



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**TESIS DE LICENCIATURA**

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Cyclospora cayetanensis* EN TRES GÉNEROS DE MOLUSCOS BIVALVOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL RECOLECTADOS EN EL GOLFO DE PANAMÁ”

**PRESENTADO POR:**

CIFUENTES, ARIEL 8-910-286

CONCEPCIÓN, ANGÉLICA 8-988-2208

**DIRIGIDO POR:**

RÍOS, NIVIA

MARTÍNEZ TORRES, ALEX

ROMAÑA, SEAN

Trabajo de graduación para optar por el título de Licenciatura en Biología, con orientación en Microbiología y Parasitología.

**Panamá, República de Panamá**

**2025.**



---

**Tribunal Examinador**

---

Título:

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Cyclospora cayetanensis* EN TRES GÉNEROS DE MOLUSCOS BIVALVOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL RECOLECTADOS EN EL GOLFO DE PANAMÁ**

Por:

Ariel A. Cifuentes M. 8-910-286 \_\_\_\_\_

Angélica P. Concepción R. 8-988-2208 \_\_\_\_\_

Trabajo de graduación presentado a consideración de la Escuela de Biología como requisito parcial para optar por el título de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología.

Mgtr. Nivia Ríos \_\_\_\_\_

Asesora principal

Firma del profesor

Lic. Sean Romaña \_\_\_\_\_

Asesor

Firma del profesor

Dr. Alex O. Martínez Torres \_\_\_\_\_

Asesor

Firma del profesor

# **DEDICATORIA**

Primeramente, le dedicamos este logro a Dios por darnos la salud, inteligencia y sabiduría para culminar este proyecto, reconociendo que su gracia a estado con nosotros en cada momento como dice en Isaías 41:10 "No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia". A nuestros padres por su apoyo incondicional y familiares que siempre estuvieron alentándonos a seguir adelante.

# **AGRADECIMIENTO**

A nuestro amado Señor y Salvador, Jesucristo, por su infinita gracia, sabiduría y fortaleza, que nos permitió llegar hasta este punto. A él sea, pues, toda la gloria y honra.

Nuestro más profundo agradecimiento a nuestra directora de tesis, Mgtr. Nivia Ríos, que gracias a su experiencia y conocimiento nos brindó consejos certeros, contribuyendo a nuestras experiencias en el complejo y enriquecedor mundo de la investigación. Estamos muy agradecidos con el Dr. Alex O. Martínez Torres, por sus consejos al momento de trabajar en un laboratorio del ámbito molecular y por sus sabias enseñanzas al introducirnos en el mundo del análisis filogenético. Al Lic. Sean Romaña, que nos brindó un apoyo incondicional durante nuestra estadía en el laboratorio, al brindarnos sus conocimientos del desarrollo y procesamiento de las muestras a nivel molecular y ayudarnos a encontrar soluciones a los imprevistos. Al Lic. Sixto Rodríguez, que nos apoyó con sus conocimientos en el análisis estadístico.

A los laboratorios de Microbiología de aguas (LAMA) y Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA), y colegas, por el apoyo durante nuestra estadía en el laboratorio.

Instituciones financiadoras de esta tesis fue gracias a los fondos adquiridos en la Convocatoria Universitaria para Fondos de Investigación VIP (Consejo Administrativo, Reunión N°1-19 del 30 de enero de 2019) y los fondos del Fideicomiso de Agua, Áreas Protegidas y Vida Silvestre del Ministerio de Ambiente (MiAmbiente) Convenio 041-53-2019.

A nuestros padres que, sin sus consejos, amor y su apoyo nada de esto fuera posible, y a nuestros amigos más cercanos, muchas gracias.

<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b>	
<b>DEDICATORIA</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	9
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>CAPÍTULO I</b> .....	17
<b>1.1 Introducción</b> .....	18
<b>1.2 Marco teórico</b> .....	21
<b>1.2.1 Moluscos bivalvos</b> .....	21
<b>1.2.2 Alimentación</b> .....	21
<b>1.2.3 Importancia Comercial</b> .....	22
<b>1.2.4 Contaminación de las aguas costeras</b> .....	22
<b>1.2.5 Protozoos intestinales</b> .....	23
<b>1.2.6 Generalidades de <i>Cyclospora cayetanensis</i></b> .....	24
<b>1.2.7 Técnicas moleculares para la detección de parásitos infecciosos</b> ..	27
<b>1.2.8 Gen de referencia</b> .....	28
<b>1.3 Objetivos</b> .....	29
<b>1.4 Hipótesis</b> .....	29
<b>CAPÍTULO II</b> .....	30
<b>2 Métodos y Materiales</b> .....	31
<b>2.1 Características generales de los sitios de muestreo</b> .....	31
<b>2.2 Las muestras</b> .....	32
<b>2.3 Cuantificación del ADN</b> .....	33
<b>2.4 Identificación molecular de <i>C. cayetanensis</i> en muestras de bivalvos</b> ..	34
<b>2.4.1 Trazabilidad molecular de <i>C. Cayetanensis</i></b> .....	36
<b>2.5 Análisis estadístico</b> .....	36
<b>CAPÍTULO III</b> .....	37

<b>3.1 Resultados</b> .....	38
<b>3.1.1 Detección molecular</b> .....	38
<b>3.1.2 Análisis estadístico</b> .....	43
<b>3.1.3 Análisis de las secuencias de ácidos nucleicos</b> .....	45
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	53
<b>4.1 Conclusiones</b> .....	54
<b>4.2 Recomendaciones</b> .....	55
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56
<b>ANEXO</b> .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo general de un coccidio. Fuente: Coccidios intestinales y tisulares (García et al., 2008). .....	24
<b>Figura 2.</b> Fotografía de microscopía de un ooquiste inmaduro con citoplasma indiferenciado (izq.) y (der.) ovoquiste diferenciando en 2 esporoquistes de <i>Cyclospora</i> sp. (CDC 2016).....	25
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>C. cayetanensis</i> (Almería et al., 2019). .....	26
<b>Figura 4.</b> Localización geográfica de los tres puntos de colectas. Localidad 1: Playa Bique, con las coordenadas 8°53'37.14" N 79°39'23.33" W, Localidad 2: Bahía de Chame, con las coordenadas 8°39'29.78" N 79°52'56.82" W, Localidad 3: Santa Cruz de Chinina, con las coordenadas 9°07'30.80" N 79°03'50.86" W (Frías, 2022). .....	32
<b>Figura 5.</b> Electroforesis de resultados de <i>C. cayetanensis</i> , estación seca, en el mes de febrero. ....	39
<b>Figura 6.</b> Electroforesis de resultados de <i>C. cayetanensis</i> , estación seca, en el mes de marzo. ....	40
<b>Figura 7.</b> Electroforesis para detección de <i>C. cayetanensis</i> , estación seca, en los meses de marzo y abril. ....	40
<b>Figura 8.</b> Electroforesis de resultados de <i>C. cayetanensis</i> , estación lluviosa, en los meses de septiembre y octubre. ....	41
<b>Figura 9.</b> Electroforesis de resultados de <i>C. cayetanensis</i> , estación lluviosa, en los meses de octubre y noviembre. ....	42
<b>Figura 10.</b> Distribución de los resultados de <i>C. cayetanensis</i> en cada mes.....	43
<b>Figura 11.</b> Frecuencia de los resultados de <i>C. cayetanensis</i> durante la estación seca y lluviosa. ....	44
<b>Figura 12.</b> Análisis filogenético basado en 9 muestras positivas en este estudio para <i>C. cayetanensis</i> durante la estación seca y lluviosa. ....	45
<b>Figura 13.</b> Crio cajas con las muestras de ADN total de moluscos bivalvos correspondientes a estación seca (caja verde) y lluviosa (caja morada). ....	72
<b>Figura 14.</b> Cuantificación de ADN total de las muestras de moluscos bivalvos en el Nanodrop, en lado izquierdo se cuantificó el ADN total de las muestras de moluscos	

bivalvos para la estación seca y al lado derecho se cuantificó el ADN total de las muestras de moluscos bivalvos para la estación lluviosa. .... 72

**Figura 15.** Se muestra el proceso en donde se prepararon los reactivos moleculares para la PCR y PCR anidada, para la detección de *C. cayetanensis*. En el lado izquierdo fue la preparación para la detección en la estación lluviosa y al lado derecho para la detección en la estación seca..... 73

**Figura 16.** Se muestra el proceso del montaje de las muestras de ADN total de moluscos bivalvos en el termociclador para la detección de *Cyclospora cayetanensis*. .... 73

**Figura 17.** Se muestra el proceso de montaje de las muestras de ADN total de moluscos bivalvos en los pocillos del gel de agarosa, para la detección de *Cyclospora cayetanensis*. En el lado izquierdo para detección en la estación seca y el lado derecho para la detección en la estación lluviosa..... 74

**Figura 18.** Team ultracongelados, proyecto de tesis caracterización molecular de *C. cayetanensis*..... 74

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Información de los primers para la PCR- PCR anidada. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de PCR y nPCR en tiempo final para <i>C. cayetanensis</i> (Carrasco y Rojas 2024). ....	35
<b>Tabla 3.</b> Resultados comparativos de la detección de <i>C. cayetanensis</i> en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y moleculares obtenidos durante el mes de febrero en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste ( <i>Anadara sp.</i> ), Bique, Arraiján, Panamá Oeste ( <i>Leukoma sp.</i> ), Playa Chinina, Chepo ( <i>Donax sp.</i> ). ....	66
<b>Tabla 4.</b> Resultados comparativos de la detección de <i>C. cayetanensis</i> en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y moleculares obtenidos durante el mes de marzo en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste ( <i>Anadara sp.</i> ), Bique, Arraiján, Panamá Oeste ( <i>Leukoma sp.</i> ), Playa Chinina, Chepo ( <i>Donax sp.</i> ). ....	67
<b>Tabla 5.</b> Resultados comparativos de la detección de <i>C. cayetanensis</i> en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y moleculares obtenidos durante el mes de abril en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste ( <i>Anadara sp.</i> ), Bique, Arraiján, Panamá Oeste ( <i>Leukoma sp.</i> ), Playa Chinina, Chepo ( <i>Donax sp.</i> ). ....	68
<b>Tabla 6.</b> Resultados comparativos de la detección de <i>C. cayetanensis</i> en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y modernos obtenidos durante el mes de septiembre en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste ( <i>Anadara sp.</i> ), Bique, Arraiján, Panamá Oeste ( <i>Leukoma sp.</i> ), Playa Chinina, Chepo ( <i>Donax sp.</i> ). ....	69
<b>Tabla 7.</b> Resultados comparativos de la detección de <i>C. cayetanensis</i> en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y modernos obtenidos durante el mes de octubre en las tres diferentes zonas de producción pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste ( <i>Anadara sp.</i> ), Bique, Arraiján, Panamá Oeste ( <i>Leukoma sp.</i> ), Playa Chinina, Chepo ( <i>Donax sp.</i> ). ....	70
<b>Tabla 8.</b> Resultados comparativos de la detección de <i>C. cayetanensis</i> en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y modernos obtenidos	

durante el mes de noviembre en las tres diferentes zonas de producción pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (Anadara sp.), Bique, Arraján, Panamá Oeste (Leukoma sp.), Playa Chinina, Chepo (Donax sp.). ..... 71

# RESUMEN

*Cyclospora cayetanensis* es un parásito protozoo intracelular obligatorio, causante de la ciclosporiasis humana, que es una enfermedad diarreica de relevancia sanitaria, especialmente en personas inmunocomprometidas. Este patógeno emergente ha sido reportado en múltiples regiones del mundo y puede estar presente en ambientes costeros contaminados. En el Golfo de Panamá, la recolección artesanal de moluscos bivalvos como almejas, conchas negras y ostras constituye una actividad económica importante. Sin embargo, las condiciones ambientales de estas zonas, influenciadas por la descarga de aguas residuales y la escorrentía agrícola, pueden favorecer la contaminación microbiológica, incluyendo la presencia de parásitos. El objetivo del presente estudio fue detectar molecularmente la presencia de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos provenientes de tres zonas de producción del Golfo de Panamá. Se utilizó la técnica de PCR anidada (nPCR) dirigida al gen de la subunidad pequeña ARNr 18S. El protocolo incluyó dos rondas de amplificación con condiciones de ciclado optimizadas, se realizó la detección molecular de *C. cayetanensis* siguiendo la metodología de amplificación por PCR anidada y la visualización posterior, mediante electroforesis en gel de agarosa. El análisis reveló diferencias estadísticamente significativas en la proporción de resultados positivos y negativos para *C. cayetanensis*. Durante la época lluviosa, se detectaron 17 muestras positivas, mientras que en la época seca solo se detectaron 7 muestras positivas. Los porcentajes de muestras positivas por mes son los siguientes: febrero 0%, marzo 13.33%, abril 33.33%, septiembre 20%, octubre 60%, y noviembre 33.33%. El análisis filogenético reveló la circulación del genotipo V de *C. cayetanensis* en las muestras de moluscos bivalvos analizadas, mostrando que las secuencias analizadas de Panamá, coinciden con los genotipos V reportados en China, México, Polonia, Japón, Corea, Guatemala y Perú. Esto confirma la presencia de *C. cayetanensis* en moluscos bivalvos recolectados en el Golfo de Panamá, lo que evidencia un riesgo potencial para la salud pública asociado al consumo crudos o mal cocidos de estos organismos contaminados.

**Palabras claves:** *C. cayetanensis*, Bivalvos, Golfo de Panamá, nPCR, Ciclosporiasis, Análisis Filogenético.

# **ABSTRACT**

*Cyclospora cayetanensis* is an obligate intracellular protozoan parasite that causes human cyclosporiasis, a diarrheal disease of public health concern, especially in immunocompromised individuals. This emerging pathogen has been reported in multiple regions worldwide and can be present in contaminated coastal environments. In the Gulf of Panama, the artisanal harvesting of bivalve mollusks such as clams, black clams, and oysters is an important economic activity. However, the environmental conditions of these areas, influenced by wastewater discharge and agricultural runoff, can favor microbiological contamination, including the presence of parasite. The objective of this study was to detect the presence of *C. cayetanensis* in bivalve mollusk sample from three production areas in the Gulf of Panama using molecular methods. Nested PCR (nPCR) targeting the 18S rRNA small subunit gene was used. The protocol included two rounds of amplification with optimized cycling conditions. Molecular detection of *C. cayetanensis* was performed using nested PCR amplification, followed by visualization via agarose gel electrophoresis. The analysis revealed statistically significant differences in the proportion of positive and negative results for *C. cayetanensis*. During the rainy season, 17 positive samples were detected, while only 7 positive samples were detected during the dry season. The percentages of positive samples per month are as follows: February 0%, March 13.33%, April 33.33%, September 20%, October 60%, and November 33.33%. Phylogenetic analysis revealed the circulation of genotype V of *C. cayetanensis* in the analyzed bivalve mollusk samples, showing that the analyzed sequences from Panama coincide with genotype V reported in China, Mexico, Poland, Japan, Korea, Guatemala, and Peru. This confirms the presence of *C. cayetanensis* in bivalve mollusk collected in the Gulf of Panama, which show a potential risk to public health associated with the consumption of raw undercooked contaminated organisms.

Keywords: *C. cayetanensis*, bivalves, Gulf of Panamá, nPCR, Cyclosporiasis, Phylogenetic Analysis.

# **CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO**

## 1.1 Introducción

En Panamá y en diversas partes del mundo, el consumo de moluscos forma parte fundamental de la dieta y economía local. Es por ello, que son objeto de extracción y explotación con fines comerciales en el Pacífico de Centroamérica, de forma artesanal por las comunidades de pescadores de la zona, extrayendo principalmente las conchas negras, almejas, ostras y mejillones (Guerra-Lima et al., 2012). Sin embargo, las aguas costeras enfrentan serios problemas de contaminación debido a la presencia de poblaciones pequeñas sin control adecuado de aguas residuales, así como actividades agrícolas y ganaderas que contribuyen a la escorrentía de contaminantes. Los moluscos bivalvos, que se alimentan filtrando materia suspendida y pueden concentrar patógenos como bacterias, virus y parásitos presentes en el agua (Cáceres-Martínez et al., 2008; Walker et al., 2018).

El parasitismo es un fenómeno ecológico en el que un parásito se establece temporal o permanentemente en la superficie o el interior de un hospedero vivo, del cual obtiene nutrientes para su subsistencia sin proporcionar ningún beneficio equivalente. Desde una perspectiva biológica, un parásito se considera más adaptado cuando causa el menor daño posible a su hospedero, mientras que aquellos menos adaptados pueden provocar lesiones graves o incluso la muerte del organismo que los alberga (David y Marcos, 1998).

*C. cayetanensis* es un parásito protozoo intracelular obligatorio, perteneciente al Phylum Apicomplexa (Weitzel et al., 2017), causante de la ciclosporiasis en el humano (Mansfield y Gajadhar, 2004), una enfermedad diarreica que puede ser grave en personas con sistemas inmunitarios debilitados. La enfermedad se presenta en todo el mundo con cierta estacionalidad. Está clasificado como un patógeno emergente para humanos (Varma et al., 2003; Bartosova et al., 2021). La transmisión de *C. cayetanensis* se produce por la liberación de ooquistes inmaduros por las heces, los que se mantienen en el ambiente aproximadamente 2 semanas y dependiendo de una variedad de factores ambientales, como la temperatura y la humedad, logran esporular. Los ooquistes maduros o esporulados son los

infectantes y contienen dos esporoquistes ovoidales con dos esporozoitos. La ciclosporiasis es adquirida por hospederos susceptibles a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados con los ooquistes maduros del parásito (Weitzel et al., 2017).

Una característica destacada de este protozoo parásito es su estacionalidad. Puesto que, en algunas zonas, durante la temporada de lluvias, las tasas de infección son altas y disminuyen a niveles indetectables durante la temporada seca. Si bien, el mecanismo de transmisión no se ha dilucidado por completo, la mayoría de los casos de ciclosporiasis se han asociado con el consumo de alimentos que podrían haberse contaminado tras el contacto con agua contaminada (Herwaldt y Ackers, 1997; Varma et al., 2003).

En diversas partes del mundo, se ha documentado la presencia de *C. cayetanensis* en frutas y alimentos frescos. En Egipto, por ejemplo, se identificó este parásito en lechugas y bivalvos obtenidos de mercados en Alejandría (Nimri, 2003). La globalización creciente de productos alimenticios frescos y el aumento de los viajes internacionales, junto con la tendencia a consumir alimentos fuera del hogar, han facilitado la dispersión de este parásito desde áreas endémicas hacia regiones no endémicas (Nimri, 2003).

En EEUU y Canadá, se han registrado varios brotes significativos de ciclosporiasis asociados con el consumo de alimentos contaminados. Por ejemplo, hubo brotes destacados relacionados con el consumo de frambuesas importadas de Guatemala (Doller, 2015). Se estima que, en EEUU, el 90% de los casos de ciclosporiasis están vinculados con la ingesta de alimentos (Mead, 2015).

A nivel global, estudios han encontrado *Cyclospora* sp. en diferentes especies de bivalvos. Por ejemplo, en España se detectó en un 10% de las muestras de mejillones analizadas (Ghozzi et al., 2017), mientras que en China se encontró en un 5% de las muestras de ostras estudiadas (Kim et al., 2023).

En Panamá, la detección de *Cyclospora* sp. en bivalvos ha sido poco estudiada, aunque investigaciones recientes han revelado su presencia en géneros de

moluscos bivalvos como *Anadara* sp., *Leukoma* sp. y *Donax* sp. durante la temporada seca de 2021 (Cuevas y Spalding, 2021) y en la época lluviosa 2020 (Frías, 2022), mediante métodos tradicionales de identificación. A pesar de ello, no se habían realizado estudios moleculares exhaustivos para determinar la prevalencia de *Cyclospora* sp. en bivalvos de importancia económica en estas regiones.

Este estudio se centró en la detección y caracterización molecular de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos marinos de importancia comercial, de tres zonas de producción del país. Para esto, se empleó la técnica de PCR anidada que es altamente sensible y específica para la detección rápida de *C. cayetanensis* (Resendiz-Nava et al., 2020). Posterior a la detección positivas de las muestras, se realizará la secuenciación de los fragmentos amplificados, y esto permitirá identificar y caracterizar los genotipos circulantes. Esta metodología es necesaria para entender la diversidad genética del parásito en bivalvos-almejas recolectado en el Golfo de Panamá (Cuevas y Spalding, 2021; Frías, 2022).

El enfoque de esta investigación es relevante ya que los moluscos bivalvos, al ser filtradores, incorporan dentro de su tubo digestivo, tejidos gonadales, sifonales y branquiales, tanto partículas como agentes infecciosos, y entre estos, los parásitos, generando cuadros diarreicos severos en la población consumidora de los mismos (Lodeiros et al., 1999; Gargala et al., 2018). La presencia de alto contenido de microorganismos patógenos y otros agentes contaminantes en los moluscos bivalvos, representa uno de los principales problemas sanitarios y ecológicos de las zonas costeras (Kuhn et al., 2002; Cabrera et al., 2010; Hamza-Chaffai, 2014).

La caracterización molecular permitirá la obtención de datos claves sobre la prevalencia y genotipos de este parásito, los cuales son fundamentales para implementar medidas de control y prevención de la ciclosporiasis en la población panameña que consume dichos moluscos (Resendiz-Nava et al., 2020).

## **1.2 Marco teórico**

### **1.2.1 Moluscos bivalvos**

Contienen una prolongada historia taxonómica, en la que se han utilizado diversos nombres para sus diferentes taxones. Vulgarmente denominados “almejas”, aunque en la literatura científica sean designados como lamelibranquios o pelecípodos, el primer término en alusión a las características de sus órganos respiratorios o branquias, y el segundo, con referencia a la forma del pie u órgano que participa en la locomoción (Camacho et al., 2008; Frías, 2022).

Probablemente, fue Aristóteles el primer científico en reconocer a los moluscos y los dividió en dos grupos: Malachia (cefalópodos) y Ostrachodermata (las formas con concha), dividiendo a los últimos en dos subgrupos: univalvos y bivalvos. Los bivalvos forman uno de los grandes filos del reino animal, después de los insectos. Entre los moluscos están incluidos algunos de los invertebrados más conocidos. Las conchas de los moluscos han sido populares desde épocas antiguas y algunas culturas aún la utilizan en distintas herramientas (Jacomé, 2007; Frías, 2022).

### **1.2.2 Alimentación**

Todos los bivalvos son micrófagos y no poseen mandíbulas, rádulas o aparatos especiales para manipular, cortar o masticar. De acuerdo con el método de alimentación, los bivalvos pueden ser suspensívoros, detritívoros o carnívoros. La mayoría se alimenta de partículas (diatomeas, dinoflagelados, otras algas y bacterias) que se hayan en la suspensión del agua. Otros lo hacen de partículas alimenticias que se encuentran en el sedimento que los rodea y otros consumen presas vivas o muertas que atrapan activamente de distinta manera. Estos tres tipos de alimentación están relacionados con las branquias. Los alimentos llegan a la cavidad del manto transportados por una corriente de agua inhalante (Camacho et al., 2008). Las grandes branquias filtran el alimento del agua y lo dirigen hacia los palpos labiales donde se clasifica antes de pasar a la boca. Los bivalvos tienen la capacidad de seleccionar alimentos filtrados del agua (Getchell et al., 2016).

### **1.2.3 Importancia Comercial**

El Pacífico este tropical, es uno de los lugares más ricos en diversidad y recursos marinos del mundo. La costa Pacífica de Costa Rica, Panamá y Colombia, se extiende por más de 4000 km en el centro del Pacífico americano, en medio de las importantes corrientes marinas que aportan riqueza de nutrientes. La privilegiada posición geográfica de estos tres países ha desarrollado la pesca artesanal en su costa Pacífica (Posada et al., 2014).

La recolección de moluscos y en especial los bivalvos poseen un gran potencial para contribuir al alivio de la pobreza, como fuente económica y de proteína animal. La recolección de moluscos normalmente es realizada de forma artesanal por las comunidades de pescadores de la zona, en la que, en algunos casos la actividad se práctica meramente por subsistencia (Frías, 2022). De igual forma, la recolección de estos ha dado paso a ensayos de reproducción en cautividad para satisfacer la demanda alimentaria. Además, su papel en el mantenimiento de la integridad de los ecosistemas, los moluscos añaden un interés aplicado, ya que algunos son hospedadores intermediarios de parásitos animales (silvestres y ganado), siendo esto de importancia médica y veterinaria (García-Meseguer et al., 2017).

### **1.2.4 Contaminación de las aguas costeras**

La descarga incontrolada de aguas residuales domésticas sin tratamiento es uno de los problemas sanitarios más críticos en América Latina y otras regiones en vía de desarrollo, ya que contamina los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras (Campos Machado, 2007). Las aguas costeras destinadas a actividades recreativas, como las playas, suelen ubicarse cerca de áreas urbanas donde los vertidos sin depurar, con altas concentraciones de microorganismos patógenos y otros contaminantes, representan un problema sanitario y ecológico significativo (González et al., 2003). Este tipo de contaminación no solo afecta al ecosistema marino, sino también a las especies que lo habitan, incluidos los bivalvos. Los bivalvos suelen desarrollarse en ambientes con altos niveles de nutrientes y aguas protegidas, los cuales, desafortunadamente, están frecuentemente contaminados con materia fecal de origen humano o animal (Walker

et al., 2018). Debido a su alimentación por filtración, estos organismos pueden concentrar agentes patógenos como bacterias, virus y, en menor medida, algunos parásitos presentes en la columna de agua (Walker et al., 2018). Durante este proceso, los bivalvos pueden filtrar entre 20 y 100 L de agua, reteniendo microorganismos patógenos que se adhieren al moco de sus branquias o son ingeridos y acumulados en su tracto digestivo durante períodos prolongados (Suárez et al., 2020). Si estos patógenos no son eliminados del tracto digestivo de los moluscos o mediante la cocción durante su preparación, pueden representar un riesgo significativo para la salud pública, ya que los bivalvos suelen consumirse crudos o con mínima cocción, funcionando, así como vehículos de infección (Robertson, 2007).

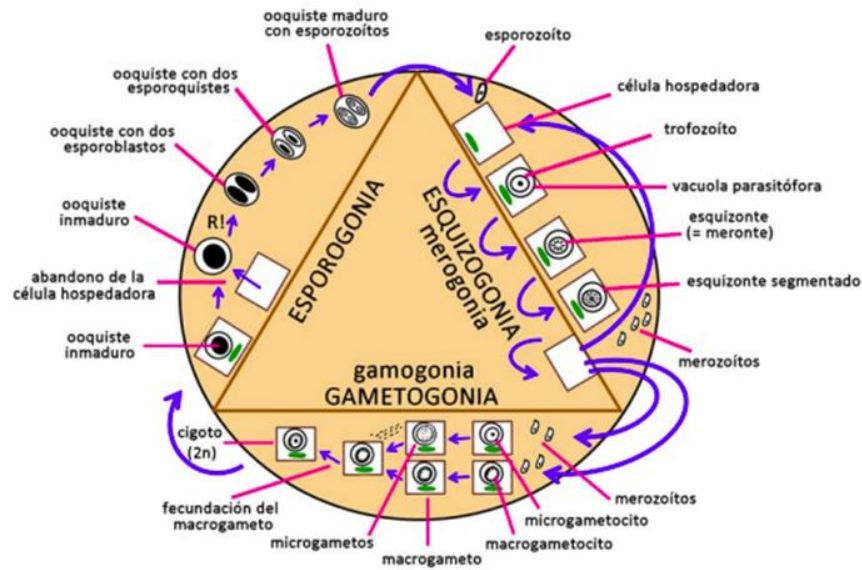
### **1.2.5 Protozoos intestinales**

Los protozoarios son organismos unicelulares eucariotas con una amplia diversidad estructural. Se estima que existen alrededor de 200,000 especies, de las cuales aproximadamente 10,000 son parásitas (Martínez, 2018). En diversas regiones tropicales, subtropicales y templadas, las infecciones causadas por estos microorganismos representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (CDC, 2016).

Gracias a su reducido tamaño y la capacidad de formar quistes, muchas especies presentan una distribución cosmopolita, mientras que otras están restringidas a áreas específicas. Su resistencia a los desinfectantes y su capacidad de sobrevivir en ambientes húmedos durante semanas o incluso meses favorecen su dispersión. Este fenómeno se acentúa con las lluvias, ya que las escorrentías desde zonas urbanas, suburbanas y rurales, se transporta quistes a cuerpos de agua sin tratamiento, aumentando el riesgo de infección en fauna acuática y en personas que consumen mariscos crudos o cocidos (Fayer et al., 2004).

Algunas especies de protozoarios forman colonias con distintos tipos de simetría, como bilateral, radial, esférica o sin un patrón definido (Álvarez, 2006). Entre los protozoarios intestinales, los coccidios presentan un ciclo de vida compuesto por tres fases: esquizogonia (merogonia), gamogonia (gametogonia) y esporogonia,

donde la mayoría de las etapas son haploides, excepto el cigoto, que es diploide (García et al., 2008).



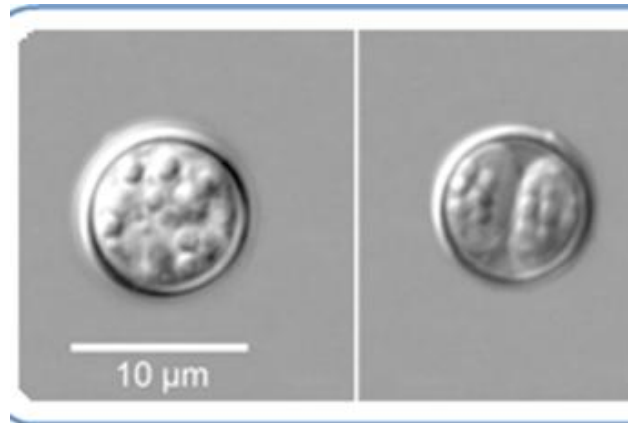
**Figura 1.** Ciclo general de un coccidio. Fuente: Coccidios intestinales y tisulares (García et al., 2008).

Los efectos patogénicos de los coccidios incluyen el aumento de la permeabilidad intestinal, alteraciones en la absorción de nutrientes y secreción excesiva de cloro, consecuencias de la destrucción de las vellosidades intestinales. En personas con un sistema inmune competente, la infección suele limitarse al intestino delgado, mientras que, en individuos inmunocomprometidos, como aquellos con VIH-SIDA, pueden desarrollarse infecciones más severas y extraintestinales. Su patogenicidad está determinada por factores como adhesión, colonización, invasión, supervivencia intracelular y evasión del sistema inmunológico del huésped (García y Rivera, 2017).

### 1.2.6 Generalidades de *Cyclospora cayetanensis*

Este protozoo pertenece al Filo Apicomplexa, Familia Eimeriidae y, siendo *C. cayetanensis* la única especie del género *Cyclospora* sp. que se sabe que infecta a los seres humanos. Posee una morfología típica redonda para el ooquiste con un aproximado de entre 7.5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con una doble pared gruesa (Figura 2). A su vez, el ooquiste maduro infectante contiene 2 esporoquistes ovoides con 2 esporozoitos en su interior (Ortega y Sánchez, 2010; Almería et al., 2019). Este

protozoo posee un ciclo de vida monoxeno, ya que una vez el hospedero se infecta con ooquistes provenientes del medio externo, éste viaja por el tracto gastrointestinal hasta llegar al intestino delgado, donde colonizará los enterocitos (Almería, et al., 2019).

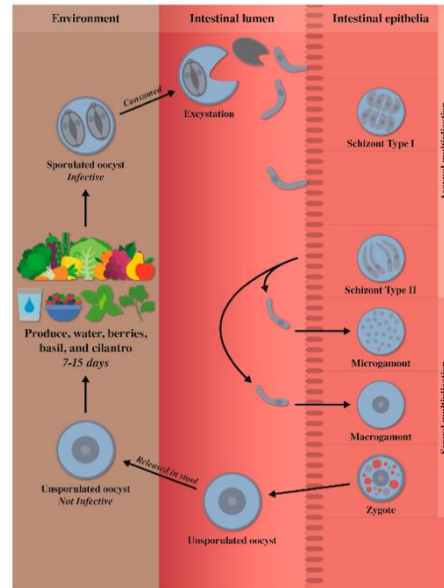


**Figura 2.** Fotografía de microscopía de un ooquiste inmaduro con citoplasma indiferenciado (izq.) y (der.) ovoquiste diferenciando en 2 esporoquistes de *Cyclospora* sp. (CDC 2016).

*C. cayetanensis* mide 8.6 µm (7.7 a 9.9 µm) de diámetro. Cuando este parásito se excreta en las heces, es una esfera indiferenciada que contiene una mórula. El ooquiste tiene una pared bicapa. También, están presentes un cuerpo polar y un residuo de ooquiste. Los ooquistes tardan más de una semana en esporular. Cuando esporulan, el ooquiste tiene dos esporoquiste (4 por 6.3 µm) y cuerpos stieda y substieda. Cada esporoquiste contiene dos esporozoítos (1.2 por 9 µm) que están plegados en dos (Ortega et al., 1994).

Después de la ingestión de ooquistes esporulados en alimentos, agua o suelo contaminados por un hospedero, los esporozoitos se enquistan en el lumen intestinal e invaden los enterocitos del epitelio del duodeno y el yeyuno (Figura 2) (Sun et al., 1996), donde los esporozoitos se transforman en trofozoitos que posteriormente forman dos tipos de esquizontes. Los esquizontes de tipo I (tamaño desconocido) contienen de 8 a 12 merozoitos pequeños (de 3 a 4 µm de largo). Los esquizontes de tipo II contienen 4 merozoitos largos (de 12 a 15 µm de largo) (Ortega et al., 1997). Los merozoitos de tipo II forman gamontes. Se desconocen las dimensiones de los gamontes. En la multiplicación sexual, el microgamonte fertiliza al macrogamonte para formar el cigoto, pero aún no se han identificado los

flagelos. Los ooquistes se forman en los enterocitos y se excretan sin esporular en las heces (Ortega et al., 1997; Connor et al., 1999). Se cree que el período prepatente es de una semana (Ortega et al., 1997).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *C. cayetanensis* (Almería et al., 2019).

### 1.2.6.1 Sintomatología asociada a *C. cayetanensis*

Los principales síntomas de la infección por *C. cayetanensis* son diarrea acuosa voluminosa, calambres abdominales, náuseas, fiebre baja, fatiga y pérdida de peso. Aunque la enfermedad es autolimitada en la mayoría de los pacientes inmunocompetentes, puede presentarse como una diarrea grave, prolongada o crónica en pacientes inmunosuprimidos (Ortega y Sánchez 2010; Almería et al., 2019).

La presentación clínica en entornos endémicos muestra diferencias según la edad, ya que las personas mayores y los niños pequeños tienen síntomas clínicos más graves, mientras que las infecciones son más leves en niños mayores y adultos. Además, las infecciones asintomáticas son frecuentes en áreas endémicas. La gravedad y la duración de la infección tienden a volverse más leves después de episodios repetidos. El período de incubación medio es de alrededor de siete días. La duración promedio de la diarrea es más larga en pacientes VIH positivos que en pacientes VIH negativos (199 días y 57.2 días, respectivamente). Se han descrito

algunos síndromes después de la infección *por Cyclospora* sp.: síndrome de Guillain-Barré y síndrome de artritis reactiva (anteriormente síndrome de Reiter). Otra manifestación clínica de la infección por *C. cayetanensis* en pacientes VIH positivos es la enfermedad biliar, la colecistitis alitiásica y la colangitis en pacientes con SIDA (Almería et al., 2019).

### 1.2.7 Técnicas moleculares para la detección de parásitos infecciosos

Los métodos basados en ácidos nucleicos para la detección de los distintos parásitos infecciosos ofrecen diversas ventajas sobre la microscopía y los métodos inmunológicos. Además de ser altamente sensibles y específicos, permiten identificar la especie hospedera, el genotipo y el subgenotipo, y también, permiten identificar la fuente y la gravedad de la infección en caso de una situación de brote (Hassan et al., 2020).

- **PCR convencional:** esta es utilizada para amplificar una porción de un gen diana en varios millones de copias detectables en poco tiempo, y el producto se detecta una vez finalizada la amplificación. Este tipo de PCR se denomina PCR convencional y es un método consolidado. Los ensayos basados en PCR se han utilizado ampliamente para detectar ooquistes, y determinar la especie y el genotipo en diversos tipos de muestras ambientales y clínicas (Hassan et al., 2020).
- **PCR anidada o nested:** utiliza dos pares de cebadores, donde el primer par de cebadores se une a secuencias externas del ADN objetivo y el producto sirve como plantilla para el segundo par de cebadores. Además, la PCR anidada aumenta la sensibilidad y la especificidad al disminuir la unión no específica resultante del primer conjunto de cebadores. La PCR anidada se ha utilizado con éxito en la detección de ooquistes en aguas superficiales, aguas residuales y en muestras fecales humanas y animales (Monis y Saint, 2001; Hassan et al., 2020).
- **Técnica de secuenciación:** es el método más popular de identificación de especies en muestras positivas. Este método es muy sensible y puede detectar una gran variedad de especies y genotipos. Con la secuenciación

del gen completo, se identifican todas las secuencias de las regiones hipervariables, por lo que se ha logrado clasificar hasta nivel taxonómico de especie (Cortés-López et al., 2020; Carrasco y Rojas 2024).

### **1.2.8 Gen de referencia**

Los genes de referencia son un control de reacción interno que tienen secuencias diferentes a las del objetivo. Para que un gen se considere una referencia fiable, debe cumplir varios criterios, siendo uno de los más importantes su nivel de expresión no afectado por factores experimentales. Además, debe mostrar una mínima variabilidad en su expresión entre tejidos y estados fisiológicos del organismo. El gen de referencia debe, a su vez, demostrar la variabilidad resultante de las imperfecciones de la tecnología utilizada y los procedimientos preparatorios, lo que asegura que cualquier variación en la cantidad de material genético se relacionará en la misma medida que el objeto de investigación y control (Kozera y Rapacz, 2013; Carrasco y Rojas, 2024).

El gen diana que se utiliza habitualmente para la identificación de *C. cayetanensis* es el gen de la subunidad pequeña ARNr 18S (Resendiz-Nava, et al., 2020; Carrasco y Rojas, 2024).

### **1.3 Objetivos**

#### **Objetivo General:**

Detectar molecularmente la presencia *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos de importancia comercial provenientes de tres zonas de producción del Golfo de Panamá.

#### **Objetivos Específicos:**

- Extraer, purificar y cuantificar ADN total de muestras de moluscos bivalvos de importancia comercial provenientes de tres zonas de producción del Golfo de Panamá.
- Identificar *C. cayetanensis* provenientes de moluscos bivalvos de importancia comercial de tres zonas de producción del Golfo de Panamá por PCR anidada.
- Caracterizar molecularmente los genotipos de *C. cayetanensis* circundantes en moluscos bivalvos provenientes de tres zonas de producción del Golfo de Panamá por secuenciación y análisis filogenético.

### **1.4 Hipótesis**

Ho: Las muestras de moluscos bivalvos provenientes de tres zonas de producción del Golfo de Panamá, no poseen *C. cayetanensis*.

Ha: Las muestras de moluscos bivalvos provenientes de tres zonas de producción del Golfo de Panamá, poseen *C. cayetanensis*.

# **CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2 Métodos y Materiales**

### **2.1 Características generales de los sitios de muestreo**

El Golfo del océano Pacífico, se encuentra localizado en la costa suroriental de Panamá, 8°05'11"N 79°16'58"O. Cuenta con una anchura de 250 km y una profundidad de 220 metros. Mantiene una amplia diversidad de peces y especies marinas (Frías, 2022).

#### **2.1.1 Localidades de muestreo (Figura 4)**

##### **2.1.1.1 Playa de Bique**

Se encuentra ubicada en el corregimiento de Cerro Silvestre, distrito de Arraiján, Provincia de Panamá Oeste, a unos 22.8 Km de la ciudad, con coordenadas 8°53'37.14" N 79°39'23.33" W. En esta área, es donde se extrae la mayor cantidad de *Leukoma* sp. para su comercialización en el país (Cuevas y Spalding, 2021; Frías, 2022).

- **Bahía de Chame**

La región de Chame, está ubicada en la parte occidental de la provincia de Panamá Oeste, en la estribación oriental de la cordillera Central en la vertiente del Pacífico, a unos 65 km al oeste de la Ciudad de Panamá, con coordenadas 8°39'29.78" N 79°52'56.82" W. En esta área, es donde se extrae la mayor cantidad de *Anadara tuberculosa* para su comercialización en el país (Cuevas y Spalding, 2021; Frías, 2022).

##### **2.1.1.3 Playa Chinina**

Está localizada en el corregimiento de Santa Cruz de Chinina, perteneciente al distrito de Chepo, Panamá, con coordenadas 9°07'30.80" N 79°03'50.86" W. En esta área, es donde se extrae la mayor cantidad de *Donax* sp. para su comercialización en el país (Cuevas y Spalding, 2021; Frías, 2022).



**Figura 4.** Localización geográfica de los tres puntos de colectas. Localidad 1: Playa Bique, con las coordenadas 8°53'37.14" N 79°39'23.33" W, Localidad 2: Bahía de Chame, con las coordenadas 8°39'29.78" N 79°52'56.82" W, Localidad 3: Santa Cruz de Chinina, con las coordenadas 9°07'30.80" N 79°03'50.86" W (Frías, 2022).

## 2.2 Las muestras

Para la fase inicial de estandarización de la PCR anidada, se utilizaron 90 muestras de ácidos nucleicos previamente extraídas y preservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , de las cuales 45 corresponden a la estación seca (Cuevas y Spalding, 2021) y 45 para la estación lluviosa (Frías, 2022), conservadas en los Laboratorios de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y de Microbiología de Aguas (LAMA) de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad de Panamá.

De requerir más muestras de ácidos nucleicos, se utilizará el protocolo de QIAamp Fast DNA Stool mini kit de Qiagen (Ver procedimiento en el apartado 2.2.1).

### 2.2.1 Protocolo de QIAamp Fast DNA Stool mini kit modificado

Se pipetearon 250  $\mu\text{L}$  de cada muestra en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL tipo Eppendorf y se colocaron sobre hielo. Se le agregaron 250  $\mu\text{L}$  de tampón InhibitEX a cada muestra y se agitaron en un vortex durante 1 min. Se calentó durante 5 min a  $75^{\circ}\text{C}$  y se colocó en un vortex durante 15 s. Este paso de calentamiento se hizo con el fin de ayudar a lisar bacterias y otros parásitos. Después, se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 1 min para sedimentar las partículas de

material. Luego, se pipetearon 600  $\mu\text{L}$  del sobrenadante del paso anterior al tubo de microcentrífuga de 2 mL, cuidando de no arrastrar material del tubo. Seguidamente, se pipetearon 15  $\mu\text{L}$  de proteinasa K al tubo de microcentrífuga de 2 mL que contenía los 600  $\mu\text{L}$  de muestra, se mezclaron en un vórtex brevemente y después, se añadió 200  $\mu\text{L}$  del tampón AL a la mezcla, y se mezcló bien en un vórtex por 15 s.

Se incubó entre 70° a 80°C durante 2 h y luego, se centrifugó brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo. Después, se añadió 400  $\mu\text{L}$  de etanol (96 – 100%) al lisado y se agitó en un vórtex durante 1 min. Se aplicará con cuidado 600  $\mu\text{L}$  del lisado del paso anterior a la columna de centrifugación. Luego, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Se descartó el filtrado del tubo de recogida y se repitió el paso anterior las veces necesarias con el resto del lisado.

Con cuidado se añadió 500  $\mu\text{L}$  de tampón AW1 a los tubos con columnas. Se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min y se desechó el filtrado del tubo de recogida.

Con cuidado se añadió 500  $\mu\text{L}$  de tampón AW2 y se centrifugó a máxima velocidad durante 3 min. Se desechó el tubo de recolección que contenía el filtrado. Se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 3 min (con un tubo de recolección nuevo, incluido).

Para finalizar, se transfirió la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga nuevo y etiquetado de 1.5 mL, y se pipeteó 50  $\mu\text{L}$  de tampón ATE directamente sobre la membrana. Se incubó durante 1 min a TA y luego, se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min para eluir el ADN. Se almacenó entre –30°C y –20°C.

### **2.3 Cuantificación del ADN**

La cuantificación de las muestras de ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Lite Plus (Thermo Scientific). De cada tubo con ADN previamente extraído, se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$ , de la cual se utilizó 1  $\mu\text{L}$  para medir la concentración y pureza del ADN. Para esta evaluación se consideró las relaciones

de absorción 260/280 y 260/230, indicadores comunes de contaminación con proteínas y compuestos orgánicos, respectivamente (García-Alegría et al., 2020). Los valores obtenidos se registraron y sirvieron para calcular el volumen de muestra necesario para las reacciones de PCR, utilizando como referencia una concentración de 50 ng de ADN por reacción.

## 2.4 Identificación molecular de *C. cayetanensis* en muestras de bivalvos

### 2.4.1 Primers

#### 2.4.1.1 Primers o cebadores para detectar el *Cyclospora* 18 rRNA gene

Primer o cebadores para la primera reacción de PCR: F1E *Cyclospora* sp. and *Eimeria* spp. (5'-TACCCAATGAAAACAGTTT-3') y R2B (5'-CAGGAGAAGCCAAGGTAGG-3'). PCR anidada segunda reacción CC719 *C. cayetanensis* (5'-GTAGCCTTCCGCGCTTCG-3') CRP999 (5'-CGTCTTCAAACCCCCTACTGTCTG-3').

**Tabla 1.** Información de los primers para la PCR- PCR anidada.

Organismo	Target	Secuencia	Gen	Tamaño del producto (pb)	No. Acceso GenBank
<i>C. cayetanensis</i>	18 rRNA Externo: CYCF1E	(5'TACCCAATGA AAACAGTTT3')	18 rRNA de <i>Cyclospora</i> sp.	630	EU861001.1
	18 rRNA Externo: CYCR2B	(5'CAGGAGAAG CCAAGGTAGG3' )			KY770759.1
	18 rRNA Interno: CC719	(5'GTAGCCTTCC GCGCTTCG3')		298	GU557063.1
	18 rRNA Interno: CRP999	(5'CGTCTTCAA ACCCCCTACTGT CG3')			

## 2.4.2 Control para diagnóstico

**Control positivo de *C. cayetanensis* código Genbank:** AF111183.1 gen 18s rARN *C. cayetanensis*.

Utilización de la secuencia con el código de GenBank y enviado a sintetizar con TWIST BIOSCIENCE (EEUU). Secuencia de 636 pb, tamaño suficiente para su amplificación y secuenciación.

## 2.4.3 Protocolo de nPCR

***Cyclospora* sp.:** la primera ronda consistió en la ampliación de un fragmento de 630 pb para *C. cayetanensis* empleando una concentración de 25 mM de los cebadores para la PCR, en una mezcla de 25  $\mu$ L que contenía cada cebador 0.5  $\mu$ L Forward y 0.5  $\mu$ L reverse (25 mM), 12.5  $\mu$ L de Go taq PCR Master Mix 2X y 50 ng de ADN extraído y 6.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O o suficiente H<sub>2</sub>O para aforar a 25  $\mu$ L. Seguido, se utilizó 2  $\mu$ L del producto de la primera PCR para realizar la segunda PCR. Los parámetros modificados de ciclado fueron 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 s, 57°C por 15 s, y 72°C por 1 min para la primera PCR; y 35 ciclos de 95°C por 15 s, 65°C por 15 s y 72°C por 1 min para el paso anidado o segunda PCR (Resendiz-Nava et al., 2020).

**Tabla 2.** Condiciones de PCR y nPCR en tiempo final para *C. cayetanensis* (Carrasco y Rojas 2024).

<i>C. cayetanensis</i>	Cyc externo Vol. 25 $\mu$ L	1. 95° C, 5:00	
		2. 95°C, 0:30	35 ciclos
		3. 56°C, 0:30	
		4. 72°C, 1:00	
		5. 72°C, 5:00	
		6. 4°C, $\infty$	
	Cyc interno Vol. 22.5 $\mu$ L	1. 95° C, 2:30	
		2. 95°C, 0:30	35 ciclos
		3. 66.5°C, 0:30	
		4. 72°C, 0:30	
		5. 72°C, 2:00	
		6. 4°C, $\infty$	

#### **2.4.4 Preparación y visualización del gel de agarosa para la Detección**

Para su preparación se empleó una concentración de agarosa (Agarosa Ultrapura de Invitrogen, EEUU) al 1.5% en buffer TBE 0.5X (TBE Buffer 10x RPI), seguido de su calentamiento y homogenización. Se le añadió bromuro de etidio a 0.5 µg/mL se dejó solidificar en la bandeja de electroforesis. Se mezcló 2 µL de Sample Loading Dye 6x BIO-RAD con 8 µL de muestra y se cargó en el gel, con su control positivo y negativo correspondiente. Como marcador de peso molecular se utilizó Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD (EEUU). El gel se visualizó bajo cámara de luz UV para la detección BioDoc-it™ Imaging System (EEUU).

#### **2.4.1 Trazabilidad molecular de *C. Cayetanensis***

El uso potencial de los fragmentos de ARNr 18S, obtenidos con PCR anidada, se evaluaron para estudios de trazabilidad molecular del origen de patógenos (Resendiz-Nava et al., 2020). Para lograr este objetivo, se realizaron estudios genómicos por Secuenciación de Sanger a través de la casa comercial Psomagen (EEUU). Si las muestras secuenciadas son positivas para *C. cayetanensis* se utilizará el software SeqMan disponible en el programa Lasergene 7.0 para el análisis de secuencias de ADN y crear el contig de las muestras, y que no presente ningún error en las secuencias. Además, se harán estudios en el GenBank utilizando la herramienta de búsqueda BLAST para la búsqueda de secuencias de genes de ARNr 18S de *C. cayetanensis* y poder comparar esas secuencias con las obtenidas en este proyecto. Las secuencias se alinearon, recortaron manualmente y editaron utilizando el software BioEdit. Las alineaciones de nucleótidos se sometieron a análisis filogenético siguiendo el método *Neighbor-Joining* Kimura 2-parametros para 1.000 réplicas, utilizando el software MEGA v. 6.0 (Resendiz-Nava et al., 2020).

#### **2.5 Análisis estadístico**

La significancia estadística de las diferencias de frecuencia fue establecida mediante la prueba de Chi-Cuadrado ( $\chi^2$ ), realizada en el software RStudio versión 4.5.1 (RStudio, PBC, Boston, MA, EEUU), siendo significativos los valores de  $P < 0,05$ . (R Core Team, 2024).

# **CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 Resultados

De las 90 muestras analizadas para la detección del parásito protozoo intracelular obligado *C. cayetanensis*, se detectaron 7(7/45; 15.6%) muestras positivas para la estación seca y 17 (17/45; 37.8%) muestras positivas para la estación lluviosa.

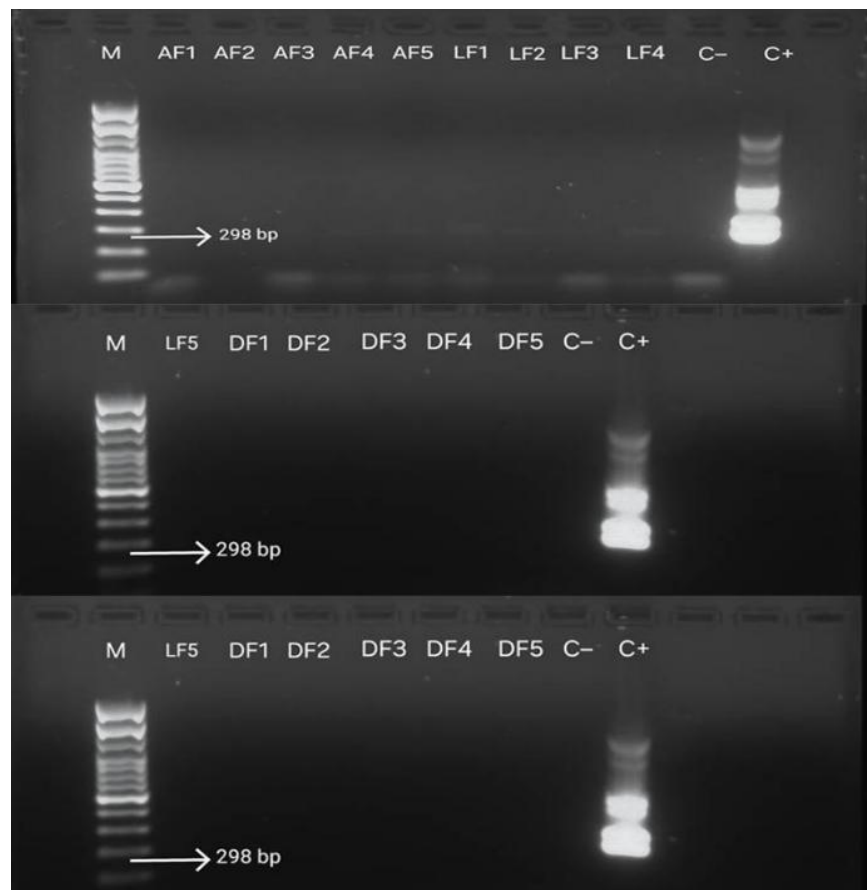
#### 3.1.1 Detección molecular

En total se detectaron 7 muestras positivas para *C. cayetanensis* en la estación seca: *Leukoma* sp. de marzo 2 y 4 (LM2 y LM4, Figura 6), y *A. tuberculosa* de abril 1 y 5, y *Leukoma* sp. de abril 4 (AA1, AA5 y LA4, Figura 7), *Donax* sp. de abril 3 y 4 (DA3 y DA4, Figura 7). Para la estación lluviosa las muestras reportadas como positivas fueron 17: *Leukoma* sp. de septiembre 1, y *Donax* sp. de septiembre 1 y 2 (LS1, DS1 y DS2, Figura 8), *A. tuberculosa* de octubre 1, 2, 3 y 4, y *Leukoma* sp. de octubre 1 (AO1, AO2, AO3, AO4 y LO1, Figura 8), *Leukoma* sp. de octubre 2, *Donax* sp. de octubre 2, 3 y 5, *A. tuberculosa* de noviembre 2 y 4, *Leukoma* sp. de noviembre 4 (LO2, DO2, DO3 y DO5, AN2, AN4, DN3, DN4 y LN4, Figura 9).

Los resultados obtenidos permiten comparar la detección de *C. cayetanensis* mediante técnicas convencionales, como las empleadas por Cuevas y Spalding (2021) y Frías (2022), con los hallazgos obtenidos a partir de métodos moleculares y análisis de secuencias a través de árboles filogenéticos. Las tablas muestran que abril (Tabla 5), septiembre (tabla 6) y octubre (Tabla 7) fueron los meses con más reportes positivos tanto con métodos convencionales como moleculares, siendo la muestra AO4 positiva para ambos métodos. Sin embargo, incluso en estos casos, la coincidencia no fue perfecta: algunas muestras solo fueron positivas en métodos convencionales, otras solo en PCR.

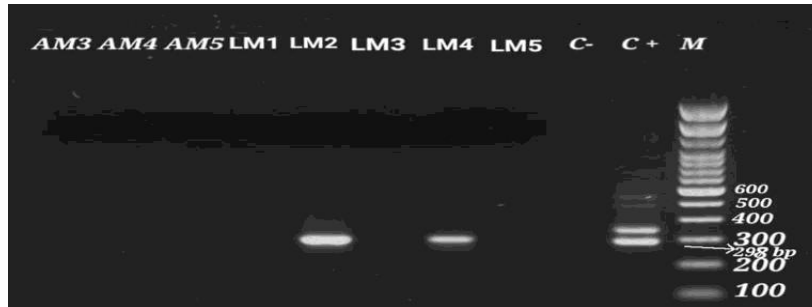
### Estación seca:

Resultados obtenidos en el mes de febrero (Figura 5), donde la letra M = marcador de peso molecular de 100 bp, AF = *A. tuberculosa* de febrero, LF = *Leukoma* sp. de febrero, DF = *Donax* sp. de febrero, C- = control negativo de *C. cayetanensis*, C+ = control positivo de *C. cayetanensis*. Se observa que las muestras AF1, AF2, AF3, AF4, AF5, LF1, LF2, LF3, LF4, LF5, DF1, DF2, DF3, DF4 y DF5 dieron resultados negativos para la presencia de *C. cayetanensis*.



**Figura 5.** Electroforesis de resultados de *C. cayetanensis*, estación seca, en el mes de febrero.

Resultados obtenidos en el mes de marzo (Figura 6), donde la letra M = marcador de peso molecular de 100 bp, AM = *A. tuberculosa* de marzo, LM = *Leukoma sp.* de marzo, C- = control negativo de *C. cayetanensis*, C+ = control positivo de *C. cayetanensis*. Se observa que las muestras AM3, AM4, AM5, LM1, LM3 y LM5 dieron negativos para la presencia de *C. cayetanensis*, en cambio LM2 y LM4 fueron los únicos resultados positivos para la presencia de *C. cayetanensis*.



**Figura 6.** Electroforesis de resultados de *C. cayetanensis*, estación seca, en el mes de marzo.

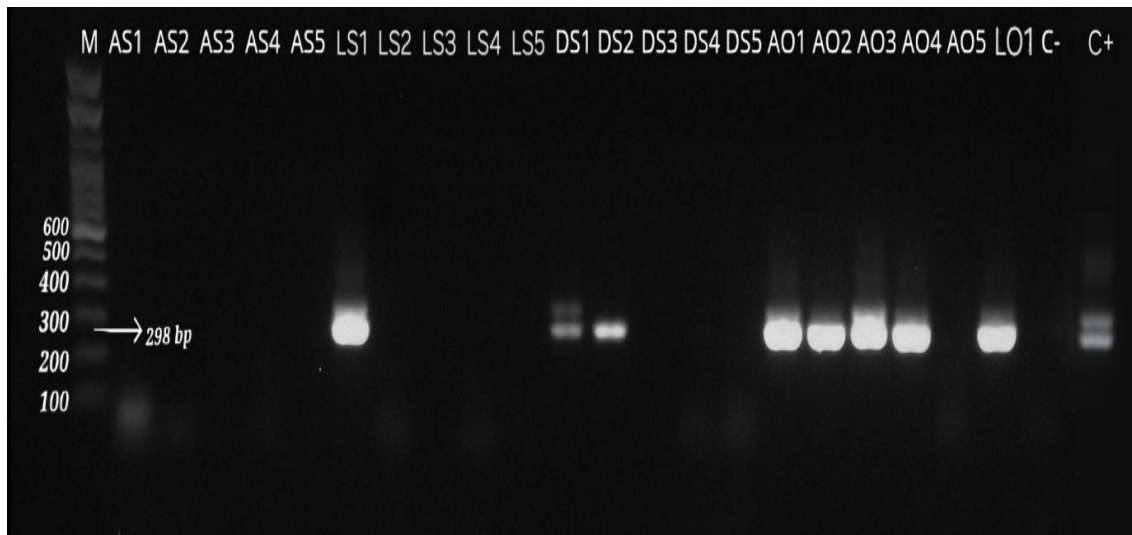
Resultados obtenidos en el mes de abril (Figura 7), donde la letra M = marcador de peso molecular de 100 bp, DM = *Donax sp.* de marzo, AA = *A. tuberculosa* de abril, LA = *Leukoma sp.* de abril, DA = *Donax sp.* de abril, C- = control negativo de *C. cayetanensis*, C+ = control positivo de *C. cayetanensis*. Se observa que las muestras DM1, AA2, AA3, AA4, LA1, LA2, DA1 y DA2 dieron negativos para la presencia de *C. cayetanensis*, en cambio AA1, AA5, LA4, DA3 y DA4 fueron los únicos resultados positivos para la presencia de *C. cayetanensis*.



**Figura 7.** Electroforesis para detección de *C. cayetanensis*, estación seca, en los meses de marzo y abril.

## Estación lluviosa

Resultados obtenidos en los meses de septiembre y octubre (Figura 8), en donde la letra M = marcador de peso molecular de 100 bp, AS = *A. tuberculosa* de septiembre, LS = *Leukoma* sp. de septiembre, DS = *Donax* sp. de septiembre, AO = *A. tuberculosa* de octubre, LO = *Leukoma* sp. de octubre, C- = control negativo de *C. cayetanensis*, C+ = control positivo de *C. cayetanensis*. Se observa que las muestras AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, LS2, LS3, LS4, LS5, DS3, DS4, DS5 y AO5 dieron negativos para la presencia de *C. cayetanensis*, en cambio LS1, DS1, DS2, AO1, AO2, AO3, AO4 y LO1 fueron los únicos resultados positivos para la presencia de *C. cayetanensis* durante el mes de septiembre y octubre.



**Figura 8.** Electroforesis de resultados de *C. cayetanensis*, estación lluviosa, en los meses de septiembre y octubre.

Resultados obtenidos en los meses de octubre y noviembre (Figura 9), donde la letra M = marcador de peso molecular de 100 bp, LO = *Leukoma* sp. de octubre, DO = *Donax* sp. de octubre, AN = *A. tuberculosa* de noviembre, LN = *Leukoma* sp. de noviembre, DN = *Donax* sp. de noviembre, C- = control negativo de *C. cayetanensis*, C+ = control positivo de *C. cayetanensis*. Se observa que las muestras LO2, DO2, DO3, DO5, AN2, AN4, DN3, DN4 y LN4 fueron los únicos resultados positivos para la presencia de *C. cayetanensis*, en cambio LO3, LO4, LO5, DO4, AN1, AN3, AN5, DN1, DN2, DN5, LN5 y LN3 dieron negativos para la presencia de *C. cayetanensis*.



**Figura 9.** Electroforesis de resultados de *C. cayetanensis*, estación lluviosa, en los meses de octubre y noviembre.

### 3.1.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado permitió determinar la distribución y frecuencia de *C. cayetanensis* en las muestras de moluscos bivalvos recolectados en el Golfo de Panamá.

Se puede observar que en el mes de febrero en su totalidad fueron muestras negativas (100%). En el mes de marzo se observa una distribución del 86.7% de muestras negativas y un 13.3% de muestras positivas. En el mes de abril hay una distribución del 66.7% de muestras negativas y un 33.3% de muestras positivas, se puede deducir entonces que durante la estación seca este sería el mes que presenta mayor número de muestras positivas. En el mes de septiembre se observa una distribución del 80.0% de muestras negativas y un 20.0 % para muestras positivas. En el mes de octubre hay una distribución del 40.0% para muestras negativas y un 60.0% de muestras positivas, siendo este mes el que abarca la mayor cantidad de muestras positivas. En el mes de noviembre hay una distribución del 66.7% de muestras negativas y un 33.3% de muestras positivas, en donde tienen resultados iguales al mes de abril (Figura 10).

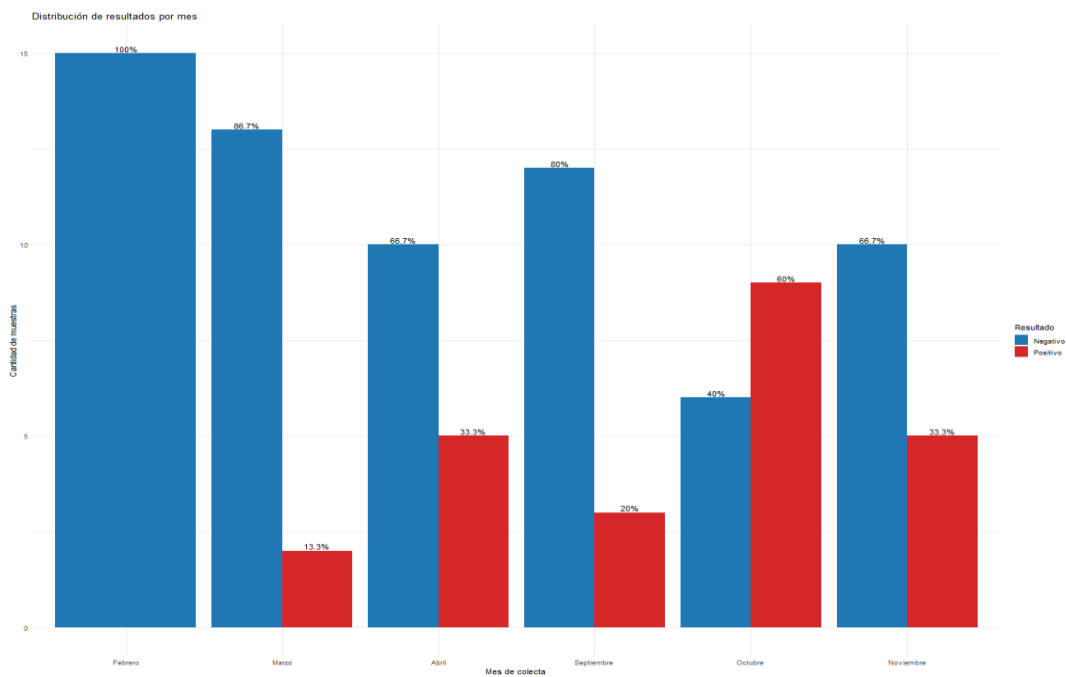
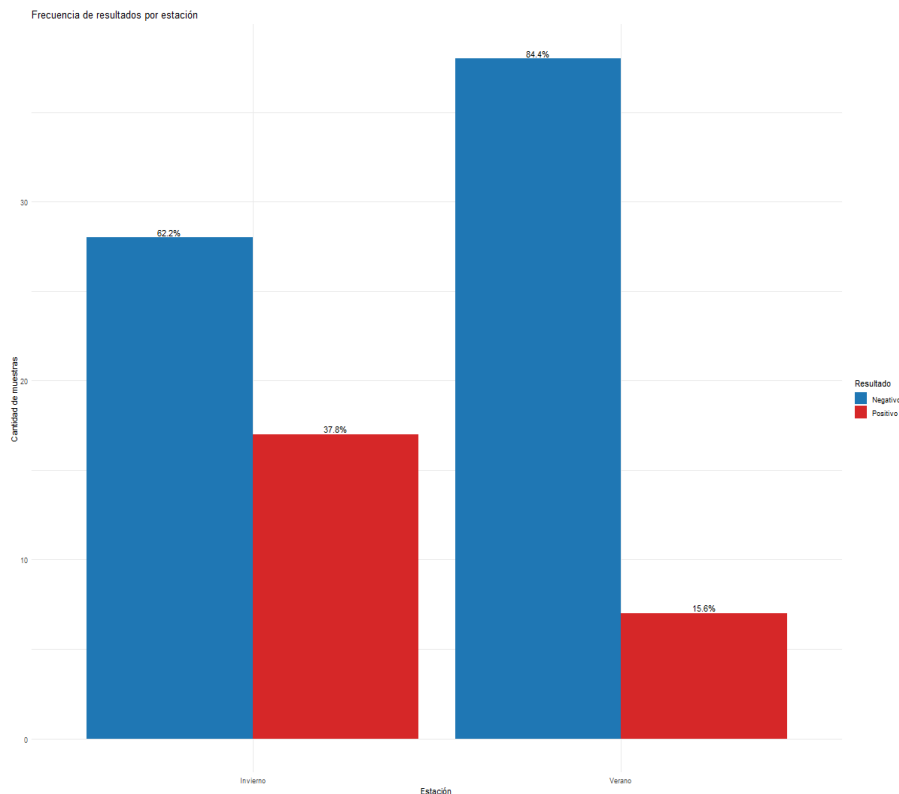


Figura 10. Distribución de los resultados de *C. cayetanensis* en cada mes.

Se puede observar que durante la estación lluviosa hay una frecuencia de 62.2% de resultados negativos y un 37.8% de resultados positivos, mientras que en la estación seca hay una frecuencia del 84.4% de resultados negativos y una frecuencia del 15.6% de resultados positivos. Se puede deducir entonces que durante la estación lluviosa se da una mayor frecuencia de resultados positivos con un 37.8%, mientras que la estación seca presenta un menor porcentaje de resultados positivos con un 15.6% (Figura 11).

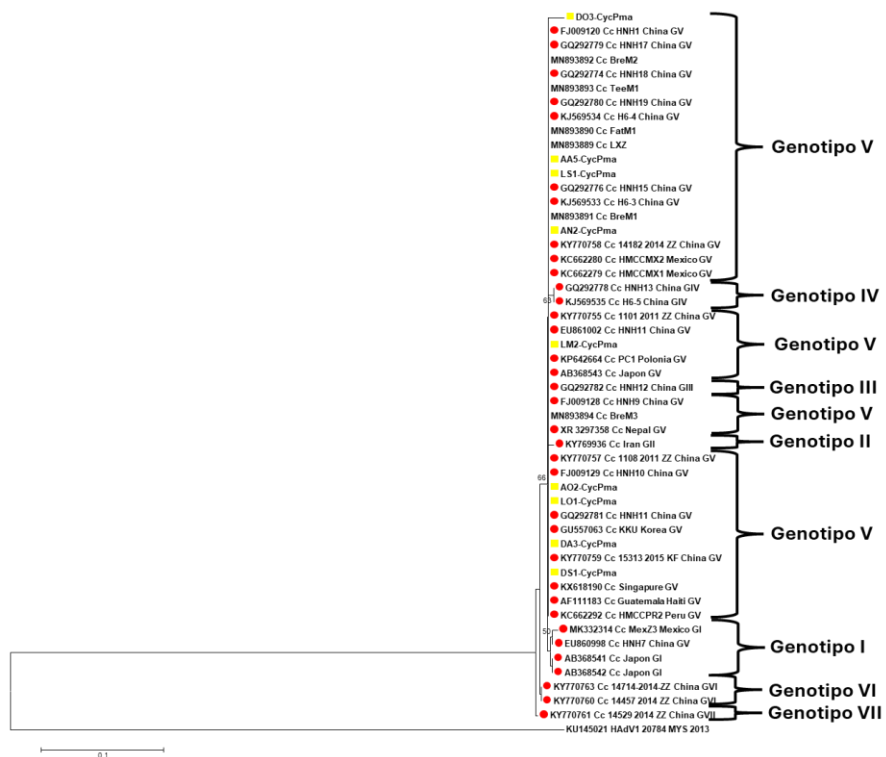


**Figura 11.** Frecuencia de los resultados de *C. cayetanensis* durante la estación seca y lluviosa.

### 3.1.3 Análisis de las secuencias de ácidos nucleicos

La secuenciación capilar tipo Sanger permitió identificar *C. cayetanensis* con seguridad en: marzo: LM2, abril: AA5, LA4, DA3, septiembre: LS1, DS1, octubre: AO2, LO1, DO3. La mayoría de estas muestras no habían resultado positivas por todos los métodos convencionales, evidenciando que la secuenciación fue clave para confirmar la especie.

Al realizar la comparación de las secuencias aisladas en este estudio con las secuencias de referencia disponibles en GenBank, se pudo construir un árbol filogenético. Este fue construido utilizando el método Neighbor-Joining con el modelo Kimura de 2 parámetros y 1000 réplicas de bootstrap. Se observa la agrupación de las secuencias en siete genotipos (I-VII), claramente diferenciados y su distribución geográfica. Las secuencias aisladas en este estudio se resaltan con un recuadro amarillo, y su análisis indica el genotipo V de *C. cayetanensis* es el que está circulando en Panamá (Figura12).



**Figura 12.** Análisis filogenético basado en 9 muestras positivas en este estudio para *C. cayetanensis* durante la estación seca y lluviosa.

### 3.2 Discusión

En los resultados obtenidos en este estudio, se pudo confirmar molecularmente la presencia de *C. cayetanensis* en tres géneros de moluscos bivalvos de importancia comercial en el Golfo de Panamá, siendo este el primer reporte de la especie de este protozoo intracelular y evidenciando su presencia en moluscos bivalvos de los géneros y especie *Anadara tuberculosa*, *Leukoma* sp., y *Donax* sp.).

Los patógenos protozoarios son parásitos microscópicos que pueden transportarse de la tierra al mar por la escorrentía que transporta contaminación fecal. Los bivalvos, incluidas las especies que se cosechan para la producción comercial de mariscos, son invertebrados que se alimentan por filtración y que filtran grandes volúmenes de agua, y posteriormente, pueden concentrar contaminantes, incluidos patógenos del agua circundante (Robertson, 2007). Estudios previos han reportado la presencia de patógenos protozoarios en bivalvos en todo el mundo, incluyendo mariscos comerciales como ostras, mejillones y almejas (Willis et al., 2013; Fung et al., 2021).

Además, en investigaciones previas en Panamá, se ha reportado que los moluscos bivalvos tienen la capacidad de albergar distintos protozoarios patógenos que pueden ser relevantes para la salud pública. Cabe destacar que en el estudio realizado por Cuevas y Spalding (2021), se reporta por primera vez la presencia del género *Cyclospora* sp. en moluscos bivalvos de interés comercial en el golfo de Panamá durante la estación seca, de igual manera el estudio de Frías (2022), se reportó el género *Cyclospora* sp. en moluscos bivalvos de importancia económica en el Golfo de Panamá durante la estación lluviosa, ambos estudios utilizaron los mismos métodos diagnósticos convencionales como: montaje directo, técnica de concentración por flotación, tinción de ácido-alcohol resistente modificada (Ziehl-Neelsen), tinción de Giemsa y Tinción de Koster. Los resultados obtenidos en ambos estudios fueron comparados en una tabla donde abarca los mismos meses, zonas de muestreo en el Golfo de Panamá, mismos géneros de moluscos bivalvos y códigos de muestras, con la diferencia de métodos diagnósticos en donde fueron comparados los métodos convencionales y moleculares, con el fin de encontrar una coincidencia con los géneros de moluscos bivalvos, zonas de producción y la

detección de *C. cayetanensis* durante la estación seca y lluviosa. En donde el estudio de Cuevas y Spalding (2021), obtuvieron resultados positivos para las pruebas de montaje directo siendo sus códigos de muestras: *A. tuberculosa* de febrero 2 (AF2) y *Leukoma* sp. de febrero 1 (LF1), para la prueba de flotación el código de muestra que resulto positivo fue: LF1, datos obtenidos durante el mes de febrero. Durante el mes de marzo los códigos de muestras que resultaron positivos para la prueba de montaje directo fueron los siguientes: *A. tuberculosa* de marzo 4 (AM4) y *Leukoma* sp. de marzo 5 (LM5), para la prueba de flotación los códigos de muestras positivos fueron: AM4 y *Leukoma* sp. de marzo 2 (LM2), y para la prueba de Ziehl-Neelsen fueron: AM4 y LM5. En el mes de abril los códigos de muestras que resultaron positivos para la prueba de montaje directo son: *A. tuberculosa* de abril 1 (AA1) y *Donax* sp. de abril 1 (DA1), y para la prueba de Ziehl-Neelsen fue: DA1.

En febrero, Cuevas y Spalding (2021) lograron reportar casos positivos, mientras que en nuestro estudio no se logró detectar resultados positivos en ninguno de los moluscos bivalvos (ver Tabla 2). Durante el mes de marzo se detectaron resultados similares en el mismo género de molusco bivalvo (*Leukoma* sp.) y a su vez coincide el código de muestra con nuestro resultado positivo, siendo el código de muestra LM2, y para Cuevas y Spalding el método diagnóstico fue con la prueba de flotación y en nuestro estudio fue mediante la PCR y secuenciación capilar tipo Sanger (Tabla 4), mientras que en el mes de abril en las tres zonas de muestreo se obtuvieron resultados similares en 2 de los géneros de moluscos bivalvos (*A. tuberculosa* y *Donax* sp.), con excepción de *Leukoma* sp. que solo en nuestro estudio se obtuvo resultados positivos (Tabla 5). Estos hallazgos son consistentes con nuestros resultados y sugieren que la presencia de *C. cayetanensis* en los moluscos bivalvos en este estudio actúan como vía de transmisión para este parásito, poniendo en peligro la salud pública de nuestra población.

El estudio de Frías (2022), las muestras que resultaron positivas para las pruebas de montaje directo fueron: *A. tuberculosa* de septiembre 4 (AS4), *Leukoma* sp. de septiembre 4 y 5 (LS4 y LS5) y *Donax* sp. de septiembre 1 (DS1), para flotación el código de muestra que resultó positivo fue: *A. tuberculosa* de septiembre 1 (AS1),

*Leukoma* sp. de septiembre 2 (LS2), DS1 y *Donax* sp. de septiembre 5 (DS5), y para la prueba de Ziehl-Neelsen fueron: AS1, *Leukoma* sp. de septiembre 1, 3 y 4 (LS1, LS3 Y LS4), datos obtenidos durante el mes de septiembre. Durante el mes de octubre los códigos de muestras que resultaron positivos para la prueba de montaje directo fueron los siguientes: *A. tuberculosa* de octubre 4 (AO4), *Leukoma* sp. de octubre 4 (LO4), *Donax* sp. de octubre 1 y 3 (DO1 y DO3), para la prueba de flotación los códigos de muestras positivos fueron: *Leukoma* sp. de octubre 1 (LO1) y DO3, y para la prueba de Ziehl-Neelsen fueron: AO4, *Leukoma* sp. de octubre 2 (LO2), LO4, DO1, DO3, *Donax* sp. de octubre 4 y 5 (DO4 y DO5). En el mes de noviembre los códigos de muestras que resultaron positivos para la prueba de montaje directo fueron: *A. tuberculosa* de noviembre 1, 2, 3, 4 y 5 (AN1, AN2, AN3, AN4 y AN5), *Leukoma* sp. de noviembre 3 (LN3), *Donax* sp. de noviembre 1 y 5 (DN1 y DN5), para la prueba de flotación los códigos de muestras positivas fueron: AN1, AN3, AN4, LN3, *Donax* sp. de noviembre 3 (DN3) y DN5, y para la prueba de Ziehl-Neelsen fue: AN2.

Los resultados obtenidos por Frías fueron similares a los nuestros en todos los meses que se realizó el muestreo (Tabla 7 y 8), con excepción de *Anadara tuberculosa* que solo se encontraron resultados positivos por métodos convencionales y no por métodos moleculares, en el mes de septiembre (Tabla 6). El análisis de estos resultados nos refuerza la idea que los moluscos bivalvos actúan como reservorios de este protozoo intracelular patógeno debido a que se contaminan en las zonas de producción.

Los resultados obtenidos mediante PCR mostraron una mayor sensibilidad de detección respecto a los métodos convencionales. Si bien algunas muestras, como AO4, resultaron positivas en ambas metodologías, varias otras fueron detectadas únicamente por PCR, lo que evidencia su superioridad diagnóstica, especialmente en muestras con baja carga parasitaria. Ortega y Sánchez (2010), ya habían señalado que la PCR ofrece una alta sensibilidad para detectar *C. cayetanensis*, hallazgo consistente con lo reportado por Aksoy et al. (2014), quienes identificaron el parásito en un 26,4% de las muestras agrupadas de *Mytilus galloprovincialis* mediante PCR en tiempo real/ análisis de fusión de alta resolución (HRM). Estos

resultados refuerzan la utilidad de los métodos moleculares como herramientas eficaces para la vigilancia y control de protozoos en mariscos, especialmente en zonas con variaciones ambientales estacionales marcadas.

Otros estudios realizados en el país indican que existe contaminación de las aguas costeras del golfo de Panamá, Stapf (2022), demostró la prevalencia de enteroparásitos dentro de los cuales se encontraba el género *Cyclospora* sp. durante un periodo comprendido entre octubre y diciembre del 2019 en la Bahía de Panamá. Las matrices evaluadas en este estudio fueron de agua y aire, siendo las muestras de aguas las que presentaron mayor contaminación por protozoos con un 87.7%. También, se observó que el río Matasnillo al desembocar sus aguas en la bahía de Panamá, es uno de los causantes de la contaminación y que está asociado a la estación lluviosa, ya que traen consigo toneladas de basura que dan a parar a la Bahía y están generando riesgos para varios sectores. El descubrimiento de *Cyclospora* sp. en los moluscos de Panamá, no solo demuestra que el parásito ya está presente en el país, sino que también corrobora la contaminación por material fecal en las costas y zonas de producción de estos bivalvos. La presencia de este patógeno en los moluscos bivalvos representa un riesgo para la salud humana, ya que estas pueden contaminarse al filtrar las aguas donde se desarrollan. Como lo indica el estudio de Ríos (2021), en donde se reportó por primera vez la presencia de *Toxoplasma gondii* en moluscos bivalvos en el golfo de Panamá, confirmando el papel de los moluscos bivalvos y sus zonas de producción como reservorios ambientales de protozoarios patógenos.

La detección de *C. cayetanensis* en bivalvos recolectados en tres zonas de producción del Golfo de Panamá, evidenció una clara variación estacional, con una mayor frecuencia de muestras positivas durante la estación lluviosa con 37,8% de muestras positivas, en comparación con la estación seca con 15,6% de muestras positivas. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 4,60$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,0319$ ), lo que sugiere una posible relación entre la presencia del parásito y la estacionalidad que incluye factores ambientales como la precipitación, humedad y escorrentía superficial, los cuales se han asociado previamente con un incremento

en la diseminación de ooquistes en ambientes acuáticos (Rodríguez y Abrahams-Sandí, 2007; Ortega y Sánchez, 2010).

Durante la estación lluviosa, el mes de octubre, que es el mes de mayor precipitación pluvial en el país (ETESA, 2010), fue bastante relevante con un 60% de muestras positivas con una diferencia significativa de acuerdo con la prueba exacta de Fisher ( $p = 0,0038$ ). Este pico coincide con el final de la temporada lluviosa, cuando las descargas fluviales y la carga de sedimentos en la columna de agua alcanzan sus niveles más altos, favoreciendo el arrastre de material fecal contaminado hacia cuerpos de agua y la dispersión de ooquistes. Este patrón coincide con lo reportado por Rodríguez y Abrahams-Sandí (2007), y ha sido documentado en otros contextos geográficos, como la costa occidental de Turquía, específicamente en las bahías de Izmir y Mersin, donde se observó una alta prevalencia de protozoos intestinales en bivalvos recolectados durante periodos de mayor humedad ambiental y carga orgánica (Aksoy et al., 2014).

En Panamá, ya existen estudios previos en los mismos géneros de bivalvos donde se reportó al género *Cyclospora* sp. y algunos de estos fueron los de Cuevas y Spalding (2021), durante la estación seca y el de Frías (2022), durante la estación lluviosa. Ambos estudios se realizaron en las mismas tres zonas de producción de los bivalvos analizados del Golfo de Panamá y se enfocaron en moluscos bivalvos a través de métodos diagnósticos convencionales. Además, el estudio de Stapf (2022), logró también detectar *Cyclospora* sp. a través de métodos convencionales, pero en diferentes matrices (agua y aire) de la Bahía de Panamá, durante la estación lluviosa en distintos puntos de muestreo. También en el estudio de García y Domínguez (2023), reportó el género *Cyclospora* sp. con una prevalencia del 27% en las muestras analizadas de agua de la Bahía de Panamá. Este género fue identificado a través de métodos diagnósticos convencionales durante la estación seca, específicamente en los meses de marzo, abril y mayo del 2021. El estudio indica que *Cyclospora* sp. es uno de los parásitos de mayor prevalencia en la Bahía, representando el 24% del total de géneros encontrados y siendo marzo el mes de mayor detección. Sin embargo, no existían estudios moleculares en la detección de este género hasta que Carrasco y Rojas (2024), lograron detectar por primera vez

al género *Cyclospora* sp. a través de métodos moleculares, durante la estación seca y lluviosa en los distintos puntos de muestreo de la Bahía de Panamá, y en las distintas matrices analizadas, agua y aire. Los resultados moleculares obtenidos en este estudio son los primeros datos reportados en Panamá de *C. cayetanensis* en moluscos bivalvos de importancia comercial durante la estación seca y lluviosa en el Golfo de Panamá.

En el estudio de Carrasco y Rojas (2024), durante la estación seca (marzo, abril y mayo), se obtuvieron para *Cyclospora* sp. un total de 94% (68/72) de muestras positivas mediante técnicas de PCR anidada y en la estación lluviosa, fue del 23.6% (17/72) de muestras positivas. Estos hallazgos no coinciden con los resultados de nuestro estudio, debido a que se obtuvo un 15.6% (7/45) de muestras positivas en la estación seca (febrero, marzo y abril), con un porcentaje menor de muestras positivas en la estación seca que la obtenida por Carrasco y Rojas. En cambio, para la estación lluviosa (septiembre, octubre y noviembre), se obtuvo un 37.8% (17/45) de muestras positivas, siendo este resultado mayor que el obtenido por Carrasco y Rojas en esta misma temporada. Esto se puede deber a que son diferentes matrices analizadas y a que los patógenos protozoarios pueden transportarse de la tierra al mar por la escorrentía, que transporta contaminación fecal y además, que los bivalvos se alimentan por filtración de grandes volúmenes de agua, concentrando estos contaminantes, incluyendo patógenos del agua donde se desarrollan (Robertson, 2007).

A nivel global, estudios han encontrado *C. cayetanensis* en diferentes especies de bivalvos. Por ejemplo, Ghazzi et al. (2017), detectó *C. cayetanensis* en *Ruditapes decussatus* a través de la técnica de qPCR (PCR en tiempo real) y este bivalvo provenía de la Bahía de Monastir, Túnez. Mientras que, en un estudio realizado en EEUU, por Kim et al. (2023), detectaron a *C. cayetanensis* mediante la técnica de PCR anidada multiplex, en muestras de ostras de las especies *Crassostrea gigas* y *Crassostrea virginica*.

El análisis filogenético del gen ARNr 18S permitió identificar siete genotipos distintos de *C. cayetanensis* (I–VII), reflejando una diversidad genética significativa a escala

global. En el árbol filogenético, las secuencias de este estudio (círculos amarillos) se agruparon principalmente dentro del genotipo V, el más ampliamente distribuido, que incluye variantes de China, Guatemala, Japón, Corea, México, Nepal, Perú, Polonia y Singapur. Este patrón sugiere que el genotipo V presenta una amplia dispersión geográfica y posiblemente, una alta plasticidad ecológica, que le permite colonizar diferentes entornos, incluyendo ecosistemas marino-costeros.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Resendiz-Nava et al. (2020), quienes al analizar secuencias del gen ARNr 18S de *C. cayetanensis* provenientes de diferentes regiones y matrices (incluyendo bayas frescas y suelos agrícolas), identificaron igualmente al genotipo V como el de distribución más amplia a nivel global, acompañado de otros genotipos con distribución más restringida (I, II, III, IV, VI y VII). De igual forma, coinciden con lo encontrado por Carrasco y Rojas (2024), donde el genotipo V fue el más predominante en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá, recolectadas durante la estación seca y lluviosa. En conjunto, estos hallazgos refuerzan que el genotipo V es el linaje más extendido geográficamente en Panamá y globalmente, mientras que otros genotipos muestran patrones de distribución más localizados.

Ninguna de las secuencias de este estudio se ubicó en otros genotipos con distribución más restringida (II, III, IV, VI y VII). La ausencia de estos genotipos podría deberse a limitaciones en el número de muestras o a diferencias en las fuentes de contaminación en la región de estudio, tal como han señalado otros autores al estudiar la variabilidad genética de *C. cayetanensis* y la influencia de factores geográficos y del tamaño de muestra sobre la detección de genotipos (Resendiz-Nava et al., 2020; Basirpour et al., 2025).

En conjunto, la ubicación de las secuencias panameñas dentro de un genotipo con amplia distribución internacional sugiere la posible existencia de rutas de introducción compartidas con otras regiones. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de integrar la vigilancia molecular y clásica, con el monitoreo ambiental y estacional para comprender mejor la dinámica de transmisión y el papel de los bivalvos en la diseminación del parásito (Aksoy et al., 2014; Almería et al., 2023).

# **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSIONES Y**

### **RECOMENDACIONES**

#### 4.1 Conclusiones

1. Se logró detectar molecularmente la presencia de *C. cayetanensis* en tres géneros de moluscos bivalvos de importancia comercial recolectados en sus sitios de producción del golfo de Panamá.
2. Se detectó molecularmente por primera vez para Panamá, la especie de *C. cayetanensis*.
3. Se identificó la presencia de *C. cayetanensis* en las muestras de moluscos bivalvos mediante la técnica de PCR anidada, con 7 resultados positivos en la estación seca (15,6%) y 17 en la estación lluviosa (37,8%), evidenciando una mayor frecuencia de detección durante la época lluviosa, tal vez influenciada debido a las lluvias y escorrentías.
4. A través de la secuenciación tipo Sanger y el análisis filogenético, se logró caracterizar el genotipo circulantes de *C. cayetanensis*, confirmándose que el genotipo V es el que predomina en las muestras recolectadas de los tres sitios de producción en el Golfo de Panamá.

## 4.2 Recomendaciones

1. Gestionar fondos y apoyo institucional para ampliar este tipo de investigaciones y orientarlas hacia áreas de salud pública y ambiental, dada la relevancia epidemiológica de *C. cayetanensis* como parásito de transmisión alimentaria.
2. Realizar un seguimiento anual al plan de saneamiento de la bahía y golfo de Panamá, y evaluar la eficiencia de este proyecto con investigaciones de detección de patógenos con técnicas de PCR en tiempo real.
3. Usar compuestos inhibidores de nucleasas, para evitar la degradación de los ácidos nucleicos extraídos.
4. Fortalecer las campañas de educación sanitaria a nivel comunitario, impulsadas por las autoridades de salud, para concienciar a pescadores, vendedores y consumidores sobre los riesgos asociados al consumo de moluscos bivalvos contaminados y la importancia de aplicar normas preventivas.
5. Evitar consumir los moluscos bivalvos crudos y con baja cocción, los cuales aún pueden albergar ooquistes infecciosos y otros patógenos, ya que para poder infectar al ser humano se necesitan solo 10 ooquistes esporulados.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aksoy, U., Marangi, M., Papini, R., Ozkoc, S., Delibas, S. B., y Giangaspero, A. (2014). Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiology*, 44, 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.012>
- Almería, S., Chacin-Bonilla, L., Maloney, J. G., y Santin, M. (2023). *Cyclospora cayetanensis*: A Perspective (2020-2023) with Emphasis on Epidemiology and Detection Methods. *Microorganisms*, 11(9), 2171. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092171>
- Almería Sonia, Hediye N. Cinar y Jitender P. Dubey. (2019). *Cyclospora cayetanensis* y Cyclosporiasis: An Update. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090317>
- Almería, S., y Shipley, A. (2021). Detection of *Cyclospora cayetanensis* on bagged pre-cut salad mixes within their shelf-life and after sell by date by the U.S. Food and Drug Administration validated method. *Food Microbiology*, 98, 103802. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103802>
- Bartosova, B., Koudela, B., y Slaná, I. (2021). Detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Echinococcus multilocularis*, *Toxocara* spp. and microsporidia in fresh produce using molecular methods: – A review. *Food And Waterborne Parasitology*, 23, e00124. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00124>
- Basirpour, B., Sadeghi, M., Ramezanzadeh, S., Daryaei, N., Gholami, S., Hosseini, SA, Ahmadpour, E., Daryani, A. y Aghayan, SA (2025). El primer estudio molecular de *Cystoisospora belli* y *Cyclospora cayetanensis* en pacientes con VIH/SIDA del norte de Irán. *Informes científicos*, 15 (1), 23304. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-06388-w>
- Cabrera, L., Díaz, S., Parra, K., y De Rodríguez Graciela, O. (2010). Detección de parásitos protozoarios y helmintos en el molusco bivalvo *Geukensia demissa* (Dillwyn, 1817) presente en el sector de Nararét del Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592010000100002](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000100002)

- Cáceres-Martínez, J., y Vásquez-Yeomans, R. (2008). La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. Estado Actual Del Cultivo y Manejo de Moluscos Bivalvos y Su Proyección Futura Factores Que Afectan Su Sustentabilidad En América Latina, 12, :329.
- Carrasco, J. y Rojas, N. (2024). Detección molecular de protozoos parásitos (*Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., *Giardia* sp.) en muestras de agua y aire, provenientes de la Bahía de Panamá durante la estación seca y lluviosa (Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá).
- Camacho, H. H., Damborenea, S., y Del Río, C. J. (2008). Bivalvia. Los invertebrados Fósiles: Vol. I (Issue January).
- Campos Machado, S. (2007). Determinación de bacterias coliformes fecales en ejemplares de *Protothaca asperima* en cuatro ecosistemas estuarinos de la zona oriental de El Salvador.
- CDC. (2016). Centers for Disease Control Prevention - US Department of Health & Human Services. <http://www.cdc.gov/parasites/about.html>.
- Connor, BA, Reidy, J. y Soave, R. (1999). Ciclosporiasis: correlatos clínicos e histopatológicos. Enfermedades infecciosas clínicas: publicación oficial de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas, 28 (6), 1216-1222. <https://doi.org/10.1086/514780>
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., y Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 11(4), 1150-1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Cuevas R., I. y Spalding B., M., (2021). Detección de *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. y *Cyclospora* sp., en tres géneros de bivalvos de interés comercial colectados en el Golfo de Panamá, durante la estación seca 2021. (Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá).
- David, B., y Marcos, R. (1998). Parasitosis Humanas. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 34(3):3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.648>

- Doller PC, Dietrich K, Filipp N, Brockmann S, Dreweck C, Vonthein R, et al. (2015). Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg Infect Dis.* 2015, 8:922-94.
- Etesa, (2010). Régimen pluviométrico de Panamá.
- Fayer, R., Dubey, J. P., y Lindsay, D. S. (2004). Zoonotic protozoa: From land to sea. *Trends in Parasitology*, 20(11), 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.008>
- Frías Moreno, YL. (2022). Detección de *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora* sp., *Giardia* sp., en tres géneros de bivalvos de importancia económica, recolectados durante la estación lluviosa en el golfo de Panamá. (Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá).
- Fung, R., Manore, A. J. W., Harper, S. L., Sargeant, J. M., Shirley, J., Caughey, A., y Shapiro, K. (2021). Clams and potential foodborne *Toxoplasma gondii* in Nunavut, Canada. *Zoonoses And Public Health*, 68(3), 277-283. <https://doi.org/10.1111/zph.12822>
- García, G. y Domínguez, B. (2023). Detección de protozoos y otros endoparásitos en muestras de agua y aire de la Bahía de Panamá durante la estación seca del 2021. (Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá).
- García-Meseguer, A. J., Esteve, M. A., Robledano, F., y Miñano, J. (2017). Atlas y Libro Rojo de los Moluscos Continentales de la Región de Murcia. noviembre, 338.
- García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L., y Astiazaran-García, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International journal of analytical chemistry*, 2020, 8896738. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>
- García D., P., y Rivera F., N. (2017). Coccidios intestinales y su aplicación clínica. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 60(6), 40–46. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2017/un176f.pdf>

- García, I., Benito, M., Araújo, M., Aguirre, A., Polo, I., Ana, R., Moreno, G., y Refoyo, P. (2008). Coccidios intestinales y tisulares. 1(1), 38–48.
- Gargala, G., Gérard, C., Villena, I., La Carbona, S., Favennec, L., Dumètre, A., Robertson, L. J. (2018). Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite*, 14. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018009>
- Getchell, R.G, Devel., Gosling, E., Grizel, H., Miahle, E., Chagot, D., y Jorgensen, C. B. (2016). Biología básica de los bivalvos: taxonomía, anatomía y ciclo vital. Cultivos de Bivalvos En Criadero. Manual Práctico., 3, 19–30.
- Ghozzi, K., Marangi, M., Papini, R., Lahmar, I., Challouf, R., Houas, N., Ben Dhiab, R., Normanno, G., Babba, H., y Giangaspero, A. (2017). First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Marine pollution bulletin*, 117(1-2), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.057>
- González, M. I., Rojas, T. T., y Chiroles Rubalcaba, S. (2003). Microbiological quality of coastal waters in tropical climates. Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista Electrónica de La Agencia de Medio Ambiente, 3(4).
- Guerra-Lima, Z., Vergara-López, P., y Manuel, M. S. J. (2012). Guía básica para el cultivo de moluscos bivalvos del Pacífico Panameño: conchuela, ostras y concha negra.
- Hamza-Chaffai, A. (2014). Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3(1), 19–26. <https://doi.org/10.6000/1927-3037.2014.03.01.4>
- Hassan, E. M., Örmeci, B., DeRosa, M. C., Dixon, B. R., Sattar, S. A., y Iqbal, A. (2020). A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. *Water Science & Technology*, 83(1), 1-25. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.515>
- Herwaldt, B. L., y Ackers, M. (1997). An Outbreak in 1996 of Cyclosporiasis Associated with Imported Raspberries. *New England Journal Of Medicine*, 336(22), 1548-1556. <https://doi.org/10.1056/nejm199705293362202>
- Jacomé, C. (2007). Capítulo 20 Moluscos (pp. 12–20).

- Kim, M., Rueda, L., Packham, A., Moore, J., Wuertz, S., y Shapiro, K. (2023). Molecular detection and viability discrimination of zoonotic protozoan pathogens in oysters and seawater. *International journal of food microbiology*, 407, 110391. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110391>
- Kozera, B. y Rapacz, M. (2013). Genes de referencia en PCR en tiempo real. *Journal of Applied Genetics*, 54, 391–406
- Kuhn, R., Rock, C. y Oshima, K. (2002). Presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en patos silvestres a lo largo del valle del Río Grande en el sur de Nuevo México. *Microbiología Aplicada y Ambiental*, 68(1), 161-165. <https://doi.org/10.1128/aem.68.1.161-165.2002>
- Lodeiros, C., Marín, B., y Prieto, A. (1999). Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela: Clase Bivalvia. Venezuela: Edición Apudons.
- Ma, D. W., Lee, M. R., Ku, B., Cho, S. H., y Lee, S. E. (2020). Outbreak of Cyclosporiasis in Korean Travelers Returning from Nepal. *The Korean journal of parasitology*, 58(5), 589–592. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.5.589>
- Mansfield, L. S., y Gajadhar, A. A. (2004). *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 73-90. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.011>
- Martínez, E. (2018). Relación del género *Cryptosporidium* con la subclase Gregarina del filo Apicomplexa.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. (2015). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 5:607-25.
- Monis, P. y Saint, C. (2001). Desarrollo de un ensayo de PCR anidado para la detección de *Cryptosporidium parvum* en agua tratada. *Water Res*. 35, 1641-1648. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(00\)00426-7](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(00)00426-7)
- Morton, V., Meghna, K., Gheorghe, M., Fitzgerald-Husek, A., Hobbs, J., Honish, L., y David, S. (2019). Use of a case-control study and control bank to investigate an outbreak of locally acquired cyclosporiasis in Canada, 2016. *Canada communicable disease report = Releve des maladies*

*transmissibles* au Canada, 45(9), 225–229.  
<https://doi.org/10.14745/ccdr.v45i09a01>

- Nimri, L. F. (2003). *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites associated with diarrhea in a rural area of Jordan. *International Microbiology*, 6(2):131-135. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0121-4>
- Ortega, Y. R., Gilman, R. H., y Sterling, C. R. (1994). A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *The Journal of parasitology*, 80(4), 625–629.
- Ortega, Y. R.; Nagle, R.; Gilman, R. H.; Watanabe, J.; Miyagui, J.; Quispe, H.; Kanagusuku, P.; Roxas, C.; Sterling, C. R. (1997). Hallazgos patológicos y clínicos en pacientes con ciclosporiasis y descripción de las etapas del ciclo vital intracelular del parásito. *J. Infect. Dis.* 176, 1584–1589.
- Ortega, Y. R., Sánchez, R. (2010). Actualización sobre *Cyclospora cayetanensis*, un parásito transmitido por los alimentos y el agua. *Clinical Microbiology Reviews* 23, (1), 218–234). <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-09>
- Posada, J. M., Piedra, A., Ross, E., Días, J. M., Melo, G., Sánchez, N., Guerra, Z., y De León, M. (2014). Guía de Identificación: Invertebrados marinos de importancia comercial en la costa Pacífica de Panamá. 120.
- R Core Team. (2024). R: A language and environment for statistical computing (Version 4.5.1) [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>
- Resendiz-Nava, Carolina N., Orozco-Mosqueda, Guadalupe E., Mercado-Silva, Edmundo M., Flores-Robles, Susana, Silva-Rojas, Hilda V. y Nava, Gerardo M. (2020). Una herramienta molecular para la detección y trazabilidad rápidas de *Cyclospora cayetanensis* en bayas frescas y suelos agrícolas de bayas. *Foods*, 9, 261.
- Robertson, L. J. (2007). The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 120(3), 201–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.058>

- Rodríguez Benavides, G., y Abrahams-Sandí, E. (2007). *Cyclospora cayetanensis*: revisión de cuatro casos clínicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 28(1-2), 49–56.
- Stapf Valdés, Alice Vanessa (2022). Detección de protozoos en el agua y aire provenientes de la Bahía de Panamá en época lluviosa de 2019. (Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá).
- Suarez, P. (Universidad de C., Yanez, M. J. (Universidad de C., Fernandez, I., y Veronica, M. (2020). Detección de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa Cryptosporidiidae) en ejemplares de cholga *Aulacomya ater* extraídas desde la costa de la Región del Bio Bio, Chile. *Rev chilena*.
- Sun, T.; Ilardi, CF; Asnis, D.; Bresciani, AR; Goldenberg, S.; Roberts, B.; Teichberg, S (1996). Identificación mediante microscopía óptica y electrónica de especies de *Cyclospora* en el intestino delgado. Evidencia de la presencia de un ciclo de vida asexual en el huésped humano. *Am. J. Clin. Pathol.* 105, 216–220.
- Totton, SC, O'Connor, AM, Naganathan, T., Martinez, BAF, Vriezen, ER, Torrence, ME y Sargeant, JM (2021). Revisión exploratoria de la detección, epidemiología y control de *Cyclospora cayetanensis* con énfasis en productos agrícolas, agua y suelo. *Epidemiology And Infection*, 149, e49. <https://doi.org/10.1017/s0950268821000200>
- Varma, M., Hester, J. D., Schaefer, F. W., Ware, M. W., y Lindquist, H. (2003). Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *Journal Of Microbiological Methods*, 53(1), 27-36. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00209-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00209-9)
- Walker, D. I., Younger, A., Stockley, L., & Baker-Austin, C. (2018). *Escherichia coli* testing and enumeration in live bivalve shellfish – Present methods and future directions. *Food Microbiology*, 73, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.006>
- Weitzel, T., Vollrath, V., y Porte, L. (2017). *Cyclospora cayetanensis*. *Revista Chilena de Infectología*, 34(1), 45-46. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000100006>

Willis, J. E., McClure, J., Davidson, J., McClure, C., y Greenwood, S. J. (2013).  
Global occurrence of Cryptosporidium and Giardia in shellfish: Should Canada  
take a closer look? Food Research International, 52(1), 119-135.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.020>

# **ANEXO**

**Tabla 3.** Resultados comparativos de la detección de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y moleculares obtenidos durante el mes de febrero en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (*Anadara* sp.), Bique, Arraiján, Panamá Oeste (*Leukoma* sp.), Playa Chinina, Chepo (*Donax* sp.).

MOLUSCO BIVALVO		MÉTODOS CONVENCIONALES					MÉTODOS MOLECULARES	
		MUESTRA	MONTAJE DIRECTO	FLOTACIÓN	TINCIÓN DE ZIELH NEELSEN	TINCIÓN DE KOSTER	TINCIÓN DE GIEMSA	ANÁLISIS MOLECULAR
		<i>Cyclospora</i> sp.					<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
<i>Anadara</i> sp.	AF1	-	-	-	-	-	-	-
	AF2	+	-	-	-	-	-	-
	AF3	-	-	-	-	-	-	-
	AF4	-	-	-	-	-	-	-
	AF5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leukoma</i> sp.	LF1	+	+	-	-	-	-	-
	LF2	-	-	-	-	-	-	-
	LF3	-	-	-	-	-	-	-
	LF4	-	-	-	-	-	-	-
	LF5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Donax</i> sp.	DF1	-	-	-	-	-	-	-
	DF2	-	-	-	-	-	-	-
	DF3	-	-	-	-	-	-	-
	DF4	-	-	-	-	-	-	-
	DF5	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 4.** Resultados comparativos de la detección de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y moleculares obtenidos durante el mes de marzo en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (*Anadara sp.*), Bique, Arraiján, Panamá Oeste (*Leukoma sp.*), Playa Chinina, Chepo (*Donax sp.*).

MOLUSCO BIVALVO		MÉTODOS CONVENCIONALES					MÉTODOS MOLECULARES	
		MUESTRA	MONTAJE DIRECTO	FLOTACIÓN	TINCIÓN DE ZIELH NEELSEN	TINCIÓN DE KOSTER	TINCIÓN DE GIEMSA	ANÁLISIS MOLECULAR
		<i>Cyclospora sp.</i>					<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
Anadara sp.	AM1	-	-	-	-	-	-	-
	AM2	-	-	-	-	-	-	-
	AM3	-	-	-	-	-	-	-
	AM4	+	+	+	-	-	-	-
	AM5	-	-	-	-	-	-	-
Leukoma sp.	LM1	-	-	-	-	-	-	-
	LM2	-	+	-	-	-	+	+
	LM3	-	-	-	-	-	-	-
	LM4	-	-	-	-	-	+	-
	LM5	+	-	+	-	-	-	-
Donax sp.	DM1	-	-	-	-	-	-	-
	DM2	-	-	-	-	-	-	-
	DM3	-	-	-	-	-	-	-
	DM4	-	-	-	-	-	-	-
	DM5	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 5.** Resultados comparativos de la detección de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y moleculares obtenidos durante el mes de abril en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (*Anadara* sp.), Bique, Arraiján, Panamá Oeste (*Leukoma* sp.), Playa Chinina, Chepo (*Donax* sp.).

MOLUSCO BIVALVO	MUESTRA	MÉTODOS CONVENCIONALES					MÉTODOS MOLECULARES	
		MONTAJE DIRECTO	FLOTACIÓN	TINCIÓN DE ZIELH NEELSEN	TINCIÓN DE KOSTER	TINCIÓN DE GIEMSA	ANÁLISIS MOLECULAR	SECUENCIACIÓN CAPILAR TIPO SANGER
		<i>Cyclospora</i> sp.					<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
<i>Anadara</i> sp.	AA1	+	-	-	-	-	+	-
	AA2	-	-	-	-	-	-	-
	AA3	-	-	-	-	-	-	-
	AA4	-	-	-	-	-	-	-
	AA5	-	-	-	-	-	+	+
<i>Leukoma</i> sp.	LA1	-	-	-	-	-	-	-
	LA2	-	-	-	-	-	-	-
	LA3	-	-	-	-	-	-	-
	LA4	-	-	-	-	-	+	+
	LA5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Donax</i> sp.	DA1	+	-	+	-	-	-	-
	DA2	-	-	-	-	-	-	-
	DA3	-	-	-	-	-	+	+
	DA4	-	-	-	-	-	+	-
	DA5	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 6.** Resultados comparativos de la detección de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y modernos obtenidos durante el mes de septiembre en las tres diferentes zonas de producciones pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (*Anadara* sp.), Bique, Arraiján, Panamá Oeste (*Leukoma* sp.), Playa Chinina, Chepo (*Donax* sp.).

		MÉTODOS CONVENCIONALES					MÉTODOS MOLECULARES	
MOLUSCO BIVALVO	MUESTRA	MONTAJE DIRECTO	FLOTACIÓN	TINCIÓN DE ZIELH NEELSEN	TINCIÓN DE KOSTER	TINCIÓN DE GIEMSA	ANÁLISIS MOLECULAR	SECUENCIACIÓN CAPILAR TIPO SANGER
		<i>Cyclospora</i> sp.					<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
<i>Anadara</i> sp.	AS1	-	+	+	-	-	-	-
	AS2	-	-	-	-	-	-	-
	AS3	-	-	-	-	-	-	-
	AS4	+	-	-	-	-	-	-
	AS5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leukoma</i> sp.	LS1	-	-	+	-	-	+	+
	LS2	-	+	-	-	-	-	-
	LS3	-	-	+	-	-	-	-
	LS4	+	-	+	-	-	-	-
	LS5	+	-	-	-	-	-	-
<i>Donax</i> sp.	DS1	+	+	-	-	-	+	+
	DS2	-	-	-	-	-	+	-
	DS3	-	-	-	-	-	-	-
	DS4	-	-	-	-	-	-	-
	DS5	-	+	-	-	-	-	-

**Tabla 7.** Resultados comparativos de la detección de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y modernos obtenidos durante el mes de octubre en las tres diferentes zonas de producción pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (*Anadara* sp.), Bique, Arraiján, Panamá Oeste (*Leukoma* sp.), Playa Chinina, Chepo (*Donax* sp.).

MOLUSCO BIVALVO		MÉTODOS CONVENCIONALES					MÉTODOS MOLECULARES	
		MUESTRA	MONTAJE DIRECTO	FLOTACIÓN	TINCIÓN DE ZIELH NEELSEN	TINCIÓN DE KOSTER	TINCIÓN DE GIEMSA	ANÁLISIS MOLECULAR
		<i>Cyclospora</i> sp.					<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
<i>Anadara</i> sp.	AO1	-	-	-	-	-	+	-
	AO2	-	-	-	-	-	+	+
	AO3	-	-	-	-	-	+	-
	AO4	+	-	+	-	-	+	-
	AO5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leukoma</i> sp.	LO1	-	+	-	-	-	+	+
	LO2	-	-	+	-	-	+	-
	LO3	-	-	-	-	-	-	-
	LO4	+	-	+	-	-	-	-
	LO5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Donax</i> sp.	DO1	+	-	+	-	-	-	-
	DO2	-	-	-	-	-	+	-
	DO3	+	+	+	-	-	+	+
	DO4	-	-	+	-	-	-	-
	DO5	-	-	+	-	-	+	-

**Tabla 8.** Resultados comparativos de la detección de *C. cayetanensis* en muestras de moluscos bivalvos mediante métodos convencionales y modernos obtenidos durante el mes de noviembre en las tres diferentes zonas de producción pertenecientes al Golfo de Panamá: Chame, Panamá Oeste (*Anadara* sp.), Bique, Arraiján, Panamá Oeste (*Leukoma* sp.), Playa Chinina, Chepo (*Donax* sp.).

		MÉTODOS CONVENCIONALES					MÉTODOS MOLECULARES	
MOLUSCO BIVALVO	MUESTRA	MONTAJE DIRECTO	FLOTACIÓN	TINCIÓN DE ZIELH NEELSEN	TINCIÓN DE KOSTER	TINCIÓN DE GIEMSA	ANÁLISIS MOLECULAR	SECUENCIACIÓN CAPILAR TIPO SANGER
		<i>Cyclospora</i> sp.					<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
<i>Anadara</i> sp.	AN1	+	+	-	-	-	-	-
	AN2	+	-	+	-	-	+	+
	AN3	+	+	-	-	-	-	-
	AN4	+	+	-	-	-	+	-
	AN5	+	-	-	-	-	-	-
<i>Leukoma</i> sp.	LN1	-	-	-	-	-	-	-
	LN2	-	-	-	-	-	-	-
	LN3	+	+	-	-	-	-	-
	LN4	-	-	-	-	-	+	-
	LN5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Donax</i> sp.	DN1	+	-	-	-	-	-	-
	DN2	-	-	-	-	-	-	-
	DN3	-	+	-	-	-	+	-
	DN4	-	-	-	-	-	+	-
	DN5	+	+	-	-	-	-	-



**Figura 13.** Crio cajas con las muestras de ADN total de moluscos bivalvos correspondientes a estación seca (caja verde) y lluviosa (caja morada).



**Figura 14.** Cuantificación de ADN total de las muestras de moluscos bivalvos en el Nanodrop, en lado izquierdo se cuantificó el ADN total de las muestras de moluscos bivalvos para la estación seca y al lado derecho se cuantificó el ADN total de las muestras de moluscos bivalvos para la estación lluviosa.



**Figura 15.** Se muestra el proceso en donde se prepararon los reactivos moleculares para la PCR y PCR anidada, para la detección de *C. cayetanensis*. En el lado izquierdo fue la preparación para la detección en la estación lluviosa y al lado derecho para la detección en la estación seca.



**Figura 16.** Se muestra el proceso del montaje de las muestras de ADN total de moluscos bivalvos en el termociclador para la detección de *Cyclospora cayetanensis*.



**Figura 17.** Se muestra el proceso de montaje de las muestras de ADN total de moluscos bivalvos en los pocillos del gel de agarosa, para la detección de *Cyclospora cayetanensis*. En el lado izquierdo para detección en la estación seca y el lado derecho para la detección en la estación lluviosa.



**Figura 18.** Team ultracongelados, proyecto de tesis caracterización molecular de *C. cayetanensis*.