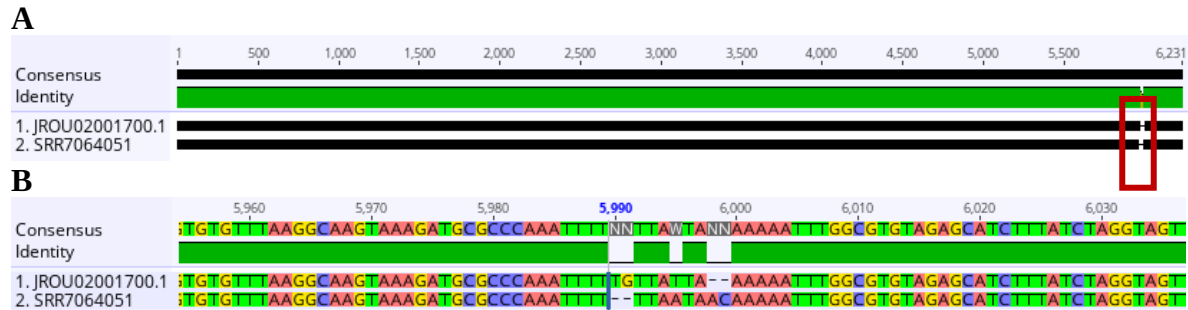
Longitud: 6,260 pb

Secuencias: 2

Sitios idénticos: 6,257 (99.95%)

Identidad por pares: 99.95%

Figura 6. Comparación realizado del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CDC:HCTX227:15. (A) Alineamiento realizado con MUSCLE del ensamblajes consensos del genoma mitocondrial a partir de lecturas y genomas mitocondriales PDML01000985.1 obtenidos a partir de genomas completos de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis relacionadas con viajes a México, aislado CDC:HCTX227:15. (B) Variaciones en el alineamiento que se encuentran en el recuadro rojo de la figura A. (C) Variaciones en el alineamiento que se encuentran en el recuadro Azul de la figura A.



Estadísticas de nucleótidos:
 Longitud: 6,246 bp
 Secuencias: 2
 Sitios idénticos: 6,185 (99%)
 Identidad por pares: 99.9%

Figura 7. Comparación del ensamblaje consenso mitocondrial y un ensamblaje mitocondrial público, aislado CHN_HEN01. (A) Alineamiento realizado con MUSCLE del ensamblajes consensos del genoma mitocondrial a partir de lecturas y genomas mitocondriales JROUO2001700.1 obtenidos a partir de genomas completos de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis de china, aislado CHN_HEN01. (B) Variaciones en el alineamiento que se encuentran en el recuadro rojo de la figura A.

6.2 Identificación de Variaciones de un Solo Nucleótidos (VSN) y Regiones Repetidas en el Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

Los resultados de la alineación, para determinar la presencia de variaciones tanto de un solo nucleótido (VSN) y regiones repetidas de 15 nucleótidos (nt) de los 33 genomas mitocondriales publicados en las bases de datos del GenBank de ocho regiones geográficas distintas (Nepal, China, Texas, Montana, Massachusetts, Carolina del sur, Maine y Ohio), son mostrados en la figura 8.

Con la comparación de los 33 genomas mitocondriales se identificaron 18 variaciones de un solo nucleótido (VSN) (cuadro 6). Estas 18 posiciones se enumeran en función de sus posiciones en la secuencia mitocondrial KP231180 utilizada como referencia. Las muestras de China presentan un mayor número de diferencias en los nucleótidos, siendo las variaciones ubicadas en la posición 2144, 3053, 3856, 4174, 4595, 4829 y 6258 únicas para esa región. Las muestras de Massachusetts presentaron las mismas variaciones, excepto la secuencia de Massachusetts MN260349.1_MA que en la posición del nucleótido 4056 contiene guanina (G) en lugar de timina (T).

Por otra parte, las muestras de Nepal fueron idénticas, salvo la secuencia KP231180.1 que varía en la posición 4416 donde presenta citosina (C) en lugar de adenina (A). De la misma manera, las

secuencias MN260358.1_TX y MN260353.1_OH presentaron las mismas VSN que las secuencias de Nepal. De manera que, esto podría sugerir que estas secuencias podrían ser originarias de Nepal, ya que los brotes que han ocurrido en Estados Unidos se asocian a productos importados de regiones endémicas o viajes a esos lugares.

En cuanto a las dos secuencias mitocondriales de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis en Texas que han sido asociados con viajes a México, se encontró que presentaron las mismas variaciones de un solo nucleótido junto con otras 5 secuencias más de Texas, por lo que el origen de los aislados podría tratarse del mismo. Asimismo, las otras dos secuencias mitocondriales de ooquistes de pacientes con ciclosporiasis en Texas que han sido asociados con cilantro importado de México son idénticas con dos secuencias más de Texas. En los recuadros rojos del cuadro 6 se encuentran las VSN entre las secuencias de viajeros a México y relacionadas con el consumo de cilantro. Lo dicho hasta aquí supone que, estas VSN podrían indicar que existe variabilidad a nivel regional o estado que permita discernir brotes acontecidos a nivel nacional.

Las VSN han sido reportadas en trabajos previos; Tang *et al.* (2015) compararon los genomas de un aislado de China (CHN_HEN01) y un aislado de Estados Unidos (Cyclo_CDC_2013) encontrando 8 variaciones de un solo nucleótidos y una variación de múltiples nucleótidos de 7-pb. Indiscutiblemente este estudio, nos proporciona información sobre las variaciones que presenta el genoma mitocondrial, no obstante tiene un número limitado de secuencias del genoma mitocondrial que no permite realizar asociaciones entre los aislados. En otro estudio realizado recientemente por Cinar *et al.* (2020) identificaron 12 variaciones de un solo nucleótido utilizando 24 secuencias. En comparación con dicho estudio, en el presente trabajo se analizaron 33 secuencias mitocondriales, incluyendo cuatro secuencias que estaban relacionadas con México y tres secuencias de China.

En el caso de las regiones repetidas de 15 nucleótidos (nt), el genoma mitocondrial de *C. cayetanensis* mostró un alto grado de variabilidad (Figura 9). Entre los genomas mitocondriales, estas regiones repeticiones varían de uno a seis copias, resultando en varias longitudes. Además, estas regiones repetidas muestran variaciones en los nucleótidos. Al respecto conviene decir que, estas secuencias son de gran interés debido a su hipervariabilidad, aunque se necesita seguir estudiando estas regiones que se encuentran dentro del genoma mitocondrial, para conocer qué tan informativas son en cuanto a relacionar aislados durante el estudio de brotes de ciclosporiasis.

Las tres secuencias de China presentaron una sola repetición de 15 nucleótidos (nt), mientras que

las secuencias relacionadas con México y otras 12 secuencias de Texas mostraron tres repeticiones de 15 nt con algunas variaciones en los nucleótidos de las regiones repetidas. Esto es interesante, ya que mediante el número de estas regiones repetidas es posible poder agrupar estos aislados dependiendo su región de aislamiento.

Las regiones repetidas que se encuentran en el genoma mitocondrial de *C. cayetanensis* ya han sido estudiadas por Cinar *et al.*, (2016) donde ellos utilizaron la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) dirigida a esta región variable del genoma mitocondrial de *C. cayetanensis*, para evaluar la heterogeneidad genética utilizando curva de fusión, electroforesis en gel y análisis de secuencia de los productos qPCR y observaron la segregación geográfica de los genotipos entre los especímenes analizados; de la misma manera como ocurrió con los aislados de China y Texas en nuestro estudio. Un segundo estudio realizó secuenciación de sanger de esta misma región para analizar muestras vinculadas a grupos de casos y comparar los datos genéticos con la información epidemiológica obtenida durante la investigación de brotes, donde observaron que los resultados de la tipificación fueron idénticos entre las muestras dentro de cada grupo de casos epidemiológicamente definidos para 7 de 10 grupos (Nascimento *et al.*, 2019).

Las regiones repetidas del genoma mitocondrial de otros organismos como peces y aves se han estudiado y asumido que el número de repeticiones podrían ser constantes en ciertas poblaciones geográficas (Mundy *et al.*, 1996; Padhi, 2014). Por lo que estas secuencias del genoma mitocondrial de aislados de China y las secuencias de aislamiento de Texas también se pueden asociar mediante el número de repeticiones, pudiendo ser esas tres repeticiones características de aislados que se encuentren circulando en México, que permitan diferenciar a posibles cepas mexicanas de aquellas de otras regiones geográficas.

De las 4 secuencias de Nepal, se detectó que todas comparten 4 repeticiones junto con 2 secuencias de Massachusetts y 1 secuencia de Ohio. Esto causa confusión, ya que en Estados Unidos sólo hay reportes de brotes de ciclosporiasis por viajes a áreas endémicas o el consumo de productos importados de estas regiones, por lo que se podría creer que estas 2 secuencias de Massachusetts y la secuencia de Ohio tienen relación con Nepal.

Por otra parte, las secuencias de Massachusetts varían de cuatro a seis repeticiones. Lo que puede significar que, estas regiones repetidas no permiten agrupar o establecer una relación entre los brotes de ciclosporiasis de los aislados de Massachusetts, contrario a lo que se aprecia con los aislados de China y Texas, por lo que diferentes números de repeticiones se puede observar en

aislados asociados. Debido a esto es necesario seguir estudiando estas regiones repetidas en las que se incluyan un mayor número de aislados, así como incluir las VSN que se encuentren en todo el genoma mitocondrial de *C. cayetanensis*.

Las variaciones en el genoma de organelos como la mitocondrial y el apicoplasto en otros apicomplexas como *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, han sido ampliamente estudiados, ya que son particularmente informativos en el rastreo de patrones de distancia genética y la dinámica de poblaciones, debido a la herencia materna estricta de estos organelos que podría excluir la recombinación y, por lo tanto, crear un código de barras que sea estable y geográficamente informativo a lo largo del tiempo (Preston *et al.*, 2014; Schmedes *et al.*, 2019).

Además, las secuencias mitocondriales y de cloroplastos se usan comúnmente en código de barras de ADN para animales y plantas y se han utilizado para explorar los orígenes de los humanos (Fiser and Buzan, 2013; Shinde *et al.*, 2018). En *Cyclospora cayetanensis*, este tipo de estudios pueden ser utilizados como herramientas de tipificación molecular importantes para las investigaciones y prevención de casos y brotes de ciclosporiasis, incluida la identificación de vehículos de infección de alimentos y sus fuentes. El presente análisis comparativo de las 33 secuencias del genoma mitocondrial de 8 regiones distintas (Texas, Carolina del Sur, Massachusetts, Ohio, Montana, Nepal, Maine, China) obtenido de las bases de datos del GenBank, es una primera aproximación que vislumbra y contribuye al conocimiento de este patógeno que puede ser ampliado en un estudio más completo de estas variaciones genéticas.

Es importante seguir analizando todo el genoma mitocondrial de *C. cayetanensis* para conocer qué tan informativos son las regiones repetidas o VSN para ser utilizados como método de la trazabilidad de este parásito y poder establecer con mayor seguridad si estas variaciones son específicas de una región. Aunque, el análisis únicamente de variaciones específicas como las regiones repetidas, es más fácil y brinda información importante, siempre es mejor el análisis de todas las variaciones para tener un panorama completo.

La secuenciación del genoma mitocondrial para la genotipificación y trazabilidad de *C. cayetanensis* se ha mostrado como un enfoque más viable que la secuenciación del genoma completo debido al tamaño del genoma (~ 45 Mb). Otro factor de complicación de la utilización del genoma completo es el grado de variaciones debido a los eventos de recombinación genética en las subpoblaciones de este parásito, lo que puede dar lugar a una alta heterocigosidad del genoma y la interrupción de las asociaciones SNP multilocus

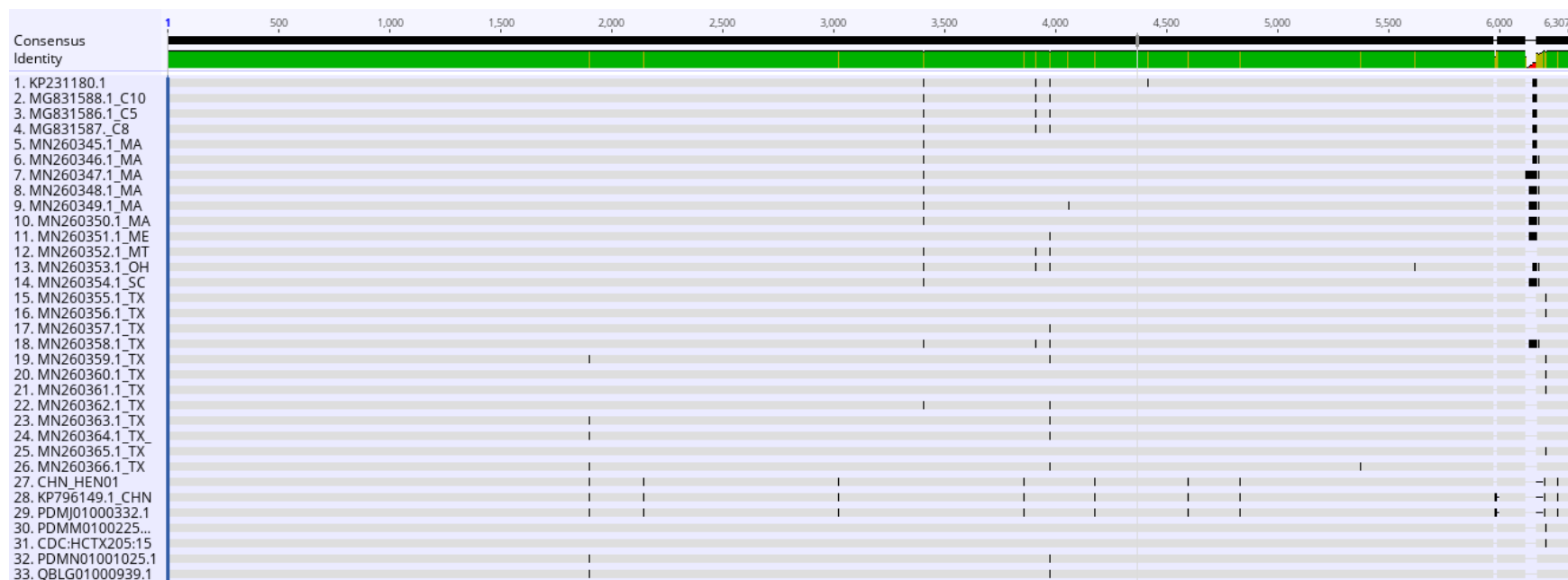


Figura 8. Identificación de variaciones en 33 genomas mitocondriales de *Cyclospora cayetanensis*. 19 variaciones de un solo nucleótido (VSN) y variaciones de regiones repetidas de 15 pb en la región terminal fueron identificadas en todo el genoma mitocondrial.

Cuadro 5. Identificación de variaciones de un solo nucleótido (VSN) en el genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

Genoma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	1898	2144	3053	3405	3856	3911	3974	4056	4174	4416	4595	4829	5371	5616	6198	6203	6205	6258
1. KP231180.1	G	G	T	T	C	A	k	T	A	C	C	C	C	A	C	T	T	T
2. MG831586.1_C5	G	G	T	T	C	A	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
3. MG831587.1_C8	G	G	T	T	C	A	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
4. MG831588.1_C10	G	G	T	T	C	A	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
5. MN260352.1_MT	G	G	T	T	C	A	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
6. MN260358.1_TX	G	G	T	T	C	A	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
7. MN260353.1_OH	G	G	T	T	C	A	T	T	A	A	C	C	C	T	C	T	T	T
8. KP796149.1_CHN	A	A	A	G	A	C	G	T	T	A	T	T	C	A	T	T	T	A
9. CHN_HEN01	A	A	A	G	A	C	G	T	T	A	T	T	C	A	T	T	T	A
10. PDMJ01000332.1	A	A	A	G	A	C	G	T	T	A	T	T	C	A	T	T	T	A
11. MN260345.1_MA	G	G	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
12. MN260346.1_MA	G	G	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
13. MN260347.1_MA	G	G	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
14. MN260348.1_MA	G	G	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
15. MN260349.1_MA	G	G	T	T	C	C	G	G	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
16. MN260350.1_MA	G	G	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
17. MN260362.1_TX	G	G	T	T	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
18. MN260354.1_SC	G	G	T	T	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
19. MN260357.1_TX	G	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
20. MN260351.1_ME	G	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
21. MN260355.1_TX	G	G	T	G	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T
22. MN260356.1_TX	G	G	T	G	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T
23. MN260360.1_TX	G	G	T	G	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T
24. MN260361.1_TX	G	G	T	G	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T
25. MN260365.1_TX	G	G	T	G	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T
26. PDMM01002259.1	G	G	T	G	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T
27. CDC:HCTX205:15	G	G	T	G	C	C	G	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T
28. PDMN01001025.1	A	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
29. QBLG01000939.1	A	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
30. MN260363.1_TX	A	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
31. MN260364.1_TX	A	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	T	T	T
32. MN260366.1_TX	A	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	T	A	C	T	T	T
33. MN260359.1_TX	A	G	T	G	C	C	T	T	A	A	C	C	C	A	C	A	A	T

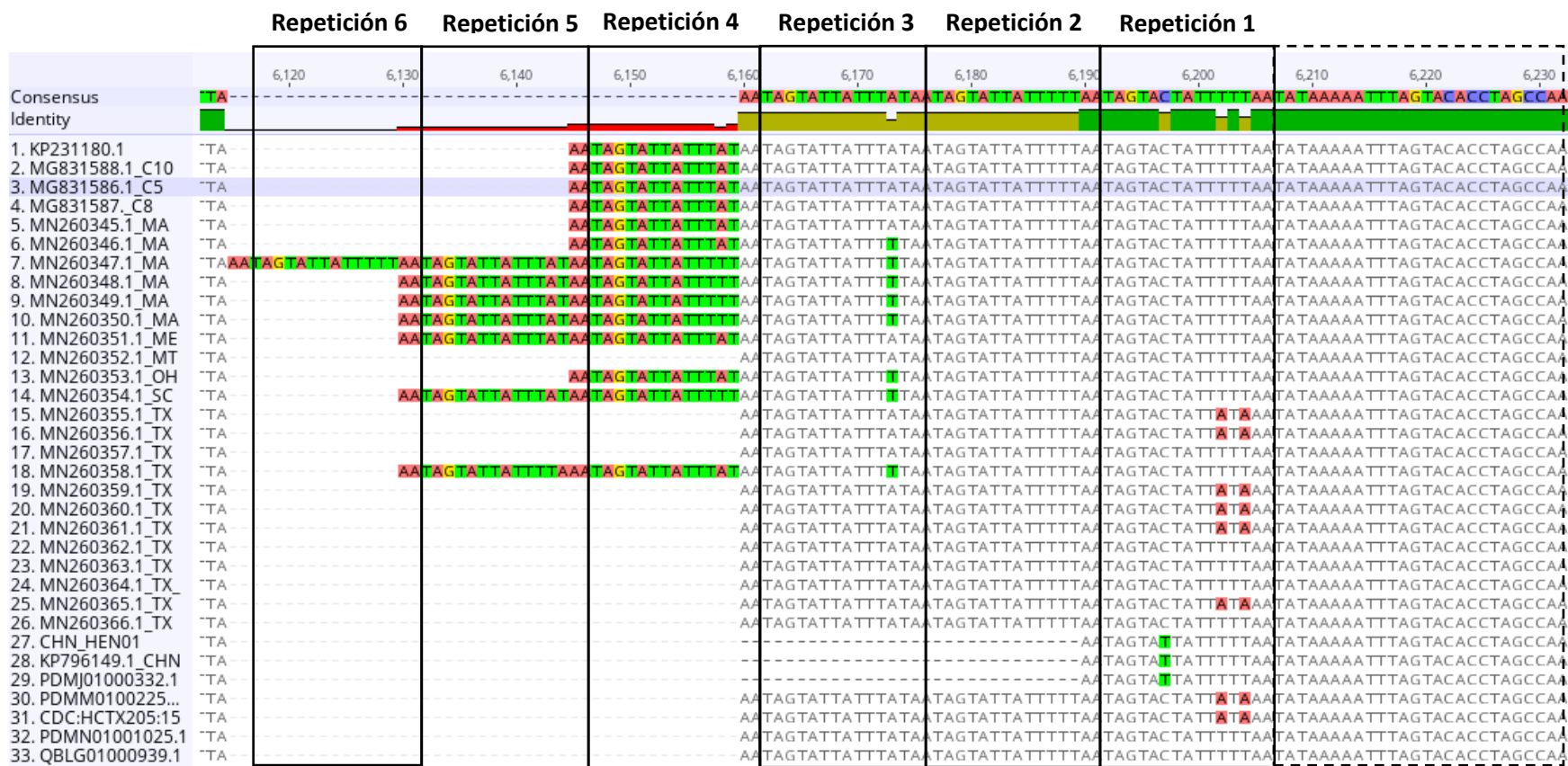


Figura 9. Identificación de regiones repetidas encontrada en el genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*.

6.3 Análisis de la Red de Haplotipos Utilizando las Regiones Repetidas del Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

Las regiones repetidas de 15 nucleótidos que se encuentran en las 33 secuencias del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* de 8 regiones distintas (Nepal, China, Texas, Montana, Massachusetts, Carolina del sur, Maine y Ohio) correspondieron a 9 haplotipos diferentes que se muestran en el cuadro 7 y figura 10. Los haplotipos con mayor frecuencia fueron el 9 y 7, que presentan mayormente secuencias de Texas, cabe resaltar que estos dos haplotipos solo están separados por un paso mutacional (Figura 10).

En el haplotipo 9 se encuentran las secuencias de las regiones repetidas del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* obtenido de ooquistes de pacientes de ciclosporiasis de Texas relacionada con viajes a México y en el haplotipo 7 se encuentran las secuencias de las regiones repetidas del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* obtenido de ooquistes de pacientes de ciclosporiasis de Texas relacionada con producto importado de México. Por lo que estos haplotipos podrían ser característicos de México.

El haplotipo 2 está conformado únicamente por secuencias de regiones repetidas de China y es el haplotipo que presenta más pasos mutacionales con respecto a los demás. En cuanto a los haplotipos de Nepal, todas las secuencias de las regiones repetidas se encuentran en el haplotipo 1. Las secuencias de las regiones repetidas de aislados de Massachusetts forman cuatro haplotipos donde la conexión no es tan cercana entre ellos, por lo que las secuencias de Massachusetts no se agrupan, contrario a lo que sucede con las secuencias de Texas, China y Nepal. Por esta razón, es importante seguir estudiando estas regiones repetidas de 15 nucleótidos como un posible marcador para lograr discernir su utilidad.

La red de haplotipos construida a partir de las regiones repetidas del genoma mitocondrial de *C. cayetanensis* aislados de ocho regiones distintas, refleja la diversidad genética de las poblaciones existentes que podrían permitir su agrupación dependiendo la región geográfica de aislamiento, que pueda contribuir en la investigación de brotes. Aun así, es relevante analizar a la par las variaciones de un solo nucleótido (VSN) informativos del genoma mitocondrial con la finalidad de poder comparar ambos resultados y analizar los haplotipos, tanto las regiones repetidas como las VSN.

Cuadro 6. Haplotipos encontrados en el genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

Haplotipo	Frec.	Secuencia (s)	Lugar
Hap_1	5	KP231180.1, MG831586.1_C5, MG831587.1_C8, MG831588.1_C10 y MN260345.1_MA	4-Nepal, 1-Massachusetts
Hap_2	3	KP796149.1_CHN JROU02001700.1 PDMJ01000332.1	3-China
Hap_3	2	MN260346.1_MA MN260353.1_OH	1-Massachusetts, 1-Ohio
Hap_4	1	MN260347.1_MA	1-Massachusetts
Hap_5	4	MN260348.1_MA MN260349.1_MA MN260350.1_MA MN260354.1_SC	3-Massachusetts, 1-Carolina del Sur
Hap_6	1	MN260351.1_ME	1-Maine
Hap_7	9	MN260352.1_MT MN260357.1_TX MN260362.1_TX MN260363.1_TX MN260364.1_TX_ MN260366.1_TX PDMN01001025.1 QBLG01000939.1	1- Montana, 8-Texas
Hap_8	7	MN260355.1_TX MN260356.1_TX MN260359.1_TX MN260360.1_TX MN260361.1_TX MN260365.1_TX PDMM01002259.1 CDC:HCTX227:15	7-Texas
Hap_9	1	MN260358.1_TX	1-Texas

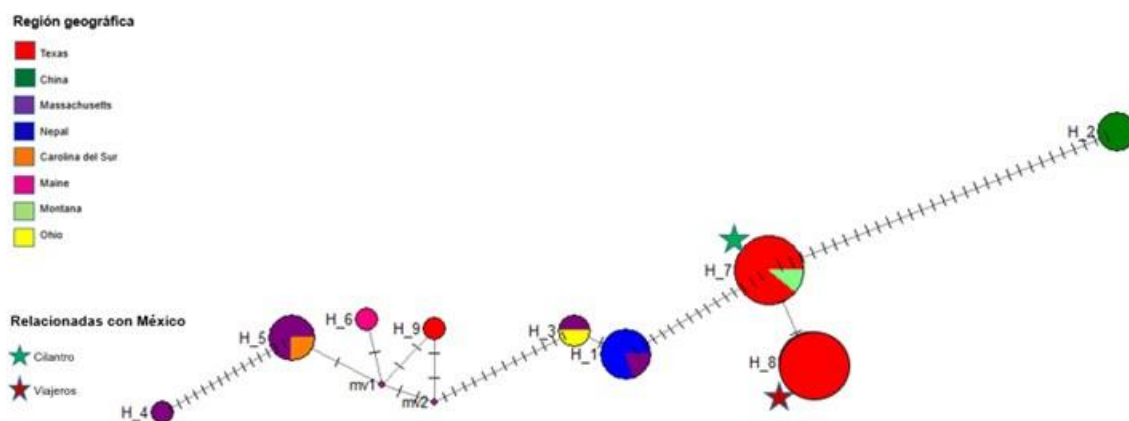


Figura 10. Red de haplotipos Median-joining basada en 33 secuencias de las regiones repetidas del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* de ocho regiones geografica.

6.4 Análisis Filogenético de Genomas Mitocondriales de *Cyclospora cayetanensis*

Los 33 genomas mitocondriales fueron sujetos a un análisis filogenético (figura 11) en donde se observa que en general las muestras provenientes de una misma ubicación, se agrupan.

Como se observa en el análisis filogenético, las cuatro secuencias de aislados que son originarias de Nepal, una de Texas, una de Montana y una de Ohio se agrupan en el mismo clado, lo cual puede significar que se tratan del mismo genotipo. Esto podría ser debido a que, aunque son aislados de regiones templadas (como el caso de los aislados de Texas, Montana y Ohio) la adquisición del patógeno ocurrió principalmente en viajes y/o importación de alimentos de regiones endémicas como puede ser el caso de Nepal (Casillas et al., 2019). Todo esto parece indicar que, posiblemente los aislados de Texas Montana y Ohio tengan una relación con los aislados de Nepal. Del mismo modo, seis muestras de Texas incluyendo dos muestras que se han relacionado con el consumo de cilantro se encuentran agrupadas. Así pues, otras seis muestras de Texas se encuentran en otro clado que incluye la secuencia PDMM01002259 y CDC:HCTX227:15 que son relacionadas con ooquistes de pacientes con ciclosporiasis que viajaron a México.

Las muestras de Massachusetts se agrupan en un solo clado, esto es muy interesante, ya que cuando se analizan únicamente la variación de las regiones repetidas estas varían de una a tres repeticiones, generando así tres genotipos diferentes de esta región de 15 nucleótidos. Esto se debe a la eliminación de gaps o sitios no informativos durante la realización de un análisis filogenético, por lo tanto consideramos que es importante analizar todo el genoma mitocondrial.

Las muestras de Massachusetts se encuentran en el mismo clado junto con una muestra de Carolina de Sur. Aunque, algunas secuencias fueron obtenidas de ooquistes de pacientes de Estados Unidos, no se toma como el país de origen, ya que no es considerado un lugar endémico de la ciclosporiasis si no que los casos que se encuentran en ese país se debe principalmente por productos que se importan a esa región o viajes a las regiones endémicas (Casillas et al., 2019). Por ejemplo, las secuencias MN260353.1 de Ohio que está altamente relacionada filogenéticamente con las secuencias mitocondriales de aislados de Nepal y la secuencia MN260352.1 de Montana es idéntica a los aislados a Nepal, por lo que se podría inferir que se trata del mismo lugar de origen.

Es evidente que se necesitan más secuencias que sean aisladas de los lugares donde la enfermedad se considera endémica para establecer genotipos propios de una región. En especial de México ya que este ha sido involucrado en brotes de ciclosporiasis causando restricciones al producto mexicano.

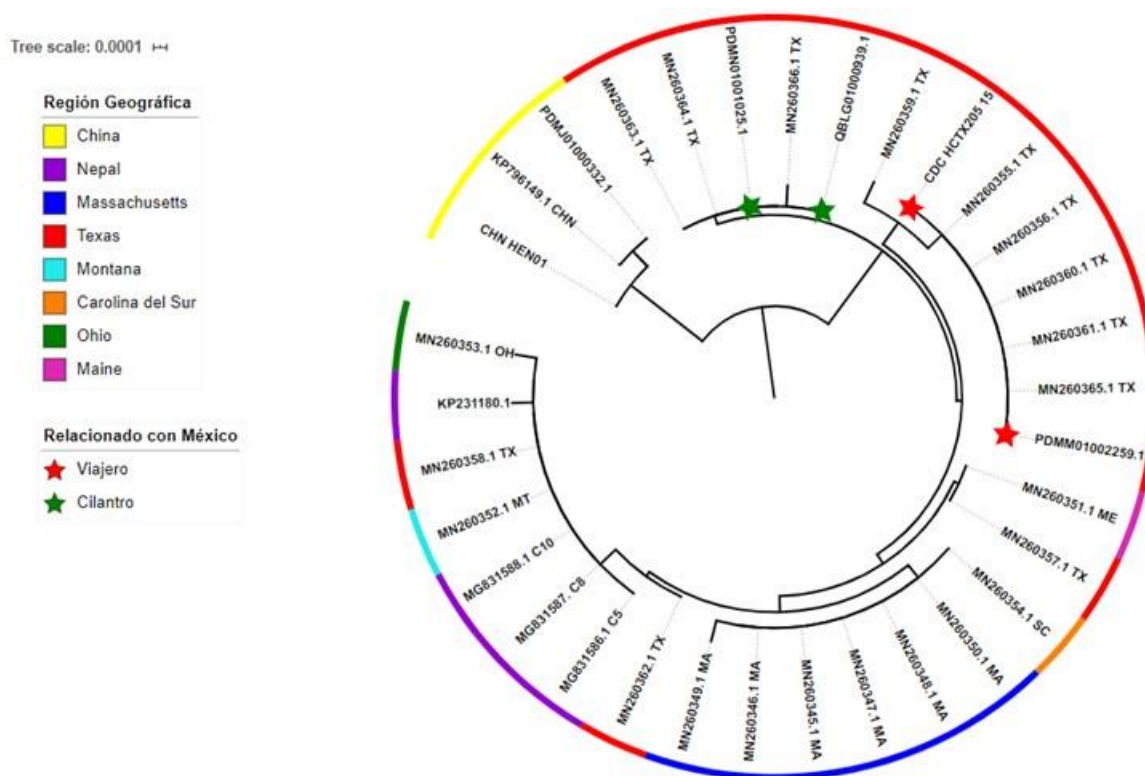


Figura 11. Análisis filogenético del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*. Árbol filogenético inferido a partir de 33 secuencias del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* de muestras de ocho regiones geográficas diferentes que se encuentran en las bases de datos. Se utilizó el método Neighbor-Joining con 500 réplicas de bootstrap. El Análisis fue realizado en MEGA7. El color es de acuerdo al lugar donde se tomó la muestra. Las estrellas indican las secuencias que se asocian con México.

6.5 Haplotipos del Genoma Mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* que se Encuentran en las Bases de Datos

A partir del alineamiento de las 33 secuencias de genoma mitocondrial en muestras de Nepal, China, Texas, Montana, Massachusetts, Carolina del sur, Maine y Ohio se construyeron haplotipos. A partir de estos, se seleccionaron un total de 6308 sitios de los cuales se excluyeron los sitios huecos (gaps), quedando con 6227 sitios. En total se encontraron 19 sitios variables (cuadro 8). Con base en esto, se determinaron 13 haplotipos distintos de las 8 regiones geográficas mencionadas anteriormente de un total de 33 muestras (Cuadro 9).

Los 13 haplotipos están conformados por las variaciones de un solo nucleótido que se muestran en el cuadro 10. Con estos datos se construyó una red de haplotipos usando una median-joining (Figura 12). Esto nos permite analizar los haplotipos basados en las regiones geográficas para visualizar mejor el número de pasos mutacionales y la conexión entre los haplotipos observados. Los 13 distintos haplotipos fueron separados de 1 a 9 mutaciones y se segregan de acuerdo a lo localización geográfica; como se observa en la figura 12, los haplotipos 2 y 4 que pertenecen a aislados de China están muy relacionados y están separados de otros haplotipos por 9 mutaciones. Todo esto parece indicar que, tanto la red de haplotipos como la relación filogenética podrían ser usadas para inferir el origen geográfico de muestras con historial de viaje desconocido de cada muestra desconocida.

Utilizar el genoma mitocondrial para la determinación de los haplotipos en lugar del genoma nuclear tiene sus ventajas. En un estudio realizado por Barratt *et al.*, (2019) determinaron que para un locus mitocondrial que analizaron, la mayoría de los especímenes poseían un solo haplotipo a diferencia del locus del genoma nuclear que presentaban más de un haplotipo; esto debido a que un ooquiste de un apicomplexa puede ser heterocigoto y poseer hasta dos alelos para cualquier locus dado, por lo que el número de tipos de secuencia detectados entre *C. cayetanensis* (Barratt *et al.*, 2019).

Por otra parte, para tener una mayor confianza en la predicción del origen geográfico, es necesario tener un mayor número de muestras de diferentes regiones geográficas, incluido México, para inferir con certeza el origen. Sin embargo, los estudios de este parásito a menudo se ven obstaculizados debido a que no existen modelos de animales ni sistemas de cultivos celulares.

Cuadro 7. Resumen general de la información utilizada para realizar el análisis de haplotipos

Información general para la obtención de haplotipos	
Número de secuencias	33
Región seleccionada	1-6307
Número de sitios	6307
Total de número de sitios (sitios excluidos con gaps / datos olvidados)	6227
Sitios con gaps alineados:	No considerados
Número de sitios variables	19

Cuadro 8. Haplotipos encontrados en el genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

Haplotipo	Frec.	Secuencia (s)	Lugar
Hap_1	7	CDC:HCTX205:15, MN260355.1_TX, MN260356.1_TX, MN260360.1_TX, MN260361.1_TX, MN260365.1_TX y PDMM01002259.1	7-Texas
Hap_2	1	CHN_HEN01	1-China
Hap_3	1	KP231180.1	1-Nepal
Hap_4	2	KP796149.1_CHN y PDMJ01000332.1	
Hap_5	5	MG831586.1_C5, MG831587.1_C8, MG831588.1_C10, MN260352.1_MT y MN260358.1_TX	3-Nepal, 1-montana, 1-Texas
Hap_6	6	MN260345.1_MA, MN260346.1_MA, MN260347.1_MA, MN260348.1_MA, MN260350.1_MA y MN260354.1_SC]	5-Massachusetts, 1-Carolina del Sur
Hap_7	1	MN260349.1_MA	1- Massachusetts
Hap_8	2	MN260351.1_ME y MN260357.1_TX	1-Maine, 1-Texas
Hap_9	1	MN260353.1_OH	1-Ohio
Hap_10	1	MN260359.1_TX	1-Texas
Hap_11	1	MN260362.1_TX	1-Texas
Hap_12	4	MN260363.1_TX, MN260364.1_TX, PDMN01001025.1 y QBLG01000939.1	4-Texas
Hap_13	1	MN260366.1_TX	1-Texas

Cuadro 9. Variaciones encontradas entre los haplotipos generados a partir de 33 secuencias del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis*

Posición absoluta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Hap 1	g	g	t	g	c	c	g	t	a	a	c	c	c	a	a	c	a	a	t
Hap 2	a	a	a	.	a	.	.	.	t	.	t	t	.	.	.	t	t	t	a
Hap 3	.	.	.	t	.	a	t	.	.	c	.	.	.	.	.	.	t	t	.
Hap 4	a	a	a	.	a	.	.	.	t	.	t	t	.	.	t	t	t	t	a
Hap 5	.	.	.	t	.	a	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	t	.
Hap 6	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	t	.
Hap 7	.	.	.	t	.	.	.	g	.	.	.	.	.	.	.	.	t	t	.
Hap 8	.	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	t	.
Hap 9	.	.	.	t	.	a	t	.	.	.	.	.	.	t	.	.	t	t	.
Hap 10	a	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap 11	.	.	.	t	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	t	.
Hap 12	a	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	.	.	.	.	t	t	.
Hap 13	a	.	.	.	.	.	t	.	.	.	.	.	t	.	.	.	t	t	.

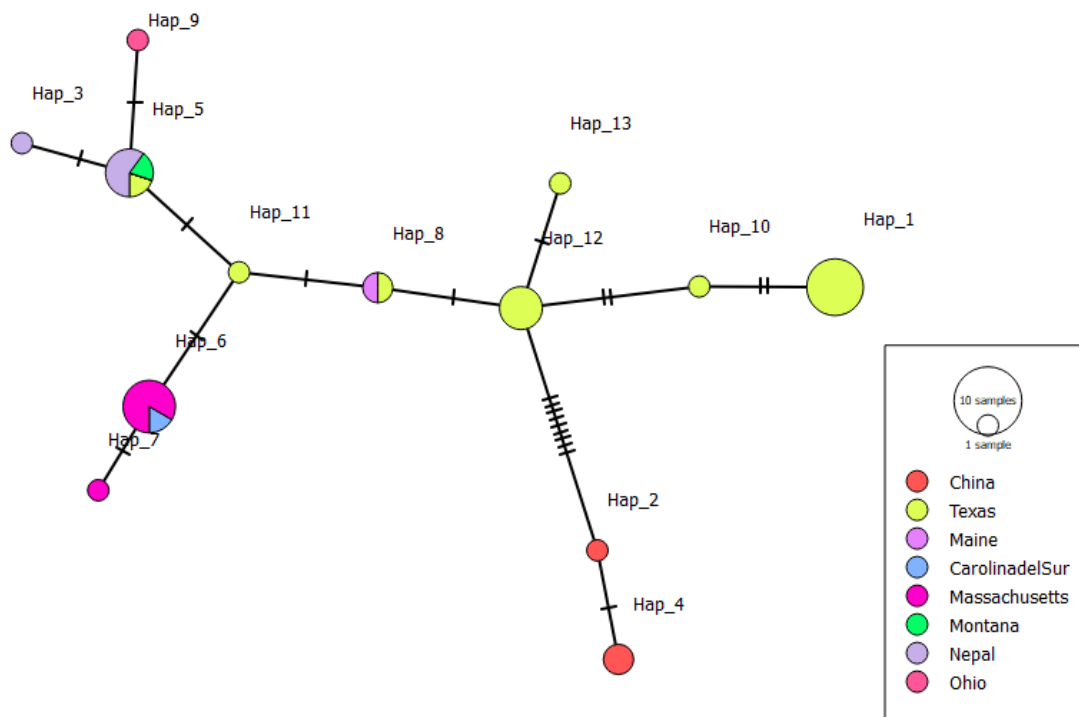


Figura 12. Red de haplotipos Median-joining del genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* de ocho regiones geograficas. La red haplotipos fue estimada usando 33 genomas mitocondriales cada marca indica el número de mutaciones diferentes entre los haplotipos.

6.6 Comparación de Estrategias Utilizadas para el Análisis de la Variabilidad del Genoma Mitocondrial

En los últimos años se han planteado algunos enfoques dirigidos a la obtención de secuencias mitocondriales para el estudio de la variabilidad de *C. cayetanensis*, por lo que en este trabajo se realizó un análisis de estas estrategias y se incorporó el análisis de redes de haplotipos para presentar de una manera más amena los diferentes caminos que se pueden seguir. Además, este esquema nos ayuda a determinar qué estrategia o combinación de ella nos acerca a lograr nuestros objetivos, dependiendo de los recursos con los que se dispongan. En la figura 13, los cuadros color rosas muestran la estrategia utilizada en este trabajo.

La primera estrategia parte de secuencias metagenómicas, lo que representa una opción adecuada, ya que *C. cayetanensis* es un microorganismo no cultivable, por tal razón es difícil aislar únicamente a *C. cayetanensis*, por lo que las muestras pueden contener material genético de otros protozoos o bacterias. Sin embargo, cuando las lecturas de secuencia se obtienen de ADN total, habrá un exceso de lecturas del genoma nuclear (Qvarnstrom *et al.*, 2018), por lo que pueden aumentar el tiempo de ejecución y los recursos computacionales. La segunda estrategia implica el diseño de cebadores, en este caso se emplea el uso de cuatro pares de cebadores específicos para cubrir el genoma completo de la mitocondria (Cinar *et al.*, 2020). Asimismo, sería un enfoque que podría recomendarse cuando deban secuenciarse muchas muestras en paralelo, por lo que tiene ventajas inherentes de tiempo y costo. En este trabajo se utilizó una combinación de las dos estrategias mencionadas anteriormente. La última estrategia consiste en amplificar únicamente la región repetida del genoma mitocondrial y analizar la electroforesis en gel y/o curva de fusión por lo que este método es capaz de evaluar rápidamente la variabilidad genética entre muestras. Además la genotipificación se obtendría al secuenciar los productos de qPCR (Guo *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2019).

Con las estrategias analizadas en ese trabajo, se puede lograr el análisis de redes de haplotipos, sin embargo, hay que tener en cuenta que al utilizar el genoma completo mediante el árbol filogenético y redes de haplotipos solo analiza las VSN, por lo que es necesario extraer la región repetida y realizar un análisis por separado.

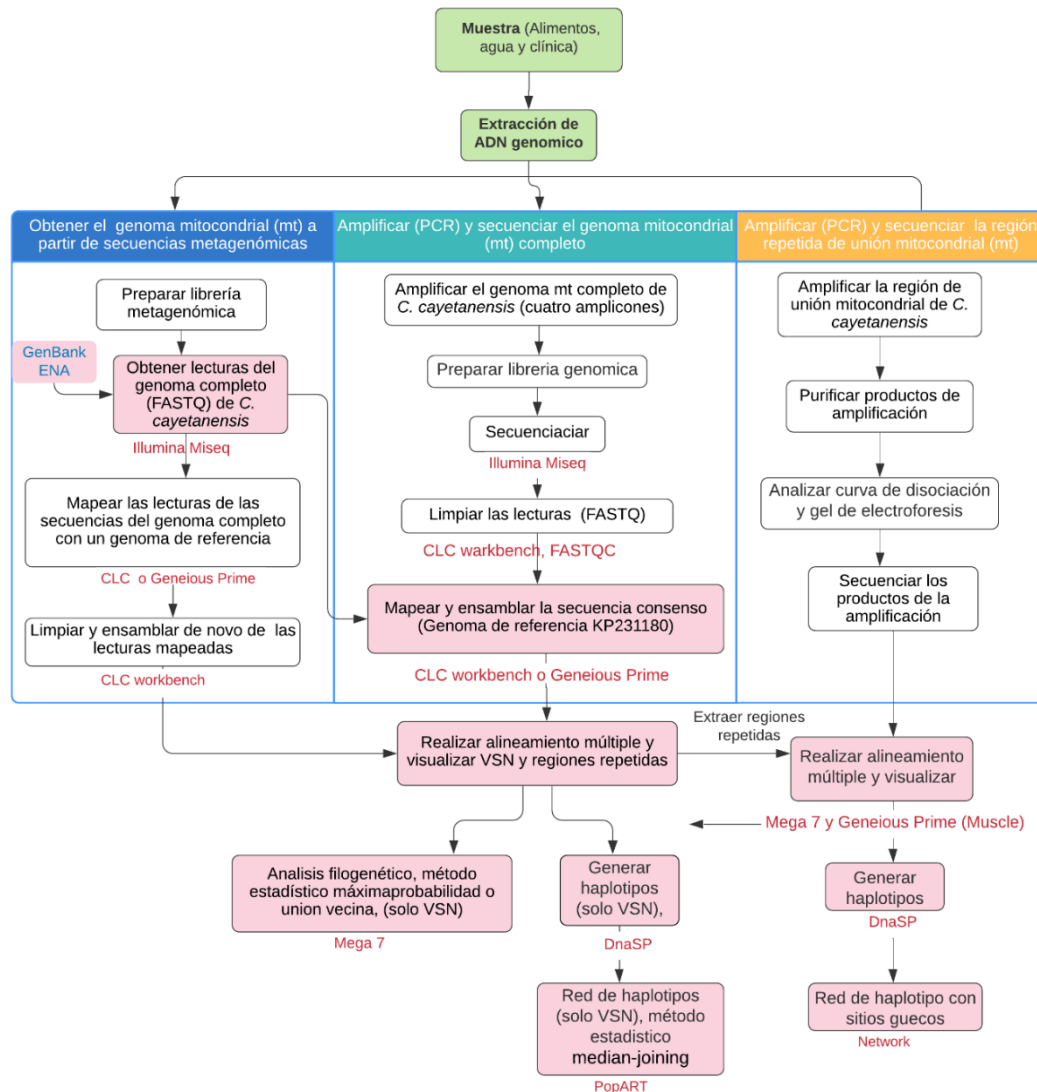


Figura 13. Flujo de trabajo para el análisis de la variabilidad genética de *C. cayetanensis* utilizando ADN mitocondrial. En los cuadros se muestras las tareas, las letras rojas los programas bioinformáticos y los cuadros rosas las tareas seguidas en este trabajo.

6.7 Filogenia de *Cyclospora cayetanensis* y *Eimeria* Spp.

El análisis de comparación del genoma mitocondrial entre *C. cayetanensis* y *Eimeria* spp mostró que efectivamente las secuencias repetidas de 15 nucleótidos son específicas para *C. cayetanensis* (Figura 14). Asimismo, el árbol filogenético realizado con los genomas mitocondrial corrobora la relación filogenética con *Eimeria* spp (Figura 15) como ya se ha demostrado por Relman *et al.*,

(1996) pero utilizando genes nucleares como el 18s y la proteína de choque térmico 70. Sin embargo, en nuestro estudio se muestra una relación más cercana con *Eimeria dispersa* y *Eimeria magna* como lo reportado por Tang *et al.*, (2015) utilizando el genoma mitocondrial. Pero, a diferencia de ese estudio, aquí se utilizaron un mayor número de secuencias mitocondriales de *Cyclospora cayetanensis* mostrando que presenta una mayor cercanía con *E. dispersa*. Sin embargo, es necesario un árbol filogenético del todo el genoma para establecer la relación entre estos dos microorganismos.

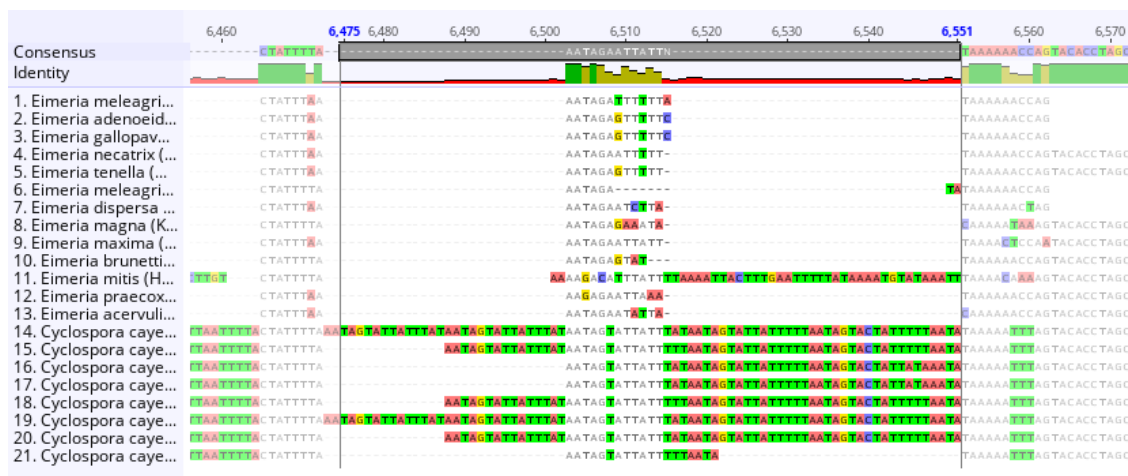


Figura 14. Secuencias de regiones repetidas de 15 nt presentes en el genoma mitocondrial de *C. cayetanensis* y ausencia en el genoma mitocondrial de *Eimeria* spp.

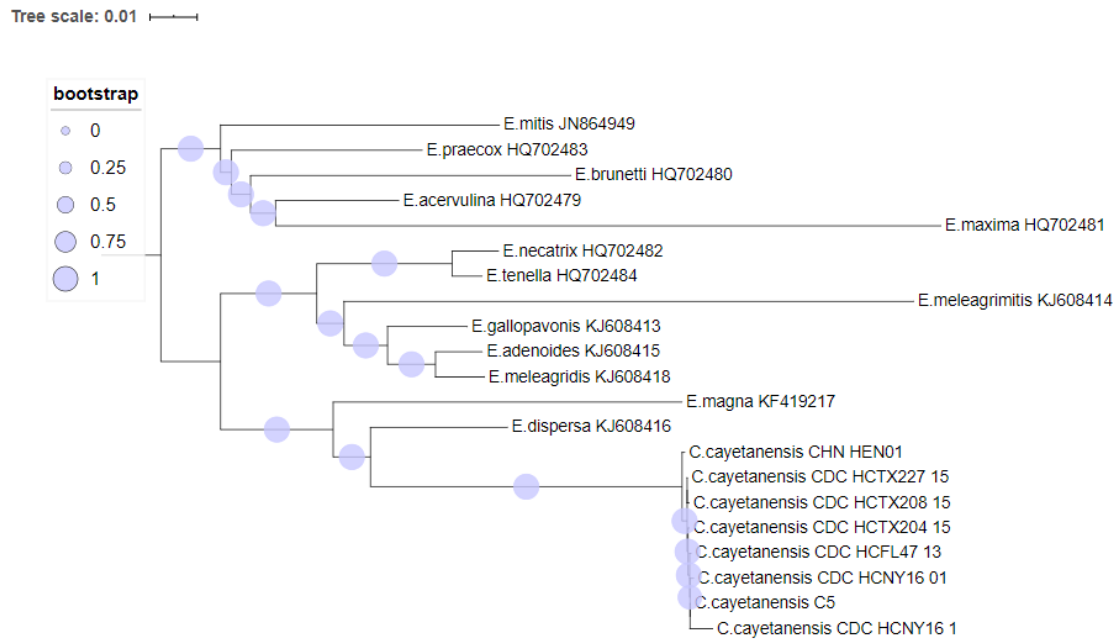


Figura 15. Relación filogenética entre *Cyclospora cayetanensis* y *Eimeria* spp.

7. CONCLUSIONES

El análisis reveló la identificación de 18 variaciones de un solo nucleótido (VSN) en el genoma mitocondrial de 33 aislados de ocho regiones geográficas distintas, que podrían ser posibles marcadores que contribuyan al estudio de brotes de ciclosporiasis. Las VSN de secuencias mitocondriales de aislados relacionados con México varían entre ellas, en las posiciones ubicados en los nucleótidos 1898, 3974, 6203 y 6205 de acuerdo al genoma de referencia. Esto podría indicar variaciones a nivel nacional.

Las regiones repetidas que se encuentran en el genoma mitocondrial varían de 1 a 6 repeticiones, esto permitió agrupar aislados de *Cyclospora cayetanensis* de Texas, Nepal y China. Así mismo, las secuencias de aislados relacionados con México presentan el mismo número de regiones repetidas junto con otras secuencias de Texas, por lo que podría tratarse de características de posibles cepas circulando en México.

El árbol filogenético y la red de haplotipos realizados con el genoma completo presentaron especificad geográfica similar. Por otra parte, la comparación de la red de haplotipos realizada con las regiones repetidas y el genoma completo difieren principalmente en el número de haplotipos en los aislados de Texas y Massachusetts, lo que evidencia la necesidad de seguir estudiando el genoma mitocondrial de este parásito.

8. RECOMENDACIONES

- Es importante obtener muestras de aislados de Sinaloa y otros estados para analizar las variaciones en el genoma mitocondrial de *Cyclospora cayetanensis* mediante la amplificar por PCR de todo el genoma mitocondrial y secuenciación de los productos de PCR.
- En definitiva, es recomendable analizar las secuencias del genoma mitocondrial de aislados de *Cyclospora cayetanensis* del estado de Sinaloa para determinar si el genoma mitocondrial permite crear un código de barras característico de esta región, de esta manera poder refutar o comprobar las imputaciones de brotes acontecidos a nivel nacional o internacional.
- Es recomendable evaluar las regiones repetidas como un marcador que permita la agrupación de secuencias mexicanas mediante una red de haplotipos. Asimismo, analizar la relación que existe entre aislados obtenidos del agua utilizada para el riego, aislados de productos alimenticios y pacientes, para analizar una posible ruta de diseminación del parásito.
- Es interesante conocer si la mitocondria o los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* presenta heroplasmia es decir la presencia de tipos diferentes de DNA mitocondrial en la misma mitocondria o célula.
- Es interesante conocer la tasa de mutación del genoma mitocondrial ya que podría ser diferentes en las regiones repetidas que en mutaciones puntuales. En el genoma mitocondrial de humanos la tasa de mutación general en la región control no codificante es aproximadamente 10 veces mayor que el de la región codificante.

9. REFERENCIAS

- Abanyie, F., Harvey, R. R., Harris, J. R., Wiegand, R. E., Gaul, L., Desvignes-Kendrick, M., ... Lee, T. (2015a). 2013 multistate outbreaks of *Cyclospora cayetanensis* infections associated with fresh produce: Focus on the Texas investigations. *Epidemiology and Infection*, 143(16), 3451–3458.
- Abanyie, F., Harvey, R. R., Harris, J. R., Wiegand, R. E., Gaul, L., Desvignes-Kendrick, M., ... Lee, T. (2015b). 2013 multistate outbreaks of *Cyclospora cayetanensis* infections associated with fresh produce: Focus on the Texas investigations. *Epidemiology and Infection*, 143(16), 3451–3458.
- Adam, R. D., Ortega, Y. R., Gilman, R. H., & Sterling, C. R. (2000). Intervening transcribed spacer region 1 variability in *Cyclospora cayetanensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2339–2343.
- Ajawanawong, P. (2016). Molecular Phylogenetics : Concepts for a Newcomer. *Springer, Cham.*, 185–196.
- Aksoy, U., Akisu, C., Sahin, S., Usluca, S., Yalcin, G., Kuralay, F., & Oral, A. M. (2007). First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 12(2).
- Almeria, S., Cinar, H., & Dubey, J. (2019). *Cyclospora cayetanensis* and Cyclosporiasis: An Update. *Microorganisms*.
- Archelli, S., & Kozubsky, L. E. (2012). *Cyclospora cayetanensis*: Un coccidio emergente. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(4).
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). *The incomplete natural history of mitochondria*. 729–744.
- Barratt, J. L. N., Park, S., Nascimento, F. S., Hofstetter, J., Plucinski, M., Casillas, S., Talundzic, E. (2019). Genotyping Genetically Heterogeneous *Cyclospora cayetanensis* Infections to Complement Epidemiological Case Linkage. *Parasitology*, 1–33.
- Bastidas-Pacheco, G., Antoima, M. L., Bastidas-Delgado, D., & Rosales-Delgado, M. (2018). UNA MIRADA ACTUAL SOBRE *Cyclospora* spp. Y CICLOSPOROSIS. *Biosalud*, 17(2), 91–101.
- Bern, C., Ortega, Y., Checkley, W., Roberts, J. M., Lescano, A. G., Cabrera, L., Gilman, R. H. (2002). Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in peruvian children. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6), 581–585.
- Bhandari, D., Tandukar, S., Parajuli, H., Thapa, P., Chaudhary, P., & Shrestha, D. (2015). *Cyclospora* Infection among School Children in Kathmandu , Nepal : Prevalence and Associated Risk Factors. *Tropical Medicine and Health Vol.*, 43(4), 211–216.
- Bhattachan, B., Rai, G., & Munankarmi, N. N. (2018). *Cyclospora cayetanensis* : An Infestation among. *Nepal Journal of Biotechnology*, 6(1), 16–19.

- Brunkard, J. M., Ailes, E., Roberts, V. A., Hill, V., Hilborn, E. D., Craun, G. F., ... & Carpenter, J. (2011). Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water—United States, 2007–2008. *MMWR Surveill Summ*, 60(12), 38–68.
- Buss, B. F., Joshi, M. V., O’Keefe, A. L., Allensworth, C. D., Garvey, A., Obbink, K., ... Safranek, T. J. (2016). Regional investigation of a cyclosporiasis outbreak linked to imported romaine lettuce-Nebraska and Iowa, June-August 2013. *Epidemiology and Infection*, 144(9), 1807–1817.
- Casillas, S. M., Bennett, C., & Straily, A. (2018). Multiple Cyclosporiasis Outbreaks — United States, 2018. *Art Bulletin*, 64.
- Casillas, S. M., Hall, R. L., & Herwaldt, B. L. (2019). Cyclosporiasis Surveillance - United States, 2011-2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 68(3), 1–16.
- Chacín-Bonilla, L. (2008). Transmission of Cyclospora cayetanensis infection: a review focusing on soil-borne cyclosporiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(3), 215–216.
- Chacín-Bonilla, L. (2010). Epidemiology of Cyclospora cayetanensis: A review focusing in endemic areas. *Acta Tropica*, Vol. 115, pp. 181–193.
- Chacín-bonilla, L., & Barrios, F. (2011). *biología , distribución ambiental y transferencia*. 5–7.
- Chacín-Bonilla, L., & Barrios, F. (2011). Cyclospora cayetanensis: biología, distribución ambiental y transferencia. *Biomédica*, 31, 132–175.
- Chacín-Bonilla, L., Barrios, F., & Cheng-Ng, R. (2010). Cyclospora cayetanensis: FUENTES Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN. *Interciencia*, 35(9), 666–672.
- Chacín-Bonilla, L., Barrios, F., & Sanchez, Y. (2007). Epidemiology of Cyclospora cayetanensis infection in San Carlos Island, Venezuela: strong association between socio-economic status and infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(10), 1018–1024.
- Chacín Bonilla, L., & Vielma, J. R. (2018). Ciclosporiasis: distribución, prevalencia y control. *Investigación Clínica*, 59(1), 67–93.
- Chu, D. M. T., Sherchand, J. B., Cross, J. H., & Orlandi, P. A. (2004). Detection of Cyclospora cayetanensis in animal fecal isolates from Nepal using an FTA filter-base polymerase chain reaction method. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4), 373–379.
- Cinar, H. N., Gopinath, G., Jarvis, K., & Murphy, H. R. (2015). The complete mitochondrial genome of the foodborne parasitic pathogen Cyclospora cayetanensis. *PLoS ONE*, 10(6), 1–9.
- Cinar, H. N., Gopinath, G., Murphy, H. R., Almeria, S., Durigan, M., Choi, D., ... Silva, A. (2020). Molecular typing of Cyclospora cayetanensis in produce and clinical samples using targeted enrichment of complete mitochondrial genomes and next - generation sequencing. *Parasites & Vectors*, 1–12.
- Cinar, H. N., Qvarnstrom, Y., Wei-Pridgeon, Y., Li, W., Nascimento, F. S., Arrowood, M. J., ... Gopinath, G. R. (2016). Comparative sequence analysis of Cyclospora cayetanensis apicoplast genomes originating from diverse geographical regions. *Parasites and Vectors*,

9(1), 1–14.

- Deer, D. M., Lampel, K. A., & González-Escalona, N. (2010). A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 366–372.
- Diogo, M., Claire, A., Chalmers, R., Chiodini, P., Elson, R., Freedman, J., ... Kirkbride, H. (2017). Previous cyclosporiasis outbreaks among UK travellers returning from Mexico Actions taken by the UK Incident Management Team in June and July 2017. *Eurosurveillance*, 22(32), 1–8.
- Eberhard, M. L., Da Silva, A. J., Lilley, B. G., & Pieniazek, N. J. (1999). Morphologic and molecular characterization of new Cyclospora species from Ethiopian monkeys: *C. cercopithecus* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 651–658.
- Fiser, Ž., & Buzan, E. V. (2013). *20 years since the introduction of DNA barcoding : from theory to application*.
- Forster, P., & Ro, A. (1994). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Fourdrilis, S., Martins, A. M. D. F., & Backeljau, T. (2018). Relation between mitochondrial DNA hyperdiversity , mutation rate and mitochondrial genome evolution in Melarhapha neritoides (Gastropoda : Littorinidae) and other Caenogastropoda. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Galván-Ramírez, M. de la L., Madriz-Elisondo, A. L., Temores-Ramírez, C. G., Romero Rameño, J. de J., de la O-Carrasco, D. A., & Cardona-López, M. A. (2019). Enteroparasitism and Risk Factors Associated with Clinical Manifestations in Children and Adults of Jalisco State in Western Mexico. *Osong Public Health Res Perspect*, 10(1), 39–48.
- García-López, H. L., Rodríguez-Tovar, L. E., & Medina-De la Garza, C. E. (1996). Identification of Cyclospora in poultry. *Emerging Infectious Diseases*, 2(4), 356–357.
- Giangaspero, Annunziata and Robin, G. (2019). Cyclospora cayetanensis: Portrait of an Intriguing and Enigmatic Protistan Parasite. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).
- Giangaspero, A., & Gasser, R. B. (2019). Human cyclosporiasis. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 19, pp. e226–e236.
- Giangaspero, A., Marangi, M., Koehler, A. V., Papini, R., Normanno, G., Lacasella, V., ... Gasser, R. B. (2015). Molecular detection of Cyclospora in water, soil, vegetables and humans in southern Italy signals a need for improved monitoring by health authorities. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 95–100.
- Gopinath, G. R., Cinar, H. N., Murphy, H. R., Durigan, M., Almeria, M., Tall, B. D., & Dasilva, A. J. (2018). A hybrid reference-guided de novo assembly approach for generating Cyclospora mitochondrion genomes. *Gut Pathogens*, 10(1), 4–11. h
- Guo, Y., Roellig, D. M., Li, N., Tang, K., Frace, M., Ortega, Y., ... Xiao, L. (2016). Multilocus Sequence Typing Tool for Cyclospora cayetanensis. *Emerging Infectious Diseases*, 22(8), 1464–1467.
- Guo, Y., Zhang, L., Feng, Y., Wang, X., Wang, Y., & Ortega, Y. (2019). Mitochondrial genome

- sequence variation as a useful marker for assessing genetic heterogeneity among *Cyclospora cayetanensis* isolates and source-tracking. *Parasites & Vectors*, 12(1), 1–7.
- Herwaldt, B. L. (2000). *Cyclospora cayetanensis*: A Review, Focusing on the Outbreaks of Cyclosporiasis in the 1990s. *Clinical Infectious Diseases*, 31(4), 1040–1057.
- Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Marie, N., ... Tanabe, K. (2011). Mitochondrion Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. *MITOCH*, 11(2), 273–278.
- Hofstetter, J. N., Nascimento, F. S., Park, S., Casillas, S., Herwaldt, B. L., Arrowood, M. J., & Qvarnstrom, Y. (2019). Evaluation of Multilocus Sequence Typing of *Cyclospora cayetanensis* based on microsatellite markers. *Parasite*, 26.
- Huang, P., Weber, J. T., Sosin, D. M., Griffin, P. M., Long, E. G., Murphy, J. J., ... Kallick, C. (1995). The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 123(6), 409–414.
- Huson, D. H., & Scornavacca, C. (2010). A Survey of Combinatorial Methods for Phylogenetic Networks. *Genome Biology and Evolution*, 3, 23–35.
- Hussein, E. M., El-Moamly, A. A., Mahmoud, M. A., & Ateek, N. S. (2016). Wide genetic variations at 18S ribosomal RNA locus of *Cyclospora cayetanensis* isolated from Egyptian patients using high resolution melting curve. *Parasitology Research*, 115(7), 2797–2806.
- Jiang, J., Yu, J., Li, J., Li, P., Fan, Z., Niu, L., & Deng, J. (2016). *Mitochondrial Genome and Nuclear Markers Provide New Insight into the Evolutionary History of Macaques*. 1–19.
- Koumans, E. H. A., Katz, D. J., Malecki, J. M., Kumar, S., Wahlquist, S. P., Arrowood, M. J., ... Herwaldt, B. L. (1998). An outbreak of cyclosporiasis in florida in 1995 : a harbinger of multistate outbreaks in 1996 and 1997. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 59(2), 235-242.
- Kwakye-nuako, G., Borketey, P. ., Mensah-attipoe, I., Asmah, R. ., & Ayeh-kumi, P. . (2010). Sachet drinking water in accra: the potential threats of transmission of enteric pathogenic protozoan organisms. *Ghana Medical Journal*, 41(2), 62–67.
- Li, G., Xiao, S., Zhou, R., Li, W., & Wadeh, H. (2007). Molecular characterization of *Cyclospora*-like organism from dairy cattle. *Parasitology Research*, 100(5), 955–961. h
- Mansfield, L. S., & Gajadhar, A. A. (2004). *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Veterinary Parasitology*, Vol. 126, pp. 73–90.
- Marangi, M., Koehler, A. V., Zanzani, S. A., Manfredi, M. T., Brianti, E., Giangaspero, A., & Gasser, R. B. (2015a). Detection of *Cyclospora* in captive chimpanzees and macaques by a quantitative PCR-based mutation scanning approach. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–5.
- Marangi, M., Koehler, A. V., Zanzani, S. A., Manfredi, M. T., Brianti, E., Giangaspero, A., & Gasser, R. B. (2015b). Detection of *Cyclospora* in captive chimpanzees and macaques by a quantitative PCR-based mutation scanning approach. *Parasites and Vectors*, 1–5.
- Mardulyn, P. (2012). Trees and / or networks to display intraspecific DNA sequence variation ? *Molecular Ecology*, 21(14), 3385–3390.
- Morrison, D. A. (2005). Networks in phylogenetic analysis : new tools for population biology.

- Mundaca, C. C., Torres-Slimming, P. A., Araujo-Castillo, R. V., Morán, M., Bacon, D. J., Ortega, Y., ... Blazes, D. L. (2008). Use of PCR to improve diagnostic yield in an outbreak of cyclosporiasis in Lima, Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(7), 712–717. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.003>
- Mundy, N. I., Winchell, C. S., & Woodruff, D. S. (1996). Tandem Repeats and Heteroplasmy in the Mitochondrial DNA Control Region of the Loggerhead Shrike (*Lanius ludovicianus*). *The Journal of Heredity*, 87(1).
- Muñoz, D. J., & Rodriguez, R. (2015). Bacterial and Parasite Agents in Adult Housefly *Musca domestica* Collected in El Penon, Sucre State, Venezuela. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 25, 159–166.
- Mzilahowa, T., McCall, P. J., & Hastings, I. M. (2007). “ Sexual ” Population Structure and Genetics of the Malaria Agent *P. falciparum*. *PLoS ONE*, (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000613>
- Nakhleh, L. (2010). *Evolutionary Phylogenetic Networks: Models and Issues*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-09760-2>
- Nascimento, F. S., Barta, J. R., Whale, J., Hofstetter, J. N., Casillas, S., Barratt, J., ... Qvarnstrom, Y. (2019). Mitochondrial Junction Region as Genotyping Marker for *Cyclospora cayetanensis*. *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), 1314–1319. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181447>
- Nichols, G. L., Freedman, J., Pollock, K. G., Rumble, C., Chalmers, R. M., Chiodini, P., ... Hawker, J. I. (2015). *Cyclospora* infection linked to travel to Mexico, June to September 2015. *Eurosurveillance*, 20(43), 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.43.30048>
- Nimri, L. F. (2003). *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites associated with diarrhea in a rural area of Jordan. *Int Microbiol*, 6, 131–135. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0121-4>
- Orozco-Mosqueda, G. E., Martínez-Loya, O. A., & Ortega, Y. R. (2014). *Cyclospora cayetanensis* in a Pediatric Hospital in Morelia, México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 537–540. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0535>
- Ortega, Ynés R. (1993). *Cyclospora* species new protozoan pathogen of human. *The New England Journal of Medicine*, 329(20), 1442–1448. <https://doi.org/10.1056/NEJM19931113292002>
- Ortega, Ynés R., & Sanchez, R. (2010). Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 218–234. <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-09>
- Ortega, Ynes R., & Sherchand, J. B. (2015a). *Cyclospora cayetanensis*. In *Biology of Foodborne Parasites* (Vol. 22, pp. 97–110). <https://doi.org/10.1201/b18317>
- Ortega, Ynes R., & Sherchand, J. B. (2015b). *Cyclospora cayetanensis*. *Biology of Foodborne Parasites*, 34(1), 97–110. <https://doi.org/10.1201/b18317>
- Padhi, A. (2014). Geographic variation within a tandemly repeated mitochondrial DNA D-loop region of a North American freshwater fish, *Pylodictis olivaris*. *Gene*, 538(1), 63–68.

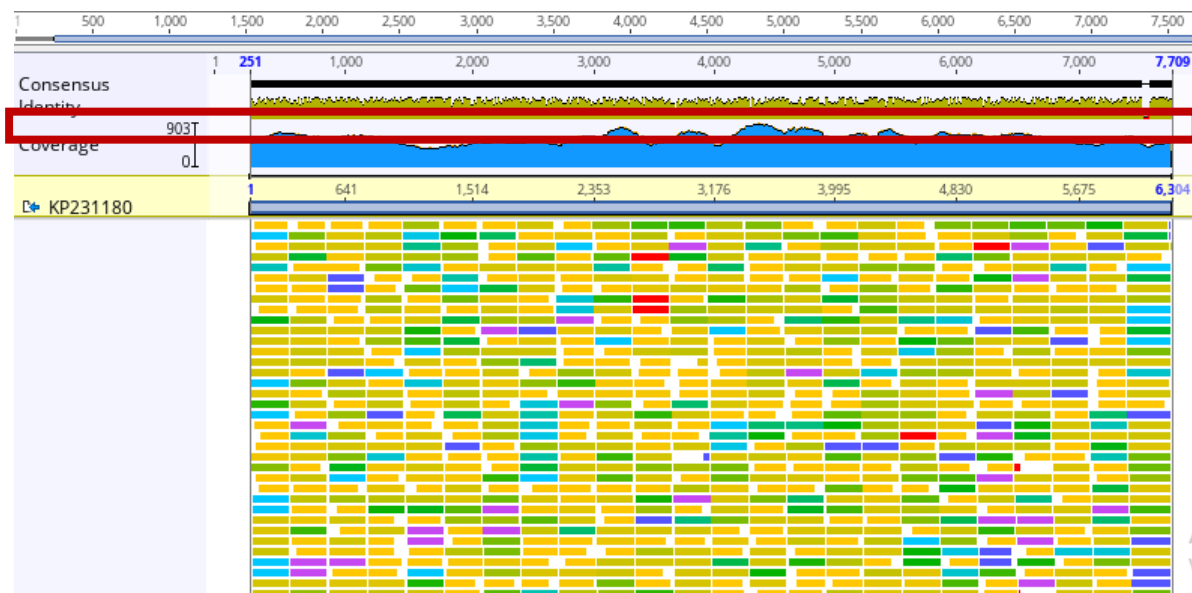
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.020>

- Payne, M., Kaur, S., Wang, Q., Hennessy, D., Luo, L., Octavia, S., & Tanaka, M. M. (2020). Multilevel genome typing: genomics-guided scalable resolution typing of microbial pathogens. *Eurosurveillance*, 25(20)
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., & Castro-nallar, E. (2018). *Microbial Sequence Typing in the Genomic Era. Microbial*. 63, 346–359.
- Pérez Cordon, G., Hitos Prados, A., Romero, D., Sánchez Moreno, M., Pontes, A., Osuna, A., & Rosales, M. J. (2009). Intestinal and haematic parasitism in the birds of the Almuñecar (Granada, Spain) ornithological garden. *Veterinary Parasitology*, 165(3–4), 361–366.
- Preisner, P. R., Wilson, R. J. M., Moore, P. W., Mccready, S., & Hajibagheri, M. A. N. (1996). *Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA*. 15(3), 684–693.
- Preston, M. D., Amambua-Ngwa, A., Roper, C., Doumbo, O. K., Fairhurst, R. M., Ocholla, H., ... Clark, T. G. (2014). A barcode of organellar genome polymorphisms identifies the geographic origin of *Plasmodium falciparum* strains. *Nature Communications*, 5(1), 1–7.
- Preuten, T., Cincu, E., Zoschke, R., Liere, K., & Bo, T. (2010). *Fewer genes than organelles : extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells*. 948–959.
- Qvarnstrom, Y., Wei-Pridgeon, Y., Nascimento, F. S., S., B. H., Herwaldt, B. L., Moss, D. M., ... Arrowood, M. J. (2015). Draft Genome Sequences from *Cyclospora cayetanensis* Oocysts Purified from a Human Stool Sample. *Genome Announcements*, 3(6), 1–2.
- Qvarnstrom, Y., Wei-Pridgeon, Y., Van Roey, E., Park, S., Srinivasamoorthy, G., Nascimento, F. S., ... Arrowood, M. J. (2018). Purification of *Cyclospora cayetanensis* oocysts obtained from human stool specimens for whole genome sequencing. *Gut Pathogens*, 10(1), 1–9.
- Rabold Gregory, Hoge, C., Shlim, D., Kefford, C., & Rajah, R. E. P. (1993). Acute promyelocytic leukaemia after tissue from marrow graft recipients with. *Lancet*, 344, 1360–1361.
- Relman, D. A., T. M. Schmidt, A. Gajadhar, M. Sogin, J. Cross, K. Yoder, O. Sethabutr, y P. Echeverria. (1996). Molecular Phylogenetic Analysis of *Cyclospora*, the Human Intestinal Pathogen, Suggests that It Is Closely Related to *Eimeria* Species. *J. Infect. Dis.* 173:440–445.
- Schmedes, S. E., Patel, D., Kelley, J., Udhayakumar, V., & Talundzic, E. (2019). Using the *Plasmodium* mitochondrial genome for classifying mixed-species infections and inferring the geographical origin of *P. falciparum* parasites imported to the US. *PloS one*, 1–14.
- Shields, J. M., Joo, J., Kim, R., & Murphy, H. R. (2013). Assessment of three commercial DNA extraction kits and a laboratory-developed method for detecting *Cryptosporidium* and *Cyclospora* in raspberry wash, basil wash and pesto. *Journal of Microbiological Methods*, 92(1), 51–58.
- Shinde, P., Sarkar, C., & Jalan, S. (2018). Codon based co-occurrence network motifs in human mitochondria. *Scientific Reports*, (May 2017), 1–11.
- Shirley, M. W., & Harvey, D. A. (1996). *Eimeria tenella : infection with a single sporocyst gives a clonal population*. 523–528.
- Sterling, C. R., & Ortega, Y. R. (1999). *Cyclospora: An enigma worth unraveling. Emerging*

Infectious Diseases, Vol. 5, pp. 48–53.

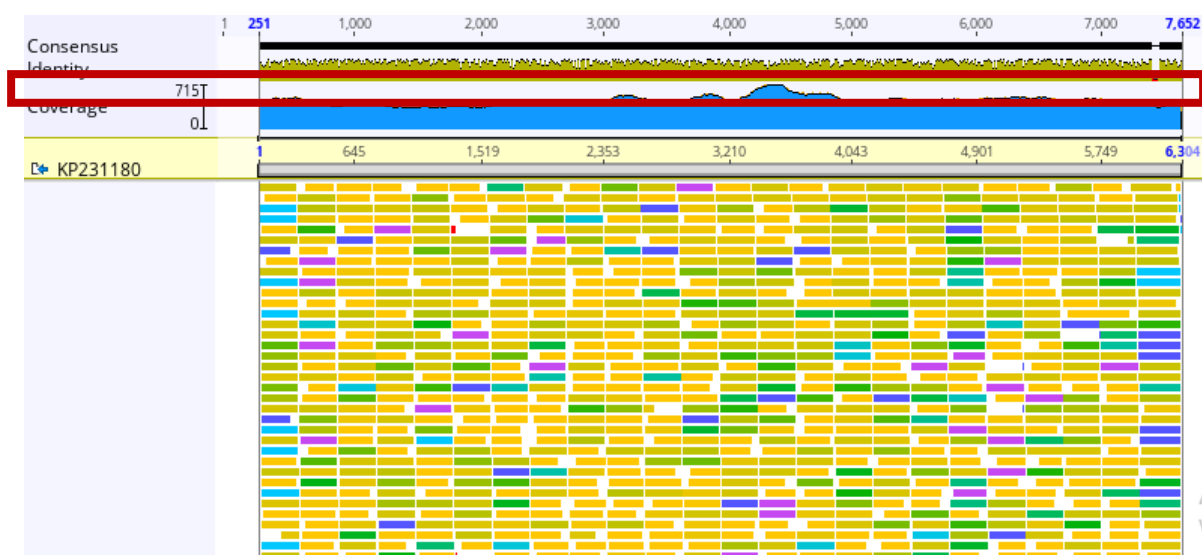
- Sturbaum, G. D., Ortega, Y. R., Gilman, R. H., Sterling, C. R., Cabrera, L., & Klein, D. A. (1998). Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2284–2286.
- Sulaiman, I. M., Ortega, Y., Simpson, S., & Kerdahi, K. (2014). Genetic characterization of human-pathogenic *Cyclospora cayetanensis* parasites from three endemic regions at the 18S ribosomal RNA locus. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 229–234.
- Sulaiman, I. M., Torres, P., Simpson, S., Kerdahi, K., & Ortega, Y. (2013). Sequence Characterization of Heat Shock Protein Gene of *Cyclospora cayetanensis* Isolates from Nepal, Mexico, and Peru. *Journal of Parasitology*, 99(2), 379–382.
- Tang, K., Guo, Y., Zhang, L., Rowe, L. A., Roellig, D. M., Frace, M. A., ... Xiao, L. (2015). Genetic similarities between *Cyclospora cayetanensis* and cecum-infecting avian *Eimeria* spp. in apicoplast and mitochondrial genomes. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–11.
- Tibaduiza-Roa, V., Huerta-de la Peña, A., Morales-Jiménez, J., Hernández-Anguiano, A. M., & Muñiz-Reyes, É. (2018). Sistema de producción del cilantro en Puebla y su impacto en la inocuidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(4), 773–786.
- Tyagi, S., Pande, V., & Das, A. (2014). New insights into the evolutionary history of *Plasmodium falciparum* from mitochondrial genome sequence analyses of Indian isolates. *Molecular Ecology*, 23(12), 2975–2987.
- Vaidya, A. B., Akella, R., & Suplick, K. (1989). Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal R N A in tandemly arrayed 6-kilobase-pair D N A of a malarial parasite. *Molecular and biochemical parasitology*, 35(2), 97–107.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Kovacs-Nace, E., Wallace, S., & Eberhard, M. L. (1997). Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 730–733.
- Wang, X., Liu, N., Zhang, H., Yang, X., Huang, Y., & Lei, F. (2015). Extreme variation in patterns of tandem repeats in mitochondrial control region of yellow-browed tits (*Sylviparus modestus* , Paridae). *Nature Publishing Group*, (32), 1–9.
- Wroblewska, L., Kitada, T., Endo, K., Siciliano, V., Stillo, B., Saito, H., & Weiss, R. (2018). Molecular Detection of *Cyclospora cayetanensis* in Human Stool Specimens using UNEX-based DNA extraction and real-time PCR. *Parasitology*, 145(7), 839–841.
- Yai, L. E. O., Bauab, A. R., Hirschfeld, M. P. M., De Oliveira, M. L., & Damaceno, J. T. (1997). The first two cases of *Cyclospora* in dogs, São Paulo, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 39(3), 177–179.
- Yamada, M., Hatama, S., Ishikawa, Y., & Kadota, K. (2014). Intranuclear coccidiosis caused by *Cyclospora* spp. in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(5), 678–682.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(May).
- Zhou, Y., Lv, B., Wang, Q., Wang, R., Jian, F., Zhang, L., ... Xiao, L. (2011). Prevalence and molecular characterization of *Cyclospora cayetanensis*, Henan, China. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1887–1890.

10. ANEXOS



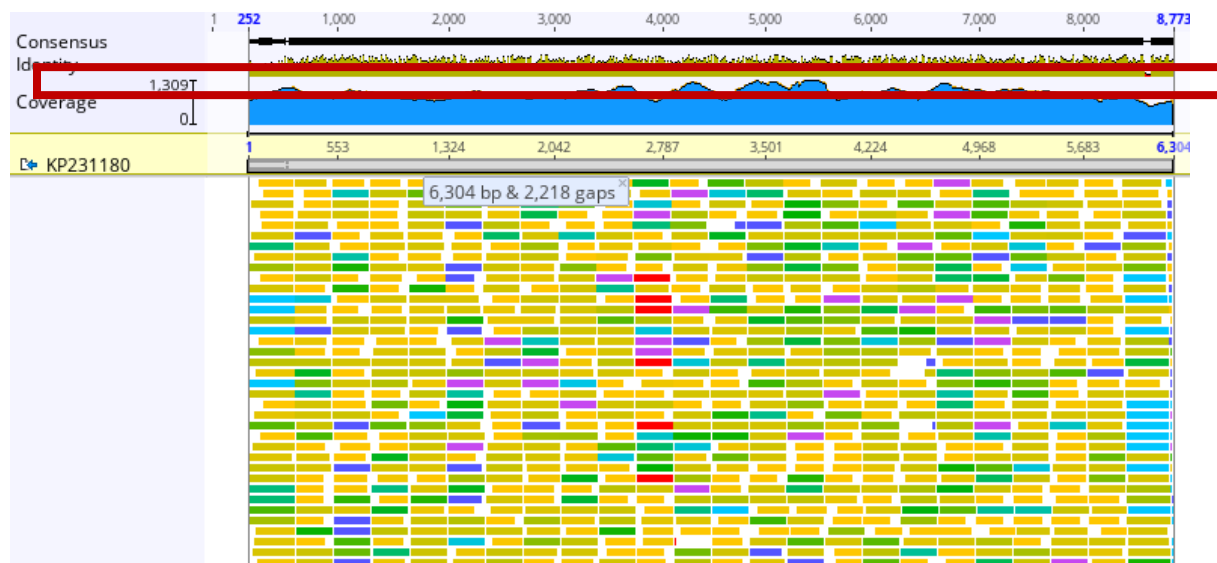
Estadísticas de nucleótidos:
 Longitud: 7,459 pb
 Secuencias: 1
 Sitios idénticos: 213 (3.2%)
 Identidad por parejas: 98.3%

Figura 16. Ensamblaje consenso del aislado CDC:HCTX208:15. Lecturas con número de acceso SRX3994915 del aislado CDC:HCTX208:15 mapeadas con un genoma de referencia en Geneious Prime. En el rectángulo rojo se muestra el ensamblaje consenso obtenido. Los colores indican la distancia emparejada. Dirección incorrecta; color rojo: Por debajo de la distancia esperada; color amarillo: Distancia esperada; color verde: Por arriba de la Distancia esperada; color azul cielo: Adelante sin emparejar; color azul rey: Reverso no apareado; color morado.



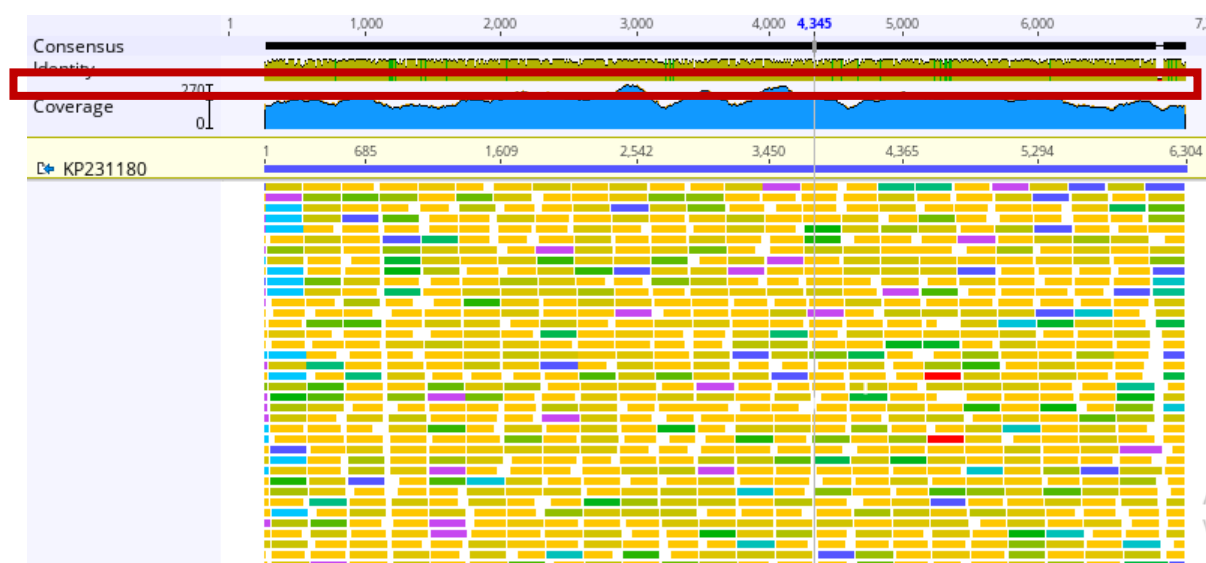
Estadísticas de nucleótidos:
 Longitud: 7,902 pb
 Secuencias: 1
 Sitios idénticos: 219 (3.3%)
 Identidad por parejas: 98.0%

Figura 17. Ensamblaje consenso del aislado del aislado CDC:HCTX204:15. Lecturas con número de acceso SRX3994924 del aislado CDC:HCTX204:15 mapeadas con un genoma de referencia en Geneious Prime. En el rectángulo rojo se muestra el ensamblaje consenso obtenido. Los colores indican la distancia emparejada. Dirección incorrecta; color rojo: Por debajo de la distancia esperada; color amarillo: Distancia esperada; color verde: Por arriba de la Distancia esperada; color azul cielo: Adelante sin emparejar; color azul rey: Reverso no apareado; color morado.



Estadísticas de nucleótidos:
 Longitud: 8,522 pb
 Secuencias: 1
 Sitios idénticos: 8 (0.1%)
 Identidad por parejas: 95.8%

Figura 18. Ensamblaje consenso del aislado del aislado CDC:HCTX205:15. Lecturas con número de acceso SRX3994923 del aislado CDC:HCTX205:15 mapeadas con un genoma de referencia en Geneious Prime. En el rectángulo rojo se muestra el ensamblaje consenso obtenido. Los colores indican la distancia emparejada. Dirección incorrecta; color rojo: Por debajo de la distancia esperada; color amarillo: Distancia esperada; color verde: Por arriba de la Distancia esperada; color azul cielo: Adelante sin emparejar; color azul rey: Reverso no apareado; color morado.



Estadísticas de nucleótidos:

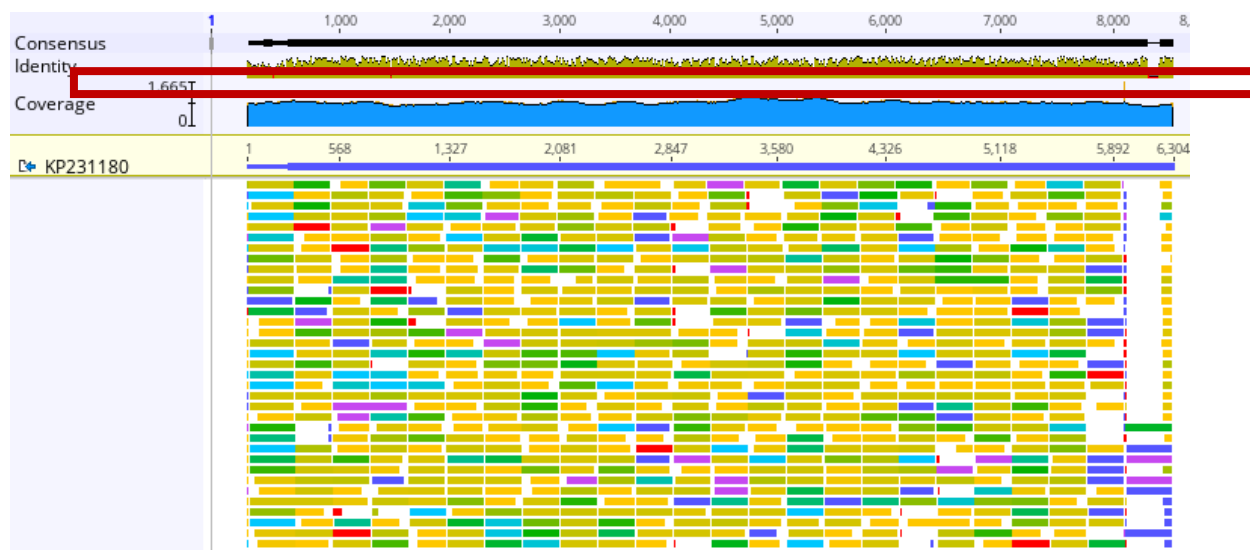
Longitud: 7,321 bp

Secuencias: 4,885

Sitios idénticos: 2,077 (32.2%)

Identidad por parejas: 98.6%

Figura 19. Ensamblaje consenso del aislado del aislado CDC:HCTX227:15. Lecturas con número de acceso SRX3994918 del aislado CDC:HCTX227:15 mapeadas con un genoma de referencia en Geneious Prime. En el rectángulo rojo se muestra el ensamblaje consenso obtenido. Los colores indican la distancia emparejada. Dirección incorrecta; color rojo: Por debajo de la distancia esperada; color amarillo: Distancia esperada; color verde: Por arriba de la Distancia esperada; color azul cielo: Adelante sin emparejar; color azul rey: Reverso no apareado; color morado.



Estadísticas de nucleótidos:

Longitud: 5,133 bp

Secuencias: 64

Sitios idénticos: 3,517 (94.0%)

Identidad por pares: 96.7%

Figura 20. Ensamblaje consenso del aislado del aislado CHN-HEN01. Lecturas con número de acceso SRX3994920 del aislado CHN-HEN01 mapeadas con un genoma de referencia en Geneious Prime. En el rectángulo rojo se muestra el ensamblaje consenso obtenido. Los colores indican la distancia emparejada. Dirección incorrecta; color rojo: Por debajo de la distancia esperada; color amarillo: Distancia esperada; color verde: Por arriba de la Distancia esperada; color azul cielo: Adelante sin emparejar; color azul rey: Reverso no apareado; color morado.