

PÁGINA GUARDA

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *CRYPTOSPORIDIUM* spp OBTENIDO EN MUESTRAS
DE MATERIA FECAL DE UNA POBLACIÓN UNIVERSITARIA MATRICES ANIMALES
Y VEGETALES.

MARIA ALEJANDRA RAMOS SILVA

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CALI
2026

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *CRYPTOSPORIDIUM* spp OBTENIDO EN MUESTRAS
DE MATERIA FECAL DE UNA POBLACIÓN UNIVERSITARIA MATRICES ANIMALES
Y VEGETALES.

MARIA ALEJANDRA RAMOS SILVA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REALIZADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRIGIDO POR:

MARIA DEL PILAR CRESPO ORTIZ MSc PhD

COTUTOR: PEDRO MORENO TOVAR, PhD

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
CALI
2026

PÁGINA DE ACEPTACIÓN

DEDICATORIA

*A mis padres, por su apoyo constante y su confianza en mí.
A mi hermano, por su acompañamiento permanente y su apoyo incondicional.
A Ángela, por su valiosa amistad y su ánimo constante durante este proceso.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Pilar Crespo Ortiz, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por su orientación constante a lo largo de este proceso de aprendizaje, guiándome en cada etapa y frente a los desafíos presentados.

Al Dr. Pedro Moreno Tovar, por su acompañamiento y orientación en el análisis bioinformático, fundamentales para la interpretación y consolidación de los resultados moleculares.

A las bacteriólogas Meleny Ramírez y Claudia Auseche, por su disposición, enseñanza y apoyo técnico, fundamentales para el desarrollo y fortalecimiento de este trabajo.

A José y a Leonor, por su colaboración y actitudes de servicio que permitieron sacar adelante el proyecto.

A Katherine Quiñones, por su gran apoyo y por su excelente trabajo con las muestras vegetales, que constituyeron una parte esencial del estudio.

A Valentina Jurado, por su apoyo en los procesos de laboratorio que servirán como base para futuros trabajos.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	xiii
GLOSARIO.....	xv
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Epidemiología	4
2.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	7
2.4. Diagnóstico de la criptosporidiosis.....	13
2.5. Tipificación molecular	16
2.6. Una sola salud	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general.....	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. METODOLOGÍA.....	23
4.1. Tipo de estudio y recolección de muestras.....	23
4.2. Procedimientos	23
4.2.1. Preparación y selección de muestras.....	23
4.2.1.1. Humanos y mascotas	23
4.2.1.2. Vegetales.....	24
4.2.1.3. Bovinos.....	24
4.2.2. Cuantificación de ooquistes.....	25
4.3. Análisis molecular	25
4.3.1. Extracción de ADN.....	25
4.3.2. Control de ADN de <i>Cryptosporidium</i>	26

4.3.3. Amplificación por PCR convencional para <i>Cryptosporidium</i>	26
4.3.4. Amplificación por PCR del ADN de <i>Cryptosporidium</i> para identificación de especie	27
4.3.5. Amplificación por PCR del ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>	28
4.3.6. Purificación de ADN	30
4.3.7. Secuenciación	31
4.4. Análisis bioinformático	31
4.4.1. Análisis de especies y subtipos.....	32
4.4.2. Análisis de diversidad.....	33
4.4.3. Secuencias sometidas al Genbank	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Muestras humanas	35
5.2. Mascotas	39
5.3. Vegetales.....	41
5.4. Bovinos.....	44
5.5. Análisis de diversidad de especies	47
5.5.1. Análisis filogenético <i>18S rRNA</i>	47
5.5.2. Análisis de haplotipos y diversidad genética <i>18S rRNA</i>	49
5.6. Tipificación de <i>Cryptosporidium parvum</i>	53
5.6.1. Análisis filogenético <i>gp60</i>	55
5.6.2. Análisis de haplotipos y diversidad genética <i>gp60</i>	57
6. DISCUSIÓN	60
7. CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Cebadores para detección de <i>Cryptosporidium</i> spp	27
Tabla 2 Cebadores para la identificación de especies de <i>Cryptosporidium</i>	27
Tabla 3 Primera combinación de cebadores para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>	28
Tabla 4 Segunda combinación de cebadores para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>	28
Tabla 5 Tercera combinación de cebadores utilizados para la tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>	29
Tabla 6 Cuarta combinación de cebadores para la obtención del amplicón para la tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>	30
Tabla 7 Características demográficas de los participantes humanos (n = 23)	36
Tabla 8 Análisis de secuencias de los aislados humanos para la identificación de especies (18S rRNA)	38
Tabla 9 Análisis de secuencias para la identificación de especie en muestras de mascotas (18S rRNA).....	40
Tabla 10 Frecuencia de <i>Cryptosporidium</i> en vegetales.....	41
Tabla 11 Nivel de contaminación de los vegetales utilizados en el análisis (n = 13).	42
Tabla 12 Análisis de secuencias para la identificación de especie de <i>Cryptosporidium</i> en vegetales	44
Tabla 13 Origen y características de las muestras de bovinos.....	44
Tabla 14 Resultados de la identificación de especie con base al gen 18S rRNA para las muestras de bovinos.....	46
Tabla 15 Diversidad molecular por poblaciones para las secuencias del gen 18S rRNA	49
Tabla 16 Análisis de la diversidad molecular de varianza (AMOVA) entre las secuencias del 18S rRNA.....	50
Tabla 17 Resultados de las pruebas de neutralidad para las secuencias del 18S rRNA	50
Tabla 18 Diversidad haplotípica en las poblaciones de las muestras del 18S rRNA.....	51
Tabla 19 Análisis de subtipos basado en el gen <i>gp60</i> según CryptoGenotyper y CryptoDB.....	54
Tabla 20 Resultados de la identificación de subtipos con el BLAST del NCBI.	55
Tabla 21 Diversidad molecular por poblaciones <i>gp60</i>	57
Tabla 22 Resultados del AMOVA del gen <i>gp60</i>	57
Tabla 23 Pruebas de neutralidad en las muestras del <i>gp60</i>	58
Tabla 24 Frecuencia y distribución de las secuencias de las diferentes fuentes en el gen <i>gp60</i> en los haplotipos descritos.	58
Tabla 25 Estudios a nivel mundial sobre <i>Cryptosporidium</i> y sus diferentes fuentes de transmisión.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Prevalencia de IPI en escolares en Colombia.	6
Figura 2 Morfología del esporozoíto y el ooquiste del <i>Cryptosporidium</i>	8
Figura 3 Micrografía de trofozoíto encapsulado en las células intestinales.	9
Figura 4 Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i>	11
Figura 5 Nomenclatura <i>gp60</i>	18
Figura 6 Gráfica de calidad de cromatograma obtenida con Biopython.	32
Figura 7 Resumen del análisis bioinformático y programas utilizados.....	34
Figura 8 Distribución geográfica de aislados humanos.	35
Figura 9 Resultados de la PCR para la identificación de especie en muestras de humanos.	38
Figura 10 Identificación de especie en muestras de mascotas.	40
Figura 11 Ubicación geográfica del sitio de recolección de muestras de vegetales contaminados (azul) y de los barrios de residencia de los aislados humanos (rojo)	42
Figura 12 Resultados de la PCR para la identificación de especie en muestras de vegetales..	43
Figura 13 Resultados de PCR para la identificación de especie de <i>Cryptosporidium</i> en muestras de bovinos.....	46
Figura 14 Árbol filogenético de especies para el marcador <i>18S rRNA</i>	49
Figura 15 Red haplotípica TCS para secuencias del <i>18S rRNA</i>	53
Figura 16 Resultados PCR para identificación de subtipos con muestras de bovinos.	53
Figura 17 Árbol filogenético de subtipos para el marcador <i>gp60</i>	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo #1. Aval comité de ética 084 – 020.....	88
Anexo #2. Aval comité de ética 006 – 024.....	90
Anexo #3. Protocolo detección de parásitos en muestras de alimentos.....	91
Anexo #4. Protocolo de extracción de ADN con kit QIAamp PowerFecal Pro DNA de QIAgen	94
Anexo #5. Protocolo de extracción de ADN con kit IBI Bioscientific	96
Anexo #6. Protocolo para validación de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	101
Anexo #7. Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para identificación de especies.	106
Anexo #8. Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>	111
Anexo #9. Protocolo purificación de fragmentos de gel kit “Invisorb® Fragment CleanUp”	121
Anexo #10. Protocolo purificación de fragmentos de gel kit “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up”	123
Anexo #11. Tabla para la interpretación de las pruebas de neutralidad	125
Anexo #12. Gel para la concentración y purificación de ADN amplificado de vegetales	126

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

ADN. Ácido Desoxirribonucleico

spp. Especies

OMS. Organización Mundial de la Salud

μm. Micrómetro

μL. Microlitro

μg. Microgramo

mL. Mililitro

mg. Miligramo

μM. Micromolar

g. Gramo

nM. Nanomolar

min. Minutos

seg. Segundos

rpm. Revoluciones por minuto

CDC. Siglas en inglés para Centers for Disease Control and Prevention (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades)

ST. Subtipo

ELISA. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

°C. Grados centígrados

NaCl. Cloruro de Sodio

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

SDS. Dodecilsulfato sódico

18S rRNA. Gen codificante de ARN de la subunidad ribosomal pequeña

pb. Pares de bases

BSA. Albúmina de suero bovino

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool

NCBI. Siglas en inglés para National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

Ig. Intervalos de libertad

DALYs. Siglas en inglés para Disability-Adjusted Life-Years (Años de vida ajustados por discapacidad)

gp60. Gen de la Glicoproteína de 60 kilodalton

GLOSARIO

MORBILIDAD: estudio de una enfermedad en una población, en el sentido de la proporción de personas que se enferman en un sitio y tiempo determinado.

MORTALIDAD: tasa de muertes, tasa de mortalidad o el número de defunciones en cierto grupo de personas en determinado período.

PREVALENCIA: medida del número total de personas en un grupo específico que tienen (o tuvieron) cierta enfermedad, afección o factor de riesgo en un momento específico o durante un período determinado.

INCIDENCIA: Es la cantidad de casos nuevos de una enfermedad, un síntoma, muerte o lesión que se presenta durante un período de tiempo específico. La incidencia muestra la probabilidad de que una persona de una cierta población resulte afectada por dicha enfermedad.

ZOONOSIS: enfermedad infecciosa que ha pasado de un animal a humanos. Los patógenos zoonóticos pueden ser bacterias, virus, parásitos o agentes no convencionales y propagarse a los humanos por contacto directo o a través de los alimentos, el agua o el medio ambiente.

ANTROPONOSIS: enfermedad infecciosa que ha pasado exclusivamente de humanos a humanos, originándose en este como reservorio principal. *C. hominis*, representa un ejemplo clásico de antroponosis

HOSPEDERO: organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí, ya sea en una simbiosis de parasitismo, comensalismo o mutualismo.

RESUMEN

El *Cryptosporidium* es un protozoo intestinal que infecta a humanos y animales. En la última década, ha emergido como causa principal de enfermedad diarreica afectando en su mayoría infantes y pacientes inmunosuprimidos. A nivel mundial se reportaron en el 2019, 133.422 muertes y ~8,2 en DALYs. Es endémico de países de Latinoamérica y el Caribe, donde las condiciones socioeconómicas y ambientales favorecen su propagación. En Colombia, su frecuencia oscila entre el 0 y el 24,5 %, aunque con alta variabilidad, se ha reportado en diversas poblaciones vulnerables, incluyendo niños, gestantes, comunidades rurales y urbanas, así como en adultos jóvenes universitarios. Además, *C. parvum* y *C. hominis* se han reportado con frecuencia en brotes transmitidos por alimentos y agua en todo el mundo, afectando a la población general. La criptosporidiosis no se diagnostica comúnmente, no existe vacuna y su tratamiento es incierto, por lo que su control se basa en estrategias del tipo “Una sola salud”. En un estudio previo, se encontró una alta prevalencia de *Cryptosporidium* (24,5 %) entre portadores asintomáticos y sus mascotas. Para comprender el potencial de virulencia y los patrones de transmisión de la infección, el objetivo de este estudio fue identificar las especies y subtipos de *Cryptosporidium* en las muestras de materia fecal obtenidas de una población universitaria, sus mascotas, potenciales vegetales de consumo y bovinos de fincas aledañas a Cali. Para ello, se extrajo ADN de muestras positivas de las diversas fuentes. Los humanos y las mascotas dieron positivo solo por PCR, mientras que el ganado y los vegetales dieron positivo tanto por microscopía como por PCR. La identificación y genotipificación de las especies de *Cryptosporidium* se realizó mediante PCR anidada dirigida a los genes *18S rRNA* y *gp60*, respectivamente. Las secuencias obtenidas por el método de Sanger se analizaron con CryptoGenotyper 1.5. Se realizaron árboles filogenéticos (máxima verosimilitud), así como análisis de diversidad genética y haplotipos, incluyendo la construcción de una red TCS (parsimonia estadística). Se identificaron sesenta y un aislados (61/96): 60 de *C. parvum* y uno de *C. bovis*. Se logró la subtipificación de quince aislados (25%) de *C. parvum*, incluyendo 10 de terneros (IIaA17G2R1), 3 de humanos (2 IIaA17G2R1, 1 IIaA16G2R1) y 2 de vegetales crudos (1 IIaA17G2R1, 1 IIaA12R1). El análisis filogenético del gen *18S rRNA* evidenció una alta

conservación genética, sin una diferenciación clara según el origen del hospedero y la red de haplotipos basada en este marcador mostró un haplotipo central compartido por muestras de diferentes fuentes. Por su parte, el gen *gp60* mostró una alta homología entre las secuencias de este estudio que compartían un mismo subtipo, lo que sugiere la circulación de una misma cepa o de cepas estrechamente relacionadas y un potencial riesgo de transmisión. Esta es la primera detección del subtipo IIaA17G2R1 de *gp60* en Colombia y una nueva variante IIaA12, ampliando la diversidad conocida de *C. parvum*.

PALABRAS CLAVE: *Cryptosporidium parvum*; *gp60*; *18S rRNA*; subtipificación molecular; una sola salud; rutas de transmisión

SUMMARY

Cryptosporidium is an intestinal protozoan that infects humans and animals. Over the past decade, it has emerged as a leading cause of diarrhea, primarily affecting infants and immunocompromised patients. In 2019, it caused 133,422 deaths and approximately 8.2 million DALYs worldwide. It is endemic in Latin America and the Caribbean, where socioeconomic and environmental conditions favor its spread. In Colombia, its frequency ranges from 0% to 24.5% although with high variability. It has been reported across diverse vulnerable populations—including children, pregnant women, rural and urban communities, and even young university students. Globally, *C. parvum* and *C. hominis* have been frequently related to food- and waterborne outbreaks affecting the general population. Cryptosporidiosis diagnosis is not routine, there is no approved vaccine, and treatment remains uncertain; therefore, its control relies on "One Health" strategies. In a previous study, a high prevalence of *Cryptosporidium* (24.5%) was found among asymptomatic carriers and their pets. Thus, this study aimed to identify *Cryptosporidium* species and subtypes in fecal samples from university students, their pets, consumed vegetables, and cattle from farms near Cali, to understand virulent potential and transmission patterns of infection. To do this, DNA was extracted from positive samples from the sources. Humans and pets tested positive only by PCR, while cattle and crops tested positive by both microscopy and PCR. *Cryptosporidium* species identification and genotyping were performed using nested PCR targeting the *18S rRNA* and *gp60* genes, respectively. Sequences obtained by the Sanger method were analyzed using CryptoGenotyper 1.5. Phylogenetic trees (maximum likelihood) were constructed, along with genetic diversity and haplotype analyses, including a TCS (statistical parsimony) network. Sixty-one isolates (61/96) were successfully identified: 60 from *C. parvum* and one from *C. bovis*. Subtyping was achieved for fifteen isolates (25%) of *C. parvum*, including 10 from calves (IIaA17G2R1), 3 from humans (2 IIaA17G2R1, 1 IIaA16G2R1), and 2 from raw vegetables (1 IIaA17G2R1, 1 IIaA12R1). Phylogenetic analysis of the *18S rRNA* gene revealed high genetic conservation, with no clear differentiation by host. The haplotype network based on *18S rRNA* showed a central haplotype shared by samples from different sources. The *gp60* gene showed high homology among the sequences that shared the same subtype, suggesting the circulation of a single strain or closely related strains and a potential risk of transmission. This is the first detection of the *gp60* subtype IIaA17G2R1 in Colombia and a new variant, IIaA12, expanding the known diversity of *C. parvum*.

KEYWORDS: *Cryptosporidium parvum*; *gp60*; *18S rRNA*; molecular subtyping; One Health; transmission routes.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones intestinales son la causa más frecuente de diarrea a nivel mundial, las cuales pueden ocasionar complicaciones y hospitalizaciones. La etiología de la diarrea incluye un amplio rango de virus, bacterias, helmintos y protozoarios, los cuales se transmiten por contaminación fecal de agua y alimentos (1). Particularmente, los protozoos y geohelmintos son altamente prevalentes en países de bajo y mediano ingreso, se cree que estos microorganismos afectan a aproximadamente 3,5 billones de personas a nivel mundial y con mayor frecuencia en los países del sureste de Asia (2). La población más afectada por el parasitismo intestinal son los niños en edad preescolar, los escolares, adolescentes y las gestantes (2). Los pacientes con parasitismo crónico pueden desarrollar complicaciones a largo plazo, tales como desnutrición y retraso del desarrollo y del crecimiento en niños. En gestantes, las parasitosis pueden ocasionar retraso en el crecimiento intrauterino y neonatos de bajo peso al nacer. Debido a los efectos que puede tener en las poblaciones en riesgo, el parasitismo intestinal se considera un problema de salud pública.

Los países de Latinoamérica y la región Caribe presentan todos los factores de riesgo que contribuyen a la presencia y persistencia de las parasitosis intestinales. Gran parte de la población de estas regiones proviene de comunidades marginadas con un alto índice de pobreza, lo que afecta negativamente las condiciones de salud de las personas, las deja vulnerables a patógenos oportunistas y dificulta su tratamiento. Muchas poblaciones no cuentan con buenos sistemas de alcantarillado, servicios sanitarios, drenaje, manejo de desechos ni de agua potable, lo que aumenta los niveles de contaminación del agua, de la tierra y de los alimentos. Adicionalmente, los países con regiones tropicales y subtropicales cuentan con condiciones ambientales que favorecen la persistencia y reproducción de los parásitos (2,3). Colombia cuenta con las condiciones mencionadas previamente, y es considerado uno de los 17 países con mayor número de niños en riesgo de una infección por parásitos intestinales (4). Lo anterior contribuye con la desnutrición, anemia, deterioro del crecimiento y el desarrollo cognitivo, que afecta principalmente a los niños en edad escolar (66 %) y en edad preescolar (37 %) (5).

Los helmintos se asocian al contacto con el suelo, mientras que los protozoarios están asociados con brotes de gastroenteritis por contaminación hídrica o alimentaria. Los últimos son de particular interés, porque pueden afectar masivamente a la población. Los protozoos intestinales más comunes causantes de síndrome diarreico son *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* (1). El protozoo flagelado *Giardia intestinalis* infecta aproximadamente a 200 millones de individuos a nivel global, produciendo diarrea aguda, mientras que *Cryptosporidium* spp. es un apicomplejo que causa diarrea moderada y severa en niños menores a dos años (6) y es el segundo patógeno más común en niños de Asia y África (7). *Giardia* y *Cryptosporidium* destacan por su carácter zoonótico y causar brotes extensos por contaminación hídrica a nivel mundial incluso en países de alto ingreso (8). Por el contrario, *Entamoeba histolytica* se encuentra en entornos de mayor deterioro socioeconómico causando colitis y disentería e infectando aproximadamente 50 millones de personas con más de 100.000 muertes anuales a nivel mundial (9).

En la última década, el *Cryptosporidium* ha emergido como la causa principal de enfermedad diarreica, afectando principalmente a infantes y pacientes inmunosuprimidos en el mundo. Este protozoo es endémico en un gran número de países de bajo y mediano ingreso y se caracteriza por su alto potencial infeccioso, alta resistencia al ambiente (3), diagnóstico subóptimo y, tratamiento incierto (10). La criptosporidiosis afecta el peso y la talla de los niños infectados debido a la rápida pérdida de líquidos y a la incapacidad para absorber macronutrientes y micronutrientes durante un episodio de diarrea, lo que puede comprometer el crecimiento adecuado (11). No obstante, su prevalencia y consecuencias en otras poblaciones de riesgo permanecen aún desconocidas. (12). La prevalencia global de la criptosporidiosis es del 7,6 %, la cual puede variar entre el 0,1 % y el 14,1 % en países de alto ingreso y entre el 1,3 % y el 31,5 % en países de bajo y medio ingreso, con hasta un 10 % de portadores asintomáticos en estos últimos (13). La variabilidad en los datos depende de la técnica de detección, ya que la microscopía tiene una sensibilidad muy limitada y se requiere de una tinción específica (ácido-alcohol resistente) para detectar el parásito. En la práctica clínica la prescripción de esta tinción es poco común o solo se hace en grupos específicos de la población (10). Una revisión sistemática en las

Américas reportó una prevalencia de *Cryptosporidium* en Suramérica del 7 % frente al 10 % reportado con métodos diagnósticos (14).

En Colombia, la frecuencia del *Cryptosporidium* también varía dependiendo del grupo poblacional y la técnica de detección fluctuando entre 0 y 24,5 % (12,15,16). Un estudio previo realizado por nuestro grupo comparando la microscopía convencional y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) encontró una frecuencia de *Cryptosporidium* del 24,5 % (12) utilizando la PCR. Esta prevalencia ha sido una de las más altas reportadas en el país y a nivel de Latinoamérica, la mayoría de estos pacientes fueron asintomáticos y considerados portadores. Un 66 % de la población estudiada tenía al menos una mascota. En las mascotas el *Cryptosporidium* también fue el patógeno más frecuente (56,8 %) (12).

Las especies de *Cryptosporidium* más prevalentes son el *C. hominis* y *C. parvum*, consideradas de tipo antroponótico y zoonótico respectivamente (10). El más virulento y sintomático es el *C. hominis* particularmente el subtipo IbA10G2 (17). La infección por *Cryptosporidium* puede causar secuelas a largo plazo, incluso el parásito se ha asociado con cáncer de colon e infecciones extraintestinales (18). Las posibles fuentes de criptosporidiosis incluyen animales (domésticos y de ganado) y vegetales, así como el consumo de agua contaminada y el contacto con aguas recreativas. Debido a esto, su control debe realizarse mediante una estrategia basada en el enfoque de “una sola salud” (One Health), la cual consiste en la prevención de riesgos de enfermedades que se originan en la interfaz entre humanos, animales y sus diversos entornos, así como la información necesaria para identificar qué aspectos se deben priorizar para la disminución del contagio a nivel integral (19). Diferentes especies y subtipos del *Cryptosporidium* se pueden asociar con el tipo de hospedero, síntomas y virulencia, entre otras características (20).

En este estudio se tipificaron las muestras previamente obtenidas en una población universitaria con el fin de identificar el potencial de virulencia del parásito y analizar la distribución de especies y subtipos de *Cryptosporidium* spp. en diferentes fuentes de contagio, incluidos los humanos, animales y vegetales. Con este conocimiento se podrá generar evidencia molecular útil para orientar hipótesis epidemiológicas y futuras estrategias de vigilancia desde un enfoque de “una sola salud”.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Epidemiología

Las enfermedades gastrointestinales se consideran un importante problema de salud pública en los países de ingresos bajos y medianos en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Los protozoos y los helmintos son parásitos que causan, en gran medida, estas enfermedades en humanos. Las infecciones parasitarias intestinales (IPI) por helmintos pueden causar efectos adversos en la salud, como desnutrición, anemia y deterioro del crecimiento y del desarrollo cognitivo. Las infecciones por protozoos contribuyen mayormente a la desnutrición y pueden causar cambios en la composición de la microbiota y la activación de las respuestas inmunitarias (21,22). En particular, algunos protozoos se asocian con brotes alimentarios de gran escala. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente 3.500 millones de personas están infectadas por protozoos intestinales y helmintos de las cuales 450 millones presentan cuadros clínicos, la mayoría de los casos en niños en edad escolar (23).

En los países en desarrollo los protozoarios intestinales más comunes son: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis* y *Cryptosporidium* (24). Entre estos, *Giardia* y *Cryptosporidium* son responsables de la mayoría de los brotes por agua contaminada y conducen a tasas significativas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Estos protozoos causan aproximadamente 4 mil millones de casos de diarrea, lo que globalmente genera 62,5 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALY por sus siglas en inglés) y 1,6 millones de muertes anuales. Más de la mitad de estos brotes han sido causados por *Cryptosporidium* (25).

En la última década, el *Cryptosporidium* ha emergido como causa principal de enfermedad diarreica, afectando en su mayoría a niños menores de 5 años y a pacientes inmunosuprimidos. A nivel mundial, se reportaron en el 2019: 133.422 muertes y ~8,2 millones de DALYs (26). Este apicomplejo es endémico en muchos países de bajo y mediano ingreso, es altamente infeccioso, resistente al ambiente, y su prevalencia es subestimada por limitaciones diagnósticas (26).

El *Cryptosporidium* presenta un desafío significativo en la descontaminación del agua debido a que el ooquiste puede resistir tratamientos químicos y desinfectantes típicos. Gracias a su pared gruesa, este puede sobrevivir en el ambiente por largos periodos de tiempo, facilitando su transmisión (25). Durante la temporada de lluvias puede pasar de tierras agrícolas a aguas superficiales, permanecer inactivo en ambientes frescos y húmedos hasta 6 meses (temperaturas entre 0°C y 20°C) y depositarse en los sedimentos fluviales o permanecer suspendido en ecosistemas de agua dulce (27).

En Latinoamérica se estima que la prevalencia puede llegar hasta un 90 % dependiendo de la zona de estudio; entre el 20 % y el 30 % de los habitantes desarrollan parasitosis recurrente. Estas cifras se han relacionado con hábitos de higiene deficientes, la falta de educación y un bajo nivel socioeconómico. A pesar de su prevalencia, el parasitismo intestinal es un problema de salud ignorado que perpetúa el ciclo de pobreza, disminuyendo la capacidad de aprendizaje en la infancia y una menor productividad económica en la edad adulta (23,28).

Se ha observado una distribución heterogénea entre las diferentes especies de *Cryptosporidium*, con prevalencia similar en *C. parvum* y *C. hominis*. El subtipo IbA10G2 de *C. hominis* se identificó con alta frecuencia y se ha asociado a brotes hídricos y alimentarios a nivel internacional. En cuanto a *C. parvum* las familias de subtipos IIa y IIc han sido las más comunes en humanos. Sin embargo, el número de estudios que caracterizan especies y subtipos de *Cryptosporidium* spp. es limitado, lo que dificulta establecer patrones claros de prevalencia (14).

La diarrea es considerada una de las 10 mayores causas de muerte a nivel mundial por la OMS y la quinta mayor causa de muerte en países de bajo ingreso. Muchos pacientes no buscan atención médica hasta que la diarrea se asocia con síntomas como la presencia visible de sangre en las heces, dolor abdominal y pérdida de peso. Lo anterior dificulta el monitoreo de las parasitosis y la posibilidad de prevenir los brotes asociados (29). (Figura 1) (5).

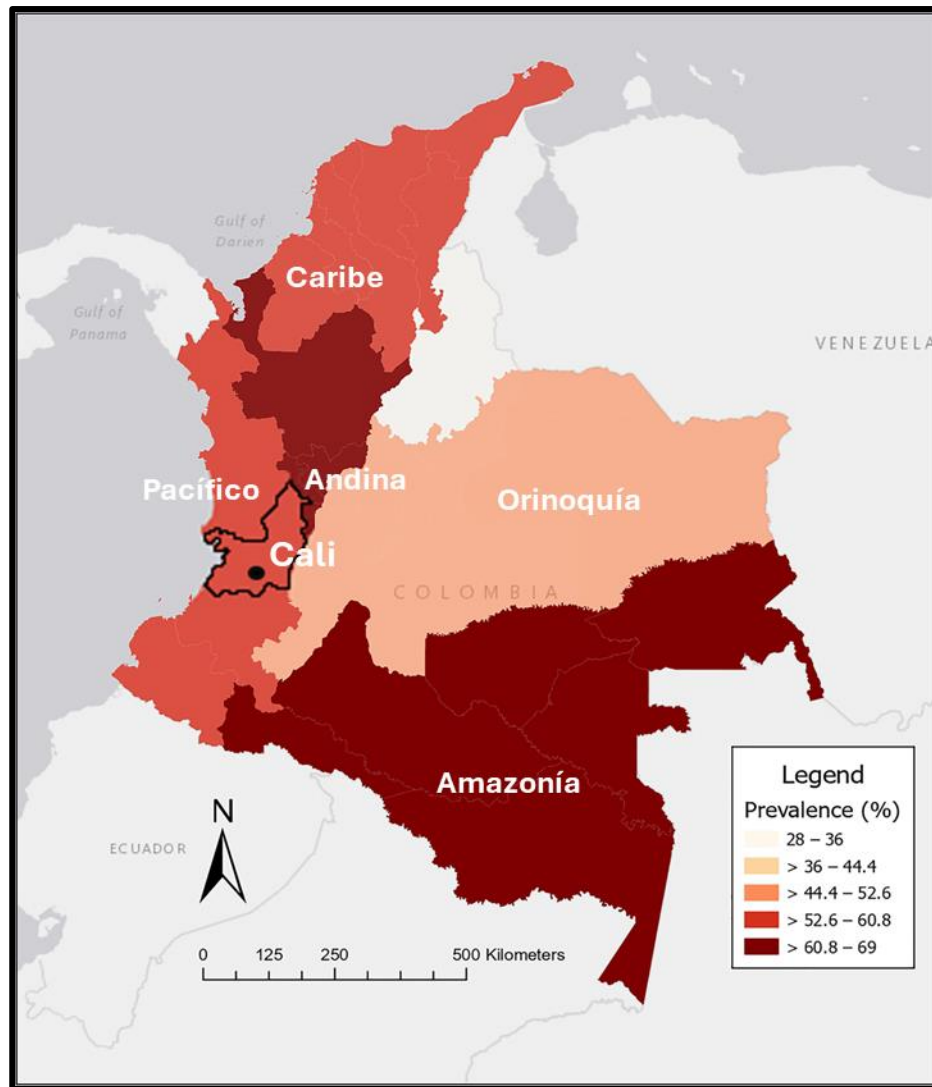


Figura 1 Prevalencia de IPI en escolares en Colombia. Modificado de Pazmiño et al (5)

En el caso de *Cryptosporidium* se ha visto una prevalencia cercana a 9,8 % (30) en niños de edad escolar, del 24,5 % en población universitaria y el 56,8 % en mascotas (12). En fauna silvestre la prevalencia reportada es del 43,5 % (31). En estudios de caracterización molecular se han descrito casos de *C. hominis* y *C. parvum*, en humanos, así como especies menos frecuentes como *C. felis*, *C. meleagridis* y *C. suis*. Igualmente, se han descrito subtipos de múltiples familias alélicas, por ejemplo, en *C. hominis* se encontraron las familias Ia, Ib, Id y Ie, siendo el subtipo IbA10G2 el más común. En el caso de *C. parvum* se detectaron miembros de las familias IIa y IIc, con subtipos como IIaA20G6R1, IIaA19G5R1, IIaA18G5R1, IIaA17G4R1 y IIcA5G3a, indicando una alta variabilidad en la diversidad genética de *Cryptosporidium* en Colombia (32).

2.2. *Cryptosporidium* spp.

Es un protozoo intracelular del filo Apicomplexa que invade el epitelio intestinal de humanos y animales. Se distinguen por su ubicación inusual dentro de la célula huésped, su capacidad para realizar autoinfección y su resistencia innata a los desinfectantes. El *Cryptosporidium* es un patógeno que puede infectar a un gran número de vertebrados, entre ellos los humanos, el ganado, los gatos y perros. El estadio de transmisión, el ooquiste puede presentar una pared gruesa que los hace resistentes al cloro y así mantener su viabilidad en fuentes de agua y vegetales (22,29).

Existen más de 44 especies, y más de 120 subtipos, de las cuales por lo menos 20 tienen la capacidad de infectar a los humanos. Las especies más prevalentes en humanos son *C. hominis* y *C. parvum* que representan el 95 % de los casos de criptosporidiosis (33,34). Otras especies que se han asociado con menos frecuencia a la enfermedad humana a nivel mundial incluyen *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis* y *C. canis*, los cuales también se encuentran infectando hospederos animales (35–37).

En la figura 2 se muestra la morfología de *Cryptosporidium*. Su forma infectiva, el ooquiste cuenta con una pared gruesa, lisa e incolora, por lo general su forma es esférica y mide aproximadamente 5 x 5 µm (38). En el interior se encuentran los esporozoítos que se activan al pasar del estómago al intestino delgado. Estos se liberan cuando la pared del ooquiste responde a la temperatura elevada y al choque químico. El esporozoíto tiene un tamaño de 5 x 1 µm y alberga el núcleo, los gránulos densos, los cuerpos cristaloides y el complejo apical compuesto por orgánulos denominados micronemas, y una sola roptria (39–41).

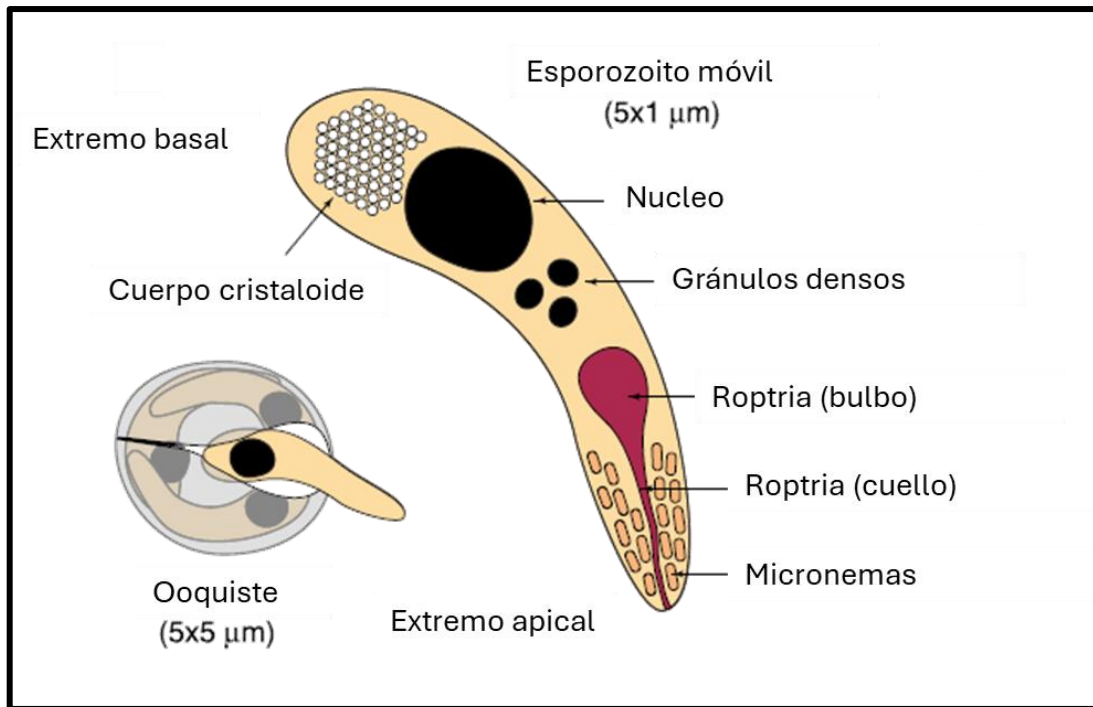


Figura 2 Morfología del esporozoito y el ooquiste del *Cryptosporidium*. Modificado de Guérin et al, (41)

Una vez que llegan al intestino, los esporozoitos se encapsulan en las células intestinales como se muestra en la figura 3, formando la vacuola parasitófora que separa el parásito tanto del citoplasma de la célula huésped como del entorno intestinal externo (42). También se forma una unión entre el parásito y la célula del hospedero conocida como orgánulo alimentador, por medio de esta unión el *Cryptosporidium* obtiene los nutrientes y energía necesarios del huésped (43).

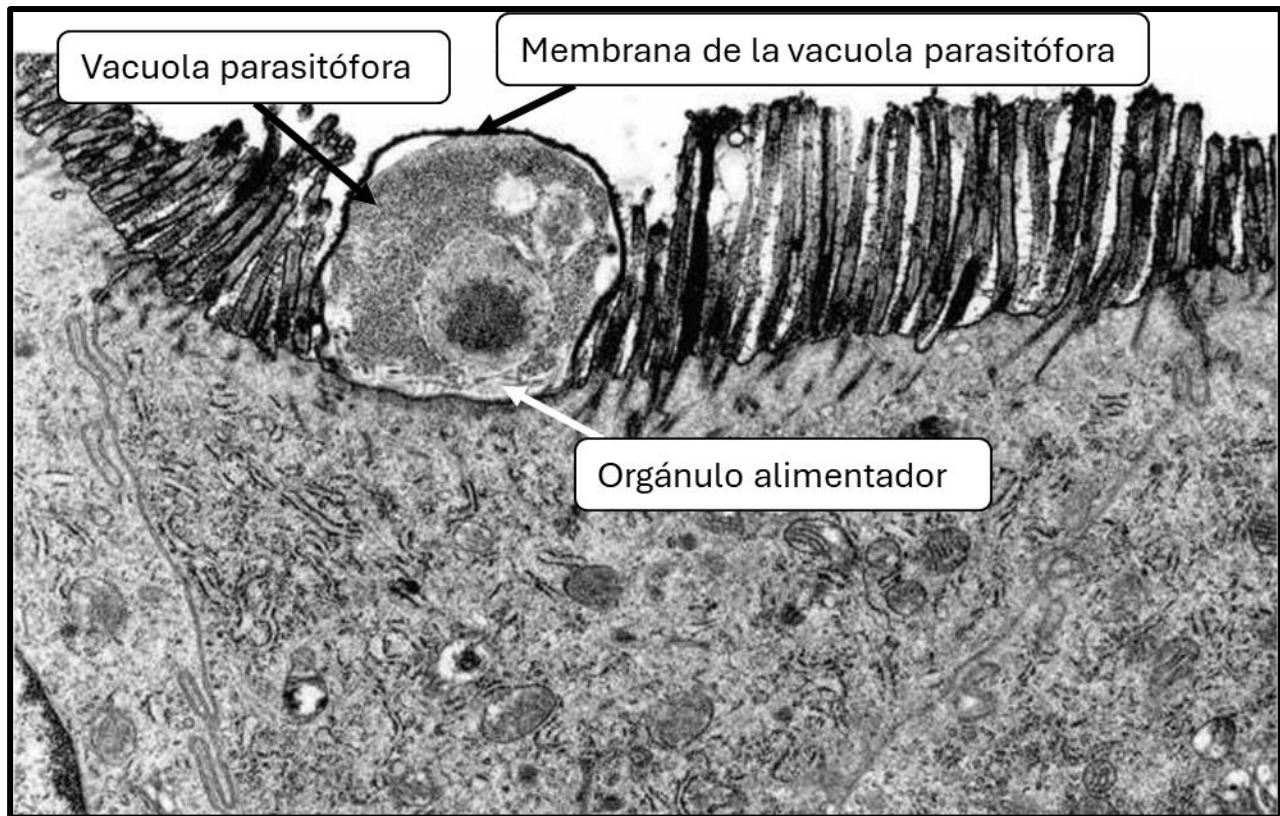


Figura 3 Micrografía de trofozoíto encapsulado en las células intestinales. Modificado de Pohlenz et al. (44).

El *Cryptosporidium* se transmite a través del contacto persona-persona (transmisión antropológica), contacto directo con animales (transmisión zoonótica), por la ingestión de agua o alimentos contaminados y por el contacto con aguas recreativas. Según la cantidad de casos y brotes, la transmisión zoonótica y la contaminación hídrica son los medios más comunes de propagación (10,45).

Su ciclo de vida, como se describe en la figura 4. **(1)** Empieza cuando 4 esporozoítos se liberan de un ooquiste ingerido. **(2)** Cuando llegan al tracto gastrointestinal se encapsulan en el borde en cepillo de las células intestinales, donde se desarrollan en trofozoítos y experimentan replicación asexual para formar merontes tipo I que contienen 8 merozoítos. Los merozoítos invaden otras células epiteliales cercanas y se desarrollan en merontes de tipo I adicionales, realizando aproximadamente 3 rondas de reinvasión. **(3)** A partir de esta, en las siguientes rondas de reinvasión, algunos merozoítos se desarrollan en merontes tipo II que contienen cuatro merozoítos (41). **(4)** Cuando estos salen de la célula, se inicia

un proceso de replicación sexual mediante el desarrollo de microgamontes y macrogamontes. Los microgamontes experimentan 4 rondas de división, produciendo 16 microgametos, y los macrogamontes se desarrollan en un macrogameto que permanece haploide mientras se expande en tamaño y almacena proteínas, lípidos y carbohidratos para el futuro ooquiste (46). Los microgametos salen de la célula y fecundan a los macrogametos intracelulares, generando un cigoto diploide (47). **(5)** Luego, el cigoto realiza meiosis y, en su interior, se forman los 4 esporozoitos haploides que conforman el ooquiste, que puede ser de pared gruesa o de pared delgada. **(6)** Los ooquistes de pared gruesa se liberan en las heces para ser ingeridos por otro hospedero; son resistentes al medio ambiente debido a su envoltura proteica gruesa y son inmediatamente infecciosos (46). Los ooquistes de pared delgada mantienen la infección en el mismo hospedero por autoinfección (48).

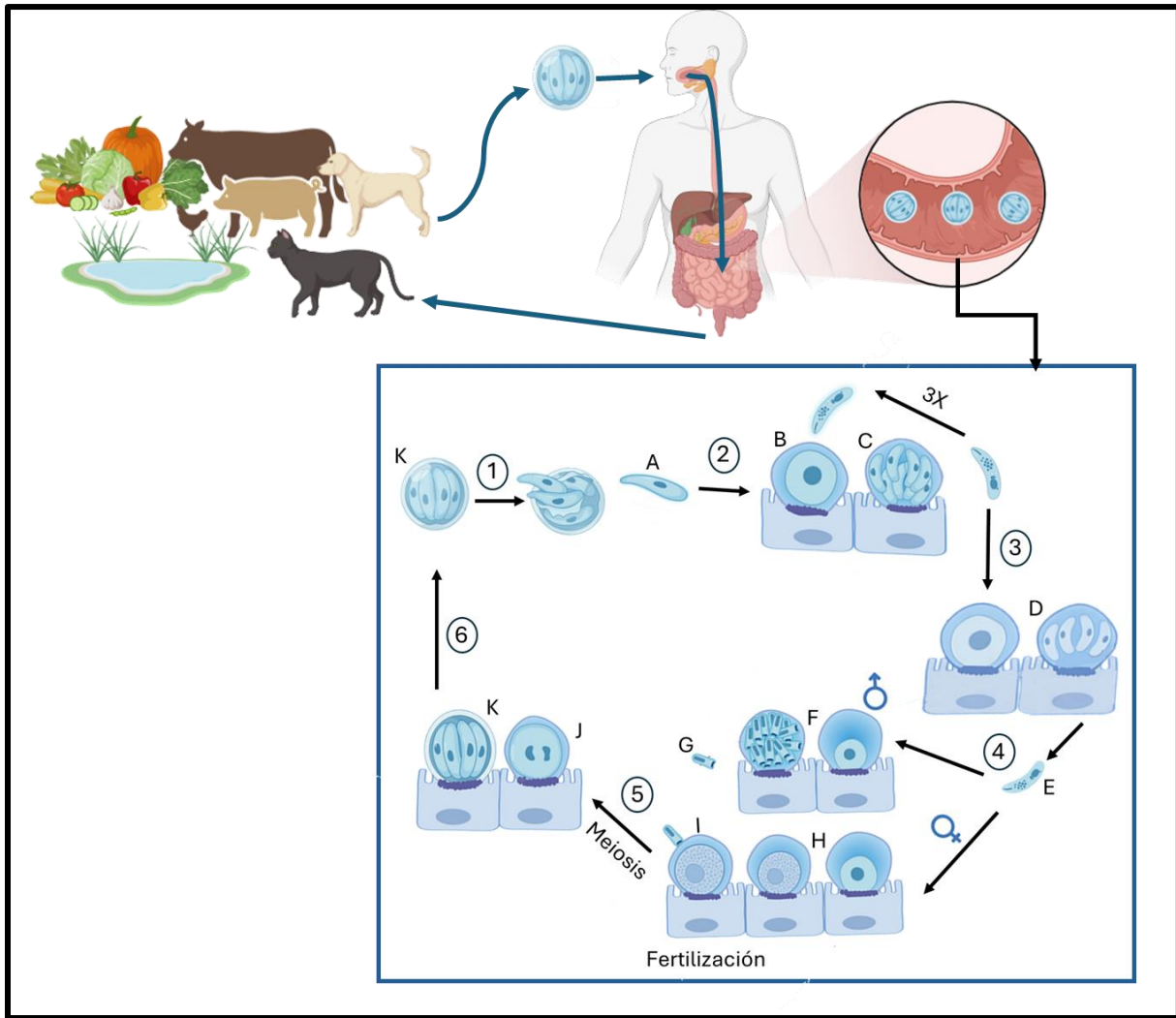


Figura 4 Ciclo de vida de *Cryptosporidium* modificado de Jex *et al.* (48) y Biorender. A. Esporozoito. B. Trofozoíto. C. Meronte tipo I. D. Meronte tipo II. E. Merozoíto. F. Microgamontes. G. Microgametos. H. Macrogamontes. I. Macrogametos. J. Cigoto. K. Ooquiste.

Una gran cantidad de avances en el estudio de *Cryptosporidium*, en particular en su biología y ciclo de vida, se atribuyen al desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro*. Se han desarrollado las líneas celulares HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal humano) y COLO-680N (carcinoma escamoso esofágico humano), que han permitido reproducir parcialmente el ciclo de vida; no obstante, solo se pueden mantener en cultivo por periodos cortos, son de bajo rendimiento y, al ser líneas tumorales, no representan las condiciones naturales. También se han realizado avances con modelos tridimensionales u organoides que se mantienen por más tiempo y recrean mejor el ambiente intestinal, aunque estos

son costosos y difíciles de escalar. Por lo anterior, no se ha logrado estandarizar un sistema de cultivo sostenible y reproducible, lo que limita los estudios sobre la biología del *Cryptosporidium* y el desarrollo de posibles tratamientos (38).

2.3. La criptosporidiosis

Después de 2 a 10 días de la ingestión de los ooquistes, comienzan los síntomas gastrointestinales con diarrea acuosa profusa, dolor abdominal y náuseas. Esto es consecuencia de la malabsorción e inflamación causadas por el parásito (49). La gravedad de la sintomatología se relaciona con la edad y el sistema inmune del individuo. La infección ha sido asociada con la pobreza y tiene un impacto desproporcionado en niños desnutridos, en los que causa alteraciones en el crecimiento y el desarrollo. En individuos inmunosuprimidos, induce enfermedad crónica con diarrea severa y prolongada, malabsorción y pérdida de peso significativa (18). En este grupo de riesgo, la infección puede complicarse, causando falla orgánica y muerte. Las secuelas a largo plazo incluyen dolor abdominal persistente, mialgias y artralgias, fatiga, síndrome de colon irritable y se ha asociado con cáncer de colon (18).

La criptosporidiosis también afecta a animales, como el ganado vacuno, ovino y porcino, las cabras, los conejos, los búfalos, los camellos y las aves. El *Cryptosporidium* zoonótico se ha reportado en animales silvestres, como venados y peces. *C. parvum* es la principal causa de diarrea en terneros de menos de 6 semanas, corderos y ovejas (49).

La transmisión de *Cryptosporidium* es variable y depende de diversos factores de riesgo, como el contacto con animales infectados, con mayores tasas de infección en animales jóvenes y niños. En cuanto al género, se ha identificado una mayor prevalencia en hombres. Otros factores de riesgo descritos son la pobreza asociada a condiciones sanitarias deficientes, la mala calidad del agua y la alta densidad poblacional, así como actividades ocupacionales como la veterinaria. También se ha observado un aumento de infecciones tras desastres naturales o inundaciones (50).

La variación de las estaciones también se ha relacionado con el aumento de los casos de *Cryptosporidium*. Por ejemplo, en primavera se atribuye la mayoría de los casos a *C. parvum* debido al aumento de las actividades ganaderas y a los periodos de pastoreo

posteriores a la descongelación de la nieve. En verano-otoño, los casos se asocian principalmente a *C. hominis* por contacto con aguas de piscina y viajes internacionales (49,50).

A pesar de la carga de la enfermedad causada por *Cryptosporidium*, las opciones para su tratamiento son limitadas y de eficacia reducida. La paromomicina es el principal fármaco utilizado en animales de campo, como terneros y ovejas, pero presenta una absorción intestinal deficiente y no proporciona una cura completa. En los casos humanos, la nitazoxanida es el único fármaco autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), que ha mostrado reducir la excreción de ooquistes, pero su eficacia es reducida en niños desnutridos y personas inmunocomprometidas, dos de los grupos más afectados por la criptosporidiosis (51)

Se han probado, además, diferentes fármacos como letrozuril, miltefosina y clofazimina, que no mostraron mejoras clínicas significativas, y albendazol, que, incluso en dosis altas, solo logra reducir la diarrea y la excreción de ooquistes, pero no eliminar la infección. Otros inhibidores del tipo benzoxaboroles y las pirazolopiridinas han mostrado resultados en animales, pero no se han validado en humanos. Alternativas como el uso de probióticos mejoran la función intestinal y la respuesta inmune, sin embargo, no eliminan directamente el *Cryptosporidium* (34).

La falta de un modelo *in vitro* eficiente para una mejor comprensión de su biología y modelos animales que permitan validar *in vivo* la eficacia de los fármacos, además de los altos costos de estos ensayos, han causado que el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos y vacunas sea lento (34,51).

2.4. Diagnóstico de la criptosporidiosis

En muchos países el diagnóstico de *Cryptosporidium* se limita a pacientes inmunocomprometidos. En adultos inmunocompetentes solo se realiza si la diarrea es acuosa y persistente, lo que subestima el número de casos. El diagnóstico de rutina se realiza por microscopía y se utilizan diferentes tinciones, entre ellas: el Ziehl-Neelsen modificado, la tinción tricrómica de Wheatley y la tinción de Kinyoun. No obstante, la sensibilidad de estas técnicas puede ser muy variable (37 – 91,6 %) (10) y se ha informado

que los límites de detección son tan bajos como 50.000 a 500.000 ooquistes por gramo de heces, lo que dificulta la identificación en muestras con bajos niveles de infección. Además, debido a la excreción esporádica, se deben examinar aproximadamente tres muestras de materia fecal en pacientes inmunocompetentes y dos en pacientes inmunocomprometidos (19).

Teniendo en cuenta la baja sensibilidad de la microscopía convencional, se han diseñado diversos métodos diagnósticos. La microscopía de fluorescencia utiliza anticuerpos monoclonales con marcadores fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la hidrazida de biotina que se adhieren a la pared de los ooquistes, esta técnica requiere de un microscopio de fluorescencia, pero aumenta la sensibilidad a un 92,1 – 100 % (10).

Las técnicas inmunológicas también han sido utilizadas para el diagnóstico. Se basan en una reacción antígeno-anticuerpo específica empleando antígenos o anticuerpos inmovilizados para la detección. Se utiliza principalmente el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), el cual presenta una sensibilidad y especificidad del 93–100 %. El resultado de esta prueba se evidencia mediante un cambio de color, producto de la reacción enzimática, que revela la interacción entre el antígeno y el anticuerpo. Aunque es una técnica muy sensible puede requerir más tiempo y depender de equipos de laboratorio especializados lo que impide que se pueda emplear para un diagnóstico rápido en campo (25).

Alternativamente, se pueden utilizar técnicas moleculares como la PCR, la cual tiene formatos variados y se considera más sensible que los métodos convencionales permitiendo analizar varias muestras simultáneamente e identificar especies y subtipos del parásito (52). En estudios previos, se observó que la PCR aumentó la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en 22 veces, en comparación con la microscopía convencional (53). También se ha evidenciado que la PCR múltiple es notablemente más sensible que la tinción Ziehl-Neelsen modificada de concentrados fecales (54). Otros estudios han reportado que la sensibilidad de la microscopía Ziehl-Neelsen modificada es del 75,4 % en comparación con el protocolo de Hadfield *et al.* para PCR en tiempo real (qPCR), con una sensibilidad del 100 % (55).

La PCR ha demostrado un gran rendimiento y utilidad práctica; logra disminuir el tiempo que toma realizar un diagnóstico. Esta prueba es altamente sensible y permite realizar la detección simultánea de los distintos patógenos que pueden causar enfermedades gastrointestinales. La PCR puede automatizarse y así optimizar el flujo de trabajo y diagnóstico permitiendo un manejo dirigido de la infección en el paciente (56).

La eficacia de la PCR radica en parte en los blancos de la amplificación. Un gen comúnmente usado en el diagnóstico de parásitos intestinales es el gen codificante de ARN de la subunidad ribosomal pequeña (*18S rRNA*), debido a que es un gen constitutivo, altamente conservado en varios parásitos y que confiere excelente sensibilidad (56). Se han publicado cebadores específicos de género y especie, lo que permite no solo una detección sensible, sino también la identificación en tiempo real de la especie. Un ejemplo de ello es una PCR que amplifica 125 pb del gen *18S rRNA* diseñado para amplificar solo muestras de *C. parvum* (57). La qPCR, es la técnica más utilizada en los países desarrollados hoy en día, debido a que tiene alta sensibilidad y rapidez, utiliza sondas fluorescentes que permite la detección del ADN en tiempo real, lo que disminuye la probabilidad de contaminación, además permite cuantificar la cantidad de ADN en la muestra por esto, está específicamente diseñada para fines diagnósticos y se utiliza cada vez más en laboratorios clínicos, sobre todo en su formato múltiple (10)

La qPCR múltiple se ha convertido en la técnica más utilizada para investigar la presencia de múltiples parásitos entéricos en una sola muestra en laboratorios clínicos. Existen más de 10 kits de qPCR múltiple comerciales actualmente disponibles, incluidos *Allplex*, *Amplidia*, *BD Max*, *Biofire FilmArray*, *FTD Stool Parasites*, *Gastro Panel Enteric*, *Bio Panel II*, *Gastroenteritis/Parasite Panel I*, *Luminex*, *NanoChip*, *PARAGenie*, *RIDAGENE* y *QIAstat*. Estos ensayos reducen significativamente los costos de reactivos y tiempo. No obstante, la PCR convencional y la qPCR aún no se han implementado en la detección de *Cryptosporidium* de rutina a nivel mundial (10).

Algunos de los kits comerciales de qPCR múltiple previamente mencionados, ya han recibido la aprobación de agencias de salud pública en varios países y se están incorporando progresivamente para el diagnóstico en muchos laboratorios clínicos,

particularmente en poblaciones pediátricas, pacientes inmunocomprometidos o inmigrantes y viajeros que provienen de áreas endémicas (58).

2.5. Tipificación molecular

La tipificación es el proceso de determinar la composición genética individual (genotipo) de un organismo lo cual permite distinguir los tipos o subtipos de las diferentes especies y así diferenciar los más virulentos o infecciosos y la posible ruta de transmisión (59). Para la tipificación se necesitan marcadores moleculares que muestren una variabilidad en su secuencia nucleotídica lo suficientemente amplia como para permitir la diferenciación entre distintos subtipos (10).

Para determinar el tipo o especie de *Cryptosporidium* comúnmente se utilizan cebadores para amplificar la región conservada del 18S rRNA, y con la secuenciación de los amplicones se pueden diferenciar las especies de *Cryptosporidium*. En la subtipificación de las especies *C. hominis* y *C. parvum* se utiliza como marcador la glucoproteína de 60 kDa (*gp60*), que ha permitido clasificar un gran número de familias o subtipos en *C. hominis* (Ia – Io) y en *C. parvum* (IIa – IIgamma) (60). El subtipo IbA10G2 de *C. hominis* es el dominante en muchas partes del mundo y se asocia con una mayor patogenicidad e infectividad; actualmente se plantea como una nueva subespecie. No obstante, se ha observado que otro subtipo el IaA12G1R5 parece estar reemplazando el subtipo virulento (17). La variabilidad de la proteína *gp60* ha permitido inferir rutas de transmisión, aunque recientemente su capacidad discriminatoria es materia de discusión (17).

El gen *gp60* se ha utilizado ampliamente para la diferenciación de subtipos de *Cryptosporidium* y se ha empleado a nivel global en estudios poblacionales e investigaciones sobre brotes. La nomenclatura inicial se estableció para *C. parvum* y *C. hominis*. Esta se puede interpretar de la siguiente forma:

- 1) Se identificaron agrupaciones alélicas distintas mediante polimorfismos de secuencia y se usaron para definir las “familias *gp60*”; se designaron con números romanos: I para *C. hominis* (Ia, Ib) y II para *C. parvum* (IIa, IIb). Lo anterior indica que cada subtipo comienza con el número del alelo correspondiente, por ejemplo: si tenemos *C. hominis* sería Ia o Ib según el polimorfismo.

- 2) Después de indicar el alelo, se introduce un segundo elemento a la nomenclatura que describe la composición de la repetición de serina. Este microsatélite se compone de codones TCA, TCG o TCT. Se cuenta el número de cada codón y se registra utilizando la última base del codón respectivo, seguida del número de repeticiones correspondiente. Por ejemplo, si tiene 10 codones TCA, entonces la anotación sería: A10; si tiene un codón TCG, entonces la anotación sería: G1; y si hay 3 codones tipo TCT, entonces: T3. La nomenclatura hasta ahí sería: IaA10G1T3.
- 3) Por último, se incorporaron minisatélites y microsatélites ocasionales que definen diferentes subtipos y que se definen como repeticiones R. Estas repeticiones pueden ser secuencias diferentes entre especies y subtipos y estar ubicadas en diferentes posiciones dentro del gen (60). Por ejemplo, se identifica una secuencia repetitiva; entonces, la anotación sería R1. Por ejemplo, sería: IaA10G1T3R1. Un esquema explicando esta nomenclatura se presenta en la figura 5

Otra técnica relevante en el análisis de protozoos es la secuenciación de nueva generación (NGS). Los análisis de muestras aisladas de *Cryptosporidium* con técnicas de NGS han revelado una diversidad genética mayor que la que se puede obtener con las metodologías actuales de subtipificación basadas en la PCR y la secuenciación de Sanger. Lo anterior se debe a la incapacidad de las pruebas mencionadas para resolver mezclas de ADN complejas y detectar variantes de baja abundancia. Los estudios basados en NGS ya han avanzado en el conocimiento actual sobre la distribución taxonómica y la dinámica de transmisión de *Cryptosporidium* spp., al permitir una caracterización genética de mayor resolución, la detección de infecciones mixtas y la identificación de subtipos nuevos, fortaleciendo así la investigación de brotes y la vigilancia molecular (63). De igual manera, cabe resaltar que existen problemas que dificultan el uso de las NGS en los laboratorios clínicos y agencias de salud pública como lo son las dificultades para extraer ADN puro de alta calidad de muestras clínicas y los problemas con la aparición de brechas en la secuencia del genoma ensamblado, todo esto afecta el costo e impide el uso generalizado de estas técnicas (10).

Alternativamente, la tipificación del *Cryptosporidium* puede realizarse mediante la tipificación de múltiples loci la cual ha sido útil para analizar la diversidad o variabilidad genética de un microorganismo incluyendo hongos, parásitos y bacterias. El estudio de los alelos de diferentes loci aumenta la resolución de la tipificación, lo que permite la detección de una mayor cantidad de linajes genéticamente distintos. La estrategia dirigida al análisis comparativo de secuencias de nucleótidos MLST (Tipificación de secuencias multilocus), que permite identificar tanto diferencias de longitud como variaciones de nucleótidos. El MLST cada día se considera más el estándar de oro, debido a que es capaz de caracterizar, con un bajo margen de error, las variaciones genómicas, como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones, deleciones, inversiones, duplicaciones, translocaciones, y deleciones. La tipificación multilocus ha sido una herramienta valiosa en el estudio de la estructura genética de poblaciones y las rutas de transmisión de *Cryptosporidium*, principalmente para la investigación en *C. parvum* y *C. hominis*. Se han informado alrededor de 50 marcadores micro y minisatélites para este propósito, siendo los loci *CP47*, *gp60*, *MS5*, *MS9*, *MSC6–7*, *TP14*, *ML2*, *ML1*, *MSB* y *5B12* los más utilizados (32).

2.6. Una sola salud

Es una estrategia para la lucha contra diferentes enfermedades principalmente zoonóticas, que reconoce que la salud de las personas está estrechamente relacionada con la salud de los animales y nuestro entorno compartido. Este enfoque surge debido a que las poblaciones humanas están creciendo y expandiéndose a nuevas zonas geográficas, causando que más personas vivan en estrecho contacto con animales salvajes, de ganado o domésticos. Por otro lado, los animales juegan un papel importante en la vida humana, ya sea como alimento, fibra, medios de subsistencia, viajes, deporte, educación o compañía. Este contacto cercano aumenta las probabilidades de contagio de enfermedades zoonóticas. Por último, el cambio climático, la deforestación y las prácticas agrícolas. Las alteraciones en las condiciones ambientales y los hábitats pueden brindar nuevas oportunidades para que las enfermedades se transmitan a los animales (64).

En Colombia se han realizado estudios que aplican un enfoque de “una sola salud” para detectar la presencia y posibles rutas de transmisión de parásitos intestinales analizando diferentes fuentes humanas, animales y ambientales. En el estudio realizado por Castañeda *et al.* (65), en la comunidad rural de Las Guacas, en el departamento del Cauca, se encontró una alta prevalencia de infecciones parasitarias mediante técnicas moleculares. Los parásitos más frecuentes fueron: *Blastocystis*, *Ancylostoma duodenale*, *Giardia* y *Cryptosporidium* spp (65).

El *Cryptosporidium*, se identificó tanto en el agua como en muestras de humanos y perros (4 % (4), 25 % (6) y 100 % (2) respectivamente) resaltando la importancia ambiental y zoonótica del parásito en esta región. Debido a su presencia en la fuente hídrica de consumo, se indica la necesidad de implementar medidas integradas de saneamiento y control que consideren la interacción entre los diferentes reservorios para prevenir infecciones y avanzar hacia estrategias efectivas de salud pública. El estudio aporta evidencia para el manejo epidemiológico en Colombia, y el papel de las comunidades rurales en la transmisión de parásitos y la necesidad de intervenciones interdisciplinarias (65). En este contexto, resulta importante considerar las características biológicas y ecológicas de *Cryptosporidium*, las cuales favorecen su circulación entre humanos, animales y el ambiente.

La estrategia de “una sola salud” para *Cryptosporidium* debería consistir primero en sensibilizar a la población sobre la enfermedad y sus formas de propagación, seguida de dismantelar las vías de transmisión. Se deben realizar estudios epidemiológicos para identificar los factores de riesgo, realizar un seguimiento constante y tratar a los animales infectados para reducir la incidencia en humanos. Igualmente, es importante que los profesionales sanitarios y los veterinarios estén entrenados en el manejo y diagnóstico de esta infección (50).

Un ejemplo de una solución enfocada a “una sola salud” para *Cryptosporidium* es el desarrollo de una vacuna que pudiera usarse para ayudar a prevenir enfermedades y la eliminación de ooquistes en terneros recién nacidos, esto no solo mejoraría la salud y el bienestar de los animales, sino que también reduciría la contaminación ambiental debido a que estos terneros son uno de los principales reservorios de ooquistes de *C. parvum*. La aplicación de un enfoque que pueda usarse tanto en veterinaria como en salud pública ayudaría en el seguimiento y la vigilancia de la fuente, e informaría los estudios epidemiológicos. Por otro lado, el tratamiento de los desechos fecales humanos y de ganado para reducir la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* ayudaría a minimizar la contaminación del medio ambiente con parásitos infecciosos y protegería la salud humana y animal (49).

En este estudio se estandarizarán y aplicarán técnicas moleculares de amplificación y secuenciación para la identificación de los tipos de *Cryptosporidium* circulantes en la población universitaria previamente caracterizada, así como en las fuentes potenciales de contaminación. Lo anterior permitirá identificar posibles relaciones entre las diferentes fuentes de transmisión y proponer estrategias con base a estas bajo el enfoque de “una sola salud”.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Tipificar molecularmente el *Cryptosporidium* spp. obtenido en muestras de una población universitaria, matrices animales y vegetales.

3.2. Objetivos específicos

- Aplicar una metodología híbrida de PCR anidada /secuenciación para identificar las especies de *Cryptosporidium* en muestras humanas, animales y de alimentos.
- Aplicar una metodología híbrida de PCR anidada /secuenciación para identificar los subtipos de *C. parvum* y *C. hominis* encontrados.
- Describir las características y relación molecular entre los parásitos obtenidos de diferentes orígenes (humano, animal o vegetal).

4. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de estudio y recolección de muestras

Se realizó un estudio de tipo descriptivo y experimental utilizando el banco de muestras del proyecto “Diagnóstico molecular de parásitos intestinales en una población universitaria en Cali”, aprobado por el comité de ética (084-020. Anexo #1. En el proyecto donde se recolectaron las muestras, se detectaron 34 muestras de materia fecal positivas para *Cryptosporidium* spp, en humanos y 24 en mascotas (12) mediante PCR. En el presente estudio, además de las muestras de humanos y mascotas, se incluyeron otras fuentes potenciales de transmisión. Entre ellos, un total de 17 vegetales positivos obtenidos de sitios de abastecimiento aledaños a los lugares de residencia reportados por los 34 participantes positivos y 11 muestras positivas de ganado bovino almacenadas en el banco de muestras de la sección de Parasitología del Laboratorio de Agentes Biológicos del Departamento de Microbiología (LDAB). Se seleccionaron las muestras de vegetales y bovinos que resultaron positivas por la tinción de Ziehl-Neelsen modificado. El proyecto fue avalado por el comité de ética de la Universidad del Valle (006-024). Anexo #2.

4.2. Procedimientos

4.2.1. Preparación y selección de muestras

Se realizó el inventario del ADN en el banco de muestras del proyecto “Diagnóstico molecular de parásitos intestinales en una población universitaria en Cali” almacenado a -20°C en la sección de Parasitología molecular del LDAB. Se identificaron las muestras que contaban con una cantidad suficiente de ADN para la estandarización de pruebas y la obtención de resultados. Las muestras insuficientes fueron extraídas nuevamente

4.2.1.1. Humanos y mascotas

Se encontró que 3 muestras de humanos no contaban con ADN ni con materia fecal y fueron excluidas del estudio, quedando con 31 muestras para análisis. Se realizaron 18 extracciones de las muestras sin ADN suficiente al inicio del estudio y 16 después de las estandarizaciones.

En el caso las muestras de mascotas 2 no contaban con ADN ni materia fecal, por lo que se trabajó con 22 muestras. Se realizó la extracción de 5 muestras sin suficiente ADN al inicio del estudio. Seis muestras del banco con resultado inconcluso fueron verificadas como positivas para *Cryptosporidium* spp. y se incluyeron en este estudio para un total de 28 muestras de mascotas.

Las muestras fueron codificadas así: la sigla PI (parásitos intestinales), seguido del número de muestra. Para las mascotas específicamente se conserva el consecutivo de su respectivo dueño seguido de un punto y el número de la mascota para distinguir aquellos voluntarios con más de una.

4.2.1.2. Vegetales

Se realizó un tamizaje de 86 vegetales crudos, entre ellos cilantro, lechuga y perejil, provenientes de diversos sitios de distribución, tales como tiendas de barrio, supermercados y venta ambulante. En la base de datos se identificaron con una V seguido del consecutivo según el orden del muestreo y se registraron con su ubicación.

Para la búsqueda de parásitos, los vegetales se procesaron según el protocolo de El Said Said, con modificaciones (66). Brevemente, se pesó el vegetal y se colocó en un mortero, donde se adicionaron 60 mL de una solución de tampón fosfato salino (PBS) con 0,01 % de Tween 80 (PBS/T), para luego homogeneizarlo. Esta solución fue filtrada mediante una gasa en un vaso desechable para transferirla a un tubo y centrifugarla a 2000 rpm durante 30 minutos (min) y posteriormente se descartó el sobrenadante. Con el sedimento se realizaron 2 láminas, una para el examen directo con solución salina fisiológica y Lugol 5 % y otra para la tinción de Ziehl-Neelsen modificado. Anexo #3. Las muestras con estructuras compatibles con ooquistes de *Cryptosporidium* (17 en total) fueron congeladas a -20°C y seleccionadas para extracción de ADN y análisis molecular.

4.2.1.3. Bovinos

Once muestras de materia fecal de terneros positivos para Ziehl-Neelsen modificado se encontraban almacenadas a -80°C antes de ser sometidas a extracción de ADN y análisis molecular. Estas muestras habían sido previamente validadas mediante una técnica

inmunocromatográfica de flujo lateral para la detección de antígeno de *Cryptosporidium* con el kit de detección rápida “RAINBOW™ Calf Scours-BIO K 306”, que permite la detección de *Rotavirus*, *Coronavirus*, *E. coli*-F5, *Cryptosporidium* y *Clostridium perfringens* en la materia fecal de bovinos (67). Aunque no se conoce el antígeno específico para la detección, comúnmente se detectan antígenos asociados a la pared del ooquiste (68).

Estas muestras se registraron en la base de datos con una B y el número de recolección de la muestra asignado por el laboratorio.

4.2.2. Cuantificación de ooquistes

En las muestras de vegetales y bovinos con tinción positiva se llevó a cabo el recuento de ooquistes por preparación, en cada lámina se utilizaron 100 μ L del extracto. Para las muestras de humanos y mascotas no se realizó recuento de ooquistes debido a que todas dieron negativas en la tinción del Ziehl-Neelsen modificado. En las muestras de vegetales, la densidad de los ooquistes fue expresada como el número de ooquistes por μ L y se convirtió a ooquistes por gramo para evaluar el nivel de contaminación. Con ayuda de la inteligencia artificial, se adaptaron los valores estipulados por la OMS para determinar la contaminación en muestras de agua (69), estableciendo unas categorías arbitrarias para evaluar la contaminación en vegetales: bajo (<10 ooquistes/g), moderado (10-100 ooquistes/g), alto (100-1,000 ooquistes/g) y muy alto (>1,000 ooquistes/g). Dado que esta clasificación fue adaptada de valores estipulados para otro tipo de reservorio y no ha sido validada para vegetales, durante el estudio se utilizó con fines descriptivos y no comparativos.

4.3. Análisis molecular

4.3.1. Extracción de ADN

Con el fin de obtener un ADN de calidad y cantidad adecuadas, todas las muestras fueron sometidas a un pretratamiento. Brevemente, un gramo de muestra fue lavado con agua estéril y suspendido en 250 μ L de tampón de lisis (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,5 % de dodecilsulfato de sodio, SDS) para luego ser agitado en vórtex por 20 min y almacenado a -80°C durante la noche. Al día siguiente, las mezclas fueron descongeladas y calentadas

a 95°C por 10 min, luego se adicionaron 3 µL de proteinasa K (25 mg/mL) y, por último, fueron incubadas durante 10 min a 56°C (12). Posteriormente, el ADN genómico fue extraído utilizando el kit “QIAamp PowerFecal Pro DNA” de QIAgen siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este efecto se agregaron 250 mg del extracto pretratado y 800 µL del buffer de lisis (solución CD1) en los tubos PowerBead Pro y se agitó en vórtex por 20 min, luego se centrifugaron y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga para añadir la solución CD2 que contiene agentes inhibidores y agitar en vórtex. Después de centrifugar, se agregó la solución CD3 para mejorar la unión del ADN a la columna. La suspensión fue colocada en la columna MB Spin y luego de centrifugar se realizan lavados con dos soluciones tampón (solución EA y C5), por último, se agregó el reactivo de elución (solución C6), antes de centrifugar nuevamente (70). Al finalizar el procedimiento, el ADN obtenido fue eluído en un volumen final de 50 µL y almacenado a -20°C. Anexo #4. En algunos casos se utilizó el kit IBI Bioscientific para la extracción de las muestras. Anexo #5.

4.3.2. Control de ADN de *Cryptosporidium*

El ADN del control (Helix Elite™ Molecular Standards (Inactivated Pellet) (Microbiologics®) fue extraído de igual forma que las muestras, excepto que no se realizó el pretratamiento. El ADN extraído de una muestra de ganado bovino se utilizó también como control en algunos ensayos. Ambos controles (bovino y comercial) se utilizaron alternativamente durante los ensayos.

4.3.3. Amplificación por PCR convencional para *Cryptosporidium*

En los casos en que el diagnóstico se realizó por tinción, se utilizó PCR convencional para confirmar el hallazgo de *Cryptosporidium* spp. El blanco de amplificación fue una región de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (18S rRNA) (Tabla 1) (71). Brevemente, se preparó una mezcla (master mix) de 25 µL con 1,25 U de Taq polimerasa, 2,5 µL del buffer 1x, 0,2 µM de cada cebador, 1 µL de albúmina bovina sérica (BSA, por sus siglas en inglés) 10 µg/µL, dNTPs 0,2 mM y MgCl₂ 1,5 mM. El termociclador (TG – 1000, Biologix) se programó para 35 ciclos de 94°C por 1,5 min, 60°C por 40 segundos (seg) y 72°C por 2 min. Un ciclo inicial de 94°C por 5 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Anexo #6.

Tabla 1 Cebadores para detección de *Cryptosporidium* spp

ORGANISMO	CEBADORES	SECUENCIA	REGIÓN	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> spp (CRY18s-S1- CRY18s-As1)	Forward	TAAACGGTAGGGTATTGGCCT	18S rRNA	240 pb	(71)
	Reverse	CAGACTTGCCCTCCAATTGATA			

4.3.4. Amplificación por PCR del ADN de *Cryptosporidium* para identificación de especie

Para la identificación de especies de *Cryptosporidium* se utilizó una PCR anidada, los cebadores se describen en la tabla 2 (72). En la primera PCR se añadieron 12,5 µL de la AzuraTaq HS 2X Mix, cebadores a una concentración de 0.3 µM y 2 µL de ADN en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador (Biologix TG 1000) con el siguiente programa de temperaturas: 94°C por 3 min para la desnaturalización inicial y 35 ciclos de 94°C por 45 seg, 58°C por 45 seg y 72°C por 1 min. La extensión final fue a 72°C por 10 min.

Para la segunda PCR (anidada) se mantienen las mismas concentraciones de los reactivos, además de agregar 0,5 µL de BSA (10 µg/µL) para mejorar el rendimiento de la reacción y 2 µL del amplicón de la primera PCR diluido 1:10, 1:50 o 1:100. El programa para la amplificación fue: un ciclo inicial de 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 45 seg, 59°C por 45 seg y la extensión a 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Anexo #7.

Tabla 2 Cebadores para la identificación de especies de *Cryptosporidium*.

ORGANISMO	CEBADORES	SECUENCIA	REGIÓN	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (CryptoX1F – CryptoX1R)	Forward	TTCTAGAGCTAATACATGCG	18S <i>rRNA</i>	1325 pb	(32,72)
	Reverse	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA			
<i>Cryptosporidium</i> (CryptoX2F – CryptoX2R)	Forward	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	18S	819 ~ 825	
	Reverse	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	<i>rRNA</i>	pb	

4.3.5. Amplificación por PCR del ADN de *Cryptosporidium* para tipificación de *C. hominis* y *C. parvum*

Se realizó una segunda PCR anidada para la identificación de subtipos en las muestras de *C. hominis* y *C. parvum*. Esta prueba amplifica una región del gen codificante para la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*), que tiene un alto grado de polimorfismo entre los aislados de *Cryptosporidium*, en especial *C. hominis* (73). La técnica debió estandarizarse con cebadores distintos según el origen de la muestra. Anexo #8.

Primero, se utilizó la combinación de cebadores LX0374/LX0375 para la primera PCR y AL3532/AL3534 para la PCR anidada (74) (Tabla 3). Para la primera PCR se utilizó 12,5 µL de AzuraTaq HS 2x Mix, 300 nM de cada cebador, 1 µL de BSA (10 µg/µL), 1 µL de ADN en un volumen final de 25 µL (75). Se programó un ciclo inicial de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 seg, 59°C por 45 seg, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min.

Para la PCR anidada se mantuvieron las mismas concentraciones de reactivos y se agregó 1 µL del ADN amplificado en la primera PCR. Las condiciones de temperatura y el número de ciclos del termociclador fueron iguales a la primera PCR excepto que la hibridación fue a 55°C.

Tabla 3 Primera combinación de cebadores para tipificación de *C. hominis* y *C. parvum*

ORGANISMO	CEBADORES	SECUENCIA	REGIÓN	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (LX0374 - LX0375)	Forward	TTA CTC TCC GTT ATA GTC TCC	<i>gp60</i>	~955pb	(73,74)
	Reverse	GGA AGG AAC GAT GTA TCT GA			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - AL3534)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	<i>gp60</i>	800 ~ 850 pb	(73)
	Reverse	GCAGAGGAACCAGCATC			

Para las muestras que no amplificaron con esta combinación de cebadores se utilizó una nueva combinación que consistió en AL3531/AL3535 para la primera PCR y AL3532/AL3534 para la anidada (73) (Tabla 4).

Tabla 4 Segunda combinación de cebadores para tipificación de *C. hominis* y *C. parvum*

ORGANISMO	CEBADORES	SECUENCIA	REGIÓN	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (AL3531 - AL3535)	Forward	ATAGTCTCCGCTGTATTC	<i>gp60</i>	~945pb	(73)
	Reverse	GGAAGGAACGATGTATCT			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - AL3534)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	<i>gp60</i>	800 ~ 850 pb	(73)
	Reverse	GCAGAGGAACCAGCATC			

Las concentraciones de reactivos se mantuvieron a las utilizadas con la combinación de cebadores anteriores y se agregaron 2 µL del ADN patrón en la primera PCR y 2 µL del amplicón de esta para la PCR anidada.

Por último, para las muestras que no amplificaron con los protocolos anteriores se utilizaron los amplicones de la primera PCR de ambas combinaciones y se realizó una PCR con AL3532/LX0029 para obtener un fragmento de ~350pb que permite tipificar aun cuando no se obtiene el fragmento largo (76,77). Las combinaciones quedaron así: primer amplicón LX0374/LX0375 y PCR anidada AL3532/LX0029 (Tabla 5) o primer amplicón de AL3531/AL3535 y PCR anidada AL3532/LX0029 (Tabla 6). Para estas PCR se utilizaron 12,5 µL de la AzuraTaq HS 2X Mix, 0.3 µM de cada cebador, 1 µL de BSA (10 µg/µL) y 2 µL del amplicón de la primera PCR y la mezcla se llevó a un volumen final de 25 µL. Para el termociclador se programaron 35 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C por 45 seg y 72°C por 1 min, un ciclo inicial de 95°C por 3 min y una extensión final de 72°C por 10 min.

Tabla 5 Tercera combinación de cebadores utilizados para la tipificación de *C. hominis* y *C. parvum*

ORGANISMO	CEBADORES	SECUENCIA	REGIÓN	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (LX0374 - LX0375)	Forward	TTA CTC TCC GTT ATA GTC TCC	<i>gp60</i>	~955 pb	(73,74)
	Reverse	GGA AGG AAC GAT GTA TCT GA			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - LX0029)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	<i>gp60</i>	~350 pb	(76,77)
	Reverse	CGA ACC ACA TTACAA ATGAAGT	<i>gp60</i>		

Se utiliza el primer amplicón de la primera combinación y se realiza una PCR anidada con los cebadores AL3532 - LX0029.

Tabla 6 Cuarta combinación de cebadores para la obtención del amplicón para la tipificación de *C. hominis* y *C. parvum*.

ORGANISMO	CEBADORES	SECUENCIA	REGIÓN	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (AL3531 - AL3535)	Forward	ATAGTCTCCGCTGTATTC	<i>gp60</i>	~945 pb	(73)
	Reverse	GGAAGGAACGATGTATCT			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - LX0029)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	<i>gp60</i>	~350 pb	(76,77)
	Reverse	CGA ACC ACA TTACAA ATGAAGT	<i>gp60</i>		

Se utiliza el primer amplicón de la segunda combinación y se realiza una PCR anidada con los cebadores AL3532 - LX0029.

Una vez terminadas las PCR, se realizó la electroforesis en el “MultiSUB Midi Midi Horizontal Electrophoresis System” con la fuente de C.B.S. SCIENTIFIC para visualizar el resultado, y la calidad de la amplificación. En los casos donde el amplicón resultante presentó una intensidad muy baja, se utilizó un proceso de enriquecimiento del ADN para la secuenciación. Se repitió la PCR anidada en un volumen de 50 µL. Para el resto de los casos se estandarizó un protocolo de re-amplificación utilizando como patrón, el amplicón de la PCR anidada en un volumen de 50 µL o 75 µL. Anexo #7 y Anexo #8.

En cada carril del gel se agregaron entre 25 – 30 µL del amplicón, luego con bisturí se cortaron los fragmentos de una misma muestra y se transfirieron a un microtubo de 1,5 mL para luego continuar con el protocolo de purificación de ADN.

4.3.6. Purificación de ADN

La purificación de las bandas esperadas y compatibles se realizó con el kit “Invisorb® Fragment CleanUp” o el kit “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up” de MACHEREY-NAGEL, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se extrae el fragmento de ADN del gel con un bisturí para transferirlo a un microtubo de 1,5 mL y se agrega un volumen de solubilizante (de agarosa) S según el peso del corte del gel. Se incubaba a 50°C y luego se agregan entre 250 µL a 500 µL de un reactivo para optimizar la unión del ADN al filtro (Binding Enhancer). Se toman aproximadamente 800 µL de la mezcla, se agrega al filtro y se centrifuga; luego se adicionan 500 µL de buffer de lavado para nuevamente centrifugar, este paso es realizado 2 veces. Por último, se transfiere el filtro a un nuevo

tubo de microcentrífuga en el que se agregan 25 µL de buffer de elución y se incuban a temperatura ambiente por 10 m para centrifugar una última vez (78). Anexo # 9 y #10.

Para confirmar la cantidad de ADN en los amplicones obtenidos, se realizó una segunda electroforesis al 1 % utilizando 1 µL de muestra y 4 µL de buffer de carga. Una vez finaliza la electroforesis se toma una foto con el fotodocumentador de NIPPON Genetics “FastGene FAS-DIGI PRO” y se utiliza el programa ImageJ (79) para identificar si la banda es visible bajo estos parámetros y si el tamaño es el correcto. Se considera que hay suficiente ADN si la banda se recupera en estas condiciones.

4.3.7. Secuenciación

Los amplicones purificados de la PCR anidada de *18S rRNA* y *gp60* fueron enviados a MacroGen® Corp., Seúl, Corea del Sur, para ser secuenciados por el método de Sanger en ambos sentidos (forward y reverse) en un secuenciador ABI 3730XL.

4.4. Análisis bioinformático

Para seleccionar las secuencias adecuadas para el análisis, se realizó un control de calidad de los cromatogramas en crudo obtenidos de MacroGen. Se generó un código con ChatGPT que utiliza Biopython para evaluar la calidad de los cromatogramas. El código utiliza el umbral de calidad estandarizado (Phred ≥ 20) (80) para evaluar la fiabilidad de las bases generadas por secuenciación. A partir de este, analiza en los cromatogramas la cantidad de bases que cumplan con este parámetro, así como el promedio de Phred a lo largo de toda la secuencia y, realiza una gráfica de calidad que visualiza estos resultados (Figura 6). Las secuencias de baja calidad se reportaron a MacroGen para su revisión.

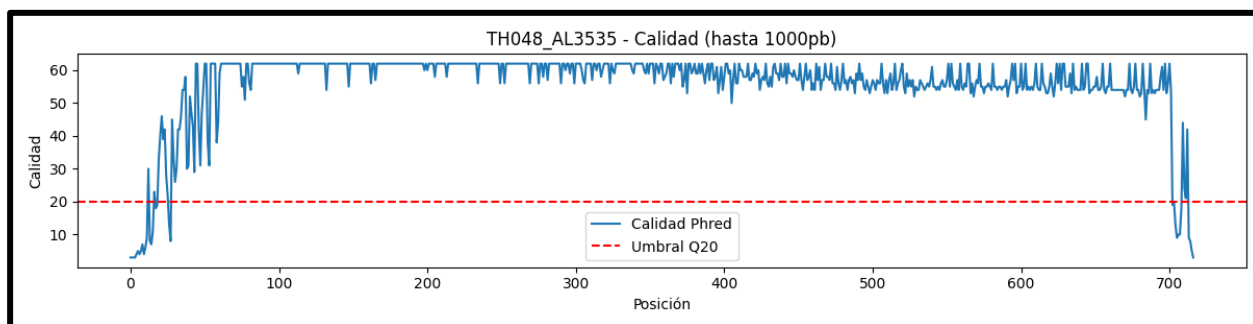


Figura 6 Gráfica de calidad de cromatograma obtenida con Biopython. La línea punteada roja marca el punto de corte de calidad y la línea azul la calidad de cada base; entre más arriba del umbral mayor calidad y entre más constante sea la línea azul mayor será el promedio de Phred de toda la secuencia.

4.4.1. Análisis de especies y subtipos

Los cromatogramas seleccionados fueron procesados con el programa CryptoGenotyper 1.5, disponible en el servidor público de Galaxy (<https://usegalaxy.eu/>). Este programa recibe como input los cromatogramas en crudo y se encarga de editarlos utilizando los parámetros más adecuados para secuencias de *Cryptosporidium* (81). Para analizarlos se le puede indicar la pareja forward/reverse de cada muestra para que analice ambos cromatogramas y genere el contig, o en algunos casos donde no fue posible analizar las muestras como contigs se pueden procesar cromatogramas forward y reverse por separado. Esta herramienta permite la determinación de especies por medio del gen *18S rRNA* y el análisis de subtipos con base en el gen de la proteína gp60 (60). Las secuencias obtenidas fueron exportadas a formato FASTA.

Para aquellas muestras en las que el programa no logró identificar el contig, se utilizó el programa BioEdit 7.7.1 que permitió generarlo a partir de los FASTA del forward y reverse. Una vez se obtuvieran todos los contigs resultantes, se analizaron con la herramienta BLAST del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y con el BLAST de la base de datos especializada en *Cryptosporidium*, CryptoDB (<https://cryptodb.org/cryptodb/app/workspace/blast/new>). Después de esto, se seleccionaron secuencias de referencia para los genes *18S rRNA* y *gp60* de *Cryptosporidium*. Estas secuencias, junto con los contigs, fueron alineadas con ClustalW (82) en MEGA 12 (83), y se cortaron los extremos, luego se utilizó TrimAl que puede identificar las regiones con más gaps y cortar bajo los mejores parámetros sin afectar el alineamiento, pero eliminando el posible ruido.

A partir de las secuencias se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con 1000 repeticiones utilizando IQTree v3 (84,85) y MEGA 12 para su visualización. Las secuencias de referencia utilizadas en el árbol del *18S rRNA* fueron descargadas de SILVA (<https://www.arb-silva.de/>) una base de datos especializada en secuencias de ADN ribosomal y las secuencias de referencia para *gp60* se obtuvieron de CryptoDB y el NCBI.

4.4.2. Análisis de diversidad

Para el análisis de poblaciones se utilizaron DnaSP v6 (86) y Arlequin v3.5.2.2 (87). A partir de los alineamientos realizados en ClustalW, estos se abrieron en el programa DnaSP donde se definieron las 4 poblaciones: humanos, mascotas, vegetales y bovinos. Para cada población se analizaron los parámetros de diversidad genética, incluyendo número de haplotipos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica (π). Se realizaron también las pruebas de neutralidad de Tajima's D y Fu's F_s para evaluar si la población sigue un modelo de evolución neutral (tamaño poblacional y diversidad genética constantes). Estas pruebas detectan desviaciones que pueden indicar cambios en haplotipos, tamaño poblacional o tasas de mutación, revelando eventos evolutivos como cuellos de botella (reducción poblacional), expansiones poblacionales o selección estabilizadora/equilibradora (88). Anexo #11.

Cada prueba se realizó con 1000 repeticiones para determinar la significancia estadística (valor p), y se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$. Una vez se obtuvieron estos análisis, se utilizó DnaSP para generar el archivo ".arp" (Arlequin Project File) y ".hap" (haplotipos) con las poblaciones definidas para analizar en Arlequin, donde se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) y se calcularon estadísticas del índice de fijación (F_{ST}) para evaluar la diferenciación genética entre las cuatro poblaciones. Entre más alto sea el valor del F_{ST} , mayor es la diferenciación genética entre las poblaciones; si el valor se encuentra cerca de 0 significa que la diferenciación genética es baja o nula (76). Se utilizó DnaSP para generar un archivo con los haplotipos ".nex" (NEXUS Haplotype data file) y construir la red de haplotipos en PopART (89). Todos los análisis se realizaron para los marcadores *18S rRNA* y *gp60*.

4.4.3. Secuencias sometidas al Genbank

Se sometieron al NCBI 6 secuencias de buena calidad provenientes de 3 muestras: un bovino (B070), un humano (PI083) y un vegetal (V088). Para cada una se sometió el contig del *18S rRNA*, con los números de acceso PX907833 – PX907835, y el *gp60*, con su respectiva identificación y sus números de acceso PX911347 – PX911349

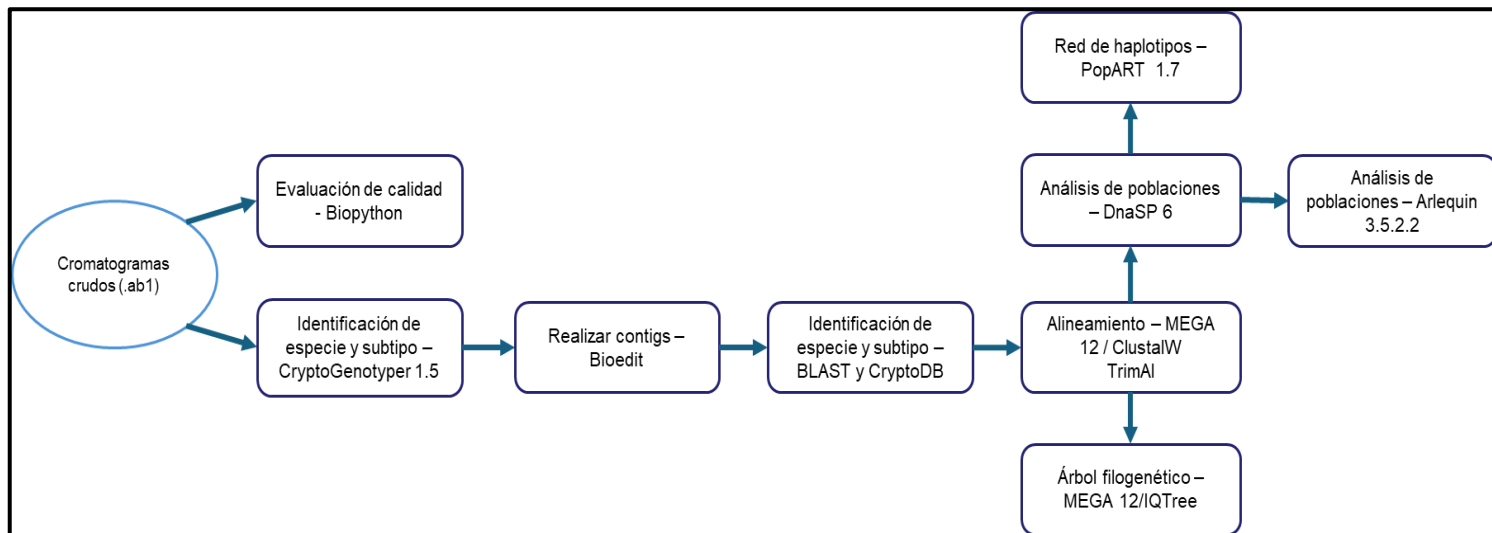


Figura 7 Resumen del análisis bioinformático y programas utilizados.

5. RESULTADOS

5.1. Muestras humanas

Los donantes de las muestras humanas residían en la región urbana de Cali, Colombia, como se observa en la figura 8. Para esta población, en el estudio previo “Diagnóstico molecular de parásitos intestinales en una población universitaria en Cali” se recolectaron diversos datos, correspondientes a variables sociodemográficas, hábitos alimenticios y el contacto con fuentes de infección (Tabla 7).

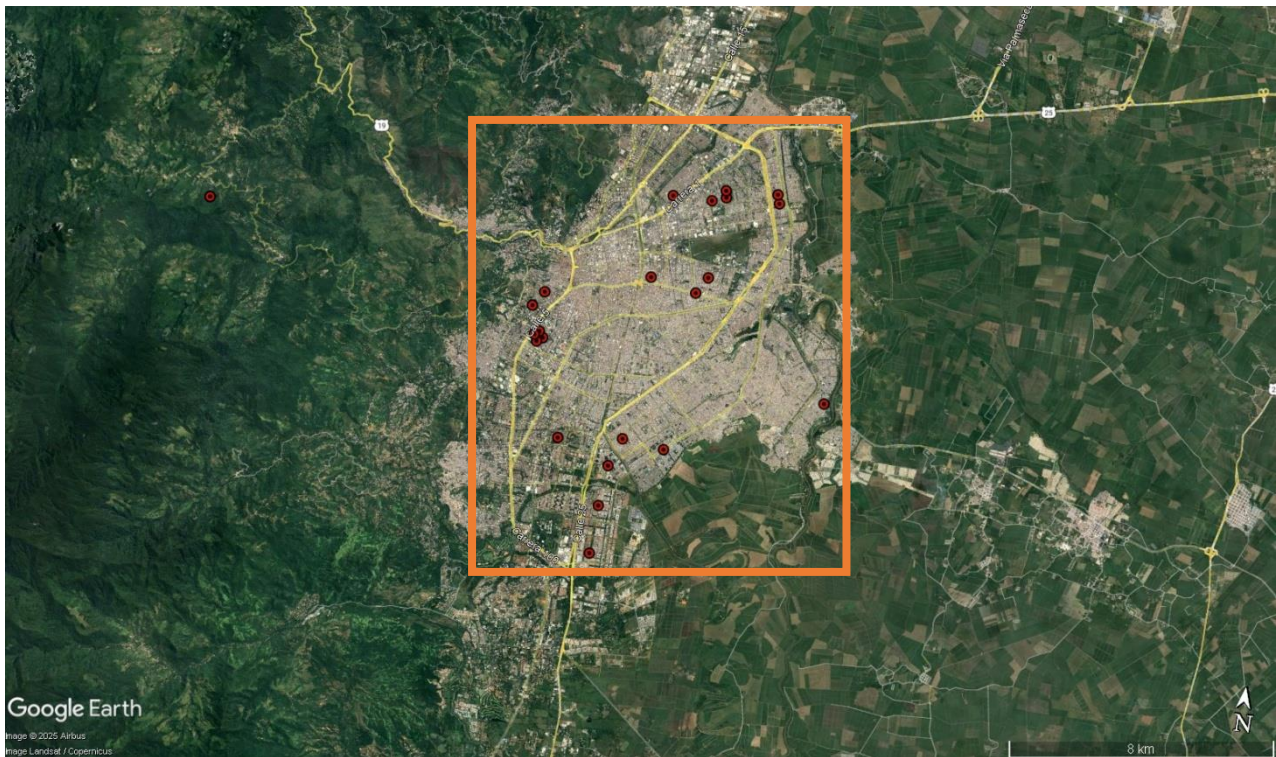


Figura 8 Distribución geográfica de aislados humanos. El mapa se realizó utilizando el programa Google Earth Pro, en el cual se ingresaron las coordenadas de los barrios de residencia de los aislados humanos, que se reflejan como puntos rojos en la imagen. La zona urbana de la ciudad se observa en el recuadro.

Tabla 7 Características demográficas de los participantes humanos (n = 23)

Variable	Categoría	n (%)
Edad	18–20 años	3 (13,0)
	21–23 años	8 (34,8)
	24–26 años	6 (26,1)
	27–31 años	6 (26,1)
Sexo	Femenino	13 (56,5)
	Masculino	10 (43,5)
Estrato	1–2	7 (30,4)
	3	9 (39,1)
	4–5	7 (30,4)
Zona de residencia	Sur	9 (39,1)
	Nororiente	9 (39,1)
	Oriente	2 (8,7)
	Distrito Agua Blanca	2 (8,7)
	Corregimiento	1 (4,3)
Mascotas	Sí	12 (52,2)
	No	11 (47,8)
Agua de grifo	Sí	20 (87,0)
	No	3 (13,0)
Lava frutas/verduras	Sí	20 (87,0)
	No	3 (13,0)
Compra alimentos	Supermercado	13 (56,5)
	Mercado	5 (21,7)
	Mixto	3 (13,0)
	Tienda	2 (8,7)
Alimentos empacados	Sí	5 (21,7)
	No	18 (78,3)
Viajes último año	Sí	15 (65,2)
	No	8 (34,8)
Exposición animal	Sin contacto	12 (52,2)
	Solo domésticos	1 (4,3)
	Aves de corral	3 (13,0)
	Caballos	2 (8,7)
	Porcino	1 (4,3)
	Exposición múltiple	4 (17,4)

Actividades terrestres	Sí	12 (52,2)
	No	6 (26,1)
	NA	5 (21,7)
Actividades acuáticas	Sí	16 (69,6)
	No	2 (8,7)
	NA	5 (21,7)
Síntomas GI	Sí	7 (30,4)
	No	16 (69,6)
Antecedente parasitosis	Sí	3 (13,0)
	No	20 (87,0)
Poliparasitismo (PCR)	Sí	9 (39,1)
	No	14 (60,9)

Esta población de adultos jóvenes (21 – 23 años) en su mayoría no presentaban síntomas asociados a la presencia del parásito (69,5 %). ni tenían antecedentes de parasitismo (87 %)

La PCR anidada para la identificación de especies debió estandarizarse y en las condiciones de laboratorio fue necesario diluir el amplicón de la primera PCR 1:10 para disminuir la concentración de los inhibidores, permitiendo la amplificación del segundo producto de PCR (Figura 9). Durante la estandarización también se hicieron diluciones 1:50 y 1:100 y aún se obtuvo amplificación, lo cual se tuvo en cuenta para intentar recuperar muestras en casos en que no amplificaran con la dilución 1:10.

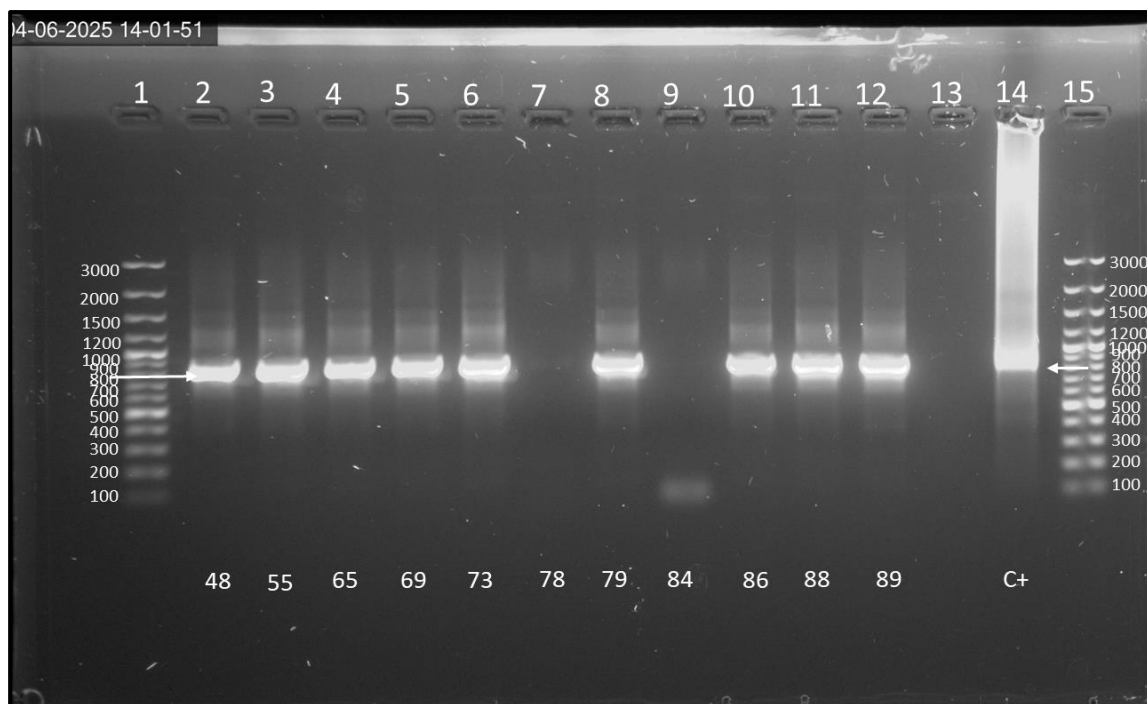


Figura 9 Resultados de la PCR para la identificación de especie en muestras de humanos. Todos los amplicones son de la PCR anidada. Tamaño esperado: ~ 800 pb; Carril 1 y 15: GeneRuler 100 bp Plus de Thermo Scientific™; Carril 2 – 6, 8, y 10 – 12: muestras positivas; Carril 7 y 9: muestras negativas; Carril 14: control positivo. Foto tomada con el LED FastGene FAS-DIGI PRO (NIPPON Genetics Europe).

De un total de 31 muestras incluidas en el estudio, 23 (74,1 %) fueron secuenciadas para la identificación de especie. Todas las muestras fueron confirmadas como *C. parvum* utilizando CryptoGenotyper y verificadas con BLAST (NCBI y CryptoDB) con un porcentaje de identidad entre el 90 – 100 % para *C. parvum* y *Cryptosporidium parvum* Iowa II (Tabla 8).

Tabla 8 Análisis de secuencias de los aislados humanos para la identificación de especies (18S rRNA)

MUESTRA	CryptoGenotyper			NCBI			CryptoDB			
	Species	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Score	Percent Identity
EH006	<i>C. parvum</i>	0	97,80 %	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1454,8	100,00 %
EH009	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1445,8	100,00 %
EH038	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	96,59 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1178,9	96,19 %
EH039	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,40 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1445,8	100,00 %
EH040	<i>C. parvum</i>	0	97,90 %	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1343	100,00 %
EH048	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,50 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1419,6	99,50 %
EH055	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	98,71 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1331,3	98,83 %

EH063	<i>C. parvum</i>	0	97,30 %	<i>C. parvum</i>	0	91,28 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	976,9	91,01 %
EH065	<i>C. parvum</i>	0	94,40 %	<i>C. parvum</i>	0	99,37 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1400,7	99,12 %
EH069	<i>C. parvum</i>	0	91,30 %	<i>C. parvum</i>	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1441,3	99,88 %
EH073	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,00 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1385,4	97,70 %
EH079	<i>C. parvum</i>	0	99,80 %	<i>C. parvum</i>	0	95,57 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1256,4	95,19 %
EH083	<i>C. parvum</i>	0	97,50 %	<i>C. parvum</i>	0	97,86 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1252,8	97,86 %
EH086	<i>C. parvum</i>	0	99,30 %	<i>C. parvum</i>	0	99,51 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1427,8	99,26 %
EH088	<i>C. parvum</i>	0	99,60 %	<i>C. parvum</i>	0	99,39 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1449,4	99,39 %
EH089	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1305,1	100,00 %
EH095	<i>C. parvum</i>	0	99,60 %	<i>C. parvum</i>	0	99,26 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1418,7	99,25 %
EH096	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,50 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1424,1	99,75 %
EH099	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,64 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1467,4	99,64 %
EH106	<i>C. parvum</i>	0	99,90 %	<i>C. parvum</i>	0	99,47 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1339,4	99,34 %
EH123	<i>C. parvum</i>	0	99,40 %	<i>C. parvum</i>	0	99,44 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1279,9	99,44 %
EH125	<i>C. parvum</i>	0	99,70 %	<i>C. parvum</i>	0	99,23 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1369,1	99,11 %
EH127	<i>C. parvum</i>	0	99,30 %	<i>C. parvum</i>	0	99,09 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1334	99,09 %

Las muestras fueron identificadas colocando una E de especie seguida de una letra para denotar la fuente: H = Humano, y el consecutivo correspondiente.

5.2. Mascotas

El estudio se inició con 28 muestras de mascotas positivas para *Cryptosporidium* y se logró identificar la especie en 14 de ellas: el 21 % (3) de gatos y el 79 % (11) de perros. Tres mascotas pertenecían a dueños con reporte positivo para *Cryptosporidium* spp. según datos del estudio previo.

Siguiendo el mismo protocolo para la PCR anidada de humanos, las 14 muestras de mascotas secuenciadas fueron identificadas como *C. parvum*. (Figura 10 y Tabla 9).

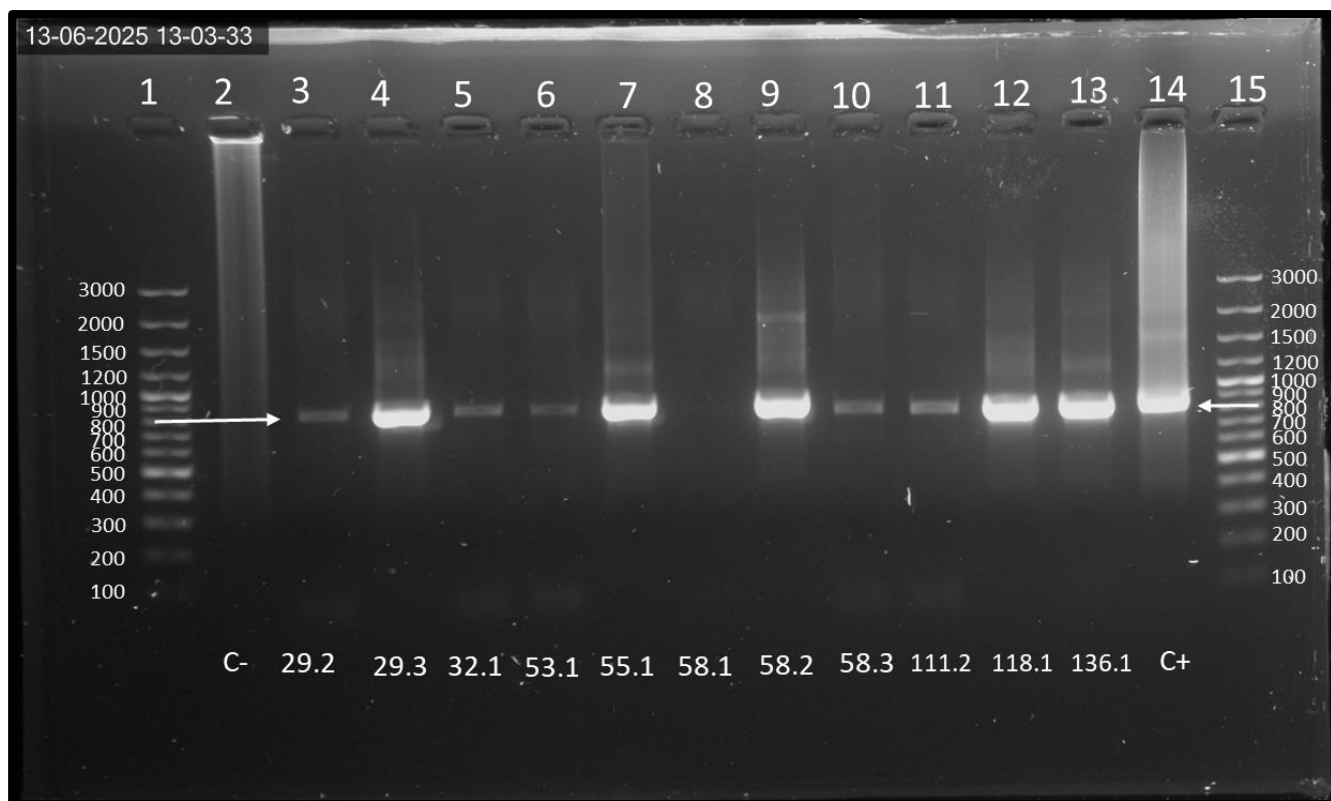


Figura 10 Identificación de especie en muestras de mascotas. Todos los amplicones son de la PCR anidada. Amplicón: ~ 800 pb; Carril 1 y 15: GeneRuler 100 bp Plus de Thermo Scientific™; Carril 2 – 7 y 9 – 13: positivas; Carril 8 muestra negativa Carril 14: control positivo.

Tabla 9 Análisis de secuencias para la identificación de especie en muestras de mascotas (18S rRNA)

MUESTRA	CryptoGenotyper			NCBI			CryptoDB			
	Species	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Score	Percent Identity
EM029.3	<i>C. parvum</i>	0	96,10 %	<i>C. parvum</i>	0	95,19 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1130,2	95,19 %
EM032.1	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,87 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1332,2	98,95 %
EM053.1	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	96,46 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1188,8	96,19 %
EM055.1	<i>C. parvum</i>	0	99,90 %	<i>C. parvum</i>	0	99,76 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1468,3	99,88 %
EM058.3	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,87 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1354,7	99,87 %
EM085.1	<i>C. parvum</i>	0	95,30 %	<i>C. parvum</i>	0	99,17 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1272,7	99,17 %
EM087.1	<i>C. parvum</i>	0	99,70 %	<i>C. parvum</i>	0	99,23 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1367,3	98,74 %
EM087.2	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	97,76 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1367,3	98,74 %
EM096.1	<i>C. parvum</i>	0	95,40 %	<i>C. parvum</i>	0	98,97 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1342,1	99,47 %
EM097.2	<i>C. parvum</i>	0	99,60 %	<i>C. parvum</i>	0	99,62 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1417,8	99,62 %
EM111.2	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,75 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1418,7	99,75 %
EM118.1	<i>C. parvum</i>	0	99,30 %	<i>C. parvum</i>	0	96,46 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1259,1	96,54 %

EM136.1	<i>C. parvum</i>	0	99,90 %	<i>C. parvum</i>	0	99,75 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1435	99,75 %
EM138.1	<i>C. parvum</i>	0	98,70 %	<i>C. parvum</i>	0	99,39 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1441,3	99,39 %

Muestras etiquetadas con E de especie, M de mascota y el número original de muestra.

La identificación utilizando CryptoGenotyper y verificadas con NCBI y CryptoDB presentan homologías > 95 %.

5.3. Vegetales

De los 86 vegetales recolectados, 17 fueron positivos con la tinción de Kinyoun y se observaron ooquistes compatibles con *Cryptosporidium* spp. La confirmación de este hallazgo se realizó con un PCR monoplex convencional. Los vegetales positivos fueron: perejil, cilantro y lechuga, siendo el perejil el que se encontró contaminado con mayor frecuencia (37,5 %) (Tabla 10).

Tabla 10 Frecuencia de *Cryptosporidium* en vegetales.

Vegetal	Total	Positivos	% Positivos
Cilantro	40	9	22,5
Lechuga	18	2	11,1
Perejil	16	6	37,5
Otros	12	0	0

La especie de *Cryptosporidium* se identificó en 13 muestras de vegetales. La distribución geográfica de estos en comparación con los humanos se observa en la figura 11.

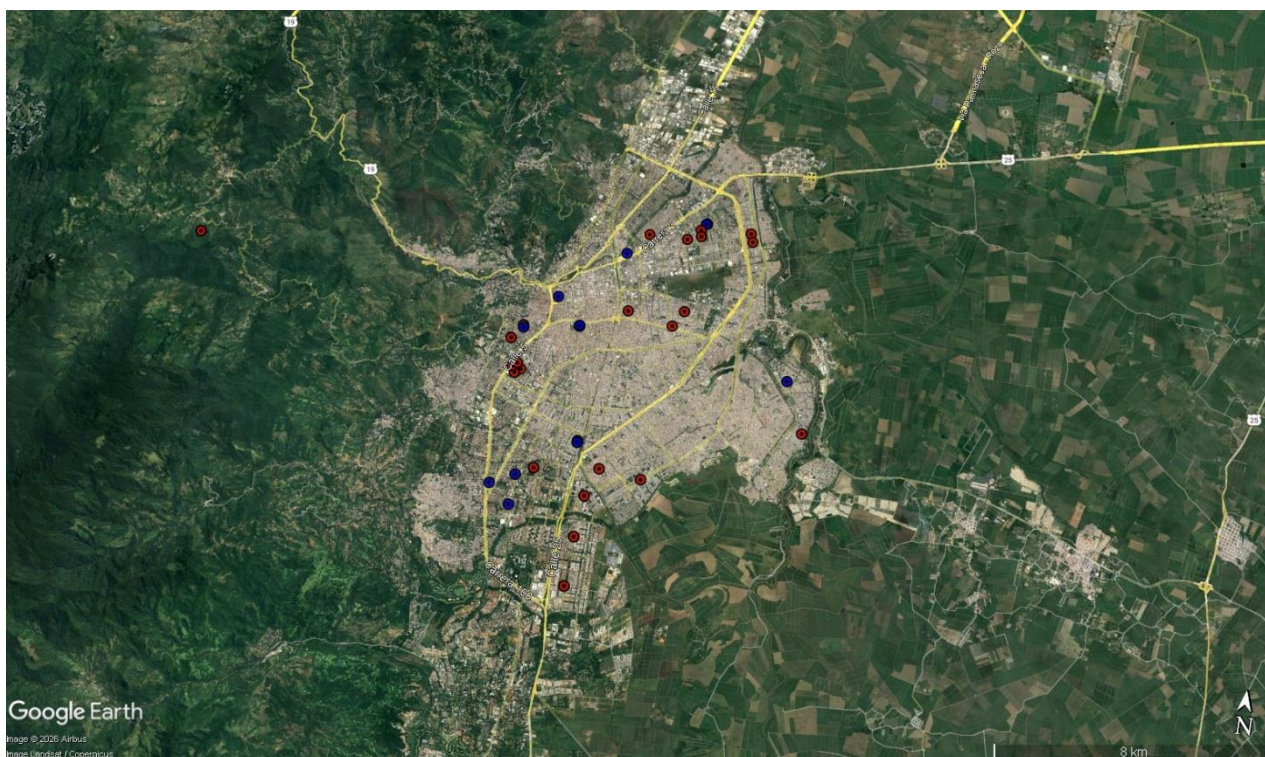


Figura 11 Ubicación geográfica del sitio de recolección de muestras de vegetales contaminados (azul) y de los barrios de residencia de los aislados humanos (rojo). La gráfica se realizó ingresando las coordenadas de los barrios de residencia y las direcciones de las tiendas donde se obtuvieron los vegetales positivos.

Entre estos vegetales, el 46,2 % (6) eran cilantros, el 38,5 % (5) perejil y el 15,4 % (2) lechuga. Al realizar el conteo de ooquistes en los vegetales, se obtuvo el nivel de contaminación de cada muestra, que se presenta en la tabla 11.

Tabla 11 Nivel de contaminación de los vegetales utilizados en el análisis (n = 13).

Muestra	Tipo	Densidad (ooquistes x g)	Nivel de contaminación
V019	Cilantro	70	Moderada
V020	Lechuga	80	Moderada
V029	Cilantro	Sin cuantificar	Sin dato
V039	Cilantro	10	Moderada
V042	Cilantro	10	Moderada
V054	Lechuga	170	Alta
V055	Perejil	150	Alta
V062	Perejil liso	30	Moderada
V070	Cilantro	10	Moderada
V088	Perejil crespo	100	Alta
V091	Perejil	70	Moderada
V104	Perejil	460	Alta

V106	Cilantro	1330	Alta
------	----------	------	------

Para el 38,5 % (5) de los vegetales se identificó una contaminación alta y para el 53,8 % (7) una contaminación moderada.

Durante la estandarización de la PCR para la identificación de especie, se siguió el protocolo empleado para las muestras anteriores, pero en vegetales se obtuvo un rendimiento menor, ya que en la mayoría de los casos la concentración de ADN resultó insuficiente para la secuenciación (Figura 12).

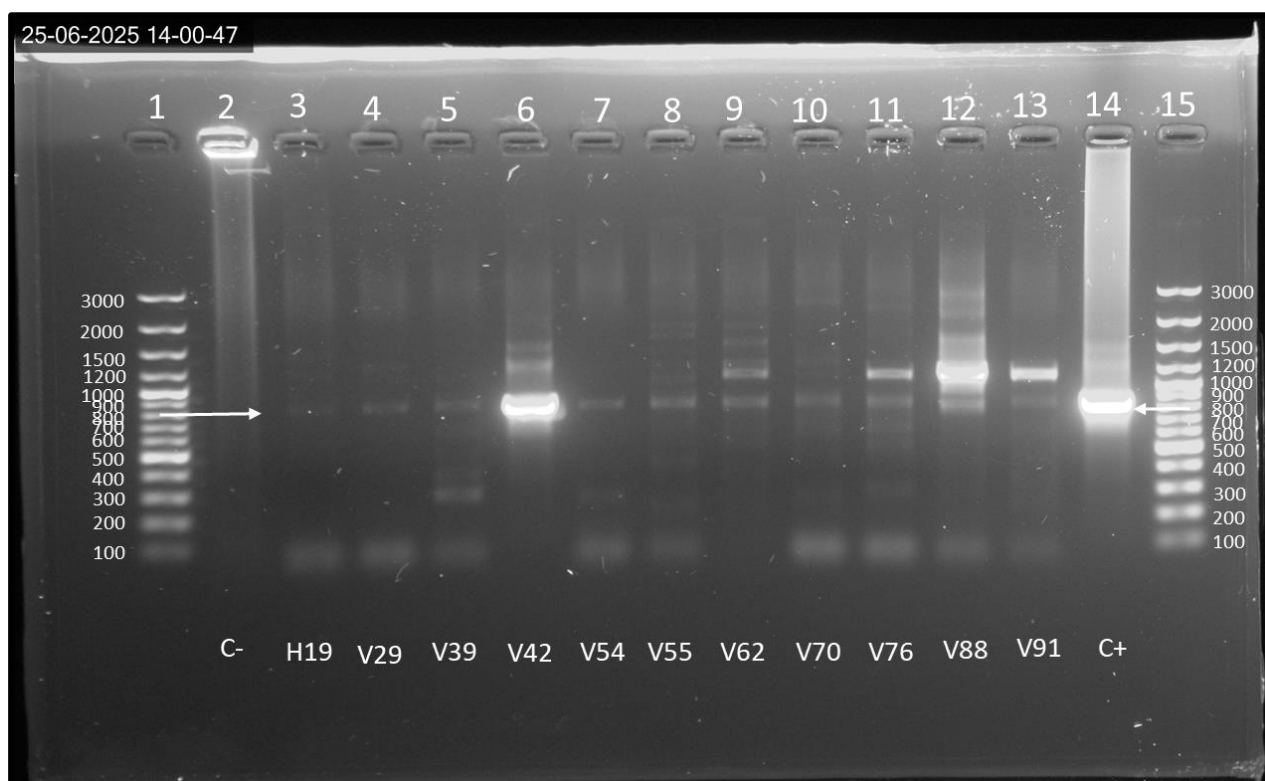


Figura 12 Resultados de la PCR para la identificación de especie en muestras de vegetales. Todos los amplicones son de la PCR anidada. Tamaño esperado: ~ 800 pb; Carril 1 y 15: GeneRuler 100 bp Plus de Thermo Scientific™; Carril 2: control negativo; Carril 4 – 13: muestras positivas; Carril 14: control positivo.

Para resolver esta limitante, se realiza un enriquecimiento de la muestra mediante reamplificación, obteniendo una mayor cantidad de ADN para su extracción del gel y su concentración mediante elución en un menor volumen. En algunas muestras fue necesario utilizar las diluciones 1:50 y 1:100 del ADN extraído para realizar la PCR anidada, lo que

reduce los inhibidores a expensas de una menor concentración final del amplicón. Anexo #12.

Todas las muestras de vegetales secuenciadas fueron caracterizadas como *C. parvum* (Tabla 12).

Tabla 12 Análisis de secuencias para la identificación de especie de *Cryptosporidium* en vegetales

MUESTRA	CryptoGenotyper			NCBI			CryptoDB			
	Species	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Score	Percent Identity
EV019	<i>C. parvum</i>	0	99,90 %	<i>C. parvum</i>	0	93,77 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1215	92,87 %
EV020	<i>C. parvum</i>	0	91,10 %	<i>C. parvum</i>	0	99,14 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1414.2	99,38 %
EV029	<i>C. parvum</i>	0	95,00 %	<i>C. parvum</i>	0	95 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1139.2	95,03 %
EV039	<i>C. parvum</i>	0	99,90 %	<i>C. parvum</i>	0	100 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1286.2	99,86 %
EV042	<i>C. parvum</i>	0	99,30 %	<i>C. parvum</i>	0	99,26 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1420.5	99,25 %
EV054	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	98,78 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1401.6	98,65 %
EV055	<i>C. parvum</i>	0	98,60 %	<i>C. parvum</i>	0	97,73 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1306	97,10 %
EV062	<i>C. parvum</i>	0	99,90 %	<i>C. parvum</i>	0	98,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1254.6	98,88 %
EV070	<i>C. parvum</i>	0	99,20 %	<i>C. parvum</i>	0	99 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1270.9	99,17 %
EV088	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,73 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1335.8	99,73 %
EV091	<i>C. parvum</i>	0	99,70 %	<i>C. parvum</i>	0	97,94 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1370.9	97,70 %
EV104	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	98,74 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1364.6	98,74 %
EV106	<i>C. parvum</i>	0	99,20 %	<i>C. parvum</i>	0	99,05 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1287.1	98,91 %

Las muestras se denotan con E seguido de V para vegetales y el número de muestra. *C. parvum* fue identificado con porcentajes de identidad promedios reportados en BLAST entre 98,25 % y 98,10 %.

5.4. Bovinos

Los 11 bovinos positivos para *Cryptosporidium* spp. procedían de fincas entre la ciudad de Palmira y Cali. La mayoría eran hembras (10/11), de la raza Gyrolando y en un rango de edad entre 4 – 15 días (Tabla 13).

Tabla 13 Origen y características de las muestras de bovinos.

Muestra	Edad (días)	Sexo	Raza	Síntomas	Kinyoun	BioK 306
B057	42	Hembra	Jersey	Asintomático	Positivo	Negativo
B070	14	Hembra	Gyrolando	Asintomático	Positivo	Positivo

B077	42	Macho	Gyrolando	Asintomático	Positivo	Positivo
B081	5	Hembra	Gyrolando	Positivo diarrea	Positivo	Positivo
B082	8	Hembra	Gyrolando	Asintomático	Positivo	Positivo
B083	4	Hembra	Gyrolando	Asintomático	Negativo	Positivo
B084	5	Hembra	Gyrolando	Asintomático	Positivo	Negativo
B086	10	Hembra	Gyrolando	Positivo diarrea	Positivo	Positivo
B087	10	Hembra	Gyrolando	Asintomático	Positivo	Positivo
B088	15	Hembra	Gyrolando	Positivo diarrea	Positivo	Positivo
B089	12	Hembra	Gyrolando	Asintomático	Positivo	Positivo

Gyrolando y Jersey: razas de los terneros. BioK 306: kit comercial para la detección de antígeno de *Cryptosporidium*.

Aunque no se encontró una relación entre las razas se ha mencionado en previos estudios que el tipo de manejo de las crías varía con las razas, por ejemplo, en un trabajo se estableció que los terneros Jersey y Angus tenían una mayor probabilidad de desarrollar diarrea neonatal bovina que la raza Holstein. Los terneros de la raza Gyrolando se criaron en sistemas de pastoreo abierto lo que aumenta el riesgo de transmisión de la enfermedad (90).

A diferencia de las muestras de otras fuentes en la PCR anidada, se logró una amplificación con una buena cantidad de ADN sin necesidad de diluir el amplicón de la primera PCR (Figura 13).

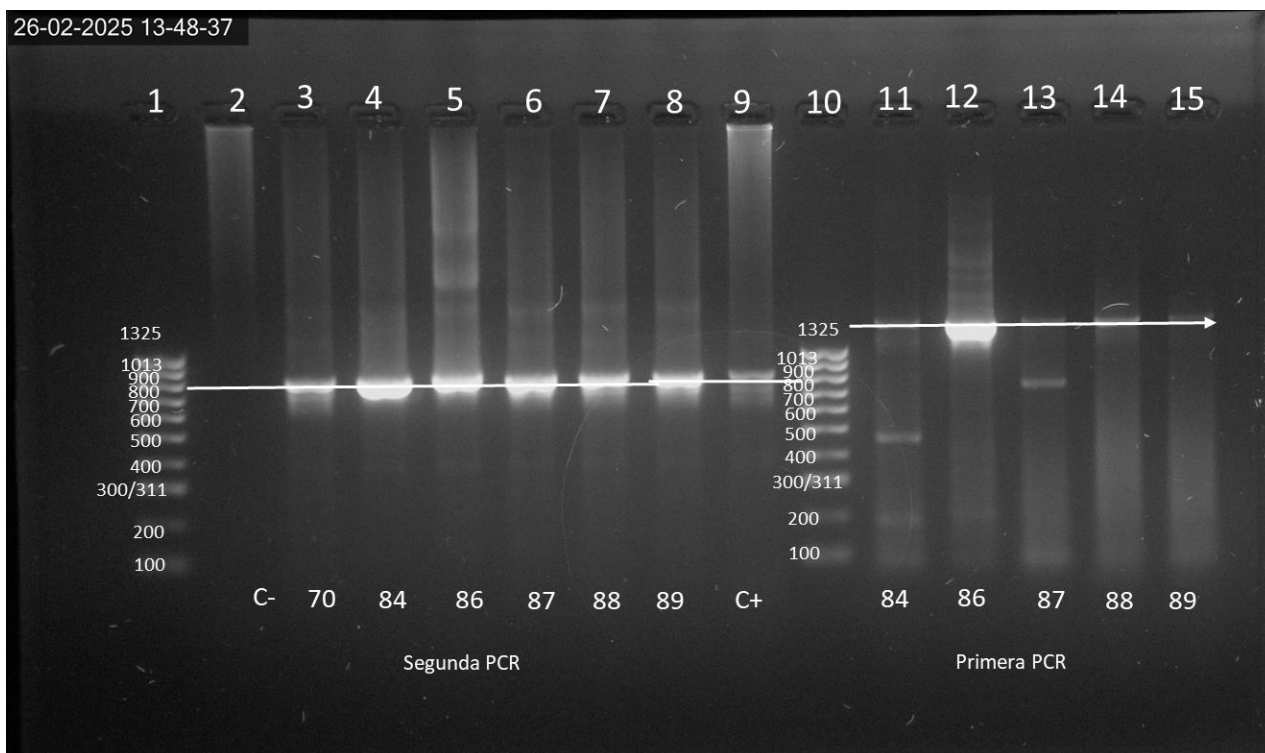


Figura 13 Resultados de PCR para la identificación de especie de *Cryptosporidium* en muestras de bovinos. Tamaño esperado primera PCR: 1325pb. Tamaño esperado PCR anidada ~800 pb. Carril 1 y 10: HyperLadder™ 100 bp de Bioline; Carril 11 – 15: muestras positivas para la primera PCR. Carril 2: control negativo PCR anidada; Carril 3 – 8: muestras positivas para la PCR anidada; Carril 9: Control positivo.

De las 11 muestras secuenciadas 10 (98 %) fueron *C. parvum* y una (2 %) se identificó como *C. bovis*. Los porcentajes de identidad en promedio para las secuencias de *C. parvum* fue de 98,75 % entre las diferentes bases de datos. En el caso del *C. bovis* se obtuvo porcentajes de identidad de 99,63 % a 100 % (Tabla 14).

Tabla 14 Resultados de la identificación de especie con base al gen *18S rRNA* para las muestras de bovinos

MUESTRA	CryptoGenotyper			NCBI			CryptoDB			
	Species	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Score	Percent Identity
EB057	<i>C. bovis</i>	0	100,00 %	<i>C. bovis</i>	0	99,63 %	<i>Cryptosporidium meleagridis</i> strain UKMEL1	0	1268,2	94,74 %
EB070	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	97,33 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1229,4	97,20 %
EB077	<i>C. parvum</i>	0	96,10 %	<i>C. parvum</i>	0	97,45 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1236,6	97,32 %
EB081	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,86 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1300,6	99,86 %
EB082	<i>C. parvum</i>	0	97,50 %	<i>C. parvum</i>	0	97,58 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1245,6	97,58 %
EB083	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1441,3	99,88 %
EB084	<i>C. parvum</i>	0	97,50 %	<i>C. parvum</i>	0	97,72 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1251,9	97,72 %

EB086	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1335,8	100,00 %
EB087	<i>C. parvum</i>	0	96,40 %	<i>C. parvum</i>	0	97,65 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1208,6	97,65 %
EB088	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1341,2	100,00 %
EB089	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> Iowa II	0	1344,8	100,00 %

Se utiliza el marcaje previamente estipulado con la B de bovino.

5.5. Análisis de diversidad de especies

5.5.1. Análisis filogenético 18S rRNA

En total, se tipificaron 61 muestras de diferentes fuentes a nivel de especie. A partir de estas secuencias, se construyó un árbol filogenético con secuencias de referencia. Se incluyó *C. ubiquitum* como grupo externo (outgroup), así como *C. bovis* y *C. parvum*, las dos especies encontradas en este estudio, con el fin de visualizar la relación filogenética entre las muestras analizadas.

Adicionalmente, se agregaron secuencias reportadas por Uran-Velasquez *et al.* (32), recolectadas en niños escolares de dos provincias de Colombia (Antioquia y Santander). También, se incluyó una secuencia de ternero recolectada entre 2010 y 2012 en el área central de Colombia por Avendaño *et al.* (91), una secuencia de materia fecal de perro de Brasil (MF589923.1), una secuencia de bovino de Brasil reportada por Toledo *et al.* (92), y una secuencia de cabra en Argentina reportada por Basset *et al.* (93). El árbol filogenético resultante se muestra en la figura 14.

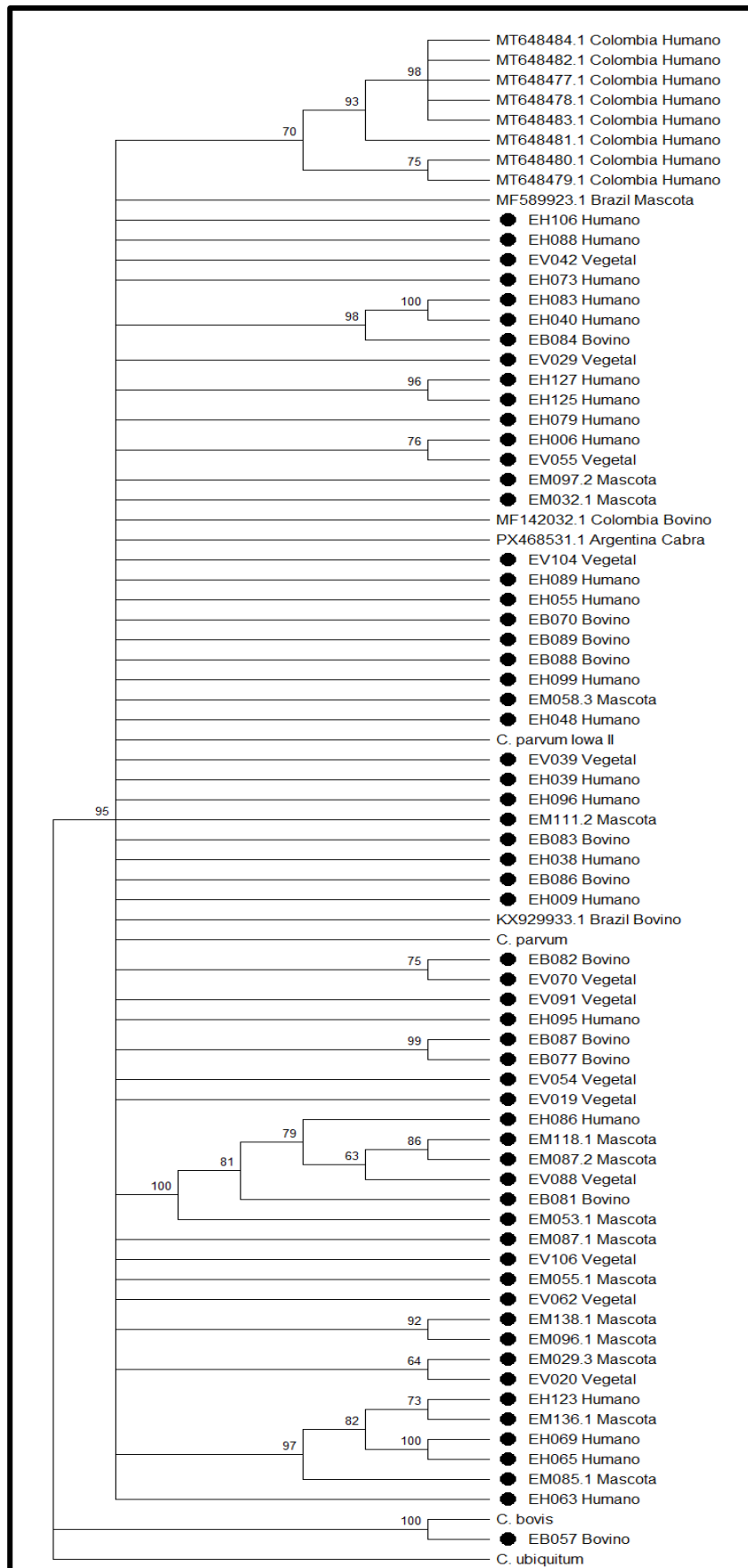


Figura 14 Árbol filogenético de especies para el marcador *18S rRNA*. Árbol de máxima verosimilitud realizado con el modelo Hasegawa–Kishino–Yano y 1000 repeticiones. Las secuencias de este estudio se denotan como: EH=humano, EM=mascota, EV=vegetal, EB=bovino y se demarcan con un punto previo al nombre. Secuencias de Uran-Velasquez *et al.*: MF142032.1, MT648480.1, MT648478.1, MT648479.1. Secuencia de Avendaño *et al.*: MF142032.1. Secuencia de perro en Brasil: MF589923.1. Secuencia de Toledo *et al.*: KX929933.1. Secuencia de Basset *et al.*: PX468531.1. Secuencias de referencia: *C. parvum* (L16996), *C. parvum Iowa II* (AAEE01000001), *C. bovis* (EF514234). Outgroup: *C. ubiquitum* (LRBP01000038).

La mayoría de las secuencias provienen del mismo ancestro y no hay grandes diferencias entre ellas. Hay algunas ramificaciones con diferentes niveles de confianza; entre estas, la relación entre el bovino identificado como *C. bovis* y la secuencia de referencia para esta especie, cuyo nodo, tiene un valor de soporte de 100. Hay pequeños clados que se distinguen como el de las secuencias de Uran-Velasquez *et al.*, que se separan del clado central y las secuencias de este estudio. Dentro de este, se visualizan dos clados con valores de soporte alto que agrupan secuencias de todos los hospederos. Se observan siete subclados: uno con dos secuencias humanas y una de vegetal; otro con una secuencia humana y una de vegetal; un tercero con una de bovino y otra de vegetal; y los restantes se conforman entre secuencias de los mismos hospederos. Esto podría sugerir una transmisión localizada, contaminación de productos frescos por actividad ganadera, o transmisión microepidémica.

5.5.2. Análisis de haplotipos y diversidad genética *18S rRNA*

Para el análisis de diversidad genética se utilizaron los programas DnaSP y Arlequin. Para la diversidad molecular básica de cada población, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 15).

Tabla 15 Diversidad molecular por poblaciones para las secuencias del gen *18S rRNA*

Población	N (secuencias)	Diversidad nucleotídica (π)	Sitios analizados*	Sitios polimórficos (S)	Diferencias promedio (k)	Theta-W por sitio (θ_W)
Humano	23	0,10467	558	481	78,290	0,19588
Bovino	11	0,12617	656	431	91,093	0,20723
Mascota	14	0,20865	661	466	164,205	0,18996
Vegetal	13	0,10852	640	426	78,893	0,19171
Total	61	0,13239	525	595	104,988	0,17304

* Sitios analizados excluyendo posiciones con gaps o datos faltantes.

Al comparar los parámetros de diversidad molecular del *18S rRNA*, se obtuvo que la diversidad nucleotídica (π) global fue de 0,13239. Entre las poblaciones, los niveles de S y θ_W fueron similares, pero π fue mayor en la población de mascotas ($\pi = 0,208$), seguida por la de bovinos y la de vegetales, mientras que en los humanos fue el más bajo ($\pi = 0,10467$). Estos valores evidencian que la distribución de las mutaciones difiere entre hospedadores.

Para determinar la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA) a partir de las secuencias del gen *18S rRNA* (Tabla 16).

Tabla 16 Análisis de la diversidad molecular de varianza (AMOVA) entre las secuencias del *18S rRNA*

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componente de varianza	% de variación
Entre poblaciones	3	174,414	Va = -0,07134	-0,12 %
Dentro de poblaciones	57	3373,996	Vb = 59,19291	100,12 %
Total	60	3548,410	59,12157	100 %

*Índice de fijación (F_{ST}): -0,00121. Prueba de significancia (1023 permutaciones): $P = 0,41349 \pm 0,01409$

Se identificó que, para el *18S rRNA*, la variabilidad genética se concentra dentro de las poblaciones. El componente de varianza Va de -0,071 señala la ausencia de estructuración poblacional, indicando que las diferencias no dependen de la fuente o tipo de hospedero. El índice de fijación obtenido ($F_{ST} = -0,00121$) y el p no significativo ($P = 0,413$) confirman esto.

Para complementar el análisis de diversidad genética, se aplicaron pruebas de neutralidad con el objetivo de inferir posibles desviaciones del modelo de evolución neutral (Tabla 17).

Tabla 17 Resultados de las pruebas de neutralidad para las secuencias del *18S rRNA*

Población	Fu & Li D*	Fu & Li F*	Fu's Fs	Significancia	Tajima's D	P-valor Tajima
------------------	-----------------------	-----------------------	----------------	----------------------	-------------------	-----------------------

Humano	-3,85	-4,04	4,061	P < 0,02	-2,296	0,001
Bovino	-2,50	-2,74	8,986	P < 0,02	-1,953	0,006
Mascota	0,68	0,53	4,085	No significativa	0,471	0,743
Vegetal	-2,95	-3,19	6,509	P < 0,02	-2,052	0,002

Se realizaron las pruebas de Fu & Li (D^* , F^*) para evaluar las mutaciones raras Fu's F_s para exceso en haplotipos y Tajima's D para evaluar la evolución de la población. Con base en lo anterior, en humanos, bovinos y vegetales se observó una posible expansión poblacional con mutaciones externas, pero con un bajo número de haplotipos, además de posibles variantes raras, lo que indica una posible expansión poblacional reciente y la desviación del modelo de evolución neutral. Mientras que en las mascotas los valores indican que su evolución se ajusta a un modelo neutral.

Adicionalmente, se analizó la diversidad haplotípica para describir la variabilidad genética y la distribución de haplotipos del gen *18S rRNA* entre las poblaciones estudiadas (Tabla 18).

Tabla 18 Diversidad haplotípica en las poblaciones de las muestras del *18S rRNA*

Población	h (haplotipos)	Diversidad haplotípica (Hd)
Humano	15	0,858
Bovino	7	0,818
Mascota	12	0,967
Vegetal	9	0,872
Total	39	0,873

Se identificó un total de 39 haplotipos entre las diferentes poblaciones. Aunque humanos y mascotas se distribuyeron en un número de haplotipos, la diversidad haplotípica fue notablemente superior en mascotas comparada con humanos, cuyos valores fueron similares a los de bovinos y vegetales. Con los haplotipos se realizó la red TCS (parsimonia estadística) (94) para visualizar su distribución entre las 4 fuentes, la cual se presenta en la figura 15.

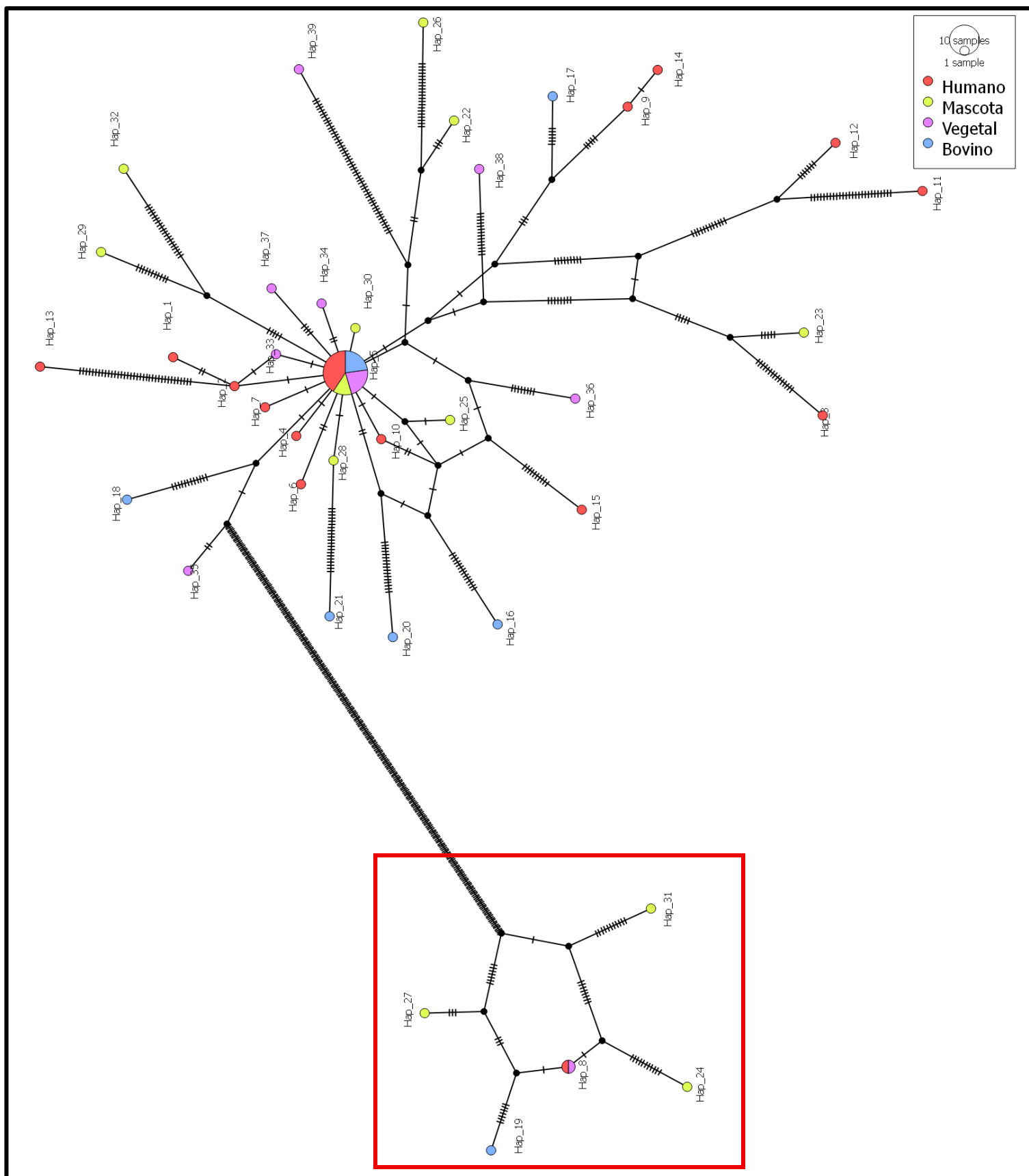


Figura 15 Red haplotípica TCS para secuencias del 18S *rRNA*. En la red se visualizan 39 haplotipos representados en círculos de diferentes colores según la fuente (Humano=rojo, mascota=amarillo, vegetal=morado, bovino=azul). Cada línea lateral representa las mutaciones entre los haplotipos. Recuadro rojo: grupo de secuencias separado del núcleo central.

En la red se identificó solo una secuencia por haplotipo en la mayoría de los casos, excepto en el nodo central, que fue el haplotipo 5, conformado por 9 secuencias de muestras de humanos, 3 de mascotas, 5 de vegetales y 5 de bovinos y el haplotipo 8, conformado por una secuencia de humano y una de vegetal. También se observó un grupo de secuencias, separado del haplotipo central, conformado por secuencias de las diferentes fuentes (recuadro rojo).

5.6. Tipificación de *Cryptosporidium parvum*

Durante el proceso de estandarización de la PCR, se optó por utilizar diferentes pares de cebadores para mejorar el rendimiento, debido a que la proteína gp60 es altamente polimórfica. (Figura 16).

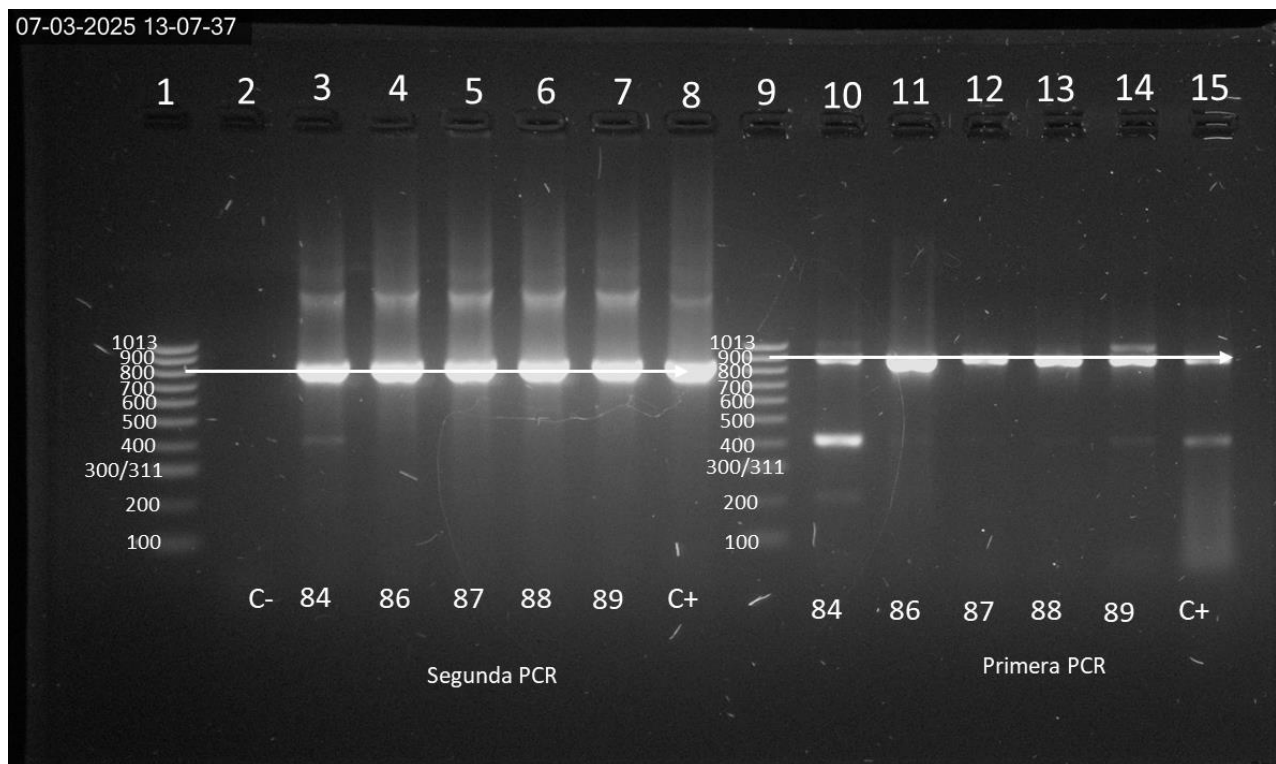


Figura 16 Resultados PCR para identificación de subtipos con muestras de bovinos. Tamaño esperado primera PCR: ~945 pb. Tamaño esperado PCR anidada: ~800 pb. Carril

1 y 9: HyperLadder™ 100 bp de Bioline; Carril 10 – 14: amplicón positivo primera PCR; Carril 15: control positivo primera PCR; Carril 2: control negativo PCR anidada; Carril 3 – 7: amplicón positivo PCR anidada; Carril 8: control positivo PCR anidada.

Se secuenciaron en total 33 muestras para el gen *gp60* de todas las fuentes; 10 eran de bovinos (30,3 %) y el programa CryptoGenotyper confirmó que el 100% pertenecían al subtipo *C. parvum* IlaA17G2R1. En las 23 muestras restantes, que incluían muestras de origen humano, vegetal y de mascotas, estas últimas no pudieron ser caracterizadas mediante el *gp60*. 9 secuencias no fueron de buena calidad y 8 correspondieron a bacterias comunes de la microbiota intestinal y oportunistas del medio ambiente. Cinco secuencias fueron analizadas con éxito incluyendo 3 humanos: 2 clasificados como *C. parvum* IlaA17G2R1 y 1 como *C. parvum* IlaA16G2R1. Dos aislados de vegetales se determinaron uno como *C. parvum* IlaA17G2R1 y el otro como *C. parvum* IlaA12R1. En las tablas 19 y 20 se presentan los resultados.

Tabla 19 Análisis de subtipos basado en el gen *gp60* según CryptoGenotyper y CryptoDB.

MUESTRA	CryptoGenotyper					Crypto DB		
	Subtype	Avg. Phred Quality	Query Coverage	E-value	Percent Identity	Especie	E-value	Identity
TB070	IlaA17G2R1	54,63(F); 57,85(R)	97 %	0	99,76 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,77 %
TB077	IlaA17G2R1	53,3(F); 58,03(R)	98 %	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,76 %
TB081	IlaA17G2R1	51,64(F); 58,24(R)	99 %	0	99,76 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,03 %
TB082	IlaA17G2R1	55,38(F); 57,15(R)	96 %	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,77 %
TB083	IlaA17G2R1	48,65(F); 48,53(R)	100 %	0	99,74 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,61 %
TB084	IlaA17G2R1	52,38(F); 56,56(R)	98 %	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,76 %
TB086	IlaA17G2R1	54,56(F); 58,77(R)	98 %	0	99,76 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,76 %
TB087	IlaA17G2R1	55,26(F); 57,65(R)	98 %	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,76 %
TB088	IlaA17G2R1	55,27(F); 58,07(R)	98 %	0	99,64 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,76 %
TB089	IlaA17G2R1	54,25(F); 57,48(R)	98 %	0	99,88 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,76 %
TH040	IlaA17G2R1	27,85(F); 49,94(R)	98 %	0	99,40 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,41 %
TH065	IlaA16G2R1	47,1(F); 51,82(R)	99 %	0	99,10 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	98,47 %
TH083	IlaA17G2R1	44,3(F); 53,58(R)	100 %	0	99,87 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,74 %
TV088	IlaA12R1	45,99(F); 53,21(R)	100 %	0	99,35 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,22 %
TV106	IlaA17G2R1	43,0(F); 51,23(R)	98 %	0	99,40 %	<i>Cryptosporidium parvum</i> IOWA-ATCC*	0	99,42 %

Para identificar las secuencias utilizadas en la identificación de subtipos se marcaron con T de tipificación seguido de una letra indicando fuente (B=bovino, H=humano, V=vegetal) y el número de muestra. *cepa de *C. parvum*.

Tabla 20 Resultados de la identificación de subtipos con el BLAST del NCBI.

MUESTRA	NCBI					
	Especie	E value	Percent Identity	Accession Number	Percent Identity	Accession Number
TB070	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TB077	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TB081	<i>C. parvum</i>	0	99,16 %	AY048666.1	99,15 %	JF727756.1
TB082	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TB083	<i>C. parvum</i>	0	99,87 %	MW411010.1	99,87 %	JF727756.1
TB084	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TB086	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TB087	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TB088	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TB089	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	AY048666.1	100,00 %	JF727756.1
TH040	<i>C. parvum</i>	2.00 E-174	99,71 %	MK034695.1	99,71 %	JF727756.1
TH065	<i>C. parvum</i>	0	99,61 %	KT148950.1	N. A	N. A
TH083	<i>C. parvum</i>	0	100,00 %	MW411010.1	100,00 %	JF727756.1
TV088	<i>C. parvum</i>	0	99,48 %	MW411010.1	N. A	N. A
TV106	<i>C. parvum</i>	1.00 E-175	99,71 %	MK034695.1	99,71 %	JF727756.1

(JF727756.1 *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA17G2R1 glycoprotein 60 gene, partial cds).

5.6.1. Análisis filogenético *gp60*

El árbol se construyó incluyendo secuencias de varias regiones geográficas: a) de Colombia publicadas por Uran-Velásquez *et al.* (32) y Avendaño *et al.* (91); b) dos secuencias humanas de Estados Unidos reportadas por Herges *et al.* (95); c) una secuencia de bovino identificada en Francia por Hoque *et al.* (96); d) una secuencia de vegetal reportada en Inglaterra (97); e) una secuencia de Toledo *et al.* (92) de bovino en Brasil; f) secuencias de Yasur-Landau, *et al.* (98) obtenidas de bovinos en Israel. Adicionalmente, una secuencia del gen *gp60* de *C. hominis* se incluyó como outgroup (Figura 17).

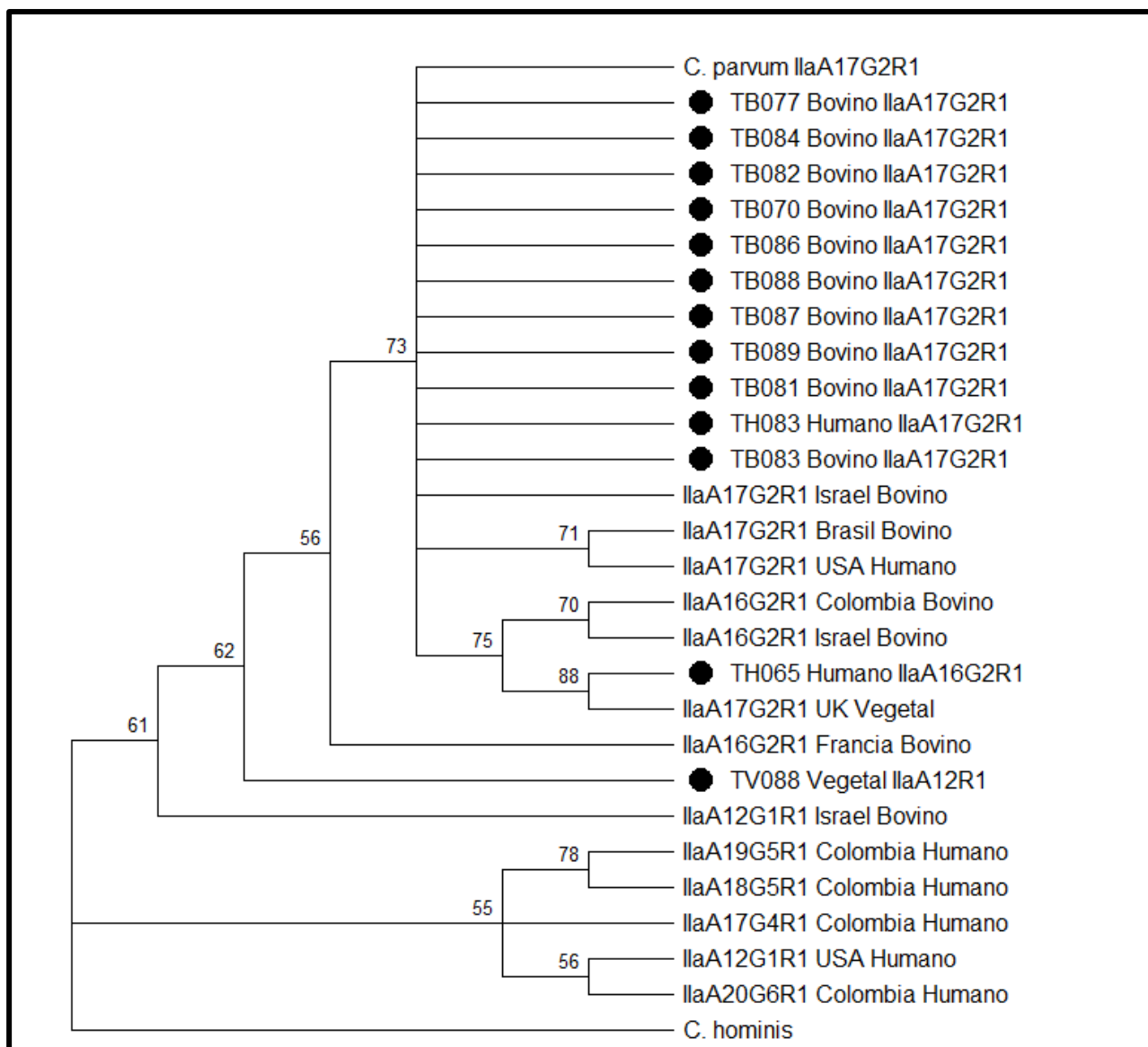


Figura 17 Árbol filogenético de subtipos para el marcador *gp60*. Árbol de máxima verosimilitud realizado con el modelo Hasegawa–Kishino–Yano y 1000 repeticiones. Las secuencias de este estudio se denotan como: TH = humano, TV = vegetal, TB = bovino y se representan con un punto previo al nombre. Secuencias de referencia: *C. parvum* IlaA17G2R1 (JF727756.1). Outgroup: *C. hominis* (CHUDEA6_1080).

Dos de las secuencias TH040 y TV106 del estudio tuvieron que ser removidas debido a que su tamaño era muy pequeño en comparación al resto de las secuencias. El árbol filogenético muestra un clado que agrupa las secuencias de Uran-Velasquez *et al.* junto con una de Herges *et al.*, a pesar de pertenecer a diferentes subtipos. Se observa un clado de *C. parvum* subtipo IlaA17G2R1 que incluye todas las secuencias de bovinos y un aislado humano correspondientes a este subtipo con un respaldo estadístico aceptable

(>70%). Adicionalmente, la secuencia humana del subtipo IlaA16G2R1 y la muestra vegetal del subtipo IlaA12R1 se encuentran segregadas.

5.6.2. Análisis de haplotipos y diversidad genética *gp60*

La diversidad molecular básica de cada población con base en el gen *gp60* se presenta en la tabla 21.

Tabla 21 Diversidad molecular por poblaciones *gp60*

Población	N (secuencias)	Sitios analizados*	Sitios polimórficos (S)	Diferencias promedio (k)	Diversidad nucleotídica (π)	Theta-W por sitio (θ_w)
Vegetal	2	293	3	3,000	0,01024	0,01024
Humano	3	291	15	13,333	0,01694	0,01694
Bovino	10	770	2	0,722	0,00085	0,00086
Total	15	291	20	3,498	0,00408	0,00747

* Sitios analizados excluyendo posiciones con gaps o datos faltantes.

Se identificaron diferentes niveles de variabilidad genética entre las poblaciones. Los vegetales presentaron tres sitios polimórficos y una diversidad nucleotídica de 0,01024. En los humanos se observó una mayor variabilidad, con 15 sitios polimórficos, un promedio de 13,333 diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias y una diversidad nucleotídica de 0,01694. Por último, en los bovinos, la variabilidad genética fue baja, con solo dos sitios polimórficos, una diversidad nucleotídica de 0,00085 y diferencias promedio de 0,722. Es de resaltar que puede haber un sesgo en los resultados de vegetales y humanos debido al bajo número de muestras.

La estructura genética entre las poblaciones humanas, bovinas y vegetales se evaluó mediante un AMOVA basado en las secuencias del gen *gp60* (Tabla 22).

Tabla 22 Resultados del AMOVA del gen *gp60*

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componente de varianza	% de variación
Entre poblaciones	2	314,033	Va = 28,16295	35,19 %
Dentro de poblaciones	12	622,500	Vb = 51,87500	64,81 %

Total	14	936,533	80,03795	100 %
--------------	-----------	----------------	-----------------	--------------

*Índice de fijación (F_{ST}): 0,35187. Prueba de significancia (1023 permutaciones): $P = 0,03910 \pm 0,00565$

En el análisis de varianza molecular para el *gp60* se identificó un mayor porcentaje (64,81 %) de variación dentro de las poblaciones. El F_{ST} (0,351) indicó un nivel alto de diferenciación genética, además de un valor p significativo (0,039), lo cual sugiere una estructuración genética asociada a la fuente u al hospedero, aunque sigue siendo limitada por el tamaño muestral.

Los resultados de las pruebas de neutralidad empleadas para evaluar los procesos evolutivos del conjunto de poblaciones con secuencias para el *gp60* se presentan en la tabla 23.

Tabla 23 Pruebas de neutralidad en las muestras del *gp60*

Fu & Li D*	Fu & Li F*	Significancia	Fu's Fs	Tajima's D
-2.769	-2.963	$P < 0.02$	-1.361	0.000 ($P = 1.000$)

Las pruebas de neutralidad basadas en Fu y Li (D y F*) mostraron valores negativos y estadísticamente significativos ($P < 0.02$), lo que sugiere un exceso de mutaciones raras compatible con procesos de expansión poblacional reciente. En contraste, las pruebas de Tajima's D y Fu's Fs no resultaron significativas, probablemente debido al bajo tamaño muestral y al reducido número de sitios polimórficos.

No se pudo realizar un análisis extensivo de haplotipos debido al bajo número de muestras. Se identificaron en el *gp60* un total de 5 haplotipos, todas las secuencias de bovinos (10) y una de las muestras de humano fueron clasificadas como un mismo haplotipo (haplotipo 3) y las otras cuatro muestras (dos de humanos y dos de vegetales) conformaron haplotipos individuales. Lo que sugiere una separación entre las distintas poblaciones. La frecuencia y distribución de las secuencias se observa en la tabla 24.

Tabla 24 Frecuencia y distribución de las secuencias de las diferentes fuentes en el gen *gp60* en los haplotipos descritos.

Haplotipos	Vegetal (2)	Humano (3)	Bovino (10)
-------------------	--------------------	-------------------	--------------------

	Frecuencia	Cantidad	Frecuencia	Cantidad	Frecuencia	Cantidad
Hap_1	0,5	1				
Hap_2	0,5	1				
Hap_3			0,33	1	1	10
Hap_4			0,33	1		
Hap_5			0,33	1		

6. DISCUSIÓN

Cryptosporidium es uno de los agentes causantes de enfermedades gastrointestinales que afecta tanto a personas inmunocomprometidas como a personas inmunocompetentes (19). En la población infantil se le atribuyen aproximadamente 1.300 muertes diarias a nivel mundial en menores de 5 años (99). Este protozoo tiene la capacidad de infectar a un gran número de hospederos y permanecer en reservorios silvestres y domésticos. Especies zoonóticas como *C. parvum* pueden infectar a perros, gatos, bovinos y humanos (50). Teniendo en cuenta los hallazgos de una investigación previa, en este trabajo se han identificado, a nivel molecular, las especies y genotipos circulantes de *Cryptosporidium* en diferentes fuentes potenciales de transmisión. La importancia de establecer una estrategia de “una sola salud” para el manejo del riesgo de transmisión se evidencia en un número creciente de estudios que analizan los aislados de *Cryptosporidium* en hospederos y reservorios (Tabla 25).

Tabla 25 Estudios a nivel mundial sobre *Cryptosporidium* y sus diferentes fuentes de transmisión.

Año	Autores	Lugar	Hospederos y/o reservorios	Técnicas para identificación	Especies identificadas	Referencia
2022	Watier-Grillot <i>et al.</i>	Francia	Humanos, agua	Microscopia, PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>C. hominis</i> IbA10G2	(100)
2022	Ahlinder <i>et al.</i>	Suecia	Humanos, vegetales	PCR	<i>C. parvum</i> IIdA24G1	(101)
2023	Mensah <i>et al.</i>	Ghana/África	Bovinos, agua	Microscopia, PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(102)
2023	Terfa & Getushe	Etiopía	Terneros, humanos	Microscopia	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(103)
2023	Coelho <i>et al.</i>	São Paulo/Brasil	Niños, perros, gatos	ELISA, PCR	<i>C. canis</i> , <i>C. parvum</i>	(104)
2025	Maxamhud <i>et al.</i>	Argelia	Humanos, animales de	PCR	<i>C. parvum</i> , <i>C. bovis</i>	(105)

			campo*, agua, suelo			
2024	Tipu <i>et al.</i>	Noruega	Humanos, bovinos, perros, ovejas	PCR Inmunofluorescencia	<i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i> , <i>C. mortiferum</i>	(106)
2025	Awisan <i>et al.</i>	Filipinas	Humanos, ganado, mascotas, agua	PCR y microscopia	<i>C. parvum</i>	(107)
2025	Maxamhud <i>et al.</i>	Bangladesh	Humanos, animales, suelo	PCR	<i>C. parvum</i> , <i>C. bovis</i> , <i>C. baileyi</i>	(108)
2025	Al-Adilee, <i>et al.</i>	Iraq	Humanos, Ganado, agua, suelo	qPCR, PCR y microscopía	<i>C. parvum</i> , <i>C. ubiquitum</i>	(109)
2026	Rai & Ghimire	Nepal	Humanos, bovinos, perros, cerdos	Microscopia	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(110)
Estudios en Colombia						
2019	Villamizar, <i>et al</i>	Cauca, Colombia	Niños, mascotas	qPCR, PCR y microscopia	<i>C. parvum</i> , <i>C. hominis</i>	(30)
2023	Potes-Morales & Crespo-Ortiz	Cali, Colombia	Humanos, mascotas	Microscopia, PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(12)
2024	Castañeda <i>et al.</i>	Cauca, Colombia	Humanos, mascotas, agua	qPCR, PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(65)
2024	Santos <i>et al.</i>	Bogotá, Colombia	Vegetales, agua	Microscopia, qPCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(111)
2025	Roncancio-Duque <i>et al.</i>	Colombia	Perros, bovinos	Microscopia, PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp., <i>C. parvum</i>	(112)

*Animales de campo: ganado, ovejas, cabras, pollos y pavos.

En el presente trabajo, el 98 % de los aislados analizados correspondían a *C. parvum*, y un aislado bovino identificado como *C. bovis*. *C. parvum* es la especie más común al ser zoonótica y transmitirse a una gran variedad de hospederos mediante distintas rutas de transmisión (113). El predominio de *C. parvum* se ha observado en diferentes estudios a

nivel mundial con frecuencias entre 2 % y 21,9 %, dependiendo del hospedero o reservorio (101,104–109). Se reportaron frecuencias de 18,58 % en animales de compañía, 21,9 % en ganado vacuno y 17 % en vegetales. Estudios en Latinoamérica reportan 19,9 % en ganado siendo una de las especies más comunes y con mayor distribución geográfica (7).

En Colombia se han reportado frecuencias de *C. parvum* del 28,6 % en humanos y 16,43 % en bovinos. Aunque, *C. hominis* suele ser la especie más prevalente en humanos según la mayoría de los estudios, este trabajo identificó solo *C. parvum* en muestras humanas. En ganado bovino, tanto en Colombia como en esta investigación, *C. parvum* se confirma como la especie más común (30,32,91).

Se detectó un caso de *C. bovis*. Esta especie predomina en bovinos especialmente entre las 3 a 9 semanas de edad (114), se ha encontrado una alta prevalencia en especial en Asia (115). En Latinoamérica se ha documentado principalmente en bovinos en Brasil (7) y también se ha reportado en la literatura un caso de dos bovinos con *C. bovis* en la zona central de Colombia (Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Meta) (91).

En el análisis filogenético del 18S *rRNA* se identificó una alta homogeneidad genética entre la mayoría de las muestras. La falta de una mayor discriminación puede estar relacionada con la conservación del gen dificultando una mayor diferenciación (60,116). Sin embargo, la ausencia de segregación según el hospedero y la presencia de subclados con alto respaldo estadístico que agrupan múltiples hospederos validan la transmisión zoonótica y ambiental. La similitud de las secuencias del trabajo con referencias de Brasil, Argentina y la secuencia de bovino en Colombia (91–93), es acorde con los reportes en Latinoamérica de una amplia distribución de la especie además de ser consistente con su carácter zoonótico (7). No obstante, también se visualizaron diferencias con las secuencias de Uran-Velanzquez, *et al.* (32) provenientes de niños escolares de las provincias de Antioquia y Santander, formando un clado separado de las muestras de este estudio. Esto refleja una diferencia entre las cepas que circulan en Cali y en lugares aledaños, y otras regiones de Colombia.

Los resultados del AMOVA indican que las muestras no presentan una diferenciación genética marcada según el hospedero. Esto concuerda con los resultados del árbol filogenético, donde no se observa una separación clara de las secuencias según su origen,

y sugiere la circulación de cepas relacionadas entre humanos, animales y vegetales (117,118).

Los análisis de neutralidad indicaron que las poblaciones humanas, vegetales y bovinas presentan patrones compatibles con procesos demográficos recientes, como expansiones poblacionales o desviaciones del equilibrio neutral. Este comportamiento es coherente con la alta frecuencia de un subtipo dominante observada en el estudio, lo que sugiere la distribución de un linaje asociado a una fuente común o a una dinámica de transmisión activa entre hospederos y el ambiente. Mientras que la población de mascotas, que presentó la mayor diversidad nucleotídica, mostró un patrón de evolución compatible con la neutralidad (88), lo que podría indicar una dinámica poblacional más estable o menos influenciada por eventos recientes de expansión.

La estructura observada en la red de haplotipos complementa estos hallazgos al mostrar un haplotipo central compartido por un alto número de muestras provenientes de diferentes poblaciones, lo que sugiere un linaje común y una distribución uniforme, sin diferenciación entre las poblaciones, y coincide con la baja diferenciación detectada por el AMOVA y con la topología del árbol filogenético. Se encontró un grupo de haplotipos estrechamente relacionados entre sí, separados del haplotipo central por múltiples mutaciones. Esta agrupación podría ser una subpoblación, pero se requieren estudios poblacionales adicionales y análisis con más marcadores o secuenciación del genoma completo para confirmar esta hipótesis (32,119).

En este estudio no se encontró *C. hominis*. Esta especie es considerada virulenta en humanos y está asociada con la transmisión antroponótica detectada a nivel mundial, principalmente en brotes relacionados alimentos o fuentes hídricas contaminadas (30,32,100,106,120). El predominio de *C. parvum* es inherente a su potencial zoonótico y la capacidad de transmitirse entre una gran cantidad de hospederos, como se ha observado en varios estudios enfocados en “una sola salud” (104,105,107,110), incluyendo el presente. Los resultados obtenidos aportan evidencia relevante sobre la dinámica de circulación de *C. parvum* en el contexto evaluado y sobre su importancia desde un enfoque de “una sola salud”.

Se realizó el mismo análisis con el gen *gp60* para determinar con mayor profundidad la relación entre las diferentes fuentes (100). En las muestras analizadas, en el 86,6 % se encontró el subtipo *C. parvum* IlaA17G2R1. Este linaje es zoonótico y se ha reportado en distintas partes del mundo. En Alemania, donde se identificó en bovinos de 4 fincas en Sajonia (121), en pacientes en Irán (122) y en Canadá, siendo el segundo subtipo más frecuente en pacientes humanos, incluyendo un paciente que adquirió el parásito en un viaje a Taiwán (123). También ha habido reportes en Suramérica, específicamente en bovinos en países como Uruguay (124) y Brasil (92). Aunque este subtipo no se considera altamente virulento, sus reportes en diferentes hospederos respaldan su potencial zoonótico (105,125).

En Colombia se han encontrado diferentes subtipos de *C. parvum* como IlaA5G3c, en humanos y IlaA15G2R1, IlaA16G2R1, IlaA17G4R1, IlaA18G5R1, IlaA19G6R1, IlaA20G5R1, IlaA20G6R1, IlaA20G7R1 en bovinos y humanos (32,126). Este sería el primer reporte de *C. parvum* IlaA17G2R1 en humanos, bovinos y vegetales en Cali y en Colombia. En este contexto, detectar su circulación entre las diferentes muestras sugiere la circulación de una misma cepa en el entorno.

Dos muestras fueron identificadas como subtipos diferentes; una de origen humano fue clasificada como *C. parvum* IlaA16G2R1 del cual se han realizado diferentes reportes a nivel mundial. Este subtipo se ha observado en fincas de bovinos en Israel (98) y Francia (127); también se ha reportado en humanos en Suecia durante un brote por contaminación de alimentos, donde la posible fuente de infección fue una ensalada (128). En Colombia, solo se ha reportado en bovinos (91) y en este estudio se observa por primera vez, este subtipo, en humanos.

Una muestra de vegetal fue identificada como *C. parvum* IlaA12R1. A pesar de que se han reportado a nivel mundial subtipos cercanos como IlaA12G3R1 (120), y IlaA12G1R1 hasta el momento el subtipo *C. parvum* IlaA12R1 no ha sido reportado en la literatura, este sería la primera observación de este subtipo a nivel mundial.

En el análisis del gen *gp60* el predominio del subtipo IlaA17G2R1 en las muestras (a pesar de su limitado número) sugieren una expansión regional de este linaje, posiblemente debido a una transmisión bovino-humano en el área. En el árbol filogenético, se observó

homogeneidad entre las secuencias pertenecientes al mismo subtipo (IIaA17G2R1) y su respectiva secuencia de referencia, lo que confirma la consistencia de la clasificación molecular y sugiere estabilidad genética dentro de este subtipo. De manera similar, otro clado está conformado principalmente por secuencias del subtipo IIaA16G2R1, aunque las secuencias son de diferentes hospederos. Esta agrupación sugiere una estrecha relación genética entre aislamientos zoonóticos y ambientales, lo que respalda la hipótesis de transmisión cruzada entre animales, humanos y vegetales. Por otro lado, la posición independiente de la muestra vegetal correspondiente al subtipo IIaA12R1 podría indicar una introducción desde una fuente distinta o un evento puntual de contaminación ambiental. La presencia de este subtipo en un vegetal resalta la importancia de las vías indirectas de transmisión, particularmente a través de agua o alimentos contaminados, y refuerza la necesidad de considerar el componente ambiental dentro del análisis epidemiológico (129).

En el análisis de variabilidad del gen *gp60*, la variación se distribuye principalmente entre poblaciones, a diferencia de lo observado para el gen *18S rRNA*, donde la variación se concentró principalmente dentro de las poblaciones. Esta diferencia es posible dado el carácter altamente polimórfico del gen *gp60* (60).

Debido a la cantidad limitada de secuencias del gen *gp60* obtenidas, no fue posible realizar un análisis completo de haplotipos. Sin embargo, se observó que todas las secuencias bovinas, junto con una de origen humano, forman un único haplotipo asociado a un mismo subtipo, lo que indica una circulación compartida de este linaje entre bovinos y humanos. En contraste, las secuencias restantes de humanos y vegetales formaron haplotipos distintos, indicando la presencia de variantes genéticas adicionales que coexisten con la cepa principal, lo que podría asociarse a eventos de transmisión o exposición a diferentes fuentes independientes (129,130).

Al igual que lo observado por otros autores, la PCR anidada, aunque es la herramienta molecular más utilizada para el análisis de *Cryptosporidium*, es técnicamente compleja (30,102,106,131,132). Por lo que se hace necesario buscar la combinación de cebadores más adecuada para obtener resultados óptimos, lo que es atribuido a la variabilidad del gen particularmente en el caso de la proteína gp60 (60). En el presente estudio, la situación

no fue diferente y se pudo observar que los cebadores no funcionan con la misma efectividad en muestras de diferentes fuentes. Así la PCR anidada presentó una mayor eficiencia en muestras de bovinos, tanto para la identificación de especie como en la tipificación basada en el gen *gp60*. Lo anterior puede atribuirse a que el ganado es el reservorio natural del *Cryptosporidium* y en el caso de muestras positivas, generalmente el número de ooquistes es alto (133). Adicionalmente, es probable que la presencia de sustancias interferentes o inhibidores sea menor en este hospedero. Los estudios filogenéticos indican que los aislados son más homogéneos, lo que brinda consistencia a la PCR anidada.

En el caso de muestras de humanos y mascotas, el rendimiento de la PCR fue menor. La variabilidad en la dieta y hábitos puede favorecer la presencia de inhibidores. Asimismo, la cantidad de ooquistes en muestras humanas y de mascotas se asume que es muy baja dado que fueron negativos en la tinción de Kinyoun, lo cual puede afectar la sensibilidad de las pruebas. Todo esto en adición a la variabilidad genética del *Cryptosporidium* en estos grupos hace que se deban considerar cebadores y protocolos modificados para este tipo de muestras.

En los vegetales, a pesar de que se evidenció un nivel de contaminación moderado y en algunos casos alto (>100 ooquistes/g), representan un tipo de muestra particularmente difícil de procesar. Las plantas tienen una gran cantidad de pigmentos y metabolitos inhibidores que dificultan la extracción del ADN y la amplificación (134). Aunque para la extracción de ADN se utilizó un pretratamiento y un kit comercial de extracción de alta eficiencia, la compleja estructura de la pared hace difícil su degradación, lo que impide una mayor recuperación del ADN (135). Un aspecto relevante al realizar estudios de “una sola salud” para *Cryptosporidium* es la necesidad de estandarizar protocolos ajustados al tipo de muestras según la fuente. Por otra parte, el grado de variabilidad genética de *Cryptosporidium* en reservorios y hospederos puede influir el rendimiento de técnicas moleculares como el PCR, por ejemplo, en el estudio de Tipu *et al.*, (106) donde se logró la identificación de especies en el 81 % de las muestras de animales en comparación con los humanos que logro la secuenciación en el 65,3 % de las muestras (106).

En relación con el análisis de subtipos, aunque el gen *gp60* es el más utilizado en la subtipificación, se han reportado diversas limitaciones asociadas a su uso. Entre ellas, la sensibilidad variable de la PCR y la elevada variabilidad genética del marcador que puede provocar variaciones en los puntos de unión de los cebadores, lo que dificulta la amplificación del producto esperado (60). Estas limitaciones se evidenciaron en el presente estudio, donde se observó un bajo rendimiento en la amplificación de *gp60*, así como problemas de inespecificidad. Algunas de las secuencias obtenidas correspondieron a productos inespecíficos o a bacterias, mientras que en otros casos se detectaron amplicones con múltiples bandas inespecíficas. A pesar de los procesos de purificación, esto se tradujo en secuencias de baja calidad. En conjunto, estas dificultades restringieron el número de muestras que pudieron ser subtipificadas y generaron una representación desigual entre las diferentes fuentes analizadas.

No obstante, la identificación de este protozoo más allá del género es importante para la vigilancia y control de brotes. Determinar las fuentes de transmisión requieren al menos de la tipificación a nivel de especie (60). Con el fin de superar las dificultades asociadas a la amplificación del gen *gp60*, Robinson *et al.*, (136), desarrollaron una combinación optimizada de cebadores que permite la detección de subtipos mediante qPCR, sin necesidad de realizar PCR anidada, que ya está siendo utilizada en clínicas en Inglaterra y Gales. Este protocolo representa una alternativa prometedora para estudios futuros y para la vigilancia molecular y de transmisión de *Cryptosporidium* (60).

Para lograr una mejor caracterización de las cepas circulantes e identificar con mayor certeza las posibles rutas de transmisión, se ha recomendado el uso de más de un marcador molecular utilizando herramientas como el MLST o incluso la secuenciación del genoma completo (32,118). En este sentido, los patrones observados en el presente estudio permiten sugerir posibles dinámicas de transmisión entre las diferentes fuentes analizadas, las cuales podrían ser confirmadas y caracterizadas con mayor precisión mediante el uso de estas herramientas de mayor resolución. Aunque estas estrategias implican mayores costos, permitirían no solo una caracterización más robusta, sino también mejorar la detección de infecciones mixtas y profundizar en la comprensión de la estructura poblacional del parásito (137)

El conocimiento de las rutas de transmisión permite elaborar directrices para su control. En este estudio se revisaron variables que pueden aumentar la exposición a fuentes contaminadas. Un alto porcentaje de los voluntarios humanos había informado participar en actividades acuáticas recreativas (69,6 %), como paseos a ríos, piscinas, playas o lagos, así como en caminatas ecológicas (52,2 %) y viajes (65,2 %). En relación con esto, la frecuencia de *Cryptosporidium* en las fuentes de transmisión se ha reportado hasta en un 77 % principalmente en brotes relacionados con actividades acuáticas recreativas (59,129).

Considerando otras posibles fuentes de exposición en humanos, el 80 % de los voluntarios reportó un consumo habitual de agua de grifo. El agua de Cali es potable y apta para el consumo. No obstante, se han realizado estudios sobre el riesgo microbiano del agua en Colombia, en los que se estimó un riesgo de enfermedad sintomática por *Cryptosporidium* asociado al consumo de agua tratada del 3,6 % (138), lo que refleja la elevada resistencia de los ooquistes a los procesos de tratamiento.

En relación con las mascotas, es relevante que todas las muestras correspondieron a *C. parvum*, lo que resalta el papel de los animales de compañía como parte de la dinámica de transmisión, no solo hacia humanos, sino también hacia otros animales y el ambiente, especialmente considerando su permanencia en exteriores (139). Mukbel *et al.* (76) encontró *C. canis* y *C. parvum* en perros callejeros y domésticos. Estos autores afirman que las mascotas generalmente son asintomáticas, tienen mayor susceptibilidad a infecciones y se infectan con *C. parvum* posiblemente por su cohabitación con otros animales y humanos.

En los vegetales, también se identificó *C. parvum*, particularmente un subtipo detectado en humanos, IIaA17G2R1. Aunque la mayoría de los voluntarios humanos (87 %) reportó lavar los vegetales antes de su consumo, los resultados indican que los vegetales son una fuente de transmisión. Por lo que, no solo es relevante el lavado, sino realizarlo en condiciones que permitan la eliminación de parásitos como el *Cryptosporidium*. Se ha reportado que el uso de agua caliente (>70°C) durante el proceso de lavado por al menos 1 minuto puede funcionar como una medida adicional para reducir la viabilidad del parásito (140). El lavado debe realizarse de manera consistente, independientemente del origen

del vegetal (mercado, tienda o supermercado). Aunque la mayoría de los voluntarios (56,5 %) compra vegetales en supermercados, dos de las muestras identificadas con nivel de contaminación moderado y alto provenían de cadenas de supermercados reconocidas.

Las medidas preventivas para disminuir el riesgo de exposición indirecta incluyen el lavado adecuado de manos, la limpieza y desinfección de superficies y objetos antes, durante y después de la exposición a ambientes recreativos o viajes, junto con el consumo de agua hervida, especialmente en contextos donde no se puede garantizar su calidad y tratamiento (141). Existen algunos desinfectantes contra los ooquistes de *Cryptosporidium*, incluyendo aquellos basados en dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno y amoníaco, siendo el ozono uno de los más efectivos, especialmente en sistemas acuáticos (45). Igualmente, es recomendable mantener precaución en el consumo de alimentos crudos o no pasteurizados, así como en el manejo de vegetales frescos, y su lavado con agua potable o hervida (50).

Finalmente, los resultados obtenidos refuerzan la importancia de continuar con estudios integrados que permitan comprender las rutas de transmisión de *Cryptosporidium* entre humanos, animales y el ambiente. En el contexto local, se encuentra limitada la literatura sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* en Cali, lo que dificulta estimar el riesgo en su totalidad. En la población universitaria evaluada en el estudio de Potes-Morales & Crespo-Ortiz (12), se identificó una prevalencia del 24,5 %, considerada elevada, y todas las muestras secuenciadas a partir de este estudio correspondieron a la misma especie, con dos muestras del mismo subtipo, lo que puede sugerir la circulación de una cepa en una población con alta susceptibilidad. Estos hallazgos, en conjunto con los resultados del presente estudio, evidencian que la criptosporidiosis podría estar subestimada en adultos jóvenes aparentemente sanos (12).

Por lo anterior, resulta fundamental el uso rutinario de herramientas moleculares que permitan identificar especies y subtipos circulantes, así como ampliar los estudios hacia poblaciones animales y fuentes ambientales, incluyendo alimentos de consumo fresco. La integración de estos componentes bajo un enfoque de “una sola salud” permitirá comprender mejor los ciclos de transmisión, estimar el impacto real del parásito en la región y diseñar estrategias de prevención y control con base a este.

7. CONCLUSIONES

- El 98% de las muestras analizadas se identificaron como *C. parvum* siendo el subtipo IIaA17G2R1 el más frecuente (86,6 %).
- El porcentaje de muestras que se lograron secuenciar varió según el hospedero y/o reservorio, evidenciando que la efectividad de la PCR anidada es depende del origen de la muestra (bovinos > humanos > mascotas > vegetales); por lo que, debe estandarizarse para cada caso de ser necesario.
- En este estudio se observó por primera vez el subtipo IIaA17G2R1 en humanos, bovinos y vegetales; y el subtipo IIaA16G2R1 en humanos en Cali y en Colombia.
- Se realizó la primera detección del subtipo *C. parvum* IIaA12R1, ampliando la diversidad genética conocida de *Cryptosporidium*. Estos hallazgos revelan la circulación de variantes adicionales al subtipo predominante, aportando información para la vigilancia molecular.
- El elevado porcentaje de *C. parvum* en las muestras junto con la homogeneidad del subtipo IIaA17G2R1 sugiere la circulación de un mismo linaje entre los hospederos y refuerza la necesidad de abordar la criptosporidiosis desde un enfoque integral inherente al humano, los animales y el medio ambiente, así como sus interacciones.

RECOMENDACIONES

- Dado el bajo rendimiento observado en la amplificación del gen *gp60* y la imposibilidad de caracterizar algunas fuentes, se recomienda implementar el nuevo protocolo sugerido para el gen *gp60* para tipificar un mayor número de muestras y poder tener una representación más equilibrada entre las poblaciones analizadas para estudiar mejor las dinámicas de transmisión entre las diferentes fuentes
- Teniendo en cuenta la alta carga de *Cryptosporidium* detectada en vegetales y su posible relación con fuentes de contaminación ambiental, se considera relevante la adición de muestras de agua al conjunto de hospederos y reservorios evaluados por su alta capacidad como fuente de transmisión
- Considerando la posibilidad de estructuración poblacional observados, se sugiere realizar estudios utilizando marcadores adicionales (MLST) o secuenciación de genoma completo, que permitan profundizar en la estructura poblacional del parásito y confirmar la posible existencia de subpoblaciones o linajes emergentes
- Partiendo de que se encontró una posible circulación de un mismo linaje y transmisión zoonótica. Es necesario establecer programas de vigilancia epidemiológica en las poblaciones vulnerables con el fin de detectar oportunamente la circulación de subtipos zoonóticos

BIBLIOGRAFÍA

1. Di Genova BM, Tonelli RR. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. *Front Microbiol.* Frontiers Media S.A.; 2016. p. 256. doi:10.3389/fmicb.2016.00256
2. Wattano S, Kerdpunya K, Keawphanuk P, Hunnangkul S, Loimak S, Tungtrongchitra A, et al. An epidemiological survey of intestinal parasitic infection and the socioeconomic status of the ethnic minority people of Moken and Orang Laut. *Trop Med Infect Dis.* 2023 Mar 6;8(3):161. doi:10.3390/TROPICALMED8030161
3. Wang XX, Wang XX, Cao J. Environmental factors associated with *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Pathogens.* 2023 Mar 7;12(3):420. doi:10.3390/pathogens12030420
4. Giraldo-Ospina B, Ramírez-Hoyos LS, Henao-Nieto DE, Flórez-Salazar M, Parra-Londoño F, Gómez-Giraldo EL, et al. Estimación de la prevalencia de parásitos intestinales en niños de dos comunidades colombianas. *Biosalud.* 2015;14(2):19–28. doi:10.17151/biosa.2015.14.2.3
5. Pazmiño FA, Mora-Salamanca AF, Mahecha BSP, Moreno EJP, Olivera MJ, Ospina AK, et al. Prevalence of intestinal parasitism in preschool and school children in Colombia: Systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health;* 2022 p. 781–94. doi:10.1111/tmi.13800
6. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 2017;33(7):561–76. doi:10.1016/j.pt.2017.02.006
7. Nakashima FT, Fonseca ABM, Coelho LF de O, Barbosa A da S, Bastos OMP, Uchôa CMA. *Cryptosporidium* species in non-human animal species in Latin America: Systematic review and meta-analysis. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2022 Apr 17;29(8):100690. doi:10.1016/j.vprsr.2022.100690
8. Costa D, Razakandrainibe R, Basmaciyan L, Raibaut J, Delaunay P, Morio F, et al. A summary of cryptosporidiosis outbreaks reported in France and overseas departments, 2017–2020. *Food Waterborne Parasitol.* 2022 Jun 1;27:e00160. doi:10.1016/J.FAWPAR.2022.E00160
9. Kantor M, Abrantes A, Estevez A, Schiller A, Torrent J, Gascon J, et al. *Entamoeba Histolytica*: Updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018. doi:10.1155/2018/4601420
10. O’Leary JK, Sleator RD, Lucey B. *Cryptosporidium* spp. diagnosis and research in the 21st century. *Food Waterborne Parasitol.* Elsevier; 2021. p. 15. doi:10.1016/j.fawpar.2021.e00131

11. Khalil IA, Troeger C, Rao PC, Blacker BF, Brown A, Brewer TG, et al. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study. *Lancet Glob Health*. 2018 Jul 1;6(7):e758–68. doi:10.1016/S2214-109X(18)30283-3
12. Potes-Morales C, Crespo-Ortiz MDP. Molecular diagnosis of intestinal protozoa in young adults and their pets in Colombia, South America. El-Ashram S, editor. *PLoS One*. 2023 May 23;18(5):e0283824. doi:10.1371/journal.pone.0283824
13. Dong S, Yang Y, Wang Y, Yang D, Yang Y, Shi Y, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in the global population: A systematic review and meta-analysis. *Acta Parasitol*. 2020 Dec 1;65(4):882–9. doi:10.2478/S11686-020-00230-1
14. Jann HW, Cabral-Castro MJ, Costa JVB, Alencar ACM de B, Peralta JM, Peralta RHS. Prevalence of human cryptosporidiosis in the Americas: systematic review and meta-analysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2022;64(September):1–12. doi:10.1590/S1678-9946202264070
15. Higuera A, Villamizar X, Herrera G, Giraldo JC, Vasquez-A LR, Urbano P, et al. Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ*. 2020 Mar 9;2020(3):1–26. doi:10.7717/peerj.8554
16. Bryan PE, Romero M, Sánchez M, Torres G, Gómez W, Restrepo M, et al. Urban versus rural prevalence of intestinal parasites using multi-parallel qPCR in Colombia. *J Trop Med Hyg*. 2021 Mar 1;104(3):907–9. doi:10.4269/ajtmh.20-1202
17. Jex AR, Tyler KM. American variants of *Cryptosporidium hominis*: Over-sexed and over here? *Cell Host Microbe*. 2023;31(1):5–7. doi:10.1016/j.chom.2022.12.012
18. Abd El-Latif N, Kandil N, Shamseya M, Elwany Y, Ibrahim H. Role of *Cryptosporidium* spp in development of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023 Feb 1;24(2):667–74. doi:10.31557/APJCP.2023.24.2.667
19. Ryan U, Zahedi A, Paparini A. *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunol*. 2016 Sep 1;38(9):535–47. doi:10.1111/PIM.12350
20. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(SUPPL.1):20–5. doi:10.1016/S0213-005X(13)70110-1
21. Ahmed M. Intestinal parasitic infections in 2023. *Gastroenterology Res*. 2023 Jun;16(3):127. doi:10.14740/GR1622

22. Theel ES, Pritt BS. Parasites. Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, Tang YW, editors. Microbiol Spectr. 2016 Aug 12;4(4). doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015
23. Parrales Toala JA, Pilco Romero TJ, Pin Guerra AI, Durán Pincay YE. Estudio de la prevalencia de la parasitosis intestinal a nivel de Latinoamérica. MQRInvestigar. 2022 Sep 2;6(3):1373–95. doi:10.56048/MQR20225.6.3.2022.1373-1395
24. Haque R. Human intestinal parasites. J Health Popul Nutr. 2007 Dec;25(4):387
25. Luka G, Samiei E, Tasnim N, Dalili A, Najjaraan H, Hoorfar M. Comprehensive review of conventional and state-of-the-art detection methods of *Cryptosporidium*. J Hazard Mater. 2022 Jan 5;421:126714. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2021.126714
26. Gilbert IH, Vinayak S, Striepen B, Manjunatha UH, Khalil IA, Van Voorhis WC. Safe and effective treatments are needed for cryptosporidiosis, a truly neglected tropical disease. BMJ Glob Health. 2023 Aug 4;8(8):e012540. doi:10.1136/BMJGH-2023-012540
27. Hayes L, Robinson G, Chalmers RM, Ormerod SJ, Paziowska-Harris A, Chadwick EA, et al. The occurrence and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species in freshwater biota. Parasit Vectors. 2023 Jun 21;16(1):209. doi:10.1186/s13071-023-05827-9
28. Hernández PC, Morales L, Chaparro-Olaya J, Sarmiento D, Jaramillo JF, Ordoñez GA, et al. Intestinal parasitic infections and associated factors in children of three rural schools in Colombia. A cross-sectional study. PLoS One. 2019 Jul 1;14(7):e0218681. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0218681
29. Khurana S, Gur R, Gupta N. Chronic diarrhea and parasitic infections: Diagnostic challenges. Indian J Med Microbiol. 2021 Oct 1;39(4):413–6. doi:10.1016/j.ijmmb.2021.10.001
30. Villamizar X, Higuera A, Herrera G, Vasquez-A LR, Buitron L, Muñoz LM, et al. Molecular and descriptive epidemiology of intestinal protozoan parasites of children and their pets in Cauca, Colombia: A cross-sectional study. BMC Infect Dis. 2019 Feb 26;19(1):1–11. doi:10.1186/S12879-019-3810-0
31. Cruz-Saavedra L, Arévalo VA, Garcia-Corredor D, Jiménez PA, Vega L, Pulido-Medellín M, et al. Molecular detection and characterization of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* in captive wild animals rescued from central Colombia. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2023 Dec 1;22:1–5. doi:10.1016/J.IJPPAW
32. Uran-Velasquez J, Alzate JF, Farfan-Garcia AE, Gomez-Duarte OG, Martinez-Rosado LL, Dominguez-Hernandez DD, et al. Multilocus Sequence Typing helps understand the genetic diversity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolated from Colombian patients. Gadagkar SR, editor. PLoS One. 2022 Jul 8;17(7):e0270995. doi:10.1371/journal.pone.0270995

33. Hassan EM, Örmeci B, DeRosa MC, Dixon BR, Sattar SA, Iqbal A. A review of *Cryptosporidium* spp. and their detection in water. *Water Sci Technol*. 2021 Jan 1;83(1):1–25. doi:10.2166/WST.2020.515
34. Pane S, Putignani L. *Cryptosporidium*: Still Open Scenarios. *Pathogens*. 2022 Apr 26;11(5):515. doi:10.3390/pathogens11050515
35. Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol*. 2015;45(6):367–73. doi:10.1016/j.ijpara.2015.01.009
36. Turkeltaub JA, McCarty TR, Hotez PJ. The intestinal protozoa: Emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(1):38–44. doi:10.1097/MOG.0000000000000135
37. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jan;26(1):115–34. doi:10.1128/CMR.00076-12
38. Pinto P, Ribeiro CA, Kváč M, Tsaousis AD. *Cryptosporidium*. In: Springer, Cham; 2022. p. 331–89. doi:10.1007/978-3-030-80682-8_7
39. Tetley L, Brown SMA, McDonald V, Coombs GH. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology (N Y)*. 1998;144(12):3249–55. doi:10.1099/00221287-144-12-3249
40. Bochimoto H, Kondoh D, Ishihara Y, Kabir MH Bin, Kato K. Three-dimensional fine structure of feeder organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol Int*. 2019 Dec 1;73:101958. doi:10.1016/J.PARINT.2019.101958
41. Guérin A, Striepen B. The biology of the intestinal intracellular parasite *Cryptosporidium*. *Cell Host Microbe*. 2020 Oct;28(4):509–15. doi:10.1016/j.chom.2020.09.007
42. Wiser MF. Feeding mechanisms of pathogenic protozoa with a focus on endocytosis and the digestive vacuole. *Parasitologia*. 2024 Jul 1;4(3):222–37. doi:10.3390/parasitologia4030019
43. Clode PL, Koh WH, Thompson RCA. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*?. *Trends Parasitol*. 2015 Dec 1;31(12):614–24. doi:10.1016/j.pt.2015.08.005
44. Pohlenz J, Bemrick WJ, Moon HW, Cheville NF. Bovine cryptosporidiosis: A transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host parasite relationship. *Vet Pathol*. 1978;15(3):417–27. doi:10.1177/030098587801500318
45. Helmy YA, Hafez HM. Cryptosporidiosis: From prevention to treatment, a narrative review. *Microorganisms* 2022. 2022 Dec 13;10(12):2456. doi:10.3390/MICROORGANISMS10122456

46. Chique C, Hynds PD, Andrade L, Burke L, Morris D, Ryan MP, et al. *Cryptosporidium* spp. in groundwater supplies intended for human consumption – A descriptive review of global prevalence, risk factors and knowledge gaps. *Water Res.* 2020 Jun 1;176:115726. doi:10.1016/J.WATRES.2020.115726
47. English ED, Guerin A, Tandel J, Striepen B. Live imaging of the *Cryptosporidium parvum* life cycle reveals direct development of male and female gametes from type I meronts. *PLoS Biol.* 2022 Apr 1;20(4):e3001604. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.3001604
48. Jex AR, Tonkin CJ, Ralph SA. 3, 2, 1, go! *Cryptosporidium* counts down to sex. *PLoS Biol.* 2022 May 12;20(5):e3001638. doi:10.1371/journal.pbio.3001638
49. Innes EA, Chalmers RM, Wells B, Pawlowic MC. A One Health approach to tackle cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 2020 Mar 1;36(3):290–303. doi:10.1016/j.pt.2019.12.016
50. Ali M, Ji Y, Xu C, Hina Q, Javed U, Li K. Food and waterborne cryptosporidiosis from a One Health perspective: A comprehensive review. *Animals.* 2024 Nov 14;14(22):3287. doi:10.3390/ANI14223287
51. Ali M, Xu C, Wang J, Kulyar MF e. A, Li K. Emerging therapeutic avenues against *Cryptosporidium*: A comprehensive review. *Vet Parasitol.* 2024 Oct 1;331:110279. doi:10.1016/J.VETPAR.2024.110279
52. O' Leary JK, Blake L, Corcoran GD, Sleator RD, Lucey B. A novel genotyping method for *Cryptosporidium hominis*. *Exp Parasitol.* 2021 Jun 1;225. doi:10.1016/j.exppara.2021.108113
53. Verweij JJ, Rune Stensvold C. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):371–418. doi:10.1128/CMR.00122-13
54. Stensvold CR, Nielsen HV. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):540–1. doi:10.1128/JCM.06012-11
55. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2011 Mar;49(3):918–24. doi:10.1128/JCM.01733-10
56. Dacal E, Köster PC, Carmena D. Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020;38(Supl 1):24–31. doi:10.1016/j.eimc.2020.02.005
57. Stroup SE, Roy S, Mchele J, Maro V, Ntabaguzi S, Siddique A, et al. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. *J Med Microbiol.* 2006 Sep 1;55(9):1217–22. doi:10.1099/JMM.0.46678-0

58. Paulos S, Saugar JM, de Lucio A, Fuentes I, Mateo M, Carmena D. Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis/parvum*, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. Adam RD, editor. PLoS One. 2019 Apr 8;14(4):e0215068. doi:10.1371/journal.pone.0215068
59. Chalmers RM, Robinson G, Elwin K, Elson R. Analysis of the *Cryptosporidium* spp. and *gp60* subtypes linked to human outbreaks of cryptosporidiosis in England and Wales, 2009 to 2017. Parasit Vectors. 2019 Mar 12;12(1):1–13. doi:10.1186/s13071-019-3354-6
60. Robinson G, Chalmers RM, Elwin K, Guy RA, Bessonov K, Troell K, et al. Deciphering a cryptic minefield: A guide to *Cryptosporidium gp60* subtyping. Curr Res Parasitol Vector Borne Dis. 2025;7(February):100257. doi:10.1016/j.crpvbd.2025.100257
61. Okasha H, El-Kalamawy HA, Mashaal AR, El-Wakil ES. Development and validation of qPCR assay targeting *COWP* conserved region for sensitive detection and quantification of *Cryptosporidium* infections. Vet Parasitol. 2026 Jan 1;341:110653. doi:10.1016/j.vetpar.2025.110653
62. Dąbrowska J, Sroka J, Cencek T. Investigating *Cryptosporidium* spp. Using genomic, proteomic and transcriptomic techniques: Current progress and future directions. Int J Mol Sci. 2023 Aug 16;24(16):12867. doi:10.3390/IJMS241612867
63. Bailly E, Valot S, Vincent A, Duffourd Y, Grangier N, Chevarin M, et al. Evaluation of Next-Generation Sequencing applied to *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* Epidemiological Study. Pathogens. 2022;11(8). doi:10.3390/pathogens11080938
64. Mackenzie JS, Jeggo M. The One Health Approach—Why Is It So Important? Trop Med Infect Dis. 2019 May 31;4(2):88. doi:10.3390/TROPICALMED4020088
65. Castañeda S, Acosta CP, Vasquez-A LR, Patiño LH, Mejía R, Ramírez JD. Molecular detection of intestinal parasites in a rural community of Colombia: A One Health approach to explore potential environmental–zoonotic transmission. Zoonoses Public Health. 2024 Sep 1;71(6):723–35. doi:10.1111/ZPH.13138
66. El Said Said D. Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. Alexandria J Med. 2012 Dec 1;48(4):345–52. doi:10.1016/J.AJME.2012.05.005
67. Timmermans M, Hubers W, Schroer D, Gevers K, Segers RP, Niessen R, et al. The first commercially approved efficacious *Cryptosporidium* vaccine protecting New-Born calves from severe diarrhea. Vet Vaccine. 2024 Mar 1;3(1):100054. doi:10.1016/j.vetvac.2024.100054
68. Checkley W, White AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets

for *Cryptosporidium*. Lancet Infect Dis. 2014 Jan 1;15(1):85. doi:10.1016/S1473-3099(14)70772-8

69. OMS. Quantitative Microbial Risk Assessment: Application for Water Safety Management. WHO Press [Internet]. 2016. 187 p. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/246195>
70. Srirungruang S, Mahajindawong B, Nimitpanya P, Bunkasem U, Ayuyoe P, Nuchprayoon S, et al. Comparative study of DNA extraction methods for the PCR detection of intestinal parasites in human stool samples. Diagnostics. 2022 Oct 25;12(11):2588. doi:10.3390/DIAGNOSTICS12112588
71. Bairami A, Rezaei S, Rezaeian M. Synchronous identification of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. in stool samples using a Multiplex PCR assay. Iran J Parasitol. 2018 Jan 1;13(1):24.
72. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the Small-Subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol. 1999 Apr;65(4):1578–83. doi:10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999
73. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. J Clin Microbiol. 2003 Jun 1;41(6):2744–7
74. Xiao L, Hlavsa MC, Yoder J, Ewers C, Dearen T, Yang W, et al. Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: Widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. J Clin Microbiol. 2009 Sep;47(9):3017–20. doi:10.1128/JCM.00226-09
75. Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, et al. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. Emerg Infect Dis. 2002;8(6):631–3. doi:10.3201/eid0806.010368
76. Mukbel RM, Etoom EM, Hammad HB, Enemark HL, Abu Halaweh MM. Molecular identification and genetic diversity analysis of *Cryptosporidium* spp. infecting dogs from central and northern Jordan: Detection of zoonotic genotype IId. Schallig H, editor. PLoS One. 2025 Feb 6;20(2):e0314462. doi:10.1371/journal.pone.0314462
77. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, et al. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. J Clin Microbiol. 2005 Jun;43(6):2805–9. doi:10.1128/JCM.43.6.2805-2809.2005
78. Maibach RC, Dutly F, Altwegg M. Detection of *Tropheryma whipplei* DNA in feces by PCR using a target capture method. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2466–71. doi:10.1128/JCM.40.7.2466-2471.2002

79. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul 28;9(7):671–5. doi:10.1038/nmeth.2089
80. Ewing B, Hillier LD, Wendl MC, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred I. Accuracy Assessment. *Genome Res*. 1998 Mar 1;8(3):175–85. doi:10.1101/GR.8.3.175
81. Yanta CA, Bessonov K, Robinson G, Troell K, Guy RA. CryptoGenotyper: A new bioinformatics tool for rapid *Cryptosporidium* identification. *Food Waterborne Parasitol*. 2021 Jun 1;23:e00115. doi:10.1016/J.FAWPAR.2021.E00115
81. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007 Nov;23(21):2947–8. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTM404
82. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, Tamura K. MEGA12: Molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. *Mol Biol Evol*. 2024 Dec 1;41(12). doi:10.1093/MOLBEV/MSAE263
83. Wong T, Ly-Trong N, Ren H, Baños H, Roger A, Susko E, et al. IQ-TREE 3: Phylogenomic inference software using complex evolutionary models [Internet]. *EcoEvoRxiv*; 2025. Available from: <https://ecoevorxiv.org/repository/view/8916/> doi:10.32942/X2P62N
84. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017 Jun 8;14(6):587–9. doi:10.1038/nmeth.4285
85. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol*. 2017 Dec 1;34(12):3299–302. doi:10.1093/MOLBEV/MSX248
86. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform*. 2005 Jan;1. doi:10.1177/117693430500100003
87. Doğan İ, Doğan N, Tarihi G. Statistical tests for neutrality: Review. *Türkiye Klinikleri J Biostat*. 2017;9(2):167–74. doi:10.5336/biostatic.2016-53446.
88. Leigh JW, Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*. 2015 Sep 1;6(9):1110–6. doi:10.1111/2041-210X.12410
89. May Siabato AM, Campos Gaona R, Vélez Terranova OM. Prevalencia de patógenos asociados al síndrome de diarrea neonatal bovina en el Valle del Cauca (Colombia). *Acta Agron*. 2023 Jun 30;71(3):320–6. doi:10.15446/acag.v71n3.100006

90. Avendaño C, Ramo A, Vergara-Castiblanco C, Sánchez-Acedo C, Quílez J. Genetic uniqueness of *Cryptosporidium parvum* from dairy calves in Colombia. *Parasitol Res*. 2018 May 26;117(5):1317–23. doi:10.1007/s00436-018-5818-6
91. Toledo RDS, Martins FDC, Ferreira FP, De Almeida JC, Ogawa L, Dos Santos HLEPL, et al. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *PLoS One*. 2017 Apr 1;12(4):e0175311. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0175311
92. Basset C, Steffen KD, De Felice L, Fite B, Olaizola PL, Gos ML, et al. *Cryptosporidium* spp. in adult goats from family farms in northwestern Argentina: Prevalence and epidemiological insights. *Parasitol Int*. 2026 Jun 1;112:103222. doi:10.1016/J.PARINT.2025.103222
94. Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 1992 Oct 1;132(2):619–33. doi:10.1093/genetics/132.2.619
94. Herges GR, Widmer G, Clark ME, Khan E, Giddings CW, Brewer M, et al. Evidence that *Cryptosporidium parvum* populations are panmictic and unstructured in the upper midwest of the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Nov 15;78(22):8096–101. doi:10.1128/AEM.02105-12
95. Hoque S, Pinto P, Ribeiro CA, Canniere E, Daandels Y, Dellevoet M, et al. Follow-up investigation into *Cryptosporidium* prevalence and transmission in Western European dairy farms. *Vet Parasitol*. 2023;318:109920. doi:10.1016/j.vetpar.2023.109920
96. Suleiman AJ, Mavrides DE, Maxamhud S, Gentekaki E, Tsaousis AD. Presence of *Cryptosporidium parvum* in pre-washed vegetables from different supermarkets in South East England: A pilot study. *Parasitol Res*. 2024 Jun 1;123(6):230. doi:10.1007/s00436-024-08250-w
97. Yasur-Landau D, Zilberberg M, Perry Markovich M, Behar A, Fleiderovitz L, Leszkowicz Mazuz M. *Cryptosporidium parvum* subtypes from diarrheic dairy calves in Israel. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2021 Jul 1;25:100608. doi:10.1016/J.VPRSR.2021.100608
98. Khan MA, Haque MA, Tariqujjaman M, Faruque ASG, Ahmed T, Mahfuz M. Impact of asymptomatic *Cryptosporidium* infection on nutritional status in children under two: a multi-country cohort study. *BMC Nutr*. 2025 Dec 1;11(1):190. doi:10.1186/S40795-025-01183-2
99. Watier-Grillot S, Costa D, Petit C, Razakandrainibe R, Larréché S, Tong C, et al. Cryptosporidiosis outbreaks linked to the public water supply in a military camp,

France. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16(9):e0010776.
doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0010776

100. Ahlinder J, Svedberg AL, Nystedt A, Dryselius R, Jacobsson K, Hägglund M, et al. Use of metagenomic microbial source tracking to investigate the source of a foodborne outbreak of cryptosporidiosis. Food Waterborne Parasitol. 2022 Mar 1;26:e00142. doi:10.1016/J.FAWPAR.2021.E00142
101. Mensah GT, Ayeh-Kumi PF, Annang AK, Owusu-Frimpong I, Niampoma S, Brown CA. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species in Kpong and its environs, Ghana. PLoS One. 2023 Feb 1;18(2):e0281216.
doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0281216
102. Terfa W, Getushe D. Epidemiology of Cryptosporidiosis in dairy calves and humans in Ambo and Toke Kutaye Districts of West Shewa Zone. J Vet Med Res. 2023;10(3).
103. Coelho NMD, Coelho WMD, Gomes JF, Meireles MV, Nagata WB, de Lima VMF, et al. Evidence of the zoonotic transmission of *Cryptosporidium* among children and pets. Pathogens. 2023 Nov 27;12(12):1393. doi:10.3390/pathogens12121393
104. Maxamhud S, Reghaissia N, Laatamna A, Gentekaki E, Tsaousis AD. Epidemiology and transmission patterns of *Cryptosporidium* spp., and *Giardia duodenalis* within a One Health framework in rural areas of Eastern Algeria. Parasitology. 2025 Jan 18;152(1):51–60. doi:10.1017/S0031182024001616
105. Tipu JH, Sivertsen A, Afset JE, Sandven L, Brekke H, Lund HM, et al. *Cryptosporidium* species and subtypes in Norway: predominance of *C. parvum* and emergence of *C. mortiferum*. Emerg Microbes Infect. 2024 Dec 31;13(1). doi:10.1080/22221751.2024
106. Awisan JD, Rivera PT, Angeles JMM. Prevalence of *Cryptosporidium* in La Trinidad, Benguet, Philippines: a One Health approach. Front Parasitol. 2025 Mar 14;4:1557608. doi:10.3389/FPARA.2025.1557608/BIBTEX
107. Maxamhud S, Shahiduzzaman M, Amin ARMB, Hossain MZ, Gentekaki E, Tsaousis AD. A pilot study of intestinal protist detection in humans, animals, and the environment in a slum area in Mymensingh, Bangladesh. Parasitol Int. 2025 Feb 1;104:102967. doi:10.1016/J.PARINT.2024.102967
108. Salman Al-Adilee YM, Shather MM, Kalef DA, Maxamhud S, Akdur Öztürk E, Gentekaki E, et al. Intestinal microbial eukaryotes at the human, animal and environment interface in Rural Iraq. Parasitologia. 2025 Jul 9;5(3):34.
doi:10.3390/parasitologia5030034
109. Rai P, Ghimire TR. Intestinal parasites of zoonotic significance in human and domestic animals in a rural setting in Nepal. Vet Med Sci. 2026 Jan 1;12(1):e70728. doi:10.1002/VMS3.70728

110. Santos DEO, Zapata YAU, Buitrago CA, Herrera GS, Becoche LEC, Páez MCL, et al. Occurrence of parasites in waters used for crops irrigation and vegetables from the Savannah of Bogotá, Colombia. *Environ Sci Pollut Res*. 2024 Apr 27;31(23):33360–70. doi:10.1007/s11356-024-33088-1
111. Roncancio-Duque N, García-Ariza JE, Rivera-Franco N, Peña-Stadlin J, López-Alvarez D. Relationship of the landscape configuration with the gut parasites and fungi diversity in farm animals associated with conservation areas in Colombia: Epidemiological risk to wildlife. *Acta Parasitol*. 2025 Dec 25;70(6):239. doi:10.1007/s11686-025-01164-2
113. Robinson G, Pérez-Cordón G, Hamilton C, Katzer F, Connelly L, Alexander CL, et al. Validation of a multilocus genotyping scheme for subtyping *Cryptosporidium parvum* for epidemiological purposes. *Food Waterborne Parasitol*. 2022 Jun 1;27:e00151. doi:10.1016/J.FAWPAR.2022.E00151
113. Deng ML, Heng ZJ, Li LJ, Yang JF, He JJ, Zou FC, et al. *Cryptosporidium* spp. infection and genotype identification in pre-weaned and post-weaned calves in Yunnan Province, China. *Animals*. 2024 Jul 1;14(13):1907. doi:10.3390/ANI14131907/S1
114. Buchanan R, Wieckowski P, Matechou E, Katzer F, Tsaousis AD, Farré M. Global prevalence of *Cryptosporidium* infections in cattle: A meta-analysis. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis*. 2025 Jan 1;7:100264. doi:10.1016/J.CRPVBD.2025.100264
115. Lagunas-Rangel FA. Ribosomal RNA transcription machineries in intestinal protozoan parasites: A bioinformatic analysis. *Acta Parasitol*. 2022 Dec 1;67(4):1788–99. doi:10.1007/S11686-022-00612-7
116. Menardo F. Understanding drivers of phylogenetic clustering and terminal branch lengths distribution in epidemics of *Mycobacterium tuberculosis*. *Elife*. 2022 Jun 28;11:e76780. doi:10.7554/eLife.76780
117. Ryan U, Zahedi A, Feng Y, Xiao L. An update on zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes in humans. *Animals*. 2021 Nov 19;11(11):3307. doi:10.3390/ani11113307
118. Wang T, Guo Y, Roellig DM, Li N, Santín M, Lombard J, et al. Sympatric recombination in zoonotic *Cryptosporidium* leads to emergence of populations with modified host preference. *Mol Biol Evol*. 2022 Jul 2;39(7). doi:10.1093/molbev/msac150
119. Oladele DB, Swain M, Robinson G, Clare A, Chalmers RM. A review of recent *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis*. 2025 Jan 1;8:100292. doi:10.1016/J.CRPVBD.2025.100292

120. Holzhausen I, Lendner M, Göhring F, Steinhöfel I, Dauschies A. Distribution of *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany. *Parasitol Res.* 2019 Feb 21;118(5):1549–58. doi:10.1007/S00436-019-06266-1
121. Pestechian N, Manesh RM, Tavakoli S, Mokarian F, Rahmani M. Identification and subtyping of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in cancer patients, Isfahan Province, Central Iran. *Iran J Parasitol.* 2022;17(4):497. doi:10.18502/IJPA.V17I4.11277
122. Guy RA, Yanta CA, Muchaal PK, Rankin MA, Thivierge K, Lau R, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ontario, Canada. *Parasites Vectors.* 2021 Jan 22;14(1):69-. doi:10.1186/S13071-020-04546-9
123. Caffarena RD, Meireles MV, Carrasco-Letelier L, Picasso-Risso C, Santana BN, Riet-Correa F, et al. Dairy calves in Uruguay are reservoirs of zoonotic subtypes of *Cryptosporidium parvum* and pose a potential risk of surface water contamination. *Front Vet Sci.* 2020 Aug 21;7:544228. doi:10.3389/FVETS.2020.00562/BIBTEX
124. Jian J, Liu A, Yang Y, Peng X, Yao L, Li B, et al. Occurrence rate and species and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in pet dogs in Yunnan Province, China. *BMC Microbiol.* 2024 Sep 19;24(1):354. doi:10.1186/s12866-024-03500-4
125. Galván-Díaz AL. Cryptosporidiosis in Colombia: A systematic review. *Curr Trop Med Rep.* 2018 Sep 1;5(3):144–53. doi:10.1007/S40475-018-0149-3
126. Pinto P, Ribeiro CA, Hoque S, Hammouma O, Leruste H, Détriché S, et al. Cross-Border investigations on the prevalence and transmission dynamics of *Cryptosporidium* species in dairy cattle farms in Western Mainland Europe. *Microorganisms.* 2021 Nov 20;9(11):2394. doi:10.3390/MICROORGANISMS9112394
127. Lebbad M, Winiecka-Krusnell J, Stensvold CR, Beser J. High diversity of *Cryptosporidium* species and subtypes identified in cryptosporidiosis acquired in Sweden and abroad. *Pathogens.* 2021 Apr 26;10(5):523. doi:10.3390/pathogens10050523
128. Zahedi A, Ryan U. *Cryptosporidium* – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Res Vet Sci.* 2020 Oct 1;132:500–12. doi:10.1016/j.rvsc.2020.08.002.
129. Garner TWJ, Pearman PB, Angelone S. Genetic diversity across a vertebrate species' range: A test of the central-peripheral hypothesis. *Mol Ecol.* 2004 May 1;13(5):1047–53. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02119.x
130. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis.* 2001 Feb 1;183(3):492–7. doi:10.1086/318090

131. Grossman T, Ken-Dror S, Pavlotzky E, Vainer J, Glazer Y, Sagi O, et al. Molecular typing of *Cryptosporidium* in Israel. Arez AP, editor. PLoS One. 2019 Sep 3;14(9):e0219977. doi:10.1371/journal.pone.0219977
132. Rieux A, Chartier C, Pors I, Paraud C. Dynamics of excretion and molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates in pre-weaned French beef calves. Vet Parasitol. 2013 Jul 1;195(1–2):169–72. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.043
133. Lalonde LF, Gajadhar AA. Optimization and validation of methods for isolation and real-time PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits. Food Waterborne Parasitol. 2016 Mar 1;2:1–7. doi:10.1016/J.FAWPAR.2015.12.002
134. Mthethwa NP, Amoah ID, Reddy P, Bux F, Kumari S. Development and evaluation of a molecular based protocol for detection and quantification of *Cryptosporidium* spp. in wastewater. Exp Parasitol. 2022 Mar 1;234:108216. doi:10.1016/J.EXPPARA.2022.108216
135. Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. A Real-Time PCR-Based method for the sequence determination of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes during epidemiological investigations. Methods Mol Biol. 2026;2978:77–85. doi:10.1007/978-1-0716-4824-7_6
137. Troell K, Stensvold CR, Sannella AR, Betson M, Östlund E, Chalmers RM, et al. Design, development, and testing of a new multi-locus sequence typing scheme for the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. Curr Res Parasitol Vector Borne Dis. 2025 Jan 1;8:100308. doi:10.1016/J.CRPVBD.2025.100308
137. Guzmán Barragán BL, de Souza Lauretto M, Razzolini MTP, Nardocci AC, Marimón Sibaja KV. Assessment microbial risks for the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. based on the surveillance of the water supply systems in Colombia, 2014–2018. Water Environ Res. 2022 Aug 1;94(8):e10776. doi:10.1002/WER.10776
138. de Oliveira AGL, Sudré AP, Bergamo do Bomfim TC, Santos HLC. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dogs and cats in the city of Rio de Janeiro, Brazil, reveals potentially zoonotic species and genotype. Singh BB, editor. PLoS One. 2021 Aug 3;16(8):e0255087. doi:10.1371/journal.pone.0255087
139. Fayer R. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. Appl Environ Microbiol. 1994;60(8):2732. doi:10.1128/AEM.60.8.2732-2735.1994
141. da Silva DP, de Sousa AC, Scalize PS. Water for human consumption in rural areas worldwide: A systematic review of the presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. J Ecol Eng. 2023;24(12):29–45. doi:10.12911/22998993/172052

ANEXOS

Anexo #1. Aval comité de ética 084 – 020



FACULTAD DE SALUD
Vicedecanato De Investigaciones Y
Posgrados Comité de Ética Humana

ACTA DE APROBACION N°(009-020)

Proyecto:

“CARACTERIZACIÓN Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PARÁSITOS INTESINALES EN UNA POBLACIÓN UNIVERSITARIA”

Investigador Principal:

CATERINE POTES MORALES/ DAVID KLAUS SUMMERHOLD LEVINE/MARÍA DEL PILAR CRESPO ORTIZ

Código Interno: (084-020)

Fecha en que fue sometido:

DÍA	MES	AÑO
18	05	2020

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2013; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000. Este Comité

certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

X	Protocolo de Investigación
X	Instrumentos de recolección de datos
X	Formato de consentimiento informado
X	Soportes solicitados por el CIREH
	Cartas de las instituciones participantes
	Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité.
3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

	Sin riesgo
X	Riesgo mínimo
	Riesgo mayor del mínimo

4. Las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. La forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio es adecuada.
6. Informará inmediatamente a las directivas institucionales:

F-05-IP-06-02-0202
V-01-2019

Elaborado Por: Comité de Ética Humana

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
 - c. Lesiones a sujetos humanos.
 - d. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
 - e. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que no haya sido revisado y aprobado por el Comité.
7. El presente proyecto ha sido aprobado por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.
8. El investigador principal deberá informar al Comité:
- a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - e. Cualquier decisión tomada por otros comités de ética
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
9. El investigador principal deberá presentar el informe al final cuando haya culminado el proyecto.
10. En caso que el proyecto tenga duración mayor a un año, deberán solicitar la renovación del aval adjuntando el informe de avance y los documentos requeridos en dicho formato.

Fecha de elaboración:

DIA	MES	AÑO
12	06	2020

Firma: _____

Nombre: BEATRIZ EUGENIA FERNÁNDEZ H.

Capacidad: PRESIDENTE Teléfono: 5185677

Representativa:

Anexo #2. Aval comité de ética 006 – 024

Comité de Ética en Investigación en Salud
Facultad de Salud



Santiago de Cali, 13 de marzo de 2025

Docente Responsable
MARÍA DEL PILAR CRESPO ORTIZ
Estudiante Posgrado
MARÍA ALEJANDRA RAMOS SILVA
Escuela de Ciencias Básicas
Facultad de Salud
Universidad del valle

Asunto: Renovación de aprobación a proyecto sin participación directa de seres humanos

El Comité de Ética en Investigación en Salud, deja constancia que en el proyecto **"TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CRYPTOSPORIDIUM SPP OBTENIDO EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE UNA POBLACIÓN UNIVERSITARIA Y SUS RUTAS POTENCIALES DE TRANSMISIÓN"** con código **E 006-024**, se trabajará con muestras de biobancos.

Esta propuesta fue revisada, aprobada y clasificada sin riesgo según la resolución 8430 de 1993. Se considera que no involucra la participación directa de seres humanos y cumple con los lineamientos éticos para ser renovado.

1. Se revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

X	Carta de Informe de avance justificando la renovación
X	Carta de Aval Anterior

Se hace la renovación por **un (1) año** y se deja copia en nuestro archivo para futuras consultas o constancia de esta decisión.

Atentamente,

LUIS ALEXANDER LOVERA MONTILLA
Presidente
Comité de Ética en Investigación en Salud

*Este comité considera el riesgo de confidencialidad que se pueda presentar con los datos provenientes de personas.

"Estamos en la renovación de la acreditación institucional en alta calidad 2024- 2034. ¡La vamos a lograr!"

Calle 48 N° 36 – 00 Edificio 100 oficina 221. Tel. 518 56 77 eticasalud@correounivalle.edu.co Cali, Colombia

Anexo #3 Protocolo detección de parásitos en muestras de alimentos.

GRUPO DE MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS	Nombre de la prueba DETECCIÓN DE PARÁSITOS EN MUESTRAS DE ALIMENTOS		SELLO SECO
UNIDAD: Departamento de Microbiología Universidad del Valle.	PROCESO: Código:		
REVISADO POR: MARIA DEL PILAR CRESPO			Fecha de creación dd mm aa
APROBADO POR: MARIA DEL PILAR CRESPO			Fecha de Aprobación dd mm aa
REALIZADO Y ESTANDARIZADO POR: Maria Camila Salgado			Fecha de Realización dd mm aa

1. Introducción

Este protocolo se propone como parte del trabajo de investigación para el análisis de parásitos en muestras vegetales.

2. Objetivo

Realizar técnicas fenotípicas para la identificación de diversas formas parasitarias en muestras vegetales.

3. Alcance

Este procedimiento será aplicado en el contexto del proyecto por estudiantes e investigadores que requieran determinar la presencia de formas parasitarias en muestras vegetales recolectadas de diversas fuentes comerciales para así tener un mayor acercamiento a los hábitos de la comunidad, entendiendo entonces el concepto de una sola salud.

4. Autoridad y responsabilidad

La autoridad para este documento es el coordinador de la unidad, la responsabilidad del proceso es de la persona que lo realice.

5. Requerimientos de recursos

5.1 Muestra:

Vegetales como cilantro, lechuga y perejil que no se encuentren lavados ni empacados, recolectados de diversos supermercados y galerías.

5.2 Recolección de la muestra:

Seleccionar un recipiente o una bolsa zip lock, en donde se depositarán 200g, aproximadamente, de cilantro, perejil o lechuga.

5.3 Materiales:

- PBS pH 7.4, 0.01% Tween 80 60ml
- Solución salina 0.85%
- Solución de Lugol
- Reactivos para Kinyoun

5.3 Equipos:

- Balanza
- Centrífuga

6. Procedimiento

Es recomendable, antes de iniciar, pesar el producto o muestra.

a. Examen directo

1. Realizar un lavado de la muestra al añadir la solución PBS/Tween 80 al 0.01% 60ml al recipiente.
2. Mezclar en un mortero.
3. Filtrar la solución resultante del lavado por medio una gasa en un vaso desechable. Pasar a un tubo de vidrio de laboratorio.
4. Centrifugar a 2000 rpm por 30 minutos.
5. Descartar el sobrenadante, sin arrastrar el sedimento.
6. Tomar el material del sedimento al tomar una gota para realizar el examen directo con solución salina y una gota para el examen con Lugol.
7. Tomar una gota para realizar la tinción de Kinyoun.

Dejar la placa del examen directo en la cámara húmeda mientras se observa y se procede a realizar la coloración de Kinyoun.

b. Tinción de Kinyoun para *Cryptosporidium* spp

8. Realizar un extendido delgado de materia fecal en una lámina limpia con un aplicador o palillo.
9. En caso de que las heces estén muy duras, se debe colocar una gota de solución salina 0.85% sobre la lámina y realizar el extendido.
10. Dejar secar a temperatura ambiente.
11. Fijar con metanol absoluto durante 3-5 minutos. Dejar secar a temperatura ambiente.
12. Agregar carbol fucsina a la lámina de tal forma que cubra toda la placa y dejar actuar por 1 minuto.
13. Lavar con agua del grifo.
14. Decolorar con alcohol ácido al 5% durante 30 segundos.
15. Lavar con agua del grifo.

16. Cubrir la lámina con azul de metileno durante 1 minuto.
17. Lavar con agua.
18. Dejar secar a temperatura ambiente.
19. Examinar al microscopio con objetivo de 100x y aceite de inmersión para buscar y observar los ooquistes, los cuales se tiñen de color rojo.

Guarde una fracción del extracto obtenido en un vial de vidrio para almacenar a -20° C

Realice el reporte de cada muestra, así

Colocar tipo de muestra

Peso

Origen

Resultado

Tome fotos si hay resultados positivos y colocar en el drive.

REREFERENCIAS

El Said Said, D. (2012). Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. Alexandria Journal of Medicine 48, 345–352. doi: 10.1016/j.ajme.2012.05.005.

Anexo #4. Protocolo de extracción de ADN con kit QIAamp PowerFecal Pro DNA de QIAGEN

	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 2
		Página: 1 de 2	
Fecha de Emisión: Julio 30 2024	Título: Protocolo No. 1: Kit de extracción de ADN en materia fecal		
Elaborado por: Maria Alejandra Ramos	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo.

Utilizar el kit de extracción de ADN "QIAamp PowerFecal Pro DNA Kits" para la detección de parásitos en materia fecal por PCR.

2. Alcance.

Este protocolo está diseñado para determinar la funcionalidad del kit de extracción de ADN con el fin de realizar PCR para detectar parásitos intestinales

Autoridad y Responsabilidad.

La autoridad de este protocolo recae en el director del proyecto de investigación. El responsable del desarrollo del protocolo es el personal del laboratorio encargado.

3. Materiales y Reactivos.

- Tubos PowerBead Pro
- Columnas de centrifugado MB
- Solución CD1 (40 ml)
- Solución CD2 (15 ml)
- Solución CD3 (35 ml)
- Solución EA (36 ml)
- Solución C5 (30 ml)
- Solución C6 (9 ml)
- Tubos de microcentrífuga (2 ml)
- Tubos de elución (1,5 ml)
- Tubos de recogida (2 ml)
- Microcentrífuga
- Micropipetas (10 – 100 microlitros, 100 – 1000 microlitros)
- Puntas estériles
- Tubos Eppendorf
- Vortex

Nota:

- La solución CD2 debe almacenarse entre 2 y 8 °C. Todos los demás reactivos y componentes del kit deben almacenarse a temperatura ambiente (15–25 °C).
- Si la Solución CD3 esta precipitada, calentar a 60°C hasta que se disuelva el precipitado.

4. Procedimiento.

- a) Dar un spin al PowerBead Pro Tube para asegurar que las perlas se asienten en el fondo
- b) Añadir hasta 250mg de muestra con un palillo al PowerBead Pro Tube y 800µL de solución CD1. Mezclar en vortex brevemente

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

	Instructivo de Trabajo	Número: 	Versión: 2
Fecha de Emisión: Julio 30 2024		Página: 2 de 2	
	Título: Protocolo No. 1: Kit de extracción de ADN en materia fecal		

- c) Fijar el tubo **PowerBead Pro** de forma horizontal en un adaptador para vortex para tubos de 1,5 – 2 mL. Poner en vortex a máxima velocidad durante 20 min.

Nota:

- Si usa el adaptador Vortex para más de 12 preparaciones simultáneamente, aumente el tiempo de agitación por 5 -10 min.

- d) Centrifugar el **PowerBead Pro Tube** a 13.000 r.p.m por 1 min.
- e) Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 mL (aproximadamente 500 – 600 µL).
- f) Agregar 200 µL de Solución CD2 y agitar en vórtex durante 5 s.
- g) Centrifugar a 13.000 r.p.m durante 1 min a temperatura ambiente. Evitando tocar el pellet, transferir hasta 700 µL de sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 2 mL (aproximadamente 500 – 600 µL).
- h) Agregar 600 µL de Solución CD3 y agitar en vórtex durante 5 s.
- i) Agregar 650 µL del lisado en una MB Spin Column y centrifugar a 13.000 r.p.m por 1 minuto.
- j) Desechar el filtrado y repetir el paso i para asegurarse de que todo el lisado haya pasado a través de la columna giratoria MB.
- k) Colocar con cuidado la columna de centrifugación MB en un tubo de recogida limpio de 2 mL.
- l) Agregar 500 µL de solución EA a la columna de centrifugación MB. Centrifugar a 13.000 r.p.m durante 1 min.
- m) Desechar el filtrado y colocar nuevamente la columna de centrifugación MB en el mismo tubo de recogida de 2 mL.
- n) Agregar 500 µL de la solución C5 a la columna de centrifugación MB. Centrifugar a 13.000 r.p.m por 1 minuto.
- o) Desechar el filtrado y colocar la columna de centrifugación en un tubo de recogida limpio de 2 mL.
- p) Centrifugar hasta 13.000 r.p.m durante 2 min. Colocar con cuidado la columna de centrifugación MB en un tubo de elución nuevo de 1,5 mL.
- q) Agregue 50 – 100 µL de Solución C6 al centro del filtro de la columna de centrifugación MB.
- r) Centrifugar a 13.000 r.p.m durante 1 min. Deseche la columna giratoria MB.
- s) Almacenar el ADN congelado (-30 a -15 °C o -90 a -65 °C) debido a que la solución C6 no contiene EDTA.

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT- -FACSAL-DMIC	Versión: 1.0
		Página: 1 de 5	
Fecha de Emisión: 2020	Título: Protocolo No.3: Extracción de ADN. Kit comercial IBI Scientific.		
Elaborado por: Caterine Potes Morales	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo.

Realizar la extracción de ADN siguiendo el protocolo para el kit comercial de IBI Scientific para la identificación de protozoos intestinales por técnicas moleculares.

2. Alcance.

Este protocolo está diseñado para determinar la funcionalidad de la prueba de extracción de ADN con el fin de realizar PCR convencional para detectar especies de protozoos intestinales.

Autoridad y Responsabilidad.

La autoridad de este protocolo recae en el coordinador del área de Parasitología. El responsable del desarrollo del protocolo es el personal del laboratorio encargado del diagnóstico.

3. Muestras.

Para realizar el diagnóstico de las infecciones intestinales se requiere una muestra vegetal, que debe ser tomada en un frasco plástico de tapa ajustada que evite el derrame de la muestra.

4. Materiales y Reactivos.

Fecal DNA Extraction Kit IBI Scientific
 Etanol absoluto*
 Centrifuga para 14000 revoluciones
 Incubadora
 Vortex
 Micropipetas (10–100 microlitros, 100–1000 microlitros)
 Puntas estériles
 Muestra
 Tubos Eppendorf 1,5 ml

Notas:

(1) la primera vez que se usa el kit, se debe añadir etanol absoluto al buffer de lavado (Wash Buffer). Revisar la etiqueta del frasco para verificar cuanto etanol debe añadirse.

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT- -FACSAL-DMIC	Versión: 1.0
		Página: 2 de 5	
Fecha de Emisión: 2020	Título: Protocolo No.3: Extracción de ADN. Kit comercial IBI Scientific.		
Elaborado por: Caterine Potes Morales	Revisado por:	Aprobado por:	

(2) *Revisar que en el buffer ST1 no se haya generado ningún precipitado. De ser así, calentarlo en baño maría a 37°C seguido de una agitación suave para disolver el precipitado.*

5. Procedimiento.

Lisis de la muestra

1. Transferir 250 µl de vegetales (sacar con ayuda de un palillo y si hay líquido verter en el tubo) a un tubo que contenga perlas de cerámica (Beadbeating Tube).
2. Añadir 800 µl de tampón ST1. Agitar en el vórtex brevemente.
3. Incubar a 70°C durante 8 minutos.
4. Conectar los tubos de perlas horizontalmente a un vórtex pegándolos con cinta o usando un adaptador. Agitar en el vórtex a velocidad máxima durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar los tubos de perlas a 8.000 r.p.m durante 2 minutos a temperatura ambiente para eliminar la espuma causada por los detergentes presentes en el tampón ST1.
6. Transferir 500 µl de sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml de la sección (no incluido en el kit).

Nota: *Precaliente el buffer de elución necesario (aprox. 100 µl por muestra) a 60°C para la elución del ADN.*

Eliminación del inhibidor de la PCR

7. Añadir 150 µl de tampón ST2 y agitar en el vórtex durante 5 segundos.
8. Incubar a 0-4°C durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 4 minutos a temperatura ambiente para precipitar las partículas insolubles y los inhibidores de la PCR.

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT- -FACSAL-DMIC	Versión: 1.0
		Página: 3 de 5	
Fecha de Emisión: 2020	Título: Protocolo No.3: Extracción de ADN. Kit comercial IBI Scientific.		
Elaborado por: Caterine Potes Morales	Revisado por:	Aprobado por:	

10. Colocar una columna de eliminación de inhibidores (anillo rosado) en un tubo de centrifuga de 2 ml (tubo transparente con tapa). (Marcar las tapas de las columnas y no la de los eppendorfs).

11. Transferir 500 µl de sobrenadante a la columna de eliminación de inhibidores.

12. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego desechar la columna.

13. Guardar el flujo continuo en el tubo de centrifuga de 2 ml para unión de ADN.

Nota: Si hay un sedimento en el flujo continuo, transfiera el sobrenadante transparente a un nuevo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml (no incluido).

Unión de ADN

14. Agregar 800 µl de tampón ST3 al flujo continuo y luego mezclar INMEDIATAMENTE agitando vigorosamente durante 5 segundos.

15. Colocar una columna GD (anillo verde) en un tubo de recogida de 2 ml (tubo transparente sin tapa).

16. Transferir 700 µl de mezcla de muestra a la columna GD.

17. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego desechar el flujo continuo.

18. Colocar la columna GD nuevamente en el tubo de recolección de 2 ml. Transferir la mezcla de muestra restante a la columna GD.

19. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 3 minutos a temperatura ambiente.

20. Desechar el flujo continuo y volver a colocar la columna GD en el tubo de recolección de 2 ml.

Lavado

21. Agregar 400 µl de tampón ST3 a la columna GD. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 1 minuto a temperatura ambiente.

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT- -FACSAL-DMIC	Versión: 1.0
		Página: 4 de 5	
Fecha de Emisión: 2020	Título: Protocolo No.3: Extracción de ADN. Kit comercial IBI Scientific.		
Elaborado por: Caterine Potes Morales	Revisado por:	Aprobado por:	

22. Desechar el flujo continuo y volver a colocar la columna GD en el tubo de recolección de 2 ml.

23. Agregar 600 µl de buffer de lavado o wash buffer (asegúrese de haberle agregado etanol absoluto) a la columna GD.

24. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 1 minuto a temperatura ambiente.

25. Desechar el flujo continuo y volver a colocar la columna GD en el tubo de recolección de 2 ml.

26. Volver a agregar 600 µl de buffer de lavado o wash buffer a la columna GD. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 1 minuto a temperatura ambiente.

27. Desechar el flujo continuo y volver a colocar la columna GD en el tubo de recolección de 2 ml.

28. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 4 minutos a temperatura ambiente para secar la matriz de la columna.

Elución

29. Transferir la columna GD seca a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (no incluido en el kit).

30. Añadir 50µl de buffer de elución precalentado, TE o agua en el CENTRO de la matriz de la columna.

31. Dejar reposar durante al menos 2 minutos para permitir que el buffer de elución, el TE o el agua se absorban por completo.

32. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 4 minutos a temperatura ambiente para eluir el ADN purificado.

33. Para una mayor concentración de ADN se repite el paso de elución añadiendo los mismos 50 µl de tampón de elución (que ahora contiene el ADN eluido) al centro de la matriz de la columna nuevamente y dejar reposar 2 minutos.

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT- -FACSAL-DMIC	Versión: 1.0
		Página: 5 de 5	
Fecha de Emisión: 2020	Título: Protocolo No.3: Extracción de ADN. Kit comercial IBI Scientific.		
Elaborado por: Caterine Potes Morales	Revisado por:	Aprobado por:	

34. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 4 minutos a temperatura ambiente para eluir el ADN purificado.

Nota: En el paso #30 (adición de buffer de elución), si se requiere una mayor concentración de ADN, utilice 30 µl de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) y luego repita el paso de elución agregando los mismos 30 µl de tampón de elución (que ahora contiene el ADN eluido) al centro de la matriz de la columna nuevamente. Si se requiere un rendimiento máximo de ADN, utilice 100 µl de tampón de elución (la concentración de ADN se diluirá). Asegúrese de que se agregue el tampón de elución en el centro de la matriz de la columna GD y se absorba por completo.

6. Referencias

www.ibisci.com (Casa comercial)

Anexo #6. Protocolo para validación de *Cryptosporidium* spp

	Instructivo de Trabajo	Número: IT-____-FACSAL- DMIC	Versión: 2.0
		Página: 1 de 5	
Fecha de Emisión: 2025	Título: Protocolo No.4: PCR Convencional. Taq ADN polimerasa (Brasil).		
Elaborado por: Deisy Katherine Quiñones Guacan	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo.

Realizar la amplificación de ADN utilizando PCR convencional para la identificación de *Cryptosporidium* spp por técnicas moleculares.

2. Alcance.

Este protocolo está diseñado para determinar la funcionalidad de la PCR convencional para detectar especies de *Cryptosporidium* spp.

Autoridad y Responsabilidad.

La autoridad de este protocolo recae en el coordinador del área de Parasitología. El responsable del desarrollo del protocolo es el personal del laboratorio encargado del diagnóstico.

3. Muestras.

Para realizar el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp se requiere una muestra de vegetal, a la cual se le haya realizado el proceso de extracción de ácidos nucleicos.

4. Materiales y Reactivos.

Taq Brasil
 Set dNTPs
 Micropipetas (10 – 100 microlitros, 100 – 1000 microlitros)
 Puntas estériles
 Muestra
 Agua destilada estéril o de grado molecular
 Tubos de PCR
 Primers Forward/Reverse
 Termociclador

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT-033-FACSAL- DMIC	Versión: 2.0
		Página: 2 de 5	
Fecha de Emisión: 2025	Título: Protocolo No.4: PCR Convencional Tag ADN polimerasa (Brasil).		

ORGANISMO	PRIMERS	SECUENCIA	GEN/ ENZIMA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> spp.	CRY18s-S1	TAAACGGTAGGGTATTGGCCT	SSU rRNA	240 pb	Bairami, Rezaei y Rezaeian, 2018.
	CRY18s-As1	CAGACTTGCCCTCCAATTGATA			

5. Preparación de máster Mix

a) Resuspensión de primers

La resuspensión de los cebadores se realiza teniendo en cuenta las recomendaciones de la casa comercial y la información brindada acerca del peso molecular de cada cebador. Luego de la resuspensión, los primers quedan a una concentración de 100 μ M en sus respectivos tubos madre.

Para preparar las alícuotas, se tomaron 50 μ L del tubo madre de cada primer y se diluyeron en 450 μ L de agua de grado molecular en un nuevo tubo eppendorf para un total de 500 μ L, quedando a una concentración de 10 μ M.

Para evitar problemas de contaminación, se dividieron los 500 μ L de los primers diluidos en tubos eppendorf más pequeños, para obtener 20 alícuotas de 25 μ L cada uno. Estos tubos son los que se usan a la hora de preparar la mezcla de PCR.

b) Preparación dNTPs

El set de dNTPs comprados en Promega llegaron individualizados (un dNTP por tubo; cada tubo con 250 μ L a 100mM), por lo que se requiere prepararlos para su posterior uso en la máster mix. Con el objetivo de llevarlos a una concentración de trabajo de 10mM, se hace una dilución 1:10 de la siguiente manera: para preparar una alícuota de 100 μ L, se toman 10 μ L de cada dNTP (para un total de 40 μ L por los 4 dNTPs) y se mezclan con 60 μ L de agua libre de nucleasas.

DEFINITIVO

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT-033-FACSAL- DMIC	Versión: 2.0
		Página: 3 de 5	
Fecha de Emisión: 2025	Título: Protocolo No.4: PCR Convencional Tag ADN polimerasa (Brasil).		

c) Preparación de BSA

Para preparar 25 ml de BSA se diluyeron 0,5 gramos de BSA en 25 ml de agua grado molecular, para que la solución quede a una concentración de 10µg/µl. La solución final de 25 ml fue alicuotada en tubos cónicos y tubos eppendorf estériles, y refrigerada a 4°C.

Nota: Las cantidades usadas en la preparación de la siguiente máster Mix están basadas en las recomendaciones dadas por la casa comercial (THERMOFISHER).

REACTIVOS	CANTIDAD FINAL	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10X	2,5 µL	1X
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL	1.5mM
dNTPs (10mM each)	0,5 µL	0.2 mM c/dNTP
BSA	1 µL	20 µg/µL
Primer 1 (10µM)	0,5 µL	0,2µM
Primer 2 (10µM)	0,5 µL	0,2µM
Tag Brasil (5U/µL)	0,25 µL	1,25U
H ₂ O	14 µL	-
ADN	5 µL	-
Total	25 µL	-

*Las cantidades ilustradas en la tabla son las correspondientes a 1 tubo de muestra. Teniendo en cuenta el número de tubos de muestra a procesar debe realizarse el respectivo calculo.

DEFINITIVO

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT-033-FACSAL- DMIC	Versión: 2.0
		Página: 4 de 5	
Fecha de Emisión: 2025	Título: Protocolo No.4: PCR Convencional Tag ADN polimerasa (Brasil).		

REACTIVOS	PARA 1 TUBO	PARA 5.5 TUBOS	PARA 11 TUBOS
Buffer 10X	2,5 µL	14 µL	28 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL	4,13 µL	8,3 µL
dNTPs (100mM each)	0,5 µL	2,8 µL	5,5 µL
BSA	1 µL	5,5 µL	11 µL
Primer 1 (10µM)	0,5 µL	2,8 µL	5,5 µL
Primer 2 (10µM)	0,5 µL	2,8 µL	5,5 µL
Tag Brasil (5U/µL)	0,25 µL	1,4 µL	2,8 µL
H ₂ O	14 µL	77 µL	154 µL
Total	20 µL	110,43 µL	220,6

***Adición de ADN template:** una vez se tiene la mezcla madre para la cantidad de tubos a usar, se alicuotan en tubos de PCR añadiendo a cada uno 20 µL de la mezcla, y se lleva a la cantidad final de 25 µL adicionando 5 µL del ADN template correspondiente a cada tubo.

*Para la adición de los reactivos se recomienda iniciar con el H₂O y luego adicionar los demás en orden de cantidad (los que sean de mayor cantidad primero, como el buffer y el magnesio), dejando de ultimo la adición de la Tag Polimerasa. Al final, se añade el ADN a cada tubo debidamente marcado.

Se recomienda homogenizar los reactivos antes de preparar la Master Mix (a excepción de la Tag Polimerasa).

6. Procedimiento.

1. Luego de preparar la Máster Mix en un tubo de 1,5 mL, alicuotar en los tubos de 0,2 mL y adicionar el ADN de las muestras a procesar.
2. Los tubos de 0,2 mL deben estar debidamente rotulados para evitar que se confundan las muestras.
3. Ubicar los tubos en el termociclador. Como medida de precaución, tener en cuenta el orden de ubicación de las muestras en la bandeja del equipo.
4. Elegir el perfil seleccionado para el organismo objetivo y poner a correr el proceso de amplificación.

DEFINITIVO

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número: IT-033-FACSAL- DMIC	Versión: 2.0
		Página: 5 de 5	
Fecha de Emisión: 2025	Título: Protocolo No.4: PCR Convencional Tag ADN polimerasa (Brasil).		

- Al finalizar, extraer los tubos del termociclador y almacenarlos en un espacio aislado a 4°C para evitar contaminación de los productos de amplificación.

**Perfil de amplificación *Cryptosporidium* spp.
(adaptado de Bairami, A., Rezaei, S., & Rezaeian, M., 2018)**

# DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 CICLO	94°C	5 min
35 CICLOS	94°C	1.5 min
	60°C	40 seg
	72°C	2 min
1 CICLO	72°C	5 min
	4°C	∞

7. Referencias

- Bairami, A., Rezaei, S., & Rezaeian, M. (2018). Synchronous identification of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. in stool samples using a multiplex PCR assay. *Iranian journal of parasitology*, 13(1), 24.
- Stark, D., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J., & Harkness, J. (2005). Detection of *Dientamoeba fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *International journal for parasitology*, 35(1), 57-62.
- Stensvold, R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H. V., & Arendrup, M. C. (2006). Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*, 92(5), 1081-1087.

DEFINITIVO

Anexo #7. Protocolo PCR para la amplificación de ADN de *Cryptosporidium* para identificación de especies.

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 10
		Página: 1 de 5	
Fecha de Emisión: Mayo 27 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para genotipificación de especies		
Elaborado por: Maria Alejandra Ramos	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo.

Realizar la amplificación de ADN para la genotipificación de especies de *Cryptosporidium* spp. por PCR.

2. Alcance.

Este protocolo está diseñado para determinar la funcionalidad de la prueba de PCR anidada para amplificar ADN de especies de *Cryptosporidium*.

Autoridad y Responsabilidad.

La autoridad de este protocolo recae en el coordinador del área de Parasitología. El responsable del desarrollo del protocolo es el personal del laboratorio encargado del diagnóstico.

3. Muestras.

➤ ADN extraído de muestra positiva para *Cryptosporidium* spp.

4. Materiales y Reactivos.

- Azura Taq HS 2X Mix
- ~~Primers~~ primera PCR (reverse y forward)
- ~~Primers~~ Segunda PCR (reverse y forward)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Agua libre de nucleasas
- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas
- Tubos Eppendorf

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 10
		Página:	2 de 5
Fecha de Emisión: Mayo 27 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para genotipificación de especies		

ORGANISMO	PRIMERS	SECUENCIA	GEN/ ENZIMA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> 1 Xiao	Forward	TTCTAGAGCTAATACATGCG	18S rRNA	1325 pb	(Uran-Velasquez et al., 2022; Xiao et al., 1999).
	Reverse	CCCTAATCCTTCGAAACAGGA			
<i>Cryptosporidium</i> 2 Xiao	Forward	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	18S rRNA	819 ~ 825 pb	
	Reverse	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA			

5. Preparación de Reactivos

a) Máster mix:

Contiene:

- Azura Taq HS 2X Mix
- Primers primera PCR (reverse y forward)
- Primers Segunda PCR (reverse y forward)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Agua libre de nucleasas

Nota: La cantidad de estos reactivos va de acuerdo con el número de muestras.

6. Tabla de reactivos primera PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL) Tubo	VOLUMEN X2 REACCIONES (x2)
Azura Taq HS 2X Mix	1X	12.5μL	25μL
Primer Forward CryptoX1F (10μM)	300nM	0.75μL	2μL
Primer Reverse CryptoX1R (10μM)	300nM	0.75μL	2μL
H ₂ O libre de nucleasas	-	9μL	18μL
ADN	-	2μL	
Total-	-	25μL	47μL

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 10
		Página: 3 de 5	
Fecha de Emisión: Mayo 27 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para genotipificación de especies		

7. Procedimiento primera PCR

- a) Se añaden la máster mix y 2 microlitros del ADN extraído, a un tubo Eppendorf
- b) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:
- 94°C por 3 min
 - 94°C por 45 seg
 - 58°C por 45 seg
 - 72°C por 1 min
 - 72°C por 10 min
- * En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

8. Tabla de reactivos segunda PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL) Tubo	VOLUMEN X2 REACCIONES (x2)
Azura Taq HS 2X Mix	1X	12.5μL	25μL
Primer Forward CryptoX2F (10μM)	300nM	0.72μL	2μL
Primer Reverse CryptoX2R (10μM)	300nM	0.75μL	2μL
BSA (10μg/μL)	0.2μg/μL	0.5μL	6μL
H ₂ O libre de nucleasas	-	8.5μL	18μL
Dilución amplicón primera PCR	-	2μL	
Total-	-	25μL	47μL

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 10
		Página: 4 de 5	
Fecha de Emisión: Mayo 27 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para genotipificación de especies		

9. Procedimiento segunda PCR

c) Para la segunda PCR se añaden la máster ~~mix~~ y se realiza una dilución 1:10 del amplicón de la primera PCR. Luego se añaden 2 microlitros de la dilución al tubo Eppendorf.

En casos donde no se obtenga el amplicón esperado en la segunda PCR o este sea de una intensidad muy leve se probó también las diluciones 1:50 y 1:100 que proporcionaron mejoría en algunos casos

d) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

94°C por 3 min

94°C por 45 ~~seg~~

59°C por 45 ~~seg~~

72°C por 1 min

72°C por 10 min

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

e) Conservar la muestra a 4°C.

10. ~~Tabla de reactivos~~ Re-amplificación de muestra

En caso de necesitar aumentar la cantidad de ADN se puede re amplificar el amplicón de la segunda PCR en mayor volumen.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	RE AMPLIFICACION 25µL	RE AMPLIFICACION 50µL	RE AMPLIFICACION 75µL
Azura Tag HS 2X Mix	1X	12.5µL	25µL	37.5µL
Primer Forward CryptoX2F (10µM)	300nM	0.75µL	1.5µL	2.25µL
Primer Reverse CryptoX2R (10µM)	300nM	0.75µL	1.5µL	2.25µL
BSA (10µg/µL)	0.2µg/µL	0.5µL	1µL	1.5µL
H ₂ O libre de nucleasas	-	5.5µL	11µL	16.5µL
Amplicón segunda PCR	-	5µL	10µL	15µL
Total-	-	25µL	50µL	75µL

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 10
		Página: 5 de 5	
Fecha de Emisión: Mayo 27 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para genotipificación de especies		

11. Procedimiento PCR ~~Re-amplificación~~ de muestra

d) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

94°C por 3 min

94°C por 45 seg.

59°C por 45 seg.

72°C por 1 min

72°C por 10 min

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

e) Conservar la muestra a 4°C.

Bibliografía

- Šlapeta, J. (2017). *Cryptosporidium*: Identification and genetic typing. *Current Protocols in Microbiology*, 2017(Febuary), 20B.1.1-20B.1.17. <https://doi.org/10.1002/cpmc.24>
- Uran-Velasquez, J., Alzate, J. F., Farfan-Garcia, A. E., Gomez-Duarte, O. G., Martinez-Rosado, L. L., Dominguez-Hernandez, D. D., Rojas, W., Galvan-Diaz, A. L., & Garcia-Montoya, G. M. (2022). Multilocus Sequence Typing helps understand the genetic diversity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolated from Colombian patients. *PLoS ONE*, 17(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270995>
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., Fayer, R., & Lal, A. A. (1999). Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1578–1583. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.65.4.1578-1583.1999>

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

Anexo #8. Protocolo PCR para la amplificación de ADN de *Cryptosporidium* para tipificación de *C. hominis* y *C. parvum*

	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página: 1 de 10	
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		
Elaborado por: Maria Alejandra Ramos	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo.

Realizar la amplificación de ADN para subtipificación de *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum* por PCR.

2. Alcance.

Este protocolo está diseñado para determinar la funcionalidad de la prueba de PCR anidada con diferentes sets de primers para amplificar ADN *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum*.

Autoridad y Responsabilidad.

La autoridad de este protocolo recae en el coordinador del área de Parasitología. El responsable del desarrollo del protocolo es el personal del laboratorio encargado del diagnóstico.

3. Muestras.

➤ ADN extraído de muestra positiva para *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum*.

4. Materiales y Reactivos.

- Azura Taq HS 2X Mix
- Primers primera PCR (reverse y forward)
- Primers Segunda PCR (reverse y forward)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Agua libre de nucleasas
- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas
- Tubos Eppendorf

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página:	2 de 10
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

5. Preparación de Reactivos

a) Máster mix:

Contiene:

- Azura Tag HS 2X Mix
- Primers primera PCR (reverse y forward)
- Primers Segunda PCR (reverse y forward)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Agua libre de nucleasas

Nota: La cantidad de estos reactivos va de acuerdo con el número de muestras.

6. Primer set de primers para amplificación de ADN de *C. hominis* y *C. parvum*

ORGANISMO	PRIMERS	SECUENCIA	GEN/ ENZIMA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (LX0374 - LX0375)	Forward	TTA CTC TCC GTT ATA GTC TCC	<i>gp60</i>	~955pb	(Alves et al., 2003; Glaberman et al., 2002; Xiao et al., 2009)
	Reverse	GGA AGG AAC GAT GTA TCT GA			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - AL3534)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	<i>gp60</i>	800 ~ 850 pb	
	Reverse	GCAGAGGAACCAGCATC			

6.1 Tabla de reactivos primer y segunda PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL) Tubo	VOLUMEN X2 REACCIONES (x2)
Azura Tag HS 2X Mix	1X	12.5μL	162.5μL

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página: 3 de 10	
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

Primer Forward LX0374/ AL3532 (10µM)	300nM	0.75µL	9.25µL
Primer Reverse LX0375/ AL3534 (10µM)	300nM	0.75µL	9.25µL
BSA (10µg/µL)	0.4µg/µL	1µL	13µL
H ₂ O libre de nucleasas	-	9µL	117µL
ADN/Amplicón primera PCR	-	1µL	-
Total-	-	25µL	312µL

6.2 Procedimiento primera PCR

- a) Se añaden la máster ~~mix~~ y 1 microlitros del ADN extraído, a un tubo Eppendorf
b) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

95°C por 3 minutos
94°C por 45 segundos
59°C por 45 segundos
72°C por 1 minuto
72°C por 10 minutos

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

6.3 Procedimiento segunda PCR

- c) Para la segunda PCR se añaden la máster ~~mix~~ y 1 microlitros del ADN amplificado en la primera PCR, a un tubo Eppendorf

- d) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

95°C por 3 minutos

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página: 4 de 10	
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

94°C por 45 segundos
 55°C por 45 segundos
 72°C por 1 minuto
 72°C por 10 minutos

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

e) Conservar la muestra a 4°C.

7. Segunda set de primers para amplificación de ADN de *C. hominis* y *C. parvum*.

ORGANISMO	PRIMERS	SECUENCIA	GEN/ ENZIMA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (AL3531 - AL3535)	Forward	ATAGTCTCCGCTGTATTC	<i>gp60</i>	~945pb	(Alves et al., 2003; Glaberman et al., 2002; Uran- Velasquez et al., 2022)
	Reverse	GGAAGGAACGATGTATCT			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - AL3534)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	<i>gp60</i>	800 ~ 850 pb	
	Reverse	GCAGAGGAACCAGCATC			

7.1 Tabla de reactivos primer y segunda PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL) Tubo	VOLUMEN X2 REACCIONES (x2)
Azura Taq HS 2X Mix	1X	12.5μL	162.5μL
Primer Forward AL3531 / AL3532 (10μM)	300nM	0.75μL	9.25μL
Primer Reverse AL3535/ AL3534 (10μM)	300nM	0.75μL	9.25μL

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página:	5 de 10
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

BSA (10µg/µL)	0.4µg/µL	1µL	13µL
H ₂ O libre de nucleasas	-	9µL	117µL
ADN/Amplicón primera PCR	-	2µL	-
Total-	-	25µL	312µL

7.2 Procedimiento primera PCR

- a) Se añaden la máster ~~mix~~ y 2 microlitros del ADN extraído, a un tubo Eppendorf
b) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

95°C por 3 minutos
94°C por 45 segundos
59°C por 45 segundos
72°C por 1 minuto
72°C por 10 minutos

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

7.3 Procedimiento segunda PCR

- c) Para la segunda PCR se añaden la máster ~~mix~~ y 2 microlitros del ADN amplificado en la primera PCR, a un tubo Eppendorf
d) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

95°C por 3 minutos
94°C por 45 segundos
55°C por 45 segundos
72°C por 1 minuto
72°C por 10 minutos

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

- e) Conservar la muestra a 4°C.

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página: 6 de 10	
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

En casos donde no se obtenga el amplicón esperado con ninguna de las combinaciones anteriores de primers, se utiliza un primer LX0029 con el forward de la segunda PCR para intentar recuperar un fragmento más corto que aun permite identificar los subtipos. A continuación, se describen los protocolos con este primers a partir de la primera PCR de ambas combinaciones anteriores.

8. Tercer set de primers para amplificación de ADN de *C. hominis* y *C. parvum*

ORGANISMO	PRIMERS	SECUENCIA	GEN/ ENZIMA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (LX0374 - LX0375)	Forward	TTA CTC TCC GTT ATA GTC TCC	<i>gp60</i>	~955pb	(Alves et al., 2003; Glaberman et al., 2002; Xiao et al., 2009; Sulaiman, 2005)
	Reverse	GGA AGG AAC GAT GTA TCT GA			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - LX0029)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	<i>gp60</i>	350 bp	
	Reverse	CGA ACC ACA TTACAA ATGAAGT			

8.1 Tabla de reactivos segunda PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL) Tubo	VOLUMEN X2 REACCIONES (x2)
Azura Taq HS 2X Mix	1X	12.5μL	162.5μL
Primer Forward AL3532 (10μM)	300nM	0.75μL	9.25μL
Primer Reverse LX0029 (10μM)	300nM	0.75μL	9.25μL
BSA (10μg/μL)	0.4μg/μL	1μL	13μL

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página:	7 de 10
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

H ₂ O libre de nucleasas	-	9µL	117µL
Amplicón primera PCR	-	1µL	-
Total-	-	25µL	312µL

8.2 Procedimiento segunda PCR

a) Para la segunda PCR se añaden la máster mix y 1 microlitros del ADN amplificado en la primera PCR, a un tubo Eppendorf

b) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

95°C por 3 minutos
 94°C por 45 segundos
 55°C por 45 segundos
 72°C por 1 minuto
 72°C por 10 minutos

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

c) Conservar la muestra a 4°C.

9. Cuarto set de primers para amplificación de ADN de *C. hominis* y *C. parvum*

ORGANISMO	PRIMERS	SECUENCIA	GEN/ ENZIMA	TAMAÑO	REFERENCIA
<i>Cryptosporidium</i> (AL3531 - AL3535)	Forward	ATAGTCTCCGCTGTATTC	gp60	~945pb	(Alves et al., 2003; Glaberman et al., 2002; Uran-Velasquez et al., 2022; Sulaiman, 2005)
	Reverse	GGAAGGAACGATGTATCT			
<i>Cryptosporidium</i> (AL3532 - LX0029)	Forward	TCCGCTGTATTCTCAGCC	gp60	350 bp	(Alves et al., 2003; Glaberman et al., 2002; Uran-Velasquez et al., 2022; Sulaiman, 2005)
	Reverse	CGA ACC ACA TTACAA ATGAAGT			

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página: 8 de 10	
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

9.1 Tabla de reactivos segunda PCR

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (μL) Tubo	VOLUMEN X2 REACCIONES (x2)
<u>Azura Tag HS 2X Mix</u>	1X	12.5μL	162.5μL
Primer Forward AL3532 (10μM)	300nM	0.75μL	9.25μL
Primer Reverse LX0029 (10μM)	300nM	0.75μL	9.25μL
BSA (10μg/μL)	0.4μg/μL	1μL	13μL
H ₂ O libre de nucleasas	-	9μL	117μL
Amplicón primera PCR	-	2μL	-
Total-	-	25μL	312μL

9.2 Procedimiento segunda PCR

a) Para la segunda PCR se añaden la máster mix y 2 microlitros del ADN amplificado en la primera PCR, a un tubo Eppendorf

b) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

95°C por 3 minutos
94°C por 45 segundos
55°C por 45 segundos
72°C por 1 minuto
72°C por 10 minutos

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

c) Conservar la muestra a 4°C.

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página: 9 de 10	
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

En caso de necesitar aumentar la cantidad de ADN para el envío a secuenciar se puede repetir la segunda PCR en mayor volumen si hay una gran cantidad de barrido y bandas inespecíficas o se puede re amplificar el amplicón de la segunda PCR en mayor volumen siguiendo el siguiente protocolo.

10. Tabla de reactivos ~~Re-amplificación de muestra~~

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	RE AMPLIFICACION 25µL	RE AMPLIFICACION 50µL	RE AMPLIFICACION 75µL
Azura Taq HS 2X Mix	1X	12.5µL	25µL	37.5µL
Primer Forward AL3532 (10µM)	300nM	0.75µL	1.5µL	2.25µL
Primer Reverse AL3534/ LX0029 (10µM)	300nM	0.75µL	1.5µL	2.25µL
BSA (10µg/µL)	0.4µg/µL	1µL	2µL	3µL
H ₂ O libre de nucleasas	-	5µL	10µL	15µL
Amplicón segunda PCR	-	5µL	10µL	15µL
Total-	-	25µL	50µL	75µL

11. Procedimiento PCR ~~Re-amplificación de muestra~~

d) Se programa el termociclador para que se realicen 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

95°C por 3 minutos

94°C por 45 segundos

55°C por 45 segundos

72°C por 1 minuto

72°C por 10 minutos

* En el último ciclo, al final la muestra debe quedar a 4°C

e) Conservar la muestra a 4°C.

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 4
		Página:	10 de 10
Fecha de Emisión: Octubre 02 2025	Título: Protocolo PCR para la amplificación de ADN de <i>Cryptosporidium</i> para tipificación de <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>		

Bibliografía

- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A. A., Matos, O., & Antunes, F. (2003). Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2744–2747. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.41.6.2744-2747.2003>
- Glaberman, S., Moore, J. E., Lowery, C. J., Chalmers, R. M., Sulaiman, I., Elwin, K., Rooney, P. J., Millar, B. C., Dooley, J. S. G., Lal, A. A., & Xiao, L. (2002). Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6), 631–633. <https://doi.org/10.3201/eid0806.010368>
- Uran-Velasquez, J., Alzate, J. F., Farfan-Garcia, A. E., Gomez-Duarte, O. G., Martinez-Rosado, L. L., Dominguez-Hernandez, D. D., Rojas, W., Galvan-Diaz, A. L., & Garcia-Montoya, G. M. (2022). Multilocus Sequence Typing helps understand the genetic diversity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolated from Colombian patients. *PLoS ONE*, 17(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270995>
- Xiao, L., Hlavsa, M. C., Yoder, J., Ewers, C., Dearen, T., Yang, W., Nett, R., Harris, S., Brend, S. M., Harris, M., Onischuk, L., Valderrama, A. L., Cosgrove, S., Xavier, K., Hall, N., Romero, S., Young, S., Johnston, S. P., Arrowood, M., ... Beach, M. J. (2009). Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: Widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 3017–3020. <https://doi.org/10.1128/JCM.00226-09/ASSET/34B6E99B-850A-44E0-BF9F-0FA0DA4B62D6/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0090991570002.JPEG>
- Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, Shweiki HM, et al. Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Jun [cited 2025 Oct 17];43(6):2805–9. Available from: [/doi/pdf/10.1128/jcm.43.6.2805-2809.2005?download=true](https://doi/pdf/10.1128/jcm.43.6.2805-2809.2005?download=true)

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

Anexo #9. Protocolo purificación de fragmentos de gel kit “Invisorb® Fragment CleanUp”

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión:
		Página: 1 de 2	
Fecha de Emisión: Julio 30 2023	Título: Protocolo No. 5: Purificación de Fragmentos del Gel		
Elaborado por: Maria Alejandra Ramos	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo.

Utilizar el kit “~~Invisorb® Fragment CleanUp~~” para la purificación de fragmentos de ADN después de PCR a partir del gel de agarosa.

2. Alcance.

Este protocolo está diseñado para determinar la funcionalidad del kit de purificación de fragmentos de ADN con el fin de purificar bandas del gel de agarosa después de PCR.

Autoridad y Responsabilidad.

La autoridad de este protocolo recae en el director del proyecto de investigación. El responsable del desarrollo del protocolo es el personal del laboratorio encargado.

3. Materiales y Reactivos.

- Gel Solubilizante S (60ml)
- ~~Binding Enhancer~~ (6ml)
- Buffer de lavado (18ml)
- Buffer de elución (2ml)
- Filtro de spin
- Tubos receptores (2 ml)
- Tubos receptores (1,5 ml)
- Microcentrífuga
- Micropipetas (10 – 100 microlitros, 100 – 1000 microlitros)
- Puntas estériles
- Vortex
- Etanol 96 -100%
- Isopropanol 99.7%
- Baño seco
- Bisturí 120

Nota:

- Agregar 42ml de etanol 96-100% al buffer de lavado.
- Agregar 24ml de isopropanol 99.7% al ~~Binding Enhancer~~. Mezclar por inversión por 1 min. Repetir antes de usar

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión:
Fecha de Emisión: Julio 30 2023		Página: 2 de 2	
Título:		Protocolo No. 5: Purificación de Fragmentos del Gel	

4. Procedimiento.

Nota:

- Antes de comenzar, colocar un filtro giratorio en un tubo receptor de 2,0 mL
- Con debida anticipación colocar el baño seco a 50°C

a) Extraer fragmento de ADN del gel de agarosa al 0.8 – 2 % con un bisturí. Transferir fragmento a un eppendorf

Para fragmentos de gel de hasta 150 mg, agregue 500 µL de Gel Solubilizante S
 Para rebanadas de gel > 150 mg – 300 mg agregue 1 mL de Gel Solubilizante S
 No use más de 300 mg de fragmento de gel para un filtro.

b) Incubar con agitación continua a 50 °C durante 20 minutos hasta que el fragmento se disuelva por completo.

c) agregar 250 µL de Binding Enhancer a un volumen de reacción de 500 µL de Binding Enhancer o a un volumen de reacción de 1 mL y mezclar la suspensión con pipeta o en vórtex.

d) Agregar aproximadamente 800 µL de la muestra en el filtro y centrifugar a 11000 rpm durante 2 minutos. Desechar el filtrado.

-Para volúmenes de reacción > 800 µL, vuelva a agregar el volumen residual en el filtro giratorio y repetir el paso de centrifugación.

e) Agregar 500 µL de buffer de lavado al filtro y centrifugar durante 1 min a 11000 rpm. Desechar el filtrado.

f) Repetir e

g) Retirar el etanol residual del buffer de lavado centrifugando durante 4 min a máxima velocidad.

h) Transferir el filtro a un nuevo tubo receptor de 1,5 mL. Agregar al menos 20 µL de buffer de elución directamente en el centro del filtro.

i) Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar durante 1 minuto a 11000 rpm.

Nota:

- Para aumentar el rendimiento final de ADN, utilizar un volumen mayor de buffer de elución.
- Tener en cuenta que un volumen mayor de buffer de elución reduce la concentración final del ADN purificado.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos con buffer de elución aumenta ligeramente el rendimiento final

STRATEC Molecular. User Manual Invisorb® Fragment Cleanup [Internet]. October 2017. Disponible en: https://ibl.at/ecommerce/product?product_id=529938

DEFINITIVO

FAVOR ELIMINAR UNA VEZ RECIBA UNA NUEVA VERSIÓN DEL MANUAL

Anexo #10. Protocolo purificación de fragmentos de gel kit “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up”

 Universidad del Valle	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 1
		Página: 1 de 2	
Fecha de Emisión: Agosto 04 2025	Título: Protocolo purificación de fragmentos de gel		
Elaborado por: Maria Alejandra Ramos	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo.

Utilizar el kit “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up” para la purificación de fragmentos de ADN después de PCR a partir del gel de agarosa.

2. Alcance.

Este protocolo está diseñado para determinar la funcionalidad del kit de purificación de fragmentos de ADN con el fin de purificar bandas del gel de agarosa después de PCR.

Autoridad y Responsabilidad.

La autoridad de este protocolo recae en el director del proyecto de investigación. El responsable del desarrollo del protocolo es el personal del laboratorio encargado.

3. Materiales y Reactivos.

- Binding Buffer NT1 (40ml)
- Buffer de lavado NT3 - concentrado (25ml)
- Buffer de elución NE (13ml)
- Columnas con filtro amarillo x 50
- Tubos receptores (2 ml)
- Tubos receptores (1,5 ml)
- Microcentrífuga
- Micropipetas (10 – 100 microlitros, 100 – 1000 microlitros)
- Puntas estériles
- Vortex
- Etanol 96 -100%
- Baño seco
- Bisturí 120

Nota:

- Agregar 100ml de etanol 96-100% al buffer de lavado NT3 - concentrado.

	Instructivo de Trabajo	Número:	Versión: 1
		Página:	2 de 2
Fecha de Emisión: Agosto 04 2025	Título: Protocolo purificación de fragmentos de gel		
Elaborado por: María Alejandra Ramos	Revisado por:	Aprobado por:	

Nota:

- Antes de comenzar, colocar una columna con filtro amarillo en un tubo receptor de 2 ml.
- Con debida anticipación colocar el baño seco a 50°C

a) Utilizar un bisturí limpio y extraer un fragmento de ADN de un gel de agarosa, eliminar en su mayoría el exceso de agarosa. Determinar el peso del fragmento y transferir a un eppendorf limpio.

Por cada 100 mg de gel de agarosa < 2% añadir 200 µL de buffer NT1

- 1 mg = 2 µL
- 10 mg = 20 µL
- 50 mg = 100 µL
- 200 mg = 400 µL
- 250 mg = 500 µL

Para geles con > 2 % de agarosa, duplicar el volumen de buffer NT1.

b) Incubar a 50 °C durante 15 minutos, agitar brevemente en vórtex y volver a incubar a 50 °C durante 5 minutos, agitar nuevamente en vórtex. Verificar que el gel se disuelva por completo.

c) Agregar aproximadamente 700 µL de la muestra en la columna puesta sobre el tubo receptor de 2 ml y centrifugar a 11000 rpm durante 30 segundos. Desechar el filtrado.

-Para volúmenes de reacción > 700 µL, vuelva a agregar el volumen residual en el filtro giratorio y repetir el paso de centrifugación.

e) Agregar 700 µL de buffer de lavado NT3 a la columna y centrifugar durante 30 segundos a 11000 rpm. Desechar el filtrado.

f) Repetir e

g) Retirar el etanol residual del buffer de lavado centrifugando durante 5 min a 11000 rpm.

h) Transferir el filtro a un nuevo tubo receptor de 1,5 ml. Agregar entre 25 a 30 µL de buffer de elución NE directamente en el centro del filtro.

i) Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar durante 1 minuto a 11000 rpm.

Nota:

- Para aumentar el rendimiento final de ADN:

* Incubar el buffer de elución previamente a utilizar a 70°C

* Durante el paso i centrifugar primero a 700 rpm x 1 minuto y luego a 11000 rpm x i minuto

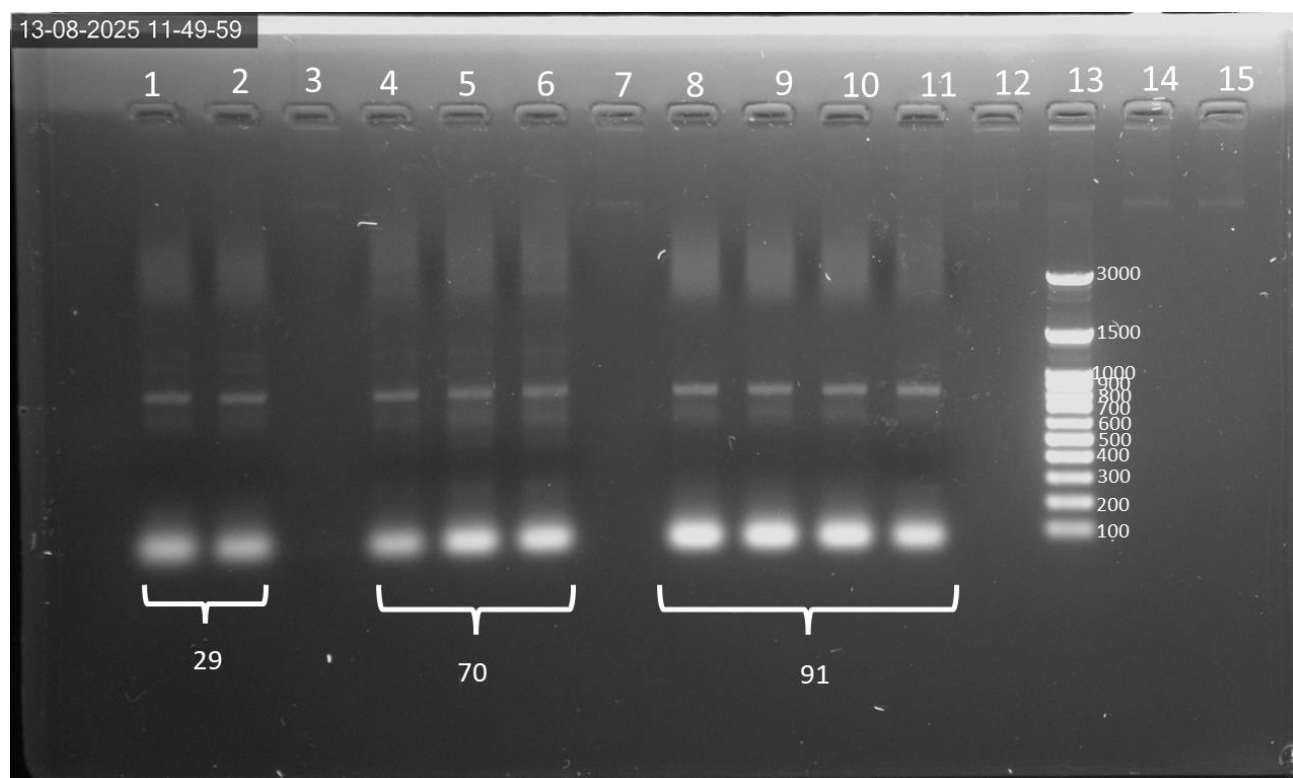
* Una vez se realice la primera elución utilizar el volumen de ADN eluido y volverlo a pasar por la columna 2 veces mas repitiendo el paso i

MACHEREY-NAGEL. Bioanalysis n NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up PCR clean-up and Gel extraction [Internet]. Disponible en: <https://www.mn-net.com/nucleospin-gel-and-pcr-clean-up-mini-kit-for-gel-extraction-or-pcr-clean-up-740609.50>

Anexo #11. Tabla para la interpretación de las pruebas de neutralidad, realizada con inteligencia artificial en base a Dogan *et al.* (88)

Prueba	Positivo significativo	Positivo no significativo	≈ 0	Negativo significativo	Negativo no significativo
Tajima's D	Exceso de variantes intermedias. Posible cuello de botella o selección equilibradora	Tendencia a estabilidad poblacional. Sin evidencia estadística concluyente	Evolución neutral, población en equilibrio	Exceso de variantes raras. Expansión poblacional reciente o selección estabilizadora	Tendencia a expansión o selección estabilizadora. Sin soporte estadístico
Fu's Fs	Déficit significativo de haplotipos. Asociado a reducción poblacional	Déficit leve de haplotipos. No se rechaza neutralidad	Neutralidad y estabilidad poblacional	Exceso significativo de haplotipos. Fuerte señal de expansión poblacional reciente	Tendencia a expansión poblacional. No concluyente
Fu & Li D*	Exceso de mutaciones internas. Posible selección equilibradora	Tendencia a estabilidad poblacional. Sin significancia	Neutralidad	Exceso de mutaciones externas. Expansión reciente o selección estabilizadora	Tendencia a expansión. Sin evidencia estadística
Fu & Li F*	Perdida de mutaciones raras; Cuellos de botella o selección equilibradora	Tendencia a estabilidad poblacional. Sin significancia	Neutralidad	Muchas mutaciones recientes; Expansión poblacional o selección estabilizadora	Tendencia a expansión. Sin evidencia estadística

Anexo #12. Gel para la concentración y purificación de ADN amplificado de vegetales



En cada carril se agregó entre 20 – 30 μ L del amplicón de la PCR anidada. Carril 13: GeneRuler 100bp Plus de Thermo Scientific™; Carril 1 y 2, 4- 6, 8-11 representan réplicas de las muestras 29, 70 y 91.