

**Genotipificación y descripción de la variabilidad genética de *Cryptosporidium* spp., identificado en muestras de pacientes colombianos, utilizando análisis multilocus de secuencias**

**Johanna Marcela Urán Velásquez**

Trabajo de grado para optar al título de Magister en  
Ciencias Básicas Biomédicas  
Énfasis Microbiología y Parasitología

Tutora:

Gisela María García Montoya. MSc, PhD.

Comité asesor:

Ángela Magnet Dávila. PhD

Ana Luz Galván Díaz. MSc, PhD

Juan Fernando Álzate Restrepo. MSc, PhD

Universidad de Antioquia

Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas

Julio de 2020

## RESUMEN

Los protistas del género *Cryptosporidium*, son parásitos con una distribución cosmopolita, favorecida por el amplio rango de hospedadores (animales y humanos) al que puede infectar, las diferentes rutas de transmisión y diversas fuentes de infección. Estos patógenos son prevalentes en humanos especialmente en población infantil e inmunocomprometida, en quienes puede causar alteraciones gastrointestinales que suelen cursar con diarreas osmóticas-secretoras persistentes, en algunos casos letales. En niños menores de cinco años las infecciones crónicas, además, pueden causar daños que alteran su desarrollo físico y cognitivo.

En la actualidad se reportan 39 especies de *Cryptosporidium*, con diversidad o variabilidad genética dentro de las mismas, probablemente asociada con diferencias en patogenicidad, especificidad de hospedador y patrones de propagación en la naturaleza. La mayoría de los estudios para analizar la variabilidad genética de *Cryptosporidium* spp., se han basado en análisis unilocus, especialmente con el marcador gp60; sin embargo, este tipo de análisis y este marcador, presenta limitaciones para identificar variantes genéticas que permitan de una manera precisa hacer análisis de diversidad, estructura poblacional y dinámica de transmisión, asociados con eventos genéticos y evolutivos de este parásito; información que se explora con mayor resolución usando análisis multilocus de secuencia (MLST), dentro de los cuales se podrían incluir a gp60 como marcador. A la fecha, en Colombia no se conocen trabajos sobre la variabilidad genética de *Cryptosporidium* utilizando análisis MLST, datos útiles y necesarios para el estudio de la dinámica de transmisión de este parásito en nuestro país.

En el presente estudio se identificaron las especies y subgenotipos de parásitos del género *Cryptosporidium* procedente de pacientes colombianos, mediante el análisis de secuencia de regiones parciales de los genes 18S rRNA y gp60 respectivamente. Además, se realizaron análisis de variabilidad genética usando análisis de múltiples loci, para los cuales fue necesario validar y evaluar el comportamiento individual de los marcadores seleccionados (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14). Con la información de la secuencia obtenida de

todos los marcadores por cada muestra incluida en el trabajo, se construyó una secuencia concatenada o consenso (SC) que se usó para realizar (i) análisis filogenéticos, (ii) establecer los genotipos multilocus (MLG), (iii) determinar los índices de diversidad génica: Hd, Pi, S, K y (iv) realizar comparaciones entre las poblaciones clínicas incluidas en el estudio, mediante el índice de fijación génica.

Con base en la metodología anterior, se identificaron cinco especies en 28 individuos incluidos en el estudio, *C. hominis* (16/28), *C. parvum* (8/28), *C. felis* (2/28), *C. meleagridis* (1/28) y *C. suis* (1/28), reportándose por primera vez las especies *C. meleagridis* y *C. felis* infectando a humanos en Colombia. La subgenotipificación unilocus con base en gp60, evidenció cuatro familias alélicas para *C. hominis* (**Ia**, **Ib**, **Id** y **Ie**), con el subgenotipo IbA10G2 como el más frecuente. Para *C. parvum*, se identificaron dos familias alélicas, **Ila** y **Ilc**, siendo más frecuente la **Ila**, y aunque la familia **Ilc** sólo se identificó en una muestra, fue un dato importante toda vez que se asocia con transmisión antroponótica dentro de *C. parvum*. Adicionalmente se reportan tres subgenotipos nuevos, con base en análisis unilocus de gp60 (**IaA13R6**, **IaA11R3** y **IlaA19G5R1**).

Se presenta, bajo nuestro conocimiento el primer trabajo realizado en Colombia sobre variabilidad genética basado en análisis MLST en los que se incluyeron 22 muestras (*C. hominis* 14/22 y *C. parvum* 8/22). Como resultados de estos análisis se observó un comportamiento polimórfico de todos los marcadores tanto para *C. hominis* como para *C. parvum*, especialmente con CP47, MS5 y gp60, marcadores con los cuales incluso se evidenciaron alelos únicos en algunas muestras. Los análisis filogenéticos con las SC mostraron una concordancia taxonómica con los resultados obtenidos con base en 18S rRNA y gp60, y además permitieron evidenciar la formación dos grupos monofiléticos que agrupaban a las especies *C. hominis* y *C. parvum*, manteniéndose el comportamiento diferencial observado con gp60 y además aumentando el número de subcladas al interior de los grupos monofiléticos.

Los análisis MLST con las SC, permitieron la identificación en las muestras *C. hominis* de 13 genotipos multilocus (MLG) y ocho para las muestras *C. parvum*; además se observó diversidad haplotípica multilocus independiente y no influenciada por gp60, y variabilidad genética también independiente de este marcador, pero influida por el mismo. En las comparaciones intra-especie por poblaciones clínicas, se observó dentro de las muestras *C. parvum*, diferencias génicas entre las muestras de los pacientes VIH positivos y los niños de Santander, con evidencia de menor cercanía evolutiva entre los parásitos *C. parvum* de estas dos poblaciones.

En conclusión, los datos obtenidos con este trabajo aportan evidencia científica de diversidad genética en los parásitos *C. hominis* y *C. parvum* identificados en muestras de pacientes VIH positivos y niños de Colombia, y soportan el evidente aporte y la necesidad del uso de análisis de múltiples loci, que permitan un abordaje más detallado y minucioso para los análisis de diversidad, que puedan explicar algunos eventos que gp60 como único marcador no permite; además, que son necesarios otros estudios a mayor escala, multicéntricos y multidisciplinarios para conocer la dinámica de transmisión y la estructura poblacional de *Cryptosporidium* spp. en Colombia.

**Palabras clave:** *Cryptosporidium*, MLST, variabilidad genética, Colombia, epidemiología molecular.

## **Genotyping and genetic diversity of *Cryptosporidium* species in Colombian patients, using multilocus sequence analysis**

### **SUMMARY**

Protists of the genus *Cryptosporidium* are cosmopolitan parasites with a wide range of vertebrate hosts (animals and humans) and multiple transmission routes and infection sources. These pathogens are prevalent in humans, especially in children and immunocompromised populations, and are associated with chronic watery diarrhea, which sometimes can be fatal. Impaired physical and cognitive development has also been reported in children under five years of age with chronic infections.

Until now there are 39 recognized species within the *Cryptosporidium* genus, with a great intra-species genetic diversity, which is probably associated with differences with the pathogenesis, host specificity, and propagation patterns of this parasite. Most of the studies on genetic variability in *Cryptosporidium* are based on unilocus analysis, being the gp60 gene the most characterized marker. However, a major limitation of this approach is their inability to provide accurate data on genetic diversity, population structure, and transmission dynamics, which is associated with genetic and evolutionary events in this parasite. Multilocus Sequences Analysis (MLST) are acknowledged to improve resolution over the analysis of a single locus, giving useful information to study genetic variability. Unfortunately, in Colombia, so far, there are no reports on *Cryptosporidium* studies in human samples using MLST analysis.

In the present study, *Cryptosporidium* species and subgenotypes circulating in Colombian patients were identified through the sequence analysis of partial regions of 18S rRNA and gp60 genes, respectively. Additionally, genetic variability was studied using an MLST strategy, after the evaluation and validation of the individual behavior of the selected markers (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7, and TP14). A concatenated/consensus sequence- SC was constructed with the sequence information obtained from all the markers for each sample, which was used to perform: (i) phylogenetic analysis, (ii) Multilocus

genotypes (MLG) identification, (iii) genetic diversity indices (Hd, Pi, S, K) determination, and (iv) comparisons between the clinical populations included in the study through the gene fixation index.

Based on the previous methodology, five species were identified in 28 individuals: *C. hominis* (16/28), *C. parvum* (8/28), *C. felis* (2/28), *C. meleagridis* (1/28) and *C. suis* (1/28). This is the first report of *C. meleagridis* and *C. felis* in humans in Colombia. Unilocus subgenotyping based on gp60 showed four allelic families for *C. hominis* (**Ia**, **Ib**, **Id**, and **Ie**), with the **IbA10G2** subgenotype as the most frequent. For *C. parvum*, two allelic families were identified, **Ila** and **Ilc**, with **Ila** as the most frequent. Although the **Ilc** family was only identified in one sample, it is important to point out the relevance of this finding since it is associated with anthroponotic transmission within *C. parvum*. Additionally, three new subgenotypes are reported based on the unilocus analysis of gp60 (IaA13R6, IaA11R3 y IlaA19G5R1).

To our knowledge, this is the first work on genetic variability based on MLST analysis in human samples in Colombia, which included 22 samples (*C. hominis* 14/22 and *C. parvum* 8/22). A polymorphic behavior was observed for both *C. hominis* and *C. parvum*, especially with CP47, MS5, and gp60 markers, for which even unique alleles were identified in some samples. Phylogenetic analysis with the SC showed an adequate taxonomic compared to the results obtained with 18S rRNA; and also, they allowed the identification of two monophyletic clades that separated the subgenotypes of the *C. hominis* and *C. parvum* related species. Additionally, thirteen and eight multilocus genotypes (MLG) were identified for *C. hominis* and *C. parvum*, respectively. High haplotypic diversity was observed with MLST analysis, which was independent and not influenced by gp60. Although genetic variability was also independent of this marker, it was influenced by this. The variability indices obtained were higher in *C. hominis* than in *C. parvum*; however, in the intra-species comparisons for clinical populations, genetic differences were observed between the *C. parvum* samples of the HIV positive patients and the children from Santander, with evidence

of less evolutionary closeness between the *C. parvum* parasites of these two clinical populations.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, MLST, genetic variability, Colombia, molecular epidemiology.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**18S rRNA / SSU rRNA** – Subunidad pequeña del RNA ribosomal

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool

**BSA** – Albumina de suero bovino

**CINZ** – Código Internacional de Nomenclatura Zoológica

**COWP** – Proteína de la pared del ooquiste

**CP47** – Proteína de 47kDa

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**F<sub>st</sub>** – Índice de fijación

**GEMS** – The Global Enteric Multicenter Study

**gp1300** – Glicoproteína de 1300kDa

**gp60** – Glicoproteína de 60kDa

**Hd** – diversidad haplotípica

**HSP70** – Proteína de choque térmico de 70kDa

**IF** – Inmunofluorescencia

**ITS** – Espaciadores transcritos internos

**K** – Número promedio de diferencias nucleotídicas

**MCS** – Microsatélites

**MLFT** – Análisis de fragmentos de múltiples locus

**MLG** – Genotipos multilocus

**MLST** – Análisis de secuencias de múltiples locus

**MNS** – Minisatélites

**NA** – Niños Antioquia

**NCBI** – National Center for Biotechnology Information

**NDT** – Neglected Tropical Diseases

**NGS** – Secuenciación de Nueva Generación / Secuenciamiento masivo

**NS** – Niños Santander

**OMS** – Organización Mundial de la Salud



**PCR** – Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PCR-RFLP** – Reacción en Cadena de la Polimerasa-Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica

**PGI** – Prostaglandinas

**Pi** – Diversidad nucleotídica

**S** – Número de sitios polimórficos

**SC** – Secuencia Consenso

**SNPs** – Polimorfismos únicos de secuencia

**SRA** – Sequence Read Archive

**TRAP** – Proteínas de adherencia relacionadas con la trombospondina

**VA** – Pacientes VIH positivos de Antioquia

**VIH** – Virus de Inmunodeficiencia Humana

**ZNM** – Ziehl Neelsen modificado

## ÍNDICE GENERAL

|  | Página    |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. <i>Cryptosporidium</i> y criptosporidiosis  | 1         |
| 1.1.1. Algunos eventos históricos  | 1         |
| 1.1.2. Taxonomía e identificación de especies  | 5         |
| 1.1.3. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.  | 10        |
| 1.1.4. Criptosporidiosis humana: Clínica y fisiopatogénesis  | 15        |
| 1.1.5. Diagnóstico   | 17        |
| 1.2. Epidemiología molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.  | 18        |
| 1.2.1. Aspectos epidemiológicos mundiales y nacionales de la criptosporidiosis humana  | 19        |
| 1.2.2. Diversidad genética   | 22        |
| 1.2.2.1 Genotipificación por análisis unilocus   | 22        |
| 1.2.2.2. Genotipificación por análisis multilocus  | 24        |
| 1.2.2.3. Análisis NGS y Genómica Comparativa   | 30        |
| 1.2.3. Dinámica de transmisión de <i>Cryptosporidium</i> spp.  | 32        |
| 1.2.4. Genética de poblaciones   | 36        |
| <b>2. JUSTIFICACIÓN</b>  | <b>40</b> |
| <b>3. HIPÓTESIS</b>  | <b>41</b> |
| <b>4. OBJETIVOS</b>  | <b>42</b> |
| 4.1. Objetivo general  | 42        |
| 4.2. Objetivos específicos   | 42        |
| <b>5. METODOLOGÍA</b>  | <b>43</b> |
| 5.1. Tipo de estudio y población analizada   | 43        |
| 5.2. Caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.  | 44        |
| 5.2.1. Purificación y análisis de estabilidad del ADN total  | 44        |
| 5.2.2. Identificación de especies de <i>Cryptosporidium</i> empleando el marcador 18S rRNA: amplificación, secuenciación y análisis filogenético | 45        |
| 5.2.3. Subgenotipificación unilocus usando el marcador gp60: amplificación, secuenciación y análisis filogenético                                | 47        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.4. Análisis multilocus de secuencias (MLST)  | <b>49</b>  |
| 5.2.4.1. Selección y validación inicial de marcadores con secuencias micro o minisatélites   | <b>49</b>  |
| 5.2.4.2. Estandarización de los protocolos de amplificación y secuenciación de los marcadores incluidos en los análisis MLST (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14)  | <b>52</b>  |
| 5.2.4.3. Análisis individual de los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14 en los parásitos clasificados como <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i> : análisis filogenéticos, alelos y tratamiento estadístico                  | <b>53</b>  |
| 5.2.4.4. Análisis MLST con la secuencia consenso de los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14: análisis filogenéticos y tratamiento estadístico, genotipos multilocus, índices de variabilidad genética y fijación génica-Fst | <b>56</b>  |
| <b>6. RESULTADOS</b>   | <b>59</b>  |
| 6.1 Muestras incluidas en el trabajo   | <b>59</b>  |
| 6.2. Caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.  | <b>59</b>  |
| 6.2.1. Análisis unilocus de secuencia  | <b>59</b>  |
| 6.2.1.1. Identificación de especies de <i>Cryptosporidium</i> con base en la secuencia parcial del gen 18S rRNA  | <b>59</b>  |
| 6.2.1.2. Identificación de subgenotipos dentro de las especies <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> y <i>C. meleagridis</i> , con base en la secuencia parcial del gen gp60, como único marcador                                       | <b>62</b>  |
| 6.2.2. Análisis multilocus de secuencias (MLST)  | <b>66</b>  |
| 6.2.2.1. Validación inicial de marcadores con secuencias micro o minisatélites seleccionados para los MLST   | <b>66</b>  |
| 6.2.2.2. Muestras, especies de <i>Cryptosporidium</i> y marcadores con secuencias micro y minisatélites incluidos en el análisis MLST  | <b>68</b>  |
| 6.2.2.3. Análisis individual de los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14: análisis filogenéticos, identificación de alelos y tratamiento estadístico   | <b>69</b>  |
| 6.2.2.4. Análisis multilocus de secuencia (MLST) con los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14  | <b>78</b>  |
| <b>7. DISCUSIÓN</b>  | <b>88</b>  |
| <b>8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>  | <b>106</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>110</b> |
| <b>10. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>  | <b>128</b> |
| Tabla. Códigos de acceso para cada una de las secuencias depositadas en el GenBank |            |
| <b>11. AGRADECIMIENTOS</b>   | <b>129</b> |

## LISTA DE TABLAS

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Tabla 1.</b> Taxonomía de parásitos del género <i>Cryptosporidium</i>  | 6      |
| <b>Tabla 2.</b> Especies de <i>Cryptosporidium</i> que cumplen con los criterios del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica   | 9      |
| <b>Tabla 3.</b> Genomas de <i>Cryptosporidium</i> spp. reportados en bases de datos públicas  | 26     |
| <b>Tabla 4.</b> Marcadores con secuencias micro o minisatélites y/o SNPs, más reportados en la literatura para análisis multilocus (MLST o MLFT) en <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>    | 26     |
| <b>Tabla 5.</b> Especies de <i>Cryptosporidium</i> reportadas en el humano y otros hospedadores   | 33     |
| <b>Tabla 6.</b> Protocolos estandarizados para la amplificación de los siete marcadores seleccionados para los análisis MLST  | 54     |
| <b>Tabla 7.</b> Medidas de diversidad y diferenciación génica   | 58     |
| <b>Tabla 8.</b> Identificación de las especies de <i>Cryptosporidium</i> con base en la secuencia parcial del gen 18S rRNA  | 60     |
| <b>Tabla 9.</b> Subgenotipos intra-especie <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> y <i>C. meleagridis</i> , con base en el análisis unilocus de la secuencia parcial del gen gp60             | 63     |
| <b>Tabla 10.</b> Información de los genomas de <i>Cryptosporidium</i> spp. seleccionados para la estrategia de validación de los marcadores para los análisis MLST                          | 67     |
| <b>Tabla 11.</b> Alelos para cada uno de los seis marcadores en las 14 muestras identificadas como <i>C. hominis</i> y las 8 identificadas como <i>C. parvum</i>                            | 74     |
| <b>Tabla 12.</b> Matriz de distancias para cada marcador entre cada una de las 22 muestras comparadas con las secuencias del genoma <i>C. hominis</i> TU502-2012 y <i>C. parvum</i> Iowa II | 76     |
| <b>Tabla 13.</b> Genotipos multilocus con base en la secuencia consenso para los parásitos <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i> identificados en las muestras de pacientes colombianos      | 80     |
| <b>Tabla 14.</b> Índices de variabilidad genética intra-especies e intra-poblaciones clínicas   | 86     |
| <b>Tabla 15.</b> Índice de fijación génica ( $F_{st}$ ) intra-especies e inter-poblaciones clínicas   | 87     |

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página    |
|--|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.  | <b>14</b> |
| <b>Figura 2.</b> Factores de virulencia descritos para <i>Cryptosporidium</i> spp.   | <b>16</b> |
| <b>Figura 3.</b> Principales rutas de transmisión descritas con base en los subgenotipos establecidos con análisis unilocus de gp60 para <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>                    | <b>35</b> |
| <b>Figura 4.</b> Modelos de estructuras de poblaciones   | <b>37</b> |
| <b>Figura 5.</b> Árbol de máxima verosimilitud. Especies de <i>Cryptosporidium</i> identificadas con base en la secuencia parcial del gen 18S rRNA   | <b>61</b> |
| <b>Figura 6.</b> Árbol de máxima verosimilitud. Subgenotipos intra-especie para <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> y <i>C. meleagridis</i> identificados con base en gp60                      | <b>64</b> |
| <b>Figura 7.</b> Análisis filogenético con las secuencias consenso de los siete marcadores en los 15 genomas de <i>Cryptosporidium</i> usados para la validación                                 | <b>68</b> |
| <b>Figura 8.</b> Árboles filogenéticos de cada marcador (CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14) construidos con las secuencias de las 14 muestras <i>C. hominis</i> y 8 <i>C. parvum</i>           | <b>71</b> |
| <b>Figura 9.</b> Boxplot: comparación de distancias génicas de cada marcador para <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i>   | <b>77</b> |
| <b>Figura 10.</b> Análisis filogenético con las secuencias consenso de los seis marcadores para las 22 muestras de pacientes colombianos identificadas como <i>C. hominis</i> y <i>C. parvum</i> | <b>79</b> |
| <b>Figura 11.</b> Gráfica para ejemplarizar algunos de los hallazgos de los MLST con respecto a los análisis de secuencias   | <b>82</b> |
| <b>Figura 12.</b> Red de Genotipos Multilocus construida con las secuencias consenso de los seis marcadores para las 14 muestras <i>C. hominis</i> y las 8 <i>C. parvum</i>                      | <b>84</b> |

## 1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

### 1.1. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis

#### 1.1.1. Algunos eventos históricos

Los parásitos del género *Cryptosporidium* son microorganismos intracelulares que pueden infectar células del epitelio gastro-intestinal, de una amplia variedad de hospedadores vertebrados incluyendo los humanos, en quienes la transmisión puede ser de tipo zoonótica o antroponótica. El primer hallazgo de este endoparásito lo reportó Ernest Tyzzer en 1907, quien observó algunos estadios parasitarios de este microorganismo en células de glándulas gástricas de ratones comunes, decidiendo darle el nombre de *Cryptosporidium muris*. En 1910 este mismo investigador, describió con más detalle la morfología y ciclo de vida del parásito identificado y para 1912 encontró a *Cryptosporidium* en ratones de laboratorio, pero ya no infectado células gástricas sino células intestinales, con daños asociados con este epitelio. Además, encontró que los ooquistes del parásito observado eran más pequeños a los previamente descritos. Con estas nuevas evidencias biológicas y morfométricas Tyzzer decidió reportar una nueva especie que llamó *C. parvum* (1–5).

Para la década de los 50, otros investigadores encontraron asociado a *Cryptosporidium* spp., con enfermedades intestinales en aves de corral y dos décadas después, se comienza a reportar evidencia de *C. parvum* en ganado vacuno y en otra variedad de animales vertebrados domésticos y silvestres, asociado con enfermedad gastrointestinal y pérdidas económicas (6). El impacto económico y de salud animal comenzó a llamar la atención de los profesionales en el campo veterinario y fomentó el aumento del número de trabajos de investigación en animales, los cuales resaltaron la necesidad de involucrar la especie del hospedador, de donde se aislaba o identificaba el parásito, como dato adicional e importante para el establecimiento de las nuevas especies de *Cryptosporidium* (7,8).

En humanos, la presencia de *Cryptosporidium* se reportó por primera vez en 1976, casi 70 años después de ser descrito en ratones (1), el hallazgo se hizo en muestras de tejido

epitelial intestinal de un niño con enterocolitis y un adulto con penfigoide ampoloso severo y síntomas gastrointestinales (9,10). A principios de la década de los 80, se reportó la presencia de este patógeno en heces de pacientes inmunológicamente competentes, con síntomas gastrointestinales, quienes podían cursar con infecciones autolimitadas (11,12) y en niños pequeños y pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), quienes presentaban enfermedad que cursaba con diarrea persistente a crónica, en ocasiones mortal (13–15). A la fecha, está comprobado que los humanos pueden infectarse con diferentes especies de *Cryptosporidium*, siendo las más importantes por frecuencia o número de casos, *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis* y las rutas de infección más comunes, pero no excluyentes, antroponótica para *C. hominis* y zoonótica para las otras dos especies (16–18).

La dispersión de *Cryptosporidium* spp. en la naturaleza, ha sido favorecida por características biológicas del parásito, como por ejemplo que los ooquistes eliminados en materia fecal son inmediatamente infectantes para una variedad de hospedadores, a través de alimentos y/o aguas contaminadas. Estos ooquistes además de tener un tamaño pequeño (4-6µm), que hace posible que escapen a los filtros usados en los procesos de potabilización de aguas, poseen una doble pared con una composición macromolecular que le confiere resistencia a las condiciones medioambientales adversas y los hace resistentes también, al tratamiento con cloro importante en los tratamientos de aguas de consumo humano (5,16,19).

La probabilidad que tiene *Cryptosporidium* spp. de ser transmitido por diversas fuentes hídricas, se asocia en gran medida con los efectos antropogénicos, que consecuentemente pueden influenciar las infecciones en diversos hospedadores animales domésticos o silvestres y por supuesto en el humano. Se considera además el papel potencial que tienen los animales, en el desarrollo de un fenómeno cíclico en el que los humanos contaminan aguas de consumo animal y animales infectados contaminan aguas de consumo animal y humano; fenómeno que representa una preocupación de salud



pública para las empresas de servicios de agua potable, en todos los países en el ámbito mundial (5,16,19,20).

La primera asociación de *Cryptosporidium* spp. con una epidemia por transmisión hídrica en población humana general, se reportó en Estados Unidos en 1993, tras la contaminación de dos fuentes hídricas cercanas a la ciudad de Milwaukee, donde se infectaron probablemente más de 400.000 personas, 600 de las cuales enfermaron y 67 murieron, situación epidemiológica que permitió un avance en el estudio clínico-epidemiológico de esta parasitosis en humanos (21) y que fue el punto de partida para la inclusión de la criptosporidiosis, dentro de la lista de enfermedades asociadas con transmisión hídrica (22).

En el ámbito mundial, aproximadamente 95 países han reportado la presentación de brotes de transmisión hídrica de *Cryptosporidium*, relacionados con lluvias estacionales, piscinas, parques acuáticos y aguas de bebida de fuentes superficiales como lagos, ríos, pozos, entre otros (23–26). Dadas la elevada morbilidad, casos de mortalidad e implicaciones socioeconómicas relacionadas con el mecanismo de infección oro-fecal de la criptosporidiosis, desde el 2004 hasta la fecha, es reconocida e incluida por la Organización Mundial de la Salud, (OMS), dentro lo que denomina “Iniciativa de Enfermedades Olvidadas” (NTD, por sus siglas en inglés Neglected Tropical Diseases) (27,28).

Con respecto a la obtención de información genética de *Cryptosporidium*, los trabajos inician con el establecimiento del cariotipo de *C. parvum* y avanzan con el uso de modernas técnicas de biología molecular, de secuenciamiento y bioinformáticas que permitieron análisis más profundos y de mayor cantidad de información, para llegar en 2004 al establecimiento del primer genoma de *C. parvum* (aislado Iowa II) por Abrahamsen y col. y de *C. hominis* aislado TU502 por Xu y col. En 2012 Ifeonu y col. mejoran las estrategias para la obtención y ensamble del genoma TU502, ahora nombrado TU502-2012, obteniendo un genoma menos fragmentado, con contigs más largos y consecuentemente genes más completos, aumentando el porcentaje de genoma codificante, comparado con la primera versión del 2004. Después de los primeros genomas, se han reportado alrededor

de 30 proyectos genómicos en diferentes bases de datos como CryptoDB y SRA del NCBI, incluyendo un genoma obtenido de un aislado colombiano por Isaza y col. en el 2015 (29–35).

Décadas de estudios genómicos en *Cryptosporidium*, han permitido llegar al establecimiento de un genoma estimado de 9,0 Mb, distribuido en ocho cromosomas, con un metabolismo extremadamente sencillo o reducido, en el cual un gran número de rutas biosintéticas convencionales se han simplificado o desaparecido. *Cryptosporidium* no realiza el ciclo de Krebs, carece del grupo de genes que codifican las enzimas que sintetizan las pirimidinas y no tiene capacidad para producir nuevos aminoácidos y folato, carece de genoma mitocondrial y de apicoplasto pero se confirmó la presencia de mitosoma (31–37).

Teniendo en cuenta la información anterior e involucrando otros aspectos importantes no mencionados aún, para sintetizar en remarcables momentos la historia de *Cryptosporidium* spp., y su relación con el humano, seis eventos deberían ser tenidos en cuenta, dadas sus implicaciones en diversos aspectos biológicos, fisiopatogénicos, clínicos, genéticos, taxonómicos y de dinámica de transmisión de este parásito:

1. *Cryptosporidium* spp., causante de procesos infecciosos graves, inclusive mortales en pacientes inmunocomprometidos, cuadros asociados con diarrea crónica y daño al enterocito del intestino delgado, hábitat del parásito (13–15).
2. Confirmación de transmisión antroponótica y zoonótica para los humanos, en ambos casos por una vía de infección oro-fecal (5).
3. Detección de *Cryptosporidium* spp. en aguas, inclusive las sometidas a procesos de potabilización, involucrando el agua como una importante fuente de infección y ampliando las rutas de transmisión y dispersión del parásito (4,19,21,38)
4. Aporte de evidencia de laboratorio, de la multiplicación de *Cryptosporidium parvum* fuera de una célula, considerando que este protozoo puede desarrollar todo su ciclo vital, libre de células (39,40).

5. Desarrollo de estadios extracelulares en biopelículas acuáticas, las cuales actúan como un sustrato para los ooquistes y un ambiente rico en nutrientes donde *Cryptosporidium* spp. puede multiplicarse y desarrollarse, evidenciando un proceso y estadios similares a los descritos en la multiplicación libre de células en laboratorio. Estos hallazgos hacen referencia al potencial de estas matrices para actuar como reservorios para *Cryptosporidium* spp. (40–43).
6. Obtención, disponibilidad y acceso a información genómica de diferentes especies de *Cryptosporidium*, que ha promovido el mejoramiento de la caracterización génica, hacer afinamientos taxonómicos y filogenéticos, además de obtener evidencia de los posibles eventos evolutivos que se han presentado en este género de parásitos, y por supuesto de toda la información que ha permitido dilucidar aspectos biológicos que tienen que ver con la relación de parasitismo que tiene *Cryptosporidium* con sus diferentes hospedadores (31,32).

### **1.1.2. Taxonomía e identificación de especies**

Hasta mediados de la década del 2010, taxonómicamente *Cryptosporidium* spp. era incluido dentro del reino Protozoa, Filo Apicomplexa, subclase coccidia, y se había clasificado como tal con base en la morfología de los estadios parasitarios, tipo de hospedador, tipo de reproducción, entre otros aspectos, que se sabe son insuficientes y en algunos casos confusos, para obtener datos que permitan llegar a una adecuada resolución a escala taxonómica. La taxonomía de *Cryptosporidium* spp. ha cambiado y se ha depurado desde su descubrimiento a la fecha, especialmente después de la década de los noventa, con el advenimiento y aplicación de las técnicas de microscopía electrónica, moleculares, herramientas filogenéticas-cladistas y de bioinformática (5,16,44).

A la fecha, se considera que los eucariotas simples (protistas) son un grupo heterogéneo y parafilético, que alberga y agrupa dentro del Reino Chromista a protozoarios del género *Cryptosporidium*, *Blastocystis* y *Balantidium*, a las algas cromofitas y un grupo de pseudohongos (Oomicetos) del género *Pythium* spp. (45). La aplicación de estudios moleculares basados principalmente en el análisis de las secuencias de ADN de la subunidad

pequeña del ARN ribosomal (SSU rRNA/18S rRNA) (46) en asociación con algunos datos biológicos como ooquiste sin esporoquistes, ausencia de apicoplasto (47), la capacidad de llevar a cabo el proceso de sizigia, la confirmación del desarrollo de estadios intra y extracelulares (48), la localización vacuolar intracelular, pero extra-citoplasmática (49); han aportado información suficiente para reagrupar a *Cryptosporidium* spp., en un nuevo nivel taxonómico de clase Gregarinomorphea, subclase Cryptogregarina, orden Cryptogregarida y género *Cryptosporidium* (50,51), clasificación aceptada y recomendada en la actualidad (Tabla 1).

**Tabla 1. Taxonomía de parásitos del género *Cryptosporidium***  
*Tomado y adaptado de Ruggiero y col. 2014 (Ref. 45)*

|             |                              |
|-------------|------------------------------|
| Super Reino | Eukariota                    |
| Reino       | Chromista                    |
| Sub Reino   | HAROSA (= "Super grupo SAR") |
| Infra Reino | HALVARIA                     |
| Superfilo   | Alveolata                    |
| Filo        | Miozoa                       |
| Subfilo     | Myzozoa                      |
| Intrafilo   | Apicomplexa                  |
| Superclase  | Sporozoa                     |
| Clase       | Gregarinomorphea             |
| Subclase    | Cryptogregarina              |
| Orden       | Cryptogregarida              |
| Género      | <i>Cryptosporidium</i>       |

Igualmente, la incriminación de especies dentro del género *Cryptosporidium* ha evolucionado a través del tiempo y como consecuencia necesariamente se han renombrado algunas especies. Para la década de los noventa, *C. parvum* era la especie aislada de la mayoría de los mamíferos infectados, y se categorizaba con un genotipo y una letra o un número diferente de acuerdo con el hospedador, si era humano o animal (7,52). Para el año 2000, con análisis filogénicos basados en marcadores moleculares como el gen 18S rRNA, los espaciadores transcritos internos (ITS) y la proteína de choque térmica de 70 kDa (HSP70), e involucrando datos biológicos, como el tipo de hospedador al que infectaban; se consideró que *C. parvum* genotipo H o I (aislado principalmente de humanos) y *C. parvum* genotipo C o II (aislado principalmente de ganado vacuno), eran dos especies diferentes que podían infectar al humano, y que se asociaban con distintas rutas de transmisión,

antroponótica para *C. hominis* y zoonótica para *C. parvum*. Con base en estos resultados se dio uno de los cambios más notables renombrando o reclasificando a *C. parvum* genotipo H como *C. hominis*, una de las especies más importantes causantes de enfermedad en humanos (5,53–57).

Actualmente el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ) establece como parámetros para establecer una especie, proveer no sólo la información morfométrica de los diferentes estadios del parásito, sino también la descripción del hospedador natural y experimental, y la caracterización genética que permita diferenciar entre las especies ya descritas (8). A la fecha, para *Cryptosporidium* spp. se han reportado alrededor de 39 especies que cumplen con todos los parámetros anteriores (Tabla 2), de estas, alrededor de 20, se han identificado en humanos, siendo *C. hominis* y *C. parvum* las especies más frecuentemente reportadas, seguida en menor frecuencia por *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. muris*, entre otras especies (Tabla 5) (18). Además, la literatura reporta aproximadamente 40 genotipos, término que hace referencia en *Cryptosporidium* a parásitos con diferencias genéticas que los aleja de las especies ya descritas, pero de los cuales la información es insuficiente para clasificarlos como una nueva especie, teniendo en cuenta los criterios del CINZ (5,18).

Varios genes con secuencias conservadas como el 18S rRNA, los que codifican para HSP70, la proteína de la pared del ooquiste (COWP) y la actina; otros con una variabilidad moderada como los que codifican para la B-tubulina y las proteínas adherencia relacionadas con la trombospondina (TRAP-C1 y TRAP-C2), así como los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2, se han empleado para la identificación de parásitos del género *Cryptosporidium*, usando herramientas basadas en el análisis de un sólo locus mediante la amplificación de una región de un gen. De estos el más usado es el gen 18S rRNA, quizás por su naturaleza multicopia y la existencia de una secuencia conservada, que permite el diseño de primers para la amplificación de una región común para todos los parásitos del género, además de regiones semi-conservadas y variables que nos permiten hacer la diferenciación de especies (58).

Las estrategias empleadas por décadas para el análisis con los marcadores antes mencionados, tanto para la identificación de género como de especie, se basaron en la amplificación por diferentes tipos de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (punto final, anidada, PCR-RFLP, tiempo real), y confirmación cualitativa de amplificación, con reportes de presencia o ausencia de *Cryptosporidium* y probablemente alguna de sus especies, con limitaciones en la detección de infecciones mixtas, en la detección de especies que no sean muy comunes en la transmisión, y además en aportar información para los análisis taxonómicos, filogenéticos y de dinámica de transmisión del parásito (16,59).

Con el advenimiento de nuevas y más depuradas técnicas de biología molecular, bioquímicas y bioinformáticas, se viene implementando y se sugiere siempre, secuenciar los productos amplificados por las diferentes estrategias de PCR, y el posterior análisis bioinformático y filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas, lo cual no sólo permite corroborar los resultados cualitativos de amplificación, sino que hace posible según el marcador utilizado, dar datos de género y especie permitiendo un abordaje filogenético (5,16).

**Tabla 2. Especies de *Cryptosporidium* que cumplen con los criterios del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica**

| Especies de <i>Cryptosporidium</i> | Hospedador donde se realizó la primera identificación | Identificada en humanos SI/NO | Principal tejido infectado        |
|------------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>C. parvum</i> (Ref. 3)          | <i>Mus musculus</i>                                   | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. hominis</i> (Ref. 57)        | <i>Homo sapiens</i>                                   | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. meleagridis</i> (Ref. 60)    | <i>Meleagris gallopavo</i>                            | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. felis</i> (Ref. 61)          | <i>Felis catus</i>                                    | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. suis</i> (Ref. 62)           | <i>Sus scrofa</i>                                     | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. muris</i> (Ref. 2)           | <i>Mus musculus</i>                                   | SI                            | Gástrico                          |
| <i>C. tyzzeri</i> (Ref. 3,63)      | <i>Mus musculus</i>                                   | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. cuniculus</i> (Ref. 64,65)   | <i>Oryctolagus cuniculus</i>                          | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. andersoni</i> (Ref. 66)      | <i>Bos taurus</i>                                     | SI                            | Gástrico                          |
| <i>C. canis</i> (Ref. 67)          | <i>Canis lupus familiaris</i>                         | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. bovis</i> (Ref. 68)          | <i>Bos taurus</i>                                     | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. fayeri</i> (Ref. 69)         | <i>Macropus Rufus</i>                                 | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. xiaoi</i> (Ref. 70)          | <i>Ovis aries</i>                                     | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. ubiquitum</i> (Ref. 71)      | <i>Coendou prehensilis</i>                            | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. molnari</i> (Ref. 72)        | <i>Sparus aurata</i><br><i>Dicentrarchus labrax</i>   | NO                            | Gástrico                          |
| <i>C. viatorum</i> (Ref. 73)       | <i>Homo sapiens</i>                                   | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. scrofarum</i> (Ref. 74)      | <i>Sus scrofa</i>                                     | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. erinacei</i> (Ref. 75)       | <i>Erinaceinae</i>                                    | SI                            | Intestinal                        |
| <i>C. fragile</i> (Ref. 76)        | <i>Duttaphrynus melanostictus</i>                     | NO                            | Gástrico                          |
| <i>C. macropodum</i> (Ref. 77)     | <i>Macropus giganteus</i>                             | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. ryanae</i> (Ref. 78)         | <i>Bos Taurus</i>                                     | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. galli</i> (Ref. 79,80)       | <i>Gallus</i>   | NO                            | Gástrico                          |
| <i>C. wrairi</i> (Ref. 81)         | <i>Cavia porcellus</i>                                | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. serpentis</i> (Ref. 82)      | <i>Elaphe spp.</i>                                    | NO                            | Gástrico                          |
| <i>C. baileyi</i> (Ref. 83)        | <i>Gallus domesticus</i>                              | NO                            | Vías respiratorias/<br>Intestinal |
| <i>C. varanii</i> (Ref. 84)        | <i>Varanus prasinus</i>                               | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. rubeyi</i> (Ref. 85)         | <i>Spermophilus spp.</i>                              | NO                            | intestinal                        |
| <i>C. huwi</i> (Ref. 86)           | <i>Paracheirodon innesi</i>                           | NO                            | Gástrico                          |
| <i>C. proliferans</i> (Ref. 87)    | <i>Tachyoryctes splendens</i>                         | NO                            | Gástrico                          |
| <i>C. homai</i> (Ref. 88)          | <i>Cavia porcellus</i>                                | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. avium</i> (Ref. 89)          | <i>Cyanoramphus novaezealandiae</i>                   | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. testudinis</i> (Ref. 90)     | <i>Testudo spp.</i>                                   | NO                            | Gástrico                          |
| <i>C. ducismarci</i> (Ref. 90)     | <i>Testudo spp.</i>                                   | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. apodemi</i> (Ref. 91)        | <i>Apodemus spp.</i>                                  | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. ditrichi</i> (Ref. 91)       | <i>Apodemus spp.</i>                                  | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. occultus</i> (Ref. 92)       | <i>Rattus norvegicus</i>                              | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. alticolis</i> (Ref. 93)      | <i>Microtus arvalis</i>                               | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. microti</i> (Ref. 93)        | <i>Microtus arvalis</i>                               | NO                            | Intestinal                        |
| <i>C. proventriculi</i> (Ref. 94)  | Psittaciformes  | NO                            | Intestinal                        |

### 1.1.3. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (Figura 1)

Tradicionalmente se ha descrito que el género *Cryptosporidium* pertenece a un grupo de parásitos intracelulares obligados de hábitat gastrointestinal, asumiéndose que en el humano todo el ciclo vital del parásito se da en este lugar anatómico; sin embargo, *Cryptosporidium* especialmente en individuos inmunocomprometidos, puede diseminarse y multiplicarse en otros órganos o tejidos como vías aéreas, árbol biliar, hígado, vejiga y páncreas (95–100).

Para su desarrollo vital, *Cryptosporidium* dada su limitada actividad biosintética, toma la mayoría de los nutrientes que necesita de su hospedador, siendo la glucólisis la principal vía energética (36). En el hospedador se dan procesos de reproducción tanto sexual como asexual en un ciclo monoxeno complejo, que involucra varios estadios parasitarios con funciones diferentes durante el mismo: oocitos (inmaduros sin esporular o maduros esporulados, es decir, con esporozoítos en su interior), trofozoíto, merozoítos y gametos (5).

Una característica común en los diferentes estadios parasitarios de los microorganismos que pertenecen al Filo Apicomplexa, es la presencia de un complejo apical, el cual está formado por un conjunto de organelas secretoras (roptrias, micronemas, gránulos densos), componentes microtubulares (conoide “microtúbulos en espiral” y anillo polar “fibrillas laminares o bandas de microtúbulos”), y una pequeña boca llamada microporo usada para la alimentación. En todos estos momentos y procesos es importante el movimiento circular y helicoidal característico de estos parásitos, conocido como “gliding”, el cual es dependiente de la unión a la célula mediada por sustratos e impulsado por un complejo macromolecular llamado glideosoma. Todos componentes del complejo apical intervienen o participan en diferentes momentos del ciclo biológico de este parásito, exquistación, reconocimiento, adhesión, invasión, formación de la vacuola parasitófora, transformación, multiplicación y salida de la célula hospedera. (5,101,102).



En el humano el ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp., ilustrado en la Figura 1, inicia con la ingestión de ooquistes que contienen libres en su interior, cuatro esporozoítos haploides infecciosos, protegidos por una pared trilaminar formada por glicolípidos y glicoproteínas. El ooquiste pasa por el tracto gastro-intestinal, pudiendo infectar tanto células del epitelio estomacal como del intestino delgado, dependiendo en parte del tropismo de las especies o genotipos del parásito. En estos tejidos se liberan los esporozoítos contenidos en el ooquiste, por daños o fisuras en su pared favorecidos por cambios de pH y temperatura, acción de sales biliares, enzimas gástricas, intestinales y pancreáticas y adicionalmente por algunas enzimas del parásito como fosfolipasa A2, serín y cisteín proteasas, entre otras, también ayudan en este proceso (5,103,104).

Los esporozoítos liberados comienzan a moverse para facilitar el reconocimiento y adhesión a receptores de la célula hospedadora mediante ligandos que ha expresado en su membrana como la glicoproteína de 1300 kDa (gp1300) y 60kDa (gp60), la proteína de 47 kDa (CP47) (105,106); este proceso induce la reorganización del citoesqueleto y la protrusión de la membrana de la célula hospedadora alrededor del esporozoíto, para formar una vacuola parasitófora con componentes tanto del parásito como de la célula que alberga los esporozoítos de forma intracelular, pero extra citoplasmáticamente (107); en la base de cada vacuola se encuentra un orgánulo de alimentación, compuesto por elementos del citoesqueleto de la célula hospedadora, que facilita la toma de nutrientes por parte del parásito (5,49).

Dentro de la vacuola parasitófora, el parásito se transforma a trofozoíto y comienza su ciclo de multiplicación asexual por fisión binaria múltiple (esquizogonia-merogonia) en el curso de la cual se dan dos ciclos merogónicos y se forman dos tipos de esquizontes o merontes en el interior de las células parasitadas. Los esquizontes o merontes de primera merogonia dan lugar a la formación de seis a ocho merozoítos tipo I, que se liberan a la luz intestinal tras la ruptura de la vacuola parasitófora y por tanto, de la célula parasitada, e infectan nuevas células adyacentes, donde nuevamente se multiplican de forma asexual dando lugar a la formación de un nuevo meronte tipo I o alternativamente formar merontes

tipo II de los cuales emergen cuatro merozoítos tipo II, que se transforman en gametocitos o gamontes, estadios que inician la multiplicación sexual o gametogonia (5,108,109).

Los gametocitos masculinos (microgametocitos) inicialmente se multiplican asexualmente para dar origen aproximadamente a 16 microgametos, mientras que los gametocitos femeninos (macrogametocitos) no se multiplican y se diferencian en un único macrogameto, estadio inmóvil. Los microgametos liberados fertilizan a los macrogametos dando origen a un cigoto, única fase diploide en todo el ciclo de vida del parásito, que sufre divisiones meióticas y forma los componentes de la pared que lo envolverán para formar un ooquiste con un esporoblasto en su interior. Este ooquiste “inmaduro” inicia la esporogonia donde se dan una serie de divisiones mitóticas, para formar libres dentro del ooquiste cuatro esporozoítos, que recuperan su estado haploide. En esta etapa ya hay un ooquiste “maduro o infectivo”, es decir esporulado (5).

La reproducción sexual en *Cryptosporidium* spp. permite que puedan darse eventos de recombinación, entre cepas genéticamente diferentes durante la meiosis, lo cual facilita tanto la aparición de nuevas variantes, como la adaptación del parásito a las exigencias ecológicas y condiciones epidemiológicas de una región (110,111). Estos eventos de recombinación genética, como otros eventos, estarían relacionados con el polimorfismo de determinados marcadores, como el gen gp60 (112).

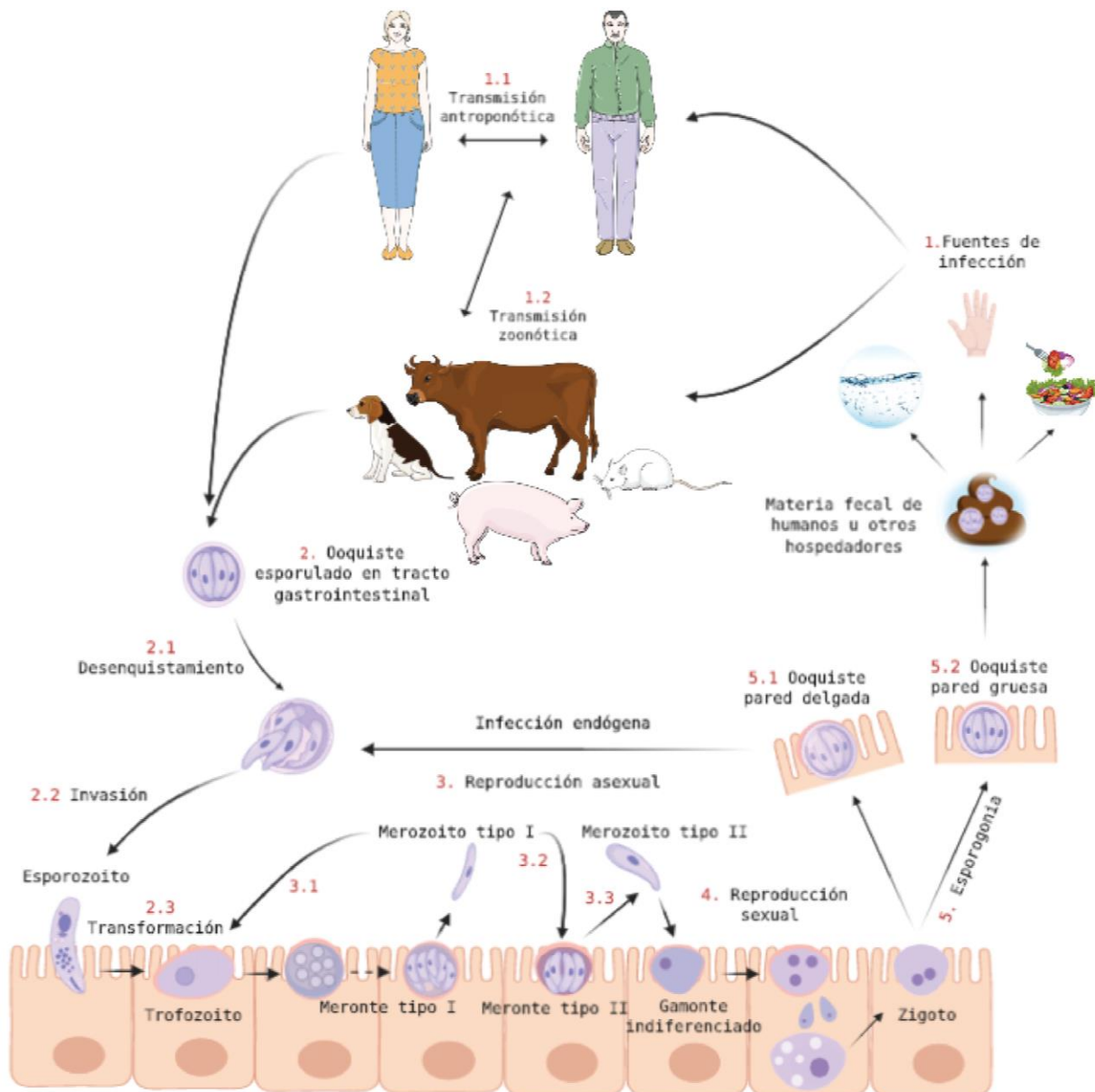
El ooquiste formado, inicia el proceso de esporogonia endógena o esporulación, en el cual se dan una o más mitosis para formar un ooquiste que contiene cuatro esporozoítos infectivos libres, es decir, un ooquiste esporulado sin esporoquiste. Estos ooquistes pueden ser de dos tipos, de pared delgada o única que liberan los esporozoítos dentro del mismo hospedador favoreciendo la autoinfección endógena y los ooquistes de pared gruesa o doble, los cuales son excretados en las heces del hospedador, contaminando el ambiente en el que sean eliminados. Los ooquistes esporulados sobreviven durante meses en condiciones ambientales húmedas, resisten la desinfección con cloro y pasan los poros de

los filtros usados para purificación de agua, permitiendo la transmisión por la ingesta de alimentos y aguas, incluso aquellas sometidas a procesos de potabilización (78,113).

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. desde una nueva infección externa, podrá comenzar en el humano cuando este se infecta con ooquistes esporulados por transmisión oro-fecal, sea a través de un mecanismo directo, es decir, de un individuo infectado con malos hábitos higiénicos y sanitarios que se auto infecta o infecta a otros hospedadores; o indirecto por el consumo de agua o alimentos contaminados con materia fecal que contiene los ooquistes esporulados, siendo esta última la principal fuente asociada con la transmisión del parásito. Sin embargo, debe tenerse presente que está documentada la acumulación o retención de *C. hominis* como *C. parvum* en moluscos bivalvos filtradores (almejas, ostras, mejillones y más recientemente esponjas) de consumo humano, favorecida por la presencia del parásito en aguas de ríos, lo que supone un posible riesgo por transmisión alimenticia y la aparición de brotes epidémicos (5,114–116).

Por otro lado, y como ya se mencionó, está demostrada la multiplicación de *Cryptosporidium* spp. libre de células, con desarrollo del ciclo completo y eventos particulares como la organización especial de los trofozoítos conocida como “sizigia”, que favorece su cercanía y la formación de una cubierta que los rodea para formar un “gametoquiste” donde se da la formación de estadios similares a los gametos, que originarán nuevos ooquistes (39,40). Relacionada con esta multiplicación libre de células, un hallazgo con repercusiones importantes en la transmisión por fuentes hídricas es que, las biopelículas acuáticas actúan como reservorios para *Cryptosporidium* spp. Las biopelículas son ecosistemas altamente eficientes y estables, que generan un micro ambiente que favorece la supervivencia y crecimiento de los microorganismos, incluso por prolongados periodos de tiempo, y para *Cryptosporidium* spp., no sólo actúa como un sustrato donde quedan atrapados los ooquistes, sino que, además proporcionan un ambiente rico en nutrientes donde puede multiplicarse extracelularmente (40–43,117).

**Figura 1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.**



**Fig. 1 Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.**

1. Fuentes de infección contaminadas con oocistos esporulados que pueden ser ingeridos por humanos y otros hospedadores animales, involucrando rutas de transmisión tanto zoonóticas como antroponóticas.
2. Llegada de oocisto esporulado al epitelio gastro-intestinal donde se da el desenquistamiento con la liberación de esporozoítos, que invaden el epitelio y se transforman en trofozoítos intracelulares que inician la reproducción asexual por merogonia.
3. En la reproducción asexual se forman merontes tipo I que contienen alrededor de ocho merozoítos tipo I, los cuales pueden convertirse en trofozoítos o en merontes tipo II, que liberan cuatro a seis merozoítos tipo II, quienes podrán transformarse en gamontes indiferenciados para iniciar la reproducción sexual.
4. Durante la reproducción sexual se forman los microgametos que fecundan los macrogametos, dando como resultado el único estadio diploide (zigoto) en una serie de divisiones meióticas, para finalmente formar un oocisto con un esporoblasto libre en su interior. Este oocisto inmaduro inicia la etapa de esporulación o esporogonia.
5. Durante la esporogonia se da la transformación del esporoblasto a 4 esporozoítos, es decir, a oocistos esporulado o infeccioso. Se forman dos tipos de oocistos esporulados, unos de pared gruesa que se liberan al ambiente con la materia fecal del hospedador, y otros de pared delgada, que perpetúan el ciclo de infección endógena.

#### **1.1.4. Criptosporidiosis humana: Clínica y fisiopatogénesis**

Las infecciones humanas causadas por *Cryptosporidium* spp. pueden cursar asintomáticas o con un espectro de manifestaciones clínicas no patognomónicas (diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas, vómitos, fiebre, mialgias, debilidad, malestar general, dolor de cabeza, anorexia y en casos crónicos deshidratación y emaciación), todas asociadas con los daños producidos por el parásito durante la invasión, multiplicación, sobrevivencia y lisis de los enterocitos, principal célula hospedera de este parásito en el humano. Es importante resaltar que pacientes infectados pero asintomáticos, no consultan al médico y no son en la mayoría de los casos diagnosticados, por tanto, se convierten en un riesgo epidemiológico toda vez que estas personas eliminan ooquistes infecciosos que contaminan el medio ambiente (5,118,119).

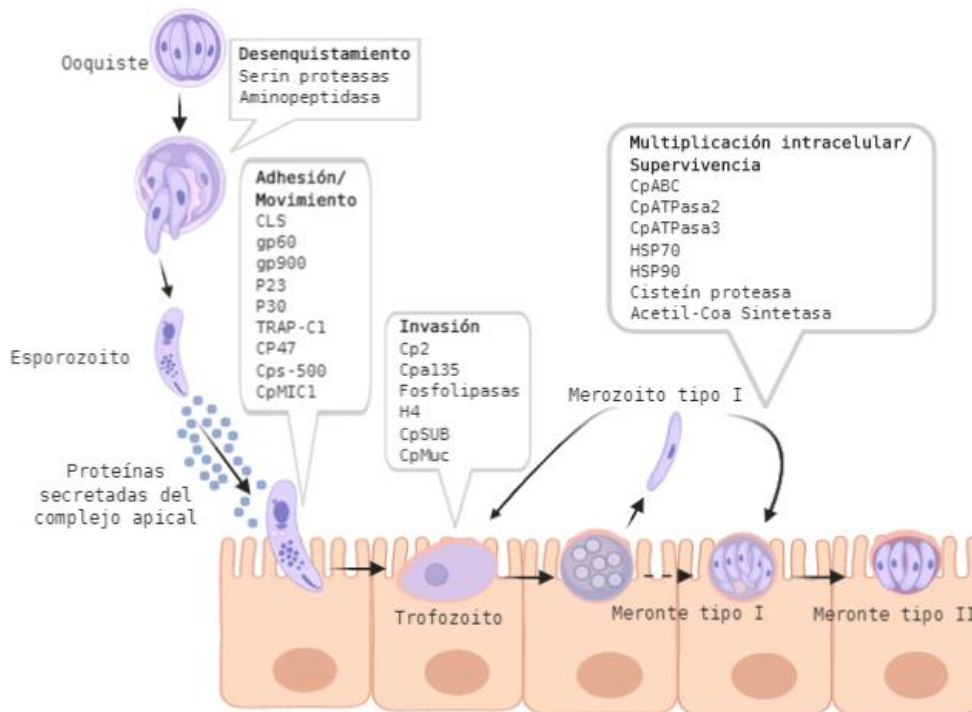
En escenarios donde el paciente tiene una alteración o disfuncionalidad de su sistema inmunológico (coinfecciones con el VIH y linfocitos CD4+ disminuidos, uso de inmunosupresores, niños menores de 5 años, ancianos, personas en estado de desnutrición, personas con cáncer en quimioterapia, etc.), se puede dar una multiplicación incontrolada del parásito y por tanto los daños son más graves, crónicos e incluso letales, con diarreas acuosas de más de dos litros por día, y donde los parásitos con alguna frecuencia pueden diseminarse del hábitat intestinal a otros órganos y tejidos, causando daños y manifestaciones clínicas asociadas con el órgano o tejido afectado (5,120–125).

Por otro lado, las infecciones asintomáticas o aquellas con signos y síntomas leves suelen presentarse en personas con un sistema inmune competente, funcional, donde el hospedador es capaz de auto resolver y aclarar la infección al cabo de 2-3 semanas posteriores al inicio de los síntomas, sin necesidad de una intervención farmacológica (126). Sin embargo, este control de la replicación del parásito no sólo puede ser afectado por alteraciones inmunológicas de base del hospedador, sino también por factores genéticos de susceptibilidad del hospedador y asociados con la virulencia del parásito, siendo, además, importante la carga parasitaria con la que se infecta el hospedador, en el desarrollo y curso de la fisiopatogénesis inducida por *Cryptosporidium* spp. (5,7,127).

Tener información genómica de diferentes especies de *Cryptosporidium*, en especial de las más frecuentes en humanos, *C. parvum* y *C. hominis*, ha permitido la identificación y posterior caracterización bioquímica e inmunológica, de más de 25 moléculas reconocidas como factores de virulencia, que participan o favorecen los eventos de adhesión, internalización, multiplicación y evasión de la respuesta inmune del hospedador y, por tanto, el establecimiento de la infección y desarrollo de la enfermedad (Figura 2) (31,32,128–130).

**Figura 2. Factores de virulencia descritos para *Cryptosporidium* spp.**

Tomado y modificado de Bouzid y col. 2013 (Ref. 130).



Enmarcados en el contexto anterior, la patogénesis de la criptosporidiosis y los daños a la célula hospedadora, principalmente el enterocito, pueden obedecer a una lisis directa por multiplicación, ruptura de vacuola parasitífora y salida de la célula para infectar otras propagando y manteniendo la infección endógena; o indirecta por efecto de la reacción inflamatoria y las citoquinas asociadas en respuesta al daño del epitelio intestinal (5,131).

Así pues, los daños al enterocito se asocian con producir atrofia de microvellosidades, hiperplasia de criptas e infiltración de células mononucleares en la lámina propia, con consecuencias directas sobre la actividad enzimática y la superficie de absorción, generando diarrea por inadecuados procesos de hidrólisis hasta unidades básicas de proteínas y carbohidratos con mala absorción de los mismos, e hiper-ósmosis asociada además, con la afectación de la producción y absorción de cloro, sodio, bicarbonato y con el aumento en la secreción de las prostaglandinas 1 y 2 (PGI2 y PGE2) que actúan sobre el sistema nervioso entérico y el enterocito, reduciendo el tiempo de tránsito gastrointestinal, con aumento de la secreción de agua y electrolitos; todos estos eventos conducen a la pérdida de fluidos y a ocasionar el tipo de diarrea acuosa-osmótica que se presenta en la criptosporidiosis humana. Los daños descritos que se infringen al tracto gastrointestinal pueden recuperarse, pero algunas secuelas sistémicas relacionadas con la respuesta inmune del hospedador, como dolor de cabeza, articular, ocular y fatiga, pueden durar aproximadamente dos meses después de la remisión de los síntomas gastrointestinales (132–134).

#### **1.1.5. Diagnóstico**

Convencionalmente la muestra usada para la búsqueda y detección de ooquistes, antígenos proteicos y/o ácido desoxirribonucleico (ADN) de *Cryptosporidium* spp. es la materia fecal, sin embargo, pueden ser detectados en diversos fluidos como esputo, bilis, aspirado duodenal y otros tejidos donde pueda estar ubicado el parásito. Las técnicas empleadas para este diagnóstico parasitológico, suelen ser las coloraciones y observaciones de ooquistes por microscopía de luz transmitida, inmunológicas para la detección de antígenos proteicos del ooquiste, y de biología molecular para la detección y amplificación de ADN específico del género *Cryptosporidium* (5,135).

Se reportan sensibilidades y especificidades variables en las técnicas parasitológicas mencionadas, pero es la PCR y sus variantes, la prueba que arroja la mayor sensibilidad. Sin embargo, en laboratorios especialmente rurales, la coloración con Ziehl Neelsen modificado (ZNM) y la observación microscópica, siguen siendo por la simplicidad tecnológica, la

técnica de elección diagnóstica. Las técnicas de detección de antígenos específicos como la Inmunofluorescencia (IF) y la ELISA son muy utilizadas de rutina en países desarrollados, tienen buena sensibilidad, pero necesitan de equipos de mediana complejidad, y a pesar de que las pruebas rápidas inmunocromatográficas, presentan mucha simplicidad tecnológica, su costo es más elevado que el del ZNM y muy parecido al de una PCR estandarizada (136,137).

En general el desempeño de estas pruebas diagnósticas, puede ser afectado por razones inherentes a las técnicas, al entrenamiento y experticia del personal que las realiza, pero también a que la eliminación de ooquistes en la materia fecal no es constante y cuando se eliminan su cantidad varía dependiendo del grado o severidad de la infección; por tales razones, siempre está indicado el análisis de muestras seriadas (11,138).

En la actualidad, muy acertadamente y pensando en que los síntomas gastrointestinales pueden ser producidos por diferentes patógenos, se están usando pruebas de qPCR multiplex, en paneles integrales que tienen una sensibilidad entre el 94,5% - 100% y una especificidad mayor o igual al 97,1%, el cual permite la identificación de 22 microorganismos, principalmente bacterias, virus y parásitos, incluyendo en estos a *Cryptosporidium* spp. Los resultados de esta prueba se obtienen en promedio en una hora, y su costo, aunque podría parecer ser alto, debe mirarse con base en la cantidad de microorganismos analizados, la oportunidad y asertividad de los resultados, sobre todo en pacientes con síntomas gastrointestinales severos (139,140).

## **1.2. Epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp.**

La epidemiología molecular trata de establecer vínculos entre la variabilidad genética de una especie de patógeno y su forma y rutas de dispersión y transmisión en las poblaciones de hospedadores, mediante la aplicación de distintas técnicas de laboratorio con los objetivos de determinar su naturaleza, establecer su origen más probable, y entre otros, caracterizar una situación epidemiológica (brote, epidemia etc.). Como muchas otras áreas, la epidemiología en general y la epidemiología molecular en particular, en las últimas



décadas, ha avanzado técnica y metodológicamente, pasando por análisis fenotípicos, hibridación de ácidos nucleicos, análisis de patrones de banda cromosomales, diferentes estrategias de amplificación (PCRs), y en la actualidad, toda vez que uno de los objetivos de la epidemiología molecular es brindar una evaluación certera de una situación específica y dar respuestas adecuadas y oportunas para tomar decisiones basadas en un mínimo de incertidumbres, la estrategia de elección es el análisis de secuencias de ADN, involucrando preferiblemente múltiples loci (141–144).

### **1.2.1. Aspectos epidemiológicos mundiales y nacionales de la criptosporidiosis humana**

*Cryptosporidium* spp. es uno de los principales parásitos asociados en el ámbito mundial, con producir enfermedad diarreaica auto limitada en pacientes inmunocompetentes, diarrea aguda en niños, diarrea del viajero y diarrea persistente-crónica e incluso letal en hospedadores inmunocomprometidos. Dado que el mecanismo de infección de este parásito incluye una ruta oro-fecal y formas de transmisión zoonótica y antroponótica, son consideradas importantes fuentes de infección alimentos y aguas contaminadas con heces humanas o de una variedad de animales especialmente mamíferos, que contienen los ooquistes infecciosos de este patógeno (5,138,145).

A la fecha, la OMS incluye la criptosporidiosis dentro de las enfermedades desatendidas de importancia en salud pública humana y veterinaria, y también dentro de aquellas asociadas con fuentes de infección hídricas, principalmente las de consumo humano, sin desestimar los casos asociados con aguas recreativas. *Cryptosporidium* spp., actualmente está incluido en la lista de patógenos contaminantes de alimentos, reportándose incluso, la posibilidad de infección por el consumo de moluscos bivalvos filtradores. Este parásito en el ámbito mundial es uno de los patógenos a identificar como indicador de calidad de aguas, dado que se estima que es el responsable del 60% de los casos de brotes humanos de enfermedades infecciosas, asociadas con consumo de aguas contaminadas (19,22,26,28,38).

Las infecciones causadas por *Cryptosporidium* spp. se reportan en aproximadamente 95 países alrededor del mundo, tanto aquellos considerados desarrollados como en desarrollo. Los datos de frecuencias de presentación de la infección varían de acuerdo con la población clínica analizada, el área geográfica, las estaciones climáticas, la disposición o no de adecuados sistemas de acueducto y alcantarillado y en general, de las condiciones higiénico sanitarias de las poblaciones, presentándose frecuentemente mayor número de reportes de infección en países tropicales en desarrollo, con aumento de casos tanto en países desarrollados como en desarrollo en épocas de lluvias, evento climático que se asocia con aumento de contaminación de las fuentes de agua de consumo humano y animal. Estos estimativos pueden verse también afectados por el método usado para el diagnóstico y la falta de reportes obligatorios de los casos confirmados, factores que en general conducen a un subregistro de casos y a que no se pueda hacer el seguimiento de estos (5,28,136,146,147).

El mayor número de reportes asociados con daños gastrointestinales graves, que pueden llevar en algunos casos a la muerte, se presentan en pacientes cuyo sistema inmune no está funcionando adecuadamente (coinfección con VIH, cáncer, terapia inmunosupresora, desnutrición, etc.) y que, por tanto, no pueden controlar eficazmente la replicación del parásito. En niños menores de cinco años, quienes aún no han desarrollado apropiadamente su sistema inmune, también se presenta criptosporidiosis grave, con consecuencias crónicas importantes en el desarrollo cognitivo y físico del infante, que se potencian si, previo a la infección el niño ya se encuentra en estado de desnutrición (5,46,146).

En población infantil, muchos estudios en el ámbito mundial muestran a *Cryptosporidium* spp., como uno de los principales patógenos que causa infecciones gastrointestinales graves inclusive mortales, reportándose datos de prevalencias que oscilan en el rango de 1 al 10,7% (145,148–151). Uno de los estudios prospectivos (tres años) más grandes realizados en la última década, conocido como “GEMS” (The Global Enteric Multicenter Study), encontró que, de los 22.568 niños de África y Asia incluidos,

9.439 presentaban diarrea, y en estos se encontró el 10.7% de infectados con *Cryptosporidium* spp., siendo este el parásito más importante causante de diarrea severa en la población de estudio, junto con Rotavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Shigella* spp. En los niños infectados se identificó *C. hominis* en el 77.8% y *C. parvum* en el 9.9% (145).

Para pacientes VIH positivos en el ámbito mundial, se estima una prevalencia global de 8.69%, siendo mayor para aquellos países en vía de desarrollo (11,6%), con respecto a los desarrollados (5,6%), y mayor número de casos entre los individuos con diarrea y bajo recuento de linfocitos T CD4+ (147). En pacientes con otras alteraciones inmunológicas, se reportan frecuencias en el rango de 1% y el 40%, donde es notoria la influencia de las características de la población estudiada y el “n” analizado (120–122,124,152,153).

En Colombia, un país que tiene muchas regiones en precariedad de sanidad ambiental y donde los casos confirmados de criptosporidiosis no son de notificación obligatoria, se reportan frecuencias en niños, entre el 1,9% y 46,8%, donde los datos de mayor sensibilidad fueron aportados por las técnicas de detección de ADN, y la especie más frecuente es *C. hominis* (154–162). En pacientes inmunocomprometidos, son pocos los trabajos realizados, con rangos de frecuencias dependiendo de la población estudiada, que van del 1,7% al 51.4%, y sólo uno de ellos usó técnicas de detección de ADN para identificación de especies, reportando a *C. hominis*, *C. parvum* y *C. felis* (162–169).

Para Colombia, además de la especie *C. hominis*, especialmente en trabajos realizados con niños, también se han identificado otras especies como *C. parvum*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, *C. muris*, *C. bovis* y *C. viatorum*, todas especies asociadas con una transmisión zoonótica (159–161,167), y muy pocos estudios se han realizado en animales, fuentes hídricas u otras fuentes de infección; sin embargo, se reportan datos de frecuencias en promedio para el ganado vacuno del 21%, que es el hospedador animal más estudiado y algunos datos puntuales en gatos, perros y monos (170,171,180,181,172–179). En fuentes hídricas sólo se reportan siete trabajos, casi todos en plantas de potabilización

de aguas, en los cuales se encontró un porcentaje general de detección de *Cryptosporidium* del 38,9%; y algunos han reportado especies como *C. hominis*, *C. parvum*, *C. molnari* y *C. galli* (162,182–187).

## **1.2.2. Diversidad genética**

### **1.2.2.1 Genotipificación por análisis unilocus**

Para la identificación de variantes genéticas o genotipos intra-especie, en *Cryptosporidium* denominados subgenotipos o subtipos, ya sea de muestras biológicas humanas o de otros animales, ambientales, aguas o de alimentos; convencionalmente se usan los análisis unilocus, siendo el gen que codifica para la glicoproteína de 60kDa, gp60, también llamada gp40/15, el marcador más utilizado y mejor caracterizado, además, para el único que se ha protocolizado una nomenclatura aceptada en el ámbito mundial, en especies como *C. parvum*, *C. hominis* y *C. meleagridis* (44,188,189).

El marcador gp60 es un gen de copia única, expresada en diferentes estadios parasitarios, que cumple funciones asociadas con procesos biológicos de movilidad, adhesión e invasión a la célula hospedadora, lo que la hace estar en continua exposición al ataque-defensa de la respuesta inmune del hospedador, es decir, bajo presión selectiva positiva. Es un marcador altamente heterogéneo con polimorfismos de secuencia en el extremo 5' terminal del gen, el cual además posee secuencias microsatélites de tres nucleótidos (TCA, TCG, TCT: codones que codifican para el amino ácido serina), que se repiten en tándem (44,188,189).

Con base en los polimorfismos de secuencia, que excluyen los microsatélites, se han establecido para gp60, unas variaciones llamadas familia alélicas, y dentro de estas y con base en el número de repeticiones en tándem de los microsatélites, se establecen otras variaciones, que en conjunto dan la categorización de subgenotipos intra-especie. Además, algunas familias alélicas pueden presentar otra región con secuencias repetitivas después de los microsatélites, denominada región R que también se tiene en cuenta para dar el subgenotipo (44).

Un ejemplo de la nomenclatura relacionada con el conjunto de las variaciones encontradas en gp60 es: *C. hominis* **IbA10G2**, que indica que este aislado es de la especie *C. hominis*, familia alélica **Ib** con 10 repeticiones de la tripleta TCA y dos TCG, y que no posee repeticiones de la secuencia TCT, ni en la región R. Este subgenotipo **IbA10G2** de *C. hominis*, es el más frecuente en el ámbito mundial, relacionado principalmente con transmisiones antroponóticas, aunque existe reportes de infección en otros hospedadores animales. Otro ejemplo es *C. parvum* **IlaA15G2R1**, este aislado es de la especie *C. parvum* y de la familia alélica **Ila**, con 15 repeticiones del microsatélite TCA, dos del TCG y una repetición de secuencia en la región R, este es el subgenotipo más reportado de *C. parvum*, descrito como causante de infecciones zoonóticas desde el ganado vacuno a los humanos (44)

Sin embargo, y a pesar de ser ampliamente usados los análisis unilocus para la identificación de variabilidad o diversidad en *Cryptosporidium* spp., se ha descrito que los análisis usando la información de un sólo marcador son insuficientes para abordar el fenómeno biológico de diversidad genética de un microorganismo, dado que no aporta información suficientemente precisa o refinada para la detección de cambios intra e inter-especies, como evidencia de variaciones puntuales en algún momento del desarrollo del parásito y la evolución genética de los mismos (190–193).

Además, otros reportes importantes que debilitan el uso del gen gp60 como “único marcador”, no en usarlo, sino en usarlo como único marcador, se basan en la evidencia de que gp60 puede separar en familias alélicas y subgenotipos a las especies de *Cryptosporidium*, pero con el análisis de otros marcadores, se ha demostrado que incluso dentro de los subgenotipos, se pueden encontrar variaciones génicas adicionales no identificadas con gp60, postulándose que los cambios evolutivos en gp60, se presentaron en eventos anteriores a los que han tenido otros genes o marcadores, e incluso antes de que se diera la diferenciación de especies (194). Gilchrist y col. en 2018 con análisis comparativos de genomas de *Cryptosporidium* obtenidos de niños de Bangladesh, demostraron una alta diversidad dentro de este parásito y aportaron evidencia de que los subgenotipos obtenidos con base en gp60, no siempre están filogenéticamente

relacionados, observando que parásitos de una misma familia alélica, no se agrupan en una misma rama dentro del árbol, concluyen además que gp60 no “captura” un patrón de relación en todo el genoma, muy probablemente debido a la alta tasa de recombinación sexual de este apicomplexa asociada con este marcador, indicando la incapacidad de asignar genotipos con un sólo marcador, sin importar cuán polimórfico sea este (195).

#### **1.2.2.2. Genotipificación por análisis multilocus**

Se sugiere entonces, que la estrategia más adecuada para abordar la diversidad o variabilidad génica de un microorganismo, debe involucrar el análisis de múltiples loci para establecer un perfil de diferentes marcadores por muestra o aislado parasitario, basados en la combinación de alelos de los diferentes loci, intentando incrementar el poder de detección de cambios puntuales, resultando muy adecuado para estudiar la estructura de poblaciones y la dinámica de transmisión de *Cryptosporidium* spp. en una determinada zona geográfica (190,191).

Para los análisis multilocus, se han desarrollado dos estrategias principales, una primera basada en el análisis comparativo del tamaño de los fragmentos amplificados de múltiples locus (MLFT), polimorfismo de longitud/tamaño, bien sea mediante geles de poliacrilamida, geles Spreadex® o por electroforesis capilar que permite la detección mediante secuencias marcadas; y una segunda estrategia, basada en el análisis comparativo de las secuencias (MLST) obtenidas después del secuenciamiento capilar de los productos previamente amplificados, permite identificar tanto diferencias de longitud como de variaciones nucleotídicas. Ambas estrategias, utilizadas no para la identificación de especies, sino para evaluar variabilidad genética intra o inter-especies, usan como marcadores para el análisis aquellos que contienen secuencias de ADN repetidos en tándem, minisatélites (MNS, tamaño de 10 hasta 60 pb) o microsatélite (MCS, tamaño de 2-9 pb) (191,196–198).

Los MNS y MCS generalmente además de pequeños, son altamente polimórficos (variables entre los individuos) y poseen una herencia mendeliana simple (un individuo

hereda uno de los alelos del gameto femenino y otro del masculino). Estos marcadores tienen polimorfismos de longitud resultante de la ganancia o pérdida de copias de la secuencia que se repite, usualmente ocurridas durante la replicación del ADN y/o durante la recombinación meiótica. Estas secuencias repetidas en tándem se distribuyen por todo el genoma de los organismos eucariotas, presentan una alta tasa de mutación y naturaleza codominante que permiten la estimación de la diversidad genética intra e inter-especies (199,200).

Seleccionar o usar una de las dos metodologías, MLST o MLFT, dependerá de varias circunstancias a considerar, dentro de las cuales pueden influir el menor costo y la rapidez con la que se pueden analizar los datos en el caso del MLFT, sin embargo, dado que para algunos marcadores se presentan diferencias en tamaño de muy pocas pares de bases, pueden dejar de detectarse algunas variaciones, además, nunca podrá saberse con qué fenómeno genético se pueden relacionar las diferencias en tamaño detectadas, información que si dan con detalle los análisis MLST, permitiendo un más preciso y adecuado análisis de las diferencias encontradas (201–203).

En *Cryptosporidium*, la identificación de marcadores con secuencias MNS y MCS para análisis MLST o MLFT y diversidad genética, ha sido posible gracias a la información generada durante las últimas décadas, sobre genomas de diferentes especies (Tabla 3), lo cual ha facilitado el diseño de primers específicos, no sólo para gp60, si no para alrededor de 50 marcadores que pueden ser utilizados para buscar variaciones genéticas, encontrándose reportado con mayor frecuencia el uso de CP47, gp60, MS5, MS9, MSC 6-7, TP14, ML2, ML1, MSB y 5B12, y las especies más estudiadas *C. hominis* y *C. parvum* (Tabla 4) (191).

**Tabla 3. Genomas de *Cryptosporidium* spp. reportados en bases de datos públicas**

| Especie / # de proyectos genómicos | Plataforma usada para el Secuenciamiento  | Estado del ensamblaje de los genomas | Base de datos donde están depositados | Referencias |
|------------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------|
| <i>C. parvum</i> /10               | Sanger, Illumina, Illumina HiSeq          | Cromosomas, Scaffolds                | CryptoDB SRA del NCBI                 | (34,35)     |
| <i>C. hominis</i> /10              | Sanger, Illumina MiSeq, 454 FLX, Illumina | Cromosomas, Scaffolds, Contigs,      | CryptoDB SRA del NCBI                 | (34,35)     |
| <i>C. tyzzeri</i> /1               | Illumina MiSeq,                           | Cromosomas                           | CryptoDB                              | (34)        |
| <i>C. muris</i> /1                 | Sanger                                    | Scaffolds                            | CryptoDB                              | (34)        |
| <i>C. ubiquitum</i> /1             | Illumina                                  | Contigs                              | CryptoDB                              | (34)        |
| <i>C. baileyi</i> /1               | Illumina MiSeq,                           | Contigs                              | CryptoDB                              | (34)        |
| <i>C. meleagridis</i> /1           | Illumina MiSeq                            | Contigs                              | CryptoDB                              | (34)        |
| <i>C. andersoni</i> /1             | Illumina                                  | Contigs                              | CryptoDB                              | (34)        |

**Tabla 4. Marcadores con secuencias micro o minisatélites y/o SNPs, más reportados en la literatura para análisis multilocus (MLST o MLFT) en *C. hominis* y *C. parvum***

| Marcador   | Ubicación cromosómica | Asignación proteica   | Secuencia repetitiva micro o minisatélites /SNPs | Producto amplificado (pb) |
|------------|-----------------------|---|--|---------------------------|
| MSA        | 1                     | Helicasa con cromodominio de unión a ADN (Ref. 204)             | CATTCTCAGGTTTAGGCT                               | 100-252                   |
| MSB        | 1                     | Factor de transcripción E2F (Ref. 204)                          | CTATCT   | 165-345                   |
| 6F11       | 1                     | No codificante (Ref. 205)                                       | SNPs   | 82                        |
| MSI        | 2                     | Proteína hipotética (Ref. 204)                                  | GCAGGA   | 168-240                   |
| SSR-1      | 2                     | No codificante (Ref. 206)                                       | AT, TA & AT                                      | 370                       |
| MSC        | 2                     | No codificante (Ref. 204)                                       | TGAGGAGTGAGAGGAGGAA                              | 147-238                   |
| MS5-Aiello | 2                     | No codificante (Ref. 206)                                       | AAT  | 127                       |
| 5B12       | 2                     | Similar a proteasa específica de ubiquitina (Ref. 205)          | AT   | 134-155                   |
| Chromo3T   | 3                     | Proteína hipotética (Ref. 207)                                  | SNPs   | 480-680                   |
| ML1        | 3                     | Proteína hipotética (Ref. 208)                                  | GAG  | 218-250                   |
| MSK        | 3                     | Proteína hipotética, rica en prolina (Ref. 204)                 | AGGTGGAGGTGGACCAAC                               | 124-232                   |
| MS12       | 3                     | Factor de crecimiento de unión a proteínas beta (Ref. 209)      | CCAACAACCACTTCTACAAGTGGAAA<br>T                  | 544-665                   |
| 7E1C       | 3                     | No codificante (Ref. 205)                                       | TA   | 79                        |
| CP273      | 4                     | No codificante (Ref. 205)                                       | TA   | 157                       |
| MSE        | 4                     | Proteína grande de baja complejidad, rica en glicina (Ref. 204) | TCAAGA   | 166-306                   |
| 2G04       | 4                     | No codificante (Ref. 205)                                       | TA   | 135                       |
| 9B10       | 4                     | No codificante (Ref. 205)                                       | TTA  | 101                       |
| MSF        | 5                     | Proteína con péptido señal (Ref. 204)                           | TCCTTCTGAGC                                      | 124-200                   |



|            |   |   |   |         |
|------------|---|---|---|---------|
| 6B03       | 5 | No codificante (Ref. 205)   | TA  | 141     |
| 1F07       | 5 | No codificante (Ref. 205)   | TA  | 189     |
| 4E12       | 5 | No codificante (Ref. 205)   | TA  | 141     |
| MS9        | 5 | Proteína hipotética (Ref. 209)  | TGGATC  | 303-534 |
| CP47       | 6 | Proteína de 47 kDa, relacionada con el proceso de invasión a la célula hospedadora (Ref. 210)               | TAA, TGA/TAG  | 350-600 |
| gp60       | 6 | Glicoproteína de 60kDa (gp40/15), relacionada con el proceso de invasión a la célula hospedadora (Ref. 189) | TC(A/G/T)   | 800-850 |
| ML2        | 6 | Proteína de adhesión transmembranal (Ref. 208)  | AG  | 175-237 |
| Cp492      | 6 | Péptido señal (Ref. 204)  | CCA   | 227-251 |
| Cp56       | 6 | Proteína transmembranal de 56 kDa (Ref. 210)  | SNPs  | 660-785 |
| MM5        | 6 | Proteína con posible actividad hidrolasa (Ref. 211)   | TC(T/C)   | 260     |
| MSC6-7     | 6 | Proteína antigénica con repeticiones de serina (Ref. 210)   | TGATGATGAT(G)GAACC(T)   | 455-560 |
| MSG        | 6 | Proteína con péptido señal (Ref. 204)   | GTAGTAGTG   | 175-334 |
| MS3        | 6 | Proteína quinasa (Ref. 206)   | AAT   | 118     |
| MS9-Aiello | 6 | No codificante (Ref. 206)   | SNPs  | 149     |
| RPGR       | 6 | Factor regulador GTPasa (Ref. 210)  | GGAGATAAG(T)AAT(A)GAAGAT(G)<br>inserción/delección de<br>AGAGGGGGATAAAAAAGA | 358-391 |
| 1G09       | 6 | No codificante (Ref. 205)   | SNPs  | 104     |
| 5D11       | 6 | No codificante (Ref. 205)   | SNPs  | 128     |
| DZHRGP     | 6 | Glicoproteína rica en hidroxiprolina (Ref. 210)   | Minisatélite de 30pb /<br>microsatélites                                    | 496-610 |
| 1887       | 7 | No codificante (Ref. 204)   | GA  | 150-194 |
| CP193      | 8 | Proteína con péptido señal (Ref. 205)   | TAA   | 105     |
| MM18       | 8 | Proteína grande de baja complejidad (Ref. 211)  | (C/G)C(A/G)G(G/A)A  | 290     |
| MM19       | 8 | Proteína grande de baja complejidad (Ref. 211)  | GGA(G/T)C(T/A)  | 299     |
| MS2        | 8 | No codificante (Ref. 206)   | AAT   | 124     |
| MS4        | 8 | No codificante (Ref. 206)   | SNPs  | 202     |
| MS5        | 8 | Proteína grande de baja complejidad (Ref. 209)  | CCTCCCTCAGCTCCTCCGACTGCA  | 181-502 |
| TP14       | 8 | Proteína hipotética (Ref. 209)  | CAA   | 234-342 |
| MS6        | 8 | No codificante (Ref. 206)   | SNPs  | 175     |
| MS7        | 8 | Trehalosa 6-fosfato sintasa, de probable origen vegetal (Ref. 206)  | TAG   | 163     |
| MS8        | 8 | No codificante (Ref. 206)   | AT  | 154     |

De acuerdo con la revisión de la literatura, cerca de 60 trabajos en el ámbito mundial han utilizado los análisis multilocus, para estudiar la variabilidad genética, la dinámica de transmisión y la estructura poblacional de varias especies de *Cryptosporidium*, especialmente *C. parvum* y *C. hominis*, la mayoría de estos trabajos usan los análisis basados en las diferencias de tamaño de los fragmentos amplificados (MLFT) y sólo 19 trabajos, usan las diferencias nucleotídicas obtenidas de datos de secuencia (MLST), para construir los perfiles multilocus. Un alto porcentaje de los trabajos revisados, son realizados en países europeos y en hospedadores vacunos, seguidos de trabajos en humanos (206,209,211–227). Algunos trabajos también han mostrado que los resultados de variabilidad génica obtenidos con análisis MLFT pueden ser diferentes cuando se analizan las mismas muestras por la estrategia MLST dado que, aunque el análisis MLFT permite hacer una relación del tamaño del fragmento con el número de repeticiones en tándem de los micro o minisatélites, estos no permiten evidenciar los polimorfismos de secuencias múltiples o únicos (SNP), como si se puede hacer con los análisis MLST (203).

En general los estudios multilocus utilizados para la identificación de haplotipos circulantes en determinadas poblaciones de *Cryptosporidium*, han aportado datos que muestran una mayor variabilidad genética inter-especies, a la observada en los análisis unilocus, lo que necesariamente va cambiando el contexto global de la estructura poblacional y dinámica de transmisión del parásito, y que podrían explicar los procesos de reinfección y de la presentación clínica de la enfermedad, ya sea de forma independiente o como parte de una etiología multifactorial que involucra tanto factores del hospedador como ambientales. Además, han permitido detectar infecciones mixtas por varias especies, genotipos o subgenotipos, posibilitando en casos de brotes epidemiológicos, incriminar apropiadamente un subgenotipo y relacionarlo adecuadamente con las rutas de transmisión, posibles fuentes y presentaciones clínicas (191–193,223).

Un estudio realizado en Estados Unidos, por Feng y col. en 2014, en el que analizaron 62 muestra humanas identificadas con el mismo subgenotipo con base en gp60 (*C. hominis* IaA28R4), asociadas con brotes de infección que implicaban aguas recreativas como fuentes

de infección; mostró evidencias de un perfil multilocus diferente con variaciones significativas principalmente en el marcador DZHRGP, para las muestras que previamente mostraron el mismo subgenotipo gp60, lo que de acuerdo con los autores indicaba, que no fueron los mismos parásitos relacionados con los diferentes brotes y que habían al menos dos orígenes diferentes de IaA28R4, con evidencia de rápida evolución para este subgenotipo, asociada con eventos de recombinación genética, que indudablemente influenciaron la virulencia en este subgenotipo de *C. hominis* (216).

Dada la relevancia de la información que los análisis multilocus aportan y la no disponibilidad de un protocolo metodológico mundial, ni regional que dificulta relacionar y comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios; desde el año 2016, expertos científicos europeos, se reúnen para tratar de establecer un consenso sobre cuáles deben ser los marcadores para utilizar, la nomenclatura protocolizada para todos los marcadores, la forma de categorizar los alelos identificados, y entre otros, crear una base de datos específica para “multilocus- *Cryptosporidium*”, donde se deposite la información alélica de secuencias individuales o consenso; además, de otras puntualidades técnicas y de entrenamiento de personal. Estos expertos han encontrado como principal barrera para la implementación, la falta de fondos, y el interés de los entes gubernamentales público y empresa privadas para el trabajo en este parásito (192,193). En este contexto, mientras estos protocolos no se establezcan, las comparaciones y asociaciones desafortunadamente, se siguen centrando en los resultados individuales de los marcadores, tomando como referencia siempre a gp60.

Se sugiere también que aumentar el número de trabajos con estrategias MLST en poblaciones humanas procedentes de diferentes áreas geográficas y con diferentes condiciones clínicas, incluir además, parásitos identificados en diferentes matrices (aguas, alimentos, materia fecal etc.), e incluir la obtención de secuencias mediante técnicas de secuenciación masiva o “NGS”, permitirían ampliar la información sobre variabilidad genética, evolución, dinámica de transmisión, genética de poblaciones y en general, de la epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp. en el ámbito mundial (119,192,193).

Para Colombia, el número de estudios reportados que realizan una caracterización molecular son pocos, pero han permitido la identificación de diez especies de *Cryptosporidium* infectando a humanos o animales y contaminando aguas: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis*, *C. viatorum*, *C. bovis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, *C. molnari* y *C. galli*, y dentro de las especies *C. hominis* y *C. parvum* con base en gp60, variaciones intergénicas que permiten la identificación de las familias alélicas **Ib**, **Ia** y **Ila** (159–162,167,172,176,180,185,187). Con respecto a los análisis multilocus solo se encuentra un trabajo realizado en 2019 por Avendaño y col. en *C. parvum* y ganado vacuno basado en MLFT, el cual encontró bajo grado de divergencia genética, con expansión clonal, pero de origen mixto; no se reporta ningún estudio multilocus realizado en humanos y ninguno sin importar el hospedador o fuente de infección con estrategia MLST (229).

### **1.2.2.3. Análisis NGS y Genómica Comparativa**

Algunos aportes más recientes, que han contribuido obtener más datos para ampliar la comprensión de la variabilidad genética inter e intra-especies, se han basado en el uso de las técnicas de Secuenciamiento masivo o de Nueva Generación “NGS”, unidos a los análisis MLST y de genómica comparativa. Los datos obtenidos mediante estas estrategias posibilitan la búsqueda y detección de todos los tipos de variaciones genómicas, en todo un genoma o en parte de estos, variantes de nucleótidos únicos (SNPs) o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, además, de variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones) (191–193).

Por otro lado, estas estrategias tienen también aplicaciones en el diagnóstico molecular de todo tipo de enfermedades infecciosas y aquellas relacionadas con cambios o alteraciones genéticas, permitiendo la identificación de factores de susceptibilidad con finalidad preventiva o de farmacogenómica, y en el caso de las enfermedades infecciosas, además, facilitan resolver mezclas complejas y detectar variantes intra-especies de baja abundancia en infecciones mixtas en un mismo individuo. Dos consideraciones importantes en estas aproximaciones son que los resultados dependen forzosamente de la calidad del alineamiento y ensamblaje de los datos y que, para el manejo de estos, es estrictamente

necesario contar con equipamiento de alto poder de almacenamiento de información, que agilice los análisis bioinformáticos (230,231).

Para *Cryptosporidium* spp. después del reporte de los primeros genomas de *C. parvum* aislado Iowa II y *C. hominis* aislado TU502 en 2004, las tecnologías NGS han permitido además de mejorar el genoma TU502 al actual TU502-2012, obtener datos genómicos de otras especies con potencial zoonótico como *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum* y *C. andersoni* (Tabla 3), cuya información se encuentran depositados en bases de datos públicas como CrytoDB y SRA del NCBI, facilitando el estudio comparativo de los genomas de diferentes especies y subgenotipos intra-especies (31,32,34,35,232).

Hallazgos importantes obtenidos de los estudios de genómica comparativa y con implicaciones principales en los procesos infecciosos en humanos, muestran una alta similitud de secuencia entre las especies *C. parvum* y *C. hominis* (~97%), con una divergencia de ~ 3%, asociada con las ganancias o pérdidas en regiones 3' subteloméricas de los cromosomas 5 y 6, relacionadas con genes que codifican para una familia de proteínas secretadas conocidas como MEDLE y proteasas similares a la insulina. También se reportan diferencias en el número de genes y secuencias que codifican para algunas glicoproteínas tipo mucina involucradas en la unión e invasión de la célula hospedera por *Cryptosporidium* spp. Para la familia MEDLE, seis genes subteloméricos están presentes en *C. parvum*, en comparación con uno en *C. hominis*, sugiriendo que estas diferencias podrían asociarse con la “especificidad” de hospedador para *C. parvum* y *C. hominis*. Las proteínas MEDLE, están involucradas en procesos de invasión del parásito a la célula hospedadora, por lo cual las diferencias en su expresión podrían también tener implicaciones fenotípicas entre las especies (31,233–237).

Estudios comparativos entre aislados de *C. hominis*, de los subgenotipos **IbA10G2** y **IaA28R4**, involucrados en eventos epidemiológicos de brotes en Estados Unidos, han mostrado que las diferencias encontradas entre estos subgenotipos están principalmente en genes ubicados en el cromosoma 6, diferencias atribuidas a eventos de recombinación

genética, soportados con análisis MLST (216,217,233). Otros trabajos han comparado diferentes aislados del subgenotipo **IbA10G2**, procedentes de varios países europeos, evidenciando una alta similitud de secuencia entre ellos, con resultados similares cuando se comparan aislados del subgenotipo **IbA10G2** de Europa con aislados del mismo subgenotipo provenientes de Estados Unidos; pero los mismos estudios muestran que cuando se comparan aislados de este subgenotipo procedentes de Europa con un aislado proveniente de Guatemala, se observa mayor variabilidad en el aislado de Guatemala, fenómeno debido quizás a los posibles eventos de segregación geográfica (233,238,239).

En otro abordaje, varios estudios han comparado los resultados obtenidos con la secuenciación por el método de sanger y NGS, para la amplificación de genes como, gp60, HSP70, 18S rRNA y actina, que permiten la identificación de subgenotipos intra-especie en aislados procedentes de varios hospedadores y de diferentes áreas geográficas; encontrando que los datos obtenidos por secuenciación masiva, permiten incrementar más de dos veces el número de subgenotipos encontrados intra-especie por aislado, comparado con los obtenidos por el método de sanger, que para todos los casos identificó sólo un subgenotipo por aislado independiente de la especie (240–243).

### **1.2.3. Dinámica de transmisión de *Cryptosporidium* spp.**

En la actualidad se sabe que no hay una estricta especificidad de hospedador para las 39 especies reconocidas de *Cryptosporidium*, no obstante, tradicionalmente las especies de este patógeno se han asociado con un determinado hospedador, según datos epidemiológicos de frecuencia de identificación. Por ejemplo, para *C. hominis* hay amplia evidencia de que el hospedador primario o más importante es el humano, y para *C. parvum*, el ganado vacuno; pero existe también múltiple evidencia científica, que demuestra que, estas dos especies pueden infectar otros hospedadores diferentes, y también se sabe que tanto humanos como el ganado vacuno pueden infectarse con otras especies de *Cryptosporidium* (Tabla 5) (16,18,244).

**Tabla 5. Especies de *Cryptosporidium* reportadas en el humano y otros hospedadores**

Tomado y modificado de Feng y col. 2018 (Ref. 18)

| Hospedador         | Especies 1<br><i>Responsables del más del 90% de los casos reportados</i> | Especies 2<br><i>Reportadas en al menos cinco casos.</i>   | Especies 3<br><i>Reportadas en menos de cinco casos.</i>  |
|--------------------|---|--|---|
| Humanos            | <b><i>C. hominis, C. parvum</i></b>                                       | <i>C. meleagridis, C. felis, C. canis, C. ubiquitum, C. cuniculus, C. viatorum, C. muris</i> , genotipo I de ardilla | <i>C. andersoni, C. suis, C. bovis, C. erinacei, C. fayeri, C. scrofarum, C. tyzzeri</i> , genotipo de caballo, <i>C. xiaoi</i> , genotipo de zorrillo, genotipo de visón |
| Ganado bovino      | <b><i>C. parvum, C. bovis</i></b>   | <i>C. ryanae, C. andersoni</i>   | <i>C. occultus, C. ubiquitum, C. xiaoi</i>  |
| Ovejas y Cabras    | <i>C. xiaoi, C. ubiquitum</i>   | <b><i>C. parvum</i></b>  | <i>C. andersoni</i>   |
| Caballos y burros  | <b><i>C. parvum, C. hominis</i></b> , Genotipo de caballo                 | <i>C. andersoni</i>  | <i>C. muris, C. tyzzeri, C. felis, C. proliferans, C. erinacei</i>  |
| Perros             | <i>C. canis</i>   | <b><i>C. parvum, C. muris</i></b>  | <i>C. scrofarum, C. ubiquitum, C. hominis</i>   |
| Gatos              | <i>C. felis</i>   | <i>C. muris</i>  | <i>C. parvum, C. ryanae, genotipo III de ratas</i>  |
| Roedores*          | <i>C. tyzzeri, C. muris</i>   | <b><i>C. parvum</i></b>  | <i>C. ubiquitum, C. proliferans, C. homai, C. apodemi, C. ditrichi, C. occultus, C. alticolis, C. microti</i>   |
| Aves*              | <i>C. meleagridis, C. baileyi, C. galli</i>                               | <b><i>C. hominis, C. parvum, C. serpentis, C. muris, C. andersoni</i></b>  | -   |
| Cerdos             | <i>C. suis, C. scrofarum</i>  | <i>C. muris</i>  | -   |
| Camellos           | <i>C. andersoni, C. muris</i>   | <b><i>C. parvum</i></b>  | -   |
| Peces              | <i>C. huwi, C. molhari</i>  | <b><i>C. parvum, C. hominis, C. xiaoi, C. scrofarum</i></b>  | -   |
| Erizos             | <i>C. erinacei</i>  | -  | -   |
| Conejos            | <i>C. cuniculis</i>   | -  | -   |
| Zorros             | <i>C. canis</i> , Genotipo del zorro, variante                            | -  | -   |
| Marsupiales*       | <i>C. fayeri, C. macropodum</i>   | -  | -   |
| Mamíferos marinos* | <i>C. muris</i> , genotipo de morsa                                       | -  | -   |
| Reptiles*          | <i>C. serpentis, C. vanarii, C. testudinis, C. ducismarci</i>             | -  | -   |
| Anfibios (Sapos)   | <i>C. fragile</i>   | -  | -   |

**Roedores\*** Incluye topillos, ratones, su doméstico, puerco espín, cobayos domésticos, entre otros. **Aves\*** Incluye pavos, aves de corral, entre otras. **Reptiles\*** Incluye serpientes, lagartos, tortugas, entre otros. **Marsupiales\*** Incluye canguros **Mamíferos marinos\*** Incluye focas, elefantes marinos, entre otros

Se ha descrito que las especies que causan criptosporidiosis humana en países en desarrollo y desarrollados pueden ser las mismas, pero con frecuencias de infección diferentes; *C. hominis* y *C. parvum* son las especies más frecuentes en todo el mundo, pero *C. hominis* se encuentran en un mayor número de casos humanos en países en desarrollo, asociado con una transmisión antroponótica, y *C. parvum* en un mayor número de casos en países desarrollados, asociándose con una transmisión de origen zoonótico (5,18).

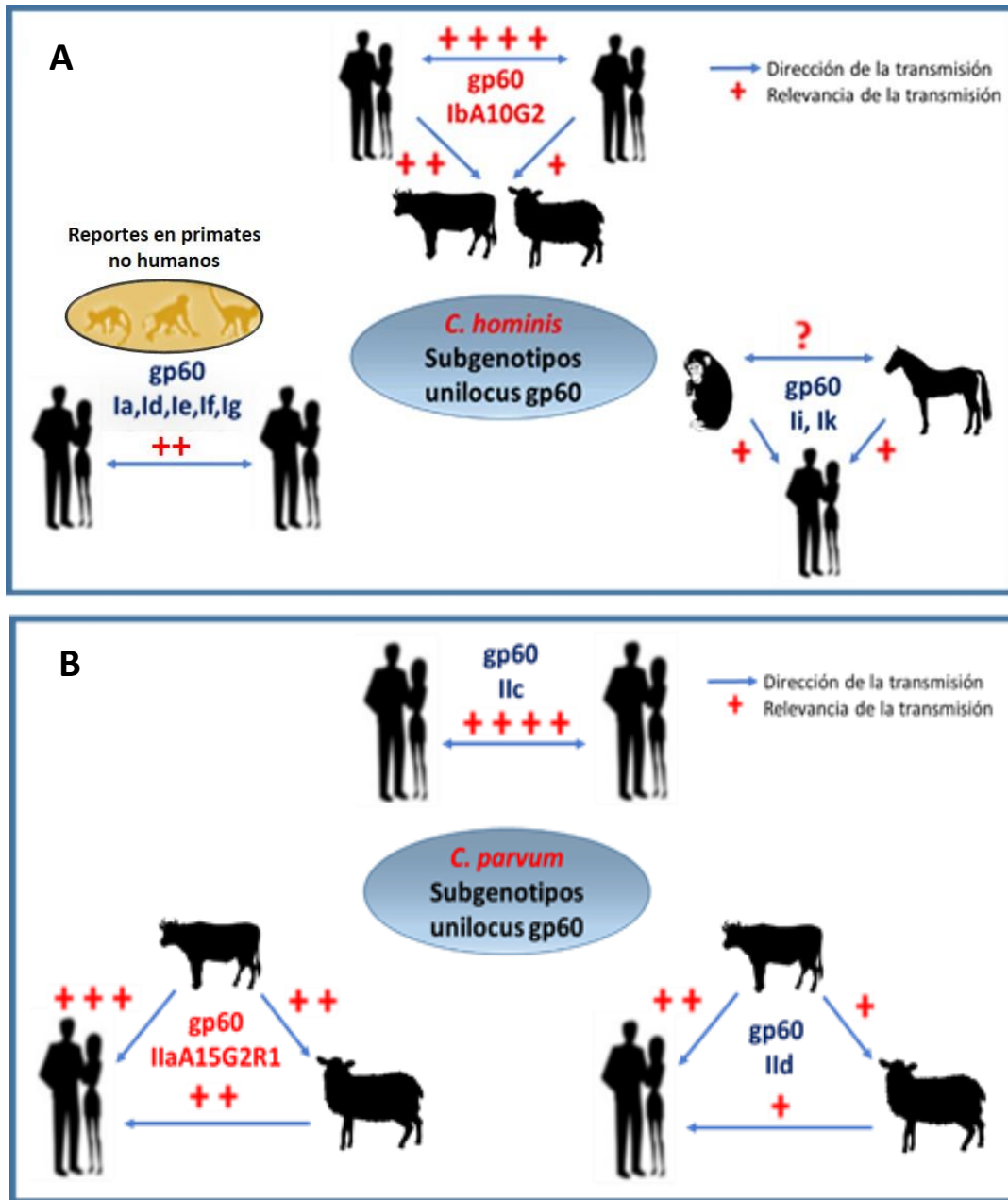
Para *C. hominis* y *C. parvum* tradicionalmente como ya se mencionó, la identificación de variantes inter e intra-especie se realiza con análisis unilocus, principalmente del marcador gp60, con base en el cual se reporta en la mayoría de los estudios que hay mayor variabilidad genética en *C. parvum* que en *C. hominis* y que algunos subgenotipos intra-especie se pueden relacionar con determinadas rutas de transmisión y fuentes de infección. En la especie *C. hominis*, el subgenotipo **IbA10G2** se reconoce como el más virulento y el responsable de la mayoría de los casos de criptosporidiosis humanas en el mundo, asociado con una transmisión de humano a humano y una expansión poblacional clonal. Otras variantes genéticas de esta especie, además, del humano también se han identificado en primates no humanos y caballos (**Ia, Ie, Id, If, Ig, Ii y Ik**) (Figura 3a) (18,244).

Para *C. parvum*, los subgenotipos relacionados con algunas familias alélicas como **Ila** y **Ild**, se asocian con una transmisión zoonótica, pero la familia alélica **Ilc**, se ha asociado con transmisión antroponótica, a pesar de *C. parvum* ser una especie cuyos hospedadores primarios son el ganado vacuno. Dentro de *C. parvum*, la variante genética más frecuente es la **IlaA15G2R1**, claramente asociada con una transmisión de animales a humanos y una expansión poblacional panmíctica (Figura 3b) (16–18).



**Figura 3. Principales rutas de transmisión descritas con base en los subgenotipos establecidos con análisis unilocus de gp60 para *C. hominis* y *C. parvum*.**

Tomado y modificado de Feng y col. 2018 (Ref. 18).



**Fig. 3 Principales rutas de transmisión de algunos subgenotipos con base en gp60.**

En la figura se ilustra las principales rutas de transmisión de algunas familias alélicas dadas por el análisis de gp60 en *C. hominis* (A) y *C. parvum* (B), los diferentes hospedadores en los que se reporta con mayor frecuencia dicha ruta de transmisión y la frecuencia (cruces +) con la que se da dicha ruta en la infección por estas familias alélicas.

En Colombia, aunque son pocos los estudios que evalúan la variabilidad inter e intra-especie y las asociaciones con posibles rutas de transmisión, se reporta para *C. hominis* identificado en humanos, variantes genéticas con base en gp60, relacionadas con las familias alélicas **Ia**, **Ib**, **Id** y **Ie**, identificadas también en otros países y diferentes hospedadores y fuentes de infección. Para *C. parvum* los estudios muestran diversidad relacionada con la familia alélica **Ila** principalmente en ganado vacuno, pero también se han identificado parásitos de la familia alélica **Ilc** relacionadas en el ámbito mundial, con casos de transmisión antroponótica (18,159,160,180).

#### **1.2.4. Genética de poblaciones**

Un aspecto central en la epidemiología de las enfermedades infecciosas es el conocimiento de los procesos micro-evolutivos que operan en las poblaciones para caracterizar los microorganismos. El conocimiento de la estructura poblacional de los microorganismos permite entre otros aspectos, hacer un acercamiento a la relación que se establece entre un patógeno y su hospedador, y los estudios de variabilidad genética conllevan al reconocimiento de nuevos patógenos, a la detección de poblaciones definidas con características particulares, como la resistencia a fármacos o la necesidad de vacunas contra microorganismos antigénicamente diversos o cambiantes, entre otros (245,246).

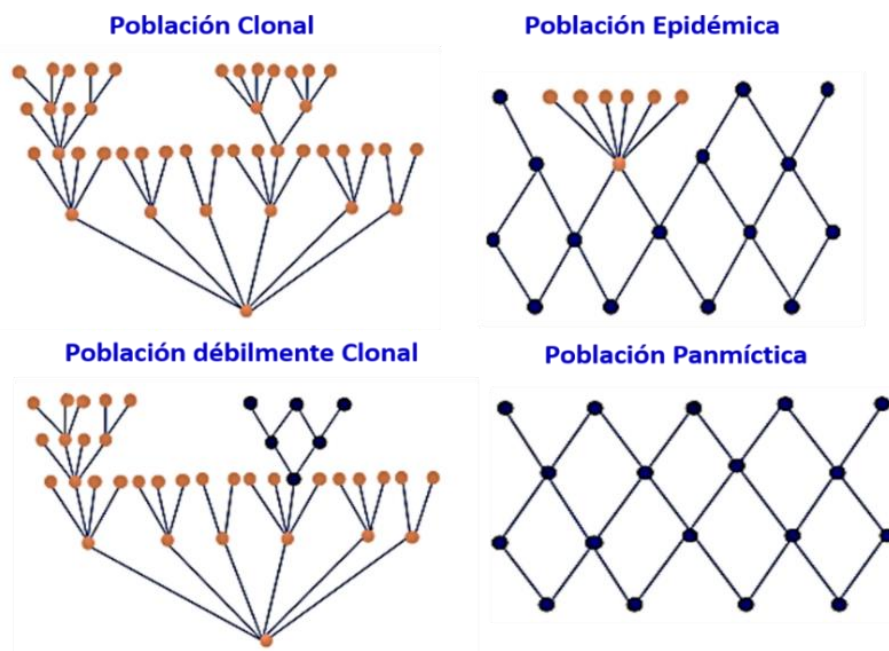
La genética de poblaciones estudia la variabilidad de las poblaciones naturales, cambios que conllevan al desarrollo de especies, donde a su vez no existe una absoluta homogeneidad genética, sino que distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar ligeras diferencias genéticas. Estos cambios en la composición genética de las poblaciones son debidos a distintos procesos genéticos como mutaciones, recombinación, migración, deriva génica y selección natural (246,247).

Las variantes genéticas generadas por los procesos anteriores, excepto la selección natural, se presentan con una frecuencia independiente de si son o no cambios adaptativos benéficos, por su parte, la selección natural es el único proceso evolutivo que es direccional respecto a la adaptación. Para explicar un poco la estructura poblacional y la evolución de

las poblaciones, los estudios de genética de poblaciones establecen los modelos extremos de clonalidad (que se presenta en desequilibrio de ligamiento) y panmixia (equilibrio de ligamiento), además, de distintas situaciones intermedias: población epidémica, débilmente clonal, entre otras (Figura 4) (248,249).

En cada una de las 39 especies de *Cryptosporidium* pueden darse eventos de adaptación parásito-hospedador, coevolución, segregación geográfica y entre otros, recombinación meiótica entre cepas genéticamente diferentes, lo que conduce a la formación de variantes genéticas intra-especie, eventualmente más estudiadas dentro de *C. parvum* y *C. hominis*. Todos los eventos mencionados, pueden ser favorecidos por las diversas fuentes de infección a las que puede estar expuesto el hospedador, relacionadas con la ecología y situación epidemiológica en una región; favoreciendo la formación de subtipos genéticamente diferentes, únicos dentro de una especie determinada, con rasgos fenotípicos que implican cambios relacionados con la virulencia del parásito (18,250).

**Figura 4. Modelos de estructuras de poblaciones**



Particularmente los análisis multilocus en *Cryptosporidium* spp., han aportado datos sobre la estructura poblacional, especialmente, de las especies *C. hominis* y *C. parvum* aislados de las dos poblaciones clínicas humanas más afectadas (pacientes VIH positivos y niños), y del hospedador animal en el que se ha reportado un mayor número de casos, el ganado vacuno. En aislados de *C. hominis* identificados en pacientes jamaquinos infectados con el VIH, se ha evidenciado una expansión clonal, mientras que en aislados de *C. hominis*, de individuos de la misma población clínica de Estados Unidos, se evidencia una alta frecuencia de recombinación génica, asociada con una estructura poblacional panmíctica (207,210,214,216,217).

Un trabajo realizado por Gatei y col. en el 2006, con un total de 69 muestras de *C. hominis* procedentes de la India, Kenia, EE. UU y Perú, mostró que los análisis MLST, a diferencia del uso de gp60 como único marcador, permiten la diferenciación de subgenotipos únicos y comunes por regiones, observándose que las muestras de Nueva Orleans de EE.UU estaban estrechamente relacionadas con las de Perú, mientras que las de Kenia más cercanas a las de la India, sugiriendo que el aislamiento geográfico ha llevado a la aparición de distintos subgenotipos dentro de *C. hominis* vinculados a la proximidad continental de poblaciones de parásitos (210).

Por otra parte, dentro de los trabajos realizados en *C. parvum*, resaltan algunos llevados a cabo en aislados provenientes de humanos y vacunos de Escocia, donde se ha evidenciado una estructura poblacional panmíctica, con alta frecuencia de recombinación génica; contrario a lo encontrado en humanos y caprinos también de Escocia e Italia, donde se observa una situación intermedia, por la coocurrencia de poblaciones clonales, epidémicas y panmícticas (209,250–256).

En otros países europeos como España, en donde hace décadas se considera a *Cryptosporidium* como un parásito de control sanitario estricto, también se han realizado estudios de múltiples loci, generalmente basados en MLFT para evaluar la diversidad genética y estructura poblacional, especialmente de parásitos *C. parvum* identificado en

ganado vacuno y caprino. En ambos hospedadores, los investigadores han encontrado mayor número de variantes génicas, comparado con lo observado con análisis unilocus y gp60, sin embargo, en ganado vacuno encuentran una expansión poblacional panmíctica, diferente a lo evidenciado en ganado caprino, donde hay una estructura poblacional clonal y baja frecuencia de recombinación, con subpoblaciones únicas por hospedador (198,255–258).

Varios trabajos de genética de poblaciones, usando los análisis multilocus, también han sido reportados en otras especies de *Cryptosporidium* con potencial zoonótico, dentro de los cuales es importante mencionar los realizados en aislados de *C. meleagridis*. Uno de estos trabajos fue hecho con parásitos identificados en muestras de humanos (niños y pacientes VIH positivos), y aves de la ciudad de Lima-Perú, el cual mostró una población parasitaria con expansión clonal, en humanos y aves, lo que muestra una baja frecuencia de recombinación y la probable ocurrencia de transmisión humanos-aves, confirmando el potencial zoonótico de esta especie del parásito (223).

Otros estudios realizados en China con *C. andersoni*, la especie que, con mayor frecuencia infecta al ganado vacuno en este país, y para la cual se tiene regionalmente implementado en los análisis MLST el uso de los marcadores MS1, MS2, MS3, y MS16, se ha evidenciado una estructura poblacional epidémica en aislados provenientes de ganado vacuno; situación contraria se presenta en este mismo país con *C. muris*, aislado de diferentes animales como roedores y aves, y evaluado con los mismos marcadores, donde encuentran una estructura poblacional clonal, para esta especie (215,218,222,226,227,259,260).

## 2. JUSTIFICACIÓN

*Cryptosporidium* spp. es un patógeno ampliamente distribuido en la naturaleza siendo posible para los humanos una transmisión tanto zoonótica como antroponótica, que involucra alimentos y aguas como fuentes de infección e inclusive como microambientes de reproducción, eventos biológicos que en alguna medida modulan los procesos que pueden favorecer cambios genéticos asociados con la diversidad génica que este puede presentar. Es posible, además, encontrar variabilidad genética asociada con eventos de recombinación, que puede tener lugar durante la fase de reproducción sexual en su ciclo de vida, existiendo una corta etapa en la que los parásitos pueden ser diploides, lo que favorece el intercambio genético entre cepas, aislados o linajes distintos, y la generación de nuevos parásitos con fenotipos diferentes que pueden establecer una relación distinta con su hospedador y/o el medio ambiente que lo condiciona.

Dado que para Colombia a la fecha de la realización de este trabajo no se encontró ningún estudio sobre variabilidad genética en parásitos del género *Cryptosporidium*, basado en análisis de polimorfismos de secuencias (MLST) y enmarcados además, en toda la información ampliamente descrita sobre el aporte de este tipo de análisis para discernir la dinámica de transmisión del parásito y esclarecer eventos epidemiológicos asociados con las fuentes y rutas de transmisión y las posibles asociaciones con patogénesis y otros eventos clínico-epidemiológicos; en este trabajo nos propusimos, implementar la estrategia MLST para hacer una descripción inicial de la variabilidad genética de este patógeno, identificado en pacientes colombianos infectados con el VIH y niños en edad escolar, con la intención final de aportar datos que inicien y motiven la realización de estudios multicéntricos enfocados en establecer la dinámica de transmisión de este patógeno prevalente en Colombia.

### **3. HIPÓTESIS**

Con la implementación de análisis Multilocus de Secuencias (MLST) y el uso de los mismos marcadores para evaluar las especies *C. hominis* y *C. parvum*, será posible identificar mayor variabilidad genética inter-especies que la observada con el análisis unilocus; además, será posible también detectar variabilidad génica intra-especie cuando se analicen las poblaciones clínicas incluidas en el estudio (pacientes de Antioquia infectados con el VIH y niños en edad escolar de Antioquia y Santander).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- Describir la variabilidad genética de parásitos del género *Cryptosporidium* identificados en muestras de pacientes humanos colombianos, implementando la estrategia de análisis multilocus de secuencia (MLST).

### **4.2. Objetivos específicos**

- Clasificar las especies y subgenotipos de los parásitos del género *Cryptosporidium*, encontrados en muestras de niños colombianos en edad escolar y de pacientes colombianos infectados con el VIH, utilizando análisis unilocus y los marcadores convencionales 18S rRNA y gp60.
- Estandarizar y ejecutar las técnicas de amplificación de siete marcadores con secuencias micro o minisatélites seleccionados para los análisis MLST, acompañados del diseño e implementación de una estrategia y flujo de trabajo para los análisis bioinformáticos.
- Describir la variabilidad genética encontrada inter-especie *C. hominis* y *C. parvum*, con base en los perfiles multilocus de secuencia.
- Describir la variabilidad genética encontrada intra-especie para cada una de las poblaciones clínicas (pacientes colombianos infectados con el VIH, niños colombianos en edad escolar), con base en los perfiles multilocus de secuencia.



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Tipo de estudio y población analizada

Estudio prospectivo descriptivo, para evaluar mediante análisis multilocus de secuencias -MLST, la variabilidad genética del parásito *Cryptosporidium* spp., identificado en muestras de materia fecal de pacientes colombianos, categorizados dentro de las dos poblaciones en las que se reporta mayor frecuencia de infección por este patógeno: adultos infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH positivos) y niños en edad escolar.

Se incluyeron en total 28 muestras parasitológicamente positivas por amplificación de ADN específico de *Cryptosporidium* spp. De estas muestras, 10 provenían de niños en edad escolar de Antioquia, obtenidas de trabajos previos realizados por el grupo de investigadores que participan del proyecto actual (261,262), y 10 de niños en edad escolar de Santander, obtenidas de trabajos colaborativos con el grupo de investigación en Manejo Clínico de la Universidad de Santander (263). Las ocho muestras restantes, pertenecían a pacientes VIH positivos de Antioquia, obtenidas por búsqueda activa, enmarcada en el proyecto macro que financia la ejecución del presente trabajo: código Colciencias 1115-777-57608 (264).

Teniendo en cuenta la información anterior, los criterios de elegibilidad de este trabajo fueron, que todas las muestras deberían provenir de pacientes de una de las dos poblaciones donde se reporta una mayor frecuencia de infección y enfermedad por *Cryptosporidium* spp.: pacientes VIH positivos y niños en edad escolar; y que estas muestras, además, tendrían que ser parasitológicamente positivas en una prueba de PCR, donde se evidenciara la amplificación del 18S rRNA específico para *Cryptosporidium* spp. Serían excluidas para los análisis MLST, aquellas muestras de las que no se obtuviera amplificación con todos los marcadores que se incluyeron en el proyecto y/o aquellas de las que no se tuviera la información de secuencias adecuadas para los análisis bioinformáticos.

Consideraciones éticas: Las muestras incluidas en este trabajo provienen de diferentes proyectos que cuentan con los respectivos avales de comités de ética para su uso, como también con un aval unificado del Comité de Bioética de Investigaciones en Humanos, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, según el acta N° 20-06-913, teniendo en cuenta los permisos anteriores. Además, se cuenta con los consentimientos y asentimientos respectivos, según sea el caso. Todas las muestras están anonimizadas y se tienen algunos datos de resultados parasitológicos como el de la coloración de Ziehl Neelsen modificada y de la detección de antígenos por pruebas inmunológicas, igualmente, algunos datos epidemiológicos como la edad, sexo y procedencia geográfica.

## **5.2. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp.**

### **5.2.1. Purificación y análisis de estabilidad del ADN total**

Para la extracción y purificación del ADN total a partir de las muestras de materia fecal (MF) de los 28 individuos incluidos en el estudio, se usó el estuche comercial marca Norgen (Stool DNA Isolation Kit, ref. 27600), siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas adaptaciones de acuerdo con el tipo de matriz y el microorganismo que se deseaba identificar. Las modificaciones al protocolo incluyeron la adición de un paso de incubación de la MF con el buffer de lisis a 70°C por 5 minutos y de un minuto de reposo en la columna posterior a las centrifugaciones durante los pasos de unión del ADN y lavado de uniones inespecíficas. El ADN total obtenido al final del protocolo se cuantificó por absorción a 260nm (NANODRP 2000c Thermo Scientific), se rotuló adecuadamente y se conservó a -30°C para los análisis posteriores.

Para evaluar la calidad y estabilidad del ADN que sería usado en los procedimientos de genotipificación y análisis MLST, se realizó una PCR de punto final previa, que permitió la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1500pb del gen 16S rRNA bacteriano, empleando los primers universales 27F-CM (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (265). Se siguió el protocolo de amplificación establecido en el Centro Nacional de Secuenciación Genómica -CNSG, de la Universidad de

Antioquia, el cual incluyó siempre el uso de 0,1µg/µl de BSA como aditivo de la PCR y la evaluación de un control negativo (todos los reactivos usados en la PCR excepto el ADN a amplificar) y uno positivo (todos los reactivos usados en la PCR más un ADN del que se conocía previamente su estabilidad). Los resultados de amplificación se evidenciaron cualitativamente por una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% y tinción con SYBR Safe 1X. La selección de la amplificación del 16S rRNA bacteriano, está fundamentada en la riqueza bacteriana que se encuentra en las muestras de MF, matriz usada para todas las extracciones y análisis de este trabajo.

### **5.2.2. Identificación de especies de *Cryptosporidium* empleando el marcador 18S rRNA: amplificación, secuenciación y análisis filogenético**

Para la detección de ADN específico de *Cryptosporidium* spp., con las 28 muestras de DNA total previamente purificado, se llevó a cabo una PCR anidada para amplificar un fragmento de aproximadamente 830pb del gen 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp., empleando los primers externos rRNACpFw (5' TTCTAGAGCTAATACATGCG 3') y rRNACpRv (5' CCCTAATCCTTCGAAACAGGA 3') y los internos SSUnestF (5' GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG 3') y SSUnestR (5' AAGGAGTAAGGAACAACCTCC 3'). Se siguió el protocolo descrito por Xiao y col. en 1999 (266), el cual se adaptó a las condiciones del laboratorio, usando como variantes en la reacción de PCR 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,35µM de cada primer, 0.1µg/µl de BSA y 1µl de ADN/amplicón para la primera y segunda ronda de la PCR respectivamente. En ambas rondas de amplificación se trabajó con una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 1 minuto y de 95°C por 45 segundos en los siguientes pasos de desnaturalización de cada uno de los 35 ciclos usados. Para todas las reacciones de amplificación siempre se evaluó un control negativo (todos los reactivos usados para la PCR excepto el ADN) y un control positivo (ADN de *C. parvum* previamente secuenciado).

Los resultados de la amplificación se evidenciaron cualitativamente por una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% y tinción con SYBR Safe 1X. Todos los productos de PCR en los que se observó amplificación, se enviaron a la empresa MACROGEN

-Corea del Sur, para su secuenciación capilar en ambas direcciones. Las secuencias nucleotídicas obtenidas para el marcador 18S rRNA de las 28 muestras, fueron sometidas a un proceso de depuración y evaluación de control de calidad, que consistió en realizar un nBLAST para ambas cadenas (forward y reverse) usando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para confirmar si las secuencias obtenidas correspondían al marcador objeto de estudio e iniciar el ensamblaje de los contigs utilizando el programa BioEdit versión 7.2. A los contigs ensamblados, se les realizó un paso más de control y verificación, llevando a cabo un nuevo nBLAST usando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que permitiera confirmar que la secuencia ensamblada en contigs correspondiera al marcador esperado y que además, quedara en la dirección adecuada para su análisis (plus/plus).

Para establecer las especies de *Cryptosporidium* encontradas en las muestras de los 28 individuos incluidos en el estudio, se construyó un “data set” con las secuencias nucleotídicas depuradas y ensambladas, más las secuencias de referencia del gen 18S rRNA de 16 especies de *Cryptosporidium* depositadas en el GenBank (*C. hominis* AF108865, *C. parvum* AF112571, *C. cuniculus* AY120901, *C. meleagridis* AF112574, *C. ubiquitum* KT922236, *C. suis* AF115377, *C. fayeri* AF108860, *C. felis* AF108862, *C. canis* AF112576, *C. bovis* AY741305, *C. scrofarum* KF597534, *C. baileyi* L19068, *C. serpents* AF093499, *C. andersoni* AF093496, *C. muris* B089284 y *C. fragile* EU162751), y dada la relación filogenética de *Eimeria* spp. (apicomplexa intestinal de aves) con *Cryptosporidium* spp., se usó como outgroup la secuencia parcial del gen 18S rRNA de *Eimeria tenella* (U40264.1) depositada también en el GenBank. Todas las secuencias fueron alineadas con el programa MAFFT versión 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) y la filogenia fue establecida empleando el programa MEGA versión 7 (<http://www.megasoftware.net/>), por el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución dado por el programa, el cual tiene en cuenta aspectos como los posibles cambios nucleotídicos en cada una de las posiciones del alineamiento y la tasa con la que suceden los cambios en una determinada posición de la secuencia, entre otros aspectos.. La fiabilidad de los árboles se evaluó con un bootstrap de 10.000 réplicas.

### 5.2.3. Subgenotipificación unilocus usando el marcador gp60: amplificación, secuenciación y análisis filogenético

Como ya se ha mencionado, gp60 es el marcador a la fecha más usado para subgenotipificar mediante análisis unilocus las especies de *Cryptosporidium*, y a través de los años se ha logrado establecer para este marcador una nomenclatura, que también se adoptó para el marcador en este trabajo (7,44). Actualmente, en la literatura se reporta la amplificación de gp60 en las especies *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. fayeri*, *C. cuniculus*, *C. wrairi*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. erinacei*, *C. viatorum* (17,44), y recientemente y posterior al desarrollo de este trabajo en *C. felis* y *C. ryanae* (267,268).

En el presente trabajo para la amplificación y análisis de gp60, se realizó una PCR anidada para las especies *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*. Para las dos primeras especies, se usaron los primers externos AL3531 (5' ATAGTCTCCGCTGTATTC 3') y AL3535 (5' GGAAGGAACGATGTATCT 3') e internos AL3532 (5' TCCGCTGTATTCTCAGCC 3') y AL3534 (5' GCAGAGGAACCAGCATC 3') que amplifican un fragmento de aproximadamente 850pb (269) y para *C. meleagridis* se obtuvo un fragmento de 900pb usando los primers externos CRSout115F (5' GATGAGATTGTCGCTCGTTATC 3') y CRSout1328R (5' AACCTGCGGAACCTGTG 3') e internos, ATGFmod (5' GAGATTGTCGCTCGTTATCG 3') y GATR2 (5' GATTGCAAAAACGGAAGG 3') (270). Para ambas PCR anidadas, se tuvieron en cuenta protocolos publicados previamente (205,207) con adaptaciones a las condiciones del laboratorio y de la matriz analizada. Siempre se usó 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 μM de cada primer y 0.1 μg/μl de BSA. En el protocolo de amplificación, se adaptaron temperaturas, tiempos y número de ciclos. En todas las reacciones se llevó a cabo la evaluación de un control negativo (todos los reactivos usados en la PCR menos el ADN) y un control positivo (ADN de *C. parvum* previamente secuenciado).

Los resultados de la amplificación se evidenciaron cualitativamente por una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% y tinción con SYBR Safe. Todas las muestras en las que se observó amplificación se enviaron a la empresa MACROGEN -Corea

del Sur, para su secuenciación capilar en ambas direcciones. Las secuencias nucleotídicas obtenidas, fueron sometidas a un proceso de depuración y evaluación de control de calidad que consistía en realizar un nBLAST para ambas cadenas (forward y reverse) usando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), confirmando que las secuencias obtenidas para cada muestra correspondieran al marcador objeto de estudio e iniciar el ensamblaje de los contigs utilizando el programa BioEdit, versión 7.2. Un paso adicional de control y verificación de la secuencia de los contigs ensamblados, fue realizar un nuevo nBLAST y un pBLAST usando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para confirmar que el contig correspondiera al marcador esperado y que dicha secuencia quedara en la dirección adecuada (plus/plus). Además, se empleó el servidor de proteómica ExpASy, para identificar y seleccionar el marco de lectura que codificaba para la proteína gp60 en cada una de las muestras. Todos los pasos de verificación fueron necesarios e importantes previo sometimiento de las secuencias a la base de datos del GenBank.

Para el análisis filogenético que permitió establecer los subgenotipos de las especies *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*, se usó el programa MEGA versión 7 (<http://www.megasoftware.net/>) y dos “data set”: uno construido con las secuencias nucleotídicas de los parásitos identificados como *C. hominis* y *C. parvum*, más **29** secuencias de referencia del gen gp60 para *C. hominis* (AF164502, MG694239.1, EU161649.1, DQ665694, KJ910023, LT556067, KY990911, KY990908, KY990897, FJ707315, HQ389257.1, AY262031, DQ665688, MH161561.1, FJ707312, FJ707314, KY990911, EF035554.1, JX088403.1, DQ665692, KY990903, FJ707316, AY738184, AF440638, FJ153244, EF208067, FJ971716, HM234173, JF681174), **18** para *C. parvum* (AY262034, DQ192501, JF727799, MF142037.1, JQ362495.1, EF576961.1, JF727759, JF727805, MF142040, MF142041, AF402285, AF164491, AY738194, AY382675, AY738188, AY873780, AY873781, AY873782) y *C. meleagridis* (AF401499) como outgroup, y el otro “data set”, con las secuencias nucleotídicas de los parásitos identificados como *C. meleagridis*, más **32** secuencias de referencias del gen gp60 para esta especie (AF401499, AF401500, JQ349260, JQ349259, JQ349257, JQ349258, JX878610, JX878611, JX878614, JX878613, AB539721, KJ210619,

KJ210608, AB539718, KJ210605, KJ210620, JF691563, JX416370, AF401501, KJ210613, AB539720, KJ210618, KJ210610, KJ210616, AB539719, KJ210612, KJ210609, KJ210606, AF401498, JQ796094, JF691562, JQ796093), y una secuencia de *C. parvum* (AY262034) como outgroup. Las secuencias de cada “*data set*” fueron alineadas con el programa MAFFT versión 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) y la filogenia fue establecida por el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución dado por el programa de acuerdo con aspectos de cada “*data set*”, como los posibles cambios nucleotídicos en cada una de las posiciones del alineamiento y la tasa con la que suceden los cambios en una determinada posición de la secuencia, entre otros aspectos. La fiabilidad de estos árboles se evaluó con un bootstrap de 10.000 réplicas.

#### **5.2.4. Análisis multilocus de secuencias (MLST)**

##### **5.2.4.1. Selección y validación inicial de marcadores con secuencias micro o minisatélites**

Se sabe que los marcadores que tienen secuencias micro o minisatélites presentan alta tasa de mutación y naturaleza codominante, y por tal razón son los más empleados en estudios de diversidad genética inter e intra-especies, justificando que esta característica fuera uno de los criterios más importantes en la selección de los marcadores a usar en el presente trabajo para los análisis MLST. Durante la selección se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos (Web of Science, Pubmed, Science direct y Scielo), teniendo en cuenta información como: poder resolutivo y discriminatorio del marcador, metodología de análisis multilocus (análisis de tamaño de fragmentos o de secuencias), ubicación cromosómica del marcador, especie de *Cryptosporidium* en la que se realizaban los análisis, la procedencia geográfica de los aislados, la población analizada y entre otros, los protocolos de amplificación empleados. Con base en esta búsqueda, se seleccionaron seis marcadores con secuencias micro o minisatélites: CP47, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14, los cuales junto con gp60 fueron utilizados en los análisis multilocus de este trabajo (Tabla 6).

Como ya se mencionó, en los análisis multilocus existen dos estrategias globales para obtener la información de variabilidad, una basada en las diferencias encontradas en el

tamaño de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar (MLFT) y la segunda, que fue la que decidimos emplear en este trabajo, se basa en los análisis de secuencias nucleotídicas de los fragmentos amplificados (MLST). La estrategia MLST, permite mejorar la especificidad de la información y obtener datos con mayor resolución y poder discriminatorio para mostrar la diversidad genética de los parásitos identificados en las muestras analizadas, en nuestro caso intra e inter-especies para *C. hominis* y *C. parvum*.

Dado que a la fecha de realización de este trabajo no había una estrategia protocolizada para los análisis multilocus en *Cryptosporidium* spp., con el objetivo de evaluar el comportamiento “*in silico*” y validar los marcadores seleccionados, antes de comenzar a procesar y analizar las muestras objeto de estudio; se decidió utilizar la información de los genomas de diferentes especies de *Cryptosporidium* disponible en las bases de datos CryptoDB y SRA del NCBI, para buscar en ellos las secuencias correspondientes a los siete marcadores seleccionados para los MLST (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14). La información de los genomas en los que se identificaron los siete marcadores se usó para construir una “Secuencia Concatenada o Consenso” (SC) por genoma, la cual se usó finalmente para realizar análisis filogenéticos, que se compararon con lo obtenido con base en gp60.

Para la selección de los genomas en los que se identificaron las secuencias de los siete marcadores, se empleó la siguiente estrategia:

**Genomas CryptoDB:** Se utilizaron las secuencias de 16 proyectos genómicos depositados en cromosomas o scaffolds, para realizar un BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que tuvo como “query” las secuencias de referencia depositadas en el GenBank de los siete marcadores (CP47 AF384127.1, ML2 AF344880.1, MS5 JX413499.1, MS9 KP172519.1, MSC6-7 GU933484.1, TP14 KP172516.1 y gp60 AY262031). Todas las secuencias “query” usadas, pertenecían a *C. parvum*, dado que sólo para esta especie, se encontraron secuencias de referencia de los siete marcadores. Con base en los resultados del BLAST, se seleccionaron 5 genomas en los que se obtuvo un



porcentaje de identidad mayor al 80% y un valor de  $E= 1e-20$ , con cada una de las secuencias de los siete marcadores.

**Genomas base de datos SRA (del inglés Sequence Read Archive) del NCBI:** Para utilizar la información depositada en esta base de datos se descargaron los reads de 11 proyectos genómicos, tres de *C. hominis* y ocho de *C. parvum* y se ensamblaron en contigs utilizando el programa SPAdes 3.0 BETA. Con los contigs ensamblados de los 11 proyectos genómicos, se realizó un BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) usando como “query” las secuencias completas para cada uno de los marcadores del genoma *C. hominis* UdeA01, dado que, a la fecha a nuestra consideración, es el genoma mejor ensamblado por la metodología empleada y resultados obtenidos (33). Se identificaron los contigs para cada marcador (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14) en cada proyecto genómico, en el que dieron “hit” con un porcentaje de identidad mayor al 80% y un valor de  $E= 1e-20$ . Con estos contigs se hizo la anotación de cada uno los genes relacionados con los siete marcadores, utilizando el programa ARTEMIS 18.0.2. Una vez anotados los genes se llevó a cabo un nuevo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) frente a las secuencias de *C. hominis* UdeA01, para establecer el porcentaje de cobertura de cada uno de los genes anotados y realizar la selección final de los genomas en los que se obtuviera un porcentaje de identidad mayor del 80% con todos los marcadores. Con el desarrollo de esta estrategia se seleccionaron 10 proyectos genómicos y se aseguró que los contigs seleccionados de cada marcador y cada proyecto genómico, sí correspondiera al marcador esperado.

Para evaluar la resolución taxonómica de los marcadores, se construyó la secuencia concatenada o consenso de los siete marcadores, para los 15 genomas seleccionados (5 Crypto DB y 10 SRA). Se construyó un árbol de máxima verosimilitud con las 15 SC, usando el modelo de sustitución dado por el programa MEGA versión 7 (<http://www.megasoftware.net/>) de acuerdo con aspectos de este “*data set*”, que tiene en cuenta los posibles cambios nucleotídicos en cada una de las posiciones del alineamiento y la tasa con la que suceden los cambios en una determinada posición de la secuencia, entre

otros aspectos. La fiabilidad de este árbol se evaluó con un bootstrap de 100 réplicas y los resultados se compararon con los obtenidos con 18S rRNA y gp60.

#### **5.2.4.2. Estandarización de los protocolos de amplificación y secuenciación de los marcadores incluidos en los análisis MLST (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14)**

Una vez seleccionados y realizada la validación de los marcadores con los genomas de referencia, se procedió con la estandarización de los protocolos de amplificación de cada uno de los siete marcadores con una muestra positiva para *Cryptosporidium* que no hacía parte de las muestras de los pacientes incluidos en el trabajo. La puesta a punto de los protocolos incluyó evaluaciones de diferentes concentraciones de los primers (0,25µM, 0,35µM, 0,5µM), cambios en la temperatura de alineamiento (50°C, 52°C, 55°C, 60°C) y volúmenes de ADN para la amplificación inicial (1µL, 2µL). Además, fue un factor importante en este proceso, el tipo y concentración de los aditivos (DMSO y/o BSA) y el número de ciclos para las reacciones. En todas las reacciones de PCR se emplearon controles tanto negativos (todos los reactivos de PCR, menos el ADN), como positivos (ADN de *C. parvum* previamente secuenciado). Los resultados de la amplificación se evidenciaron cualitativamente por una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% y tinción con SYBR Safe 1X (Tabla 6).

Finalizada la estandarización de los protocolos (Tabla 6), se inició el trabajo con las muestras de ADN positivas para *Cryptosporidium* spp., obtenidas de los pacientes incluidos en el estudio. Todos los productos de la PCR en los que se observó amplificación se enviaron a la empresa MACROGEN -Corea del Sur, donde se realizó una secuenciación capilar en ambas direcciones. Las secuencias nucleotídicas obtenidas, fueron sometidas a un proceso de depuración y evaluación de control de calidad, que consistía en realizar un nBLAST para ambas cadenas (forward y reverse) usando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), confirmando que las secuencias obtenidas para cada muestra correspondieran al marcador objeto de estudio e iniciar el ensamblaje de los contigs utilizando el programa BioEdit, versión 7.2. Un paso adicional de control y verificación de la secuencia de los contigs ensamblados, fue realizar un nuevo nBLAST y un

pBLAST usando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para confirmar que el contig correspondiera al marcador esperado y que dicha secuencia quedara en la dirección adecuada (plus/plus). Además, se empleó el servidor de proteómica ExPASy, para identificar y seleccionar el marco de lectura que codificaba cada uno de los marcadores proteicos, incluidos en el estudio.

#### **5.2.4.3. Análisis individual de los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14 en los parásitos clasificados como *C. hominis* y *C. parvum*: análisis filogenéticos, alelos y tratamiento estadístico**

De acuerdo con los resultados de protocolización de los procesos de amplificación y secuenciación, y los criterios descritos para los análisis MLST, se excluyeron 6 muestras y el marcador ML2, como se explicará en los resultados. Por lo tanto, los análisis finales se realizaron con 22 muestras y seis marcadores: CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14.

Con las secuencias nucleotídicas depuradas de las 22 muestras finalmente incluidas, se construyó un “*data set*” para cada uno de los seis marcadores, es decir cada “*data set*” contenía solo la información correspondiente a un marcador de cada una de las 22 muestras a analizar. Las secuencias de cada “*data set*” fueron alineadas con el programa MAFFT versión 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>), normalizando los fragmentos de análisis para que siempre iniciaran y terminaran en la misma posición nucleotídica en cada muestra. La normalización es necesaria para que, al momento de la identificación de los alelos por marcador, las secuencias pudieran ser comparables, además, para que, al construir las secuencias concatenadas estas pudieran ser adecuadamente analizadas en los MLST.

**Tabla 6. Protocolos estandarizados para la amplificación de los siete marcadores seleccionados para los análisis MLST**

| Marcador/<br>Referencia<br>primers | Primers  | Tipo de PCR | Protocolo de<br>amplificación  | Tamaño producto<br>amplificado (pb) | Aditivos<br>PCR | Volumen ADN<br>PCR 1/ PCR 2 | % Amplificación<br>de las 24<br>muestras |
|------------------------------------|--|-------------|--|-------------------------------------|-----------------|-----------------------------|--|
| gp60<br>(269)                      | F1: ATAGTCTCCGCTGTATTC<br>R1: GGAAGGAACGATGTATCT<br>F2: TCCGCTGTATTCTCAGCC<br>R2: GCAGAGGAACCAGCATC                                | Anidada     | 95°C x 60seg<br>95°C x 30seg<br>55°C x 30seg<br>72°C x 60seg/ 35 ciclos<br>72°C x 5min | 800-850                             | BSA             | 1µl<br>2µl                  | 100                                      |
| CP47<br>(210)                      | F1: GCTTAGATTCTGATATGGATCTAT<br>R1: AGCTTACTGGTCTGTATCAGTT<br>F2: ACCCCAGAAGGCGGACCAAGGTT<br>R2: GTATCGTGGCGTTCTGAATTATCAA         | Anidada     | 94°C x 5min<br>94°C x 45seg<br>55°C x 45seg<br>72°C x 60seg/35 ciclos<br>72°C x 10min  | 350-600                             | BSA y<br>DMSO   | 1µl<br>1µl                  | 100                                      |
| ML2<br>(110)                       | F1: CAATGTAAGTTTACTTATGATTAT<br>R1: CGACTATAAAGATGAGAGAAG  | Punto final | 94°C x 5min<br>94°C x 30seg<br>55°C x 30seg<br>72°C x 60seg/ 40 ciclos<br>72°C x 7min  | 175-237                             | BSA             | 2µl                         | 37,5                                     |
| MS5<br>(209)                       | F1: GCATGTAGTCGTATCCGGAAC<br>R1: GTATGCTGGGAATATAGCCAAG  | Punto final | 95°C x 5min<br>95°C x 50seg<br>55°C x 50seg<br>70°C x 60seg/35 ciclos<br>72°C x 10min  | 181-502                             | BSA y<br>DMSO   | 3µl                         | 100                                      |
| MS9<br>(209,271)                   | F1: TTAGTCGACCTTCAACAGTTGG<br>R1: CAGAATTGGAATCATTTTCTGAAT<br>F2: GGACTAGAAATAGAGCTTTGGCTGG<br>R2: GTCTGAGACAGAATCTAGGATCTAC       | Anidada     | 95°C x 5min<br>95°C x 50seg<br>55°C x 50seg<br>65°C x 60seg/ 35 ciclos<br>72°C x 7min  | 303-534                             | BSA y<br>DMSO   | 1µl<br>1µl                  | 95,8                                     |
| MSC6-7<br>(210)                    | F1: ATTGAACAAACGCCCAAATGTACA<br>R1:<br>CGATTATCTCAATATTGGCTGTTATTGC<br>F2: GCTATTTGCTATCGTCTCACATAACT<br>R2: CTAATGAATCTGATCTTGATC | Anidada     | 94°C x 5min<br>94°C x 45seg<br>55°C x 45seg<br>72°C x 60seg/35 ciclos<br>72°C x 10min  | 455-560                             | BSA             | 1µl<br>1µl                  | 100                                      |
| TP14<br>(271)                      | F1: GAGAAGGAGCAATGGGAGCA<br>R1: TCCTCCTTTTTGCCCTTGAA<br>F2: CTAACGTTTACAGCCAACAGTACC<br>R2: CAATAAAGACCATTATTACCACC                | Anidada     | 95°C x 3min<br>95°C x 50seg<br>55°C x 50seg<br>65°C x 60seg/ 35 ciclos<br>72°C x 10min | 234-342                             | BSA y<br>DMSO   | 1µl<br>2µl                  | 100                                      |

Con el objetivo de evaluar si los marcadores de manera individual permitían una resolución taxonómica que agrupara adecuadamente las especies y si alguno de ellos mostraba un mejor poder discriminatorio que el observado con 18S rRNA, se usó el programa MEGA versión 7 (<http://www.megasoftware.net/>), para establecer las filogenias de cada marcador en cada una de las muestras. Se usaron como referencia las secuencias obtenidas de los genomas de *C. hominis* (TU502-2012 y UKH3) y *C. parvum* (Iowa II, UKP2, UKP5, UKP6, UKP7, UKP8 y UKP15) y como outgroup las secuencias obtenidas del genoma de *C. meleagridis* UKMEL1. Se construyó un árbol de máxima verosimilitud con el modelo de sustitución designado por el programa, el cual tiene en cuenta aspectos como los posibles cambios nucleotídicos en cada una de las posiciones del alineamiento y la tasa con la que suceden los cambios en una determinada posición de la secuencia, entre otros aspectos. La fiabilidad de los árboles se evaluó con un bootstrap de 10.000 réplicas.

Las secuencias normalizadas, se usaron además para hacer las comparaciones nucleotídicas de cada marcador por muestra, empleando el programa DNAsp (<http://www.ub.edu/dnasp/>), el cual tiene en cuenta los sitios conservados, los sitios variables y la presencia de “gaps”. Las diferencias encontradas intra marcador en las 14 muestras *C. hominis* y las ocho *C. parvum*, permitieron la generación de los diferentes alelos. También se hicieron comparaciones por pares usando una matriz de distancias o de similitudes creada en el programa MEGA versión 7 (<http://www.megasoftware.net/>). Se compararon las secuencias nucleotídicas de cada marcador por muestra con una secuencia de referencia. Las secuencias de referencia para los seis marcadores fueron tomadas de la última versión del genoma *C. hominis* TU502-2012 y de la última versión del genoma Iowa II. Los datos de la matriz de distancias se graficaron en una caja de bigotes (boxplot) para observar de una mejor manera la distribución de los datos y evidenciar fácilmente aquellos datos que tenga un comportamiento particular. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico R-Studio (<http://www.rstudio.com/>).

#### **5.2.4.4. Análisis MLST con la secuencia consenso de los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14: análisis filogenéticos y tratamiento estadístico, genotipos multilocus, índices de variabilidad genética y fijación génica-Fst**

Una vez estudiado el comportamiento individual de todos los marcadores, se construyeron las secuencias concatenadas o consenso (SC) con las secuencias normalizadas de los seis marcadores por muestra, manteniendo siempre el mismo orden (CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14) para la construcción de las 22 SC. En un primer análisis el “*data set*” de las 22 SC, junto con las SC construidas con los datos de referencia de dos genomas de *C. hominis* (TU502-2012 y UKH3) y siete de *C. parvum* (Iowa II, UKP2, UKP5, UKP6, UKP7, UKP8 y UKP15), se usaron para la construcción de un árbol de máxima verosimilitud, empleando el programa MEGA versión 7 (<http://www.megasoftware.net/>). Como outgroup se usó la SC de los seis marcadores obtenida de un genoma de *C. meleagridis* (UKMEL1). La filogenia fue establecida con el modelo de sustitución designado por el programa, el cual tiene en cuenta aspectos como los posibles cambios nucleotídicos en cada una de las posiciones del alineamiento y la tasa con la que suceden los cambios en una determinada posición de la secuencia, entre otros aspectos. La fiabilidad se evaluó con un bootstrap de 10.000 réplicas.

Posteriormente las SC fueron usadas para establecer los genotipos multilocus (MLG) empleando el programa DNAsp (<http://www.ub.edu/dnasp/>) y el programa Network versión 4.6.1.0, el cual, además, permite construir una gráfica para la visualización de las relaciones entre los MLG al generar redes, teniendo en cuenta las diferencias genéticas y las frecuencias de su presentación, entre otras características. Las redes de genotipos, a diferencia de los árboles bifurcados tradicionales, permiten describir las relaciones evolutivas en forma de árboles multifurcados donde las conexiones entre genotipos son dadas por el mínimo número posible de mutaciones entre ellos (272,273).

Las conexiones entre los genotipos representan eventos coalescentes, es decir, eventos con un abordaje de la variación genética poniendo a prueba modelos basados en las fuerzas evolutivas (deriva génica, mutación, recombinación, selección natural, entre

otras) que producen y mantienen la variación genética. En estas redes podrán hacerse predicciones como (272,274):

- Los genotipos con mayor frecuencia y con múltiples conexiones tienen alta probabilidad de ser ancestrales.
- Dentro de la red, los genotipos ancestrales son de interior y los genotipos nuevos tienen mayor probabilidad de presentar una ubicación periférica.
- Se espera que los genotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica, esto debido a que probablemente han tenido mayor tiempo para dispersarse.
- Los genotipos con una única conexión se prevén estén unidos a genotipos de la misma población, debido a una evolución reciente y por lo tanto sin tiempo para dispersarse.

Finalmente, el “*data set*” de las SC correspondientes a los MLG identificados, se usó para hacer una aproximación básica de diversidad genética en las 14 muestras *C. hominis* y 8 *C. parvum*, empleando el programa DNAsp (<http://www.ub.edu/dnasp/>). Se describen algunos datos estadísticos como diversidad haplotípica ( $H_d$ ), número de sitios segregantes ( $S$ ), diversidad nucleotídica ( $P_i$ ) y número promedio de diferencias nucleotídicas ( $K$ ) (Tabla 7). Estos análisis siempre se realizaron intra-especie (*C. hominis* o *C. parvum*) y comparando las poblaciones clínicas (niños y pacientes VIH positivos) dentro de cada especie.

Adicionalmente, también se evaluaron las diferencias poblacionales por pares, mediante el cálculo del índice de fijación génica ( $F_{st}$ ) utilizando el programa Arlequin versión 3.5 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>), lo que permitiría evidenciar si estas poblaciones presentan o no una relación genética (Tabla 7). Todos los análisis se realizaron con las SC de los seis marcadores (CP47, gp60, MS5, MS9, MS6-7 y TP14) y con la SC excluyendo el marcador gp60, para evaluar el aporte de este marcador en los datos estadísticos obtenidos.

**Tabla 7. Medidas de diversidad y diferenciación génica**

| <b>Parámetro</b>  | <b>Rango de valores</b> | <b>Interpretación</b>  |
|---|-------------------------|--|
| <b>Diversidad haplotípica (Hd)</b>                      | 0-1                     | Indica la probabilidad de que dos haplotipos escogidos al azar en una población sean diferentes. Entre más cerca de 1, mayor es la probabilidad de encontrar un haplotipo diferente.   |
| <b>Diversidad nucleotídica (Pi)</b>                     | 0-1                     | Indica el número promedio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas por pares. Ejemplo: 0,0065; indica que en promedio al tomar dos secuencias de un dataset por cada 1000 nucleótidos totales hay 6,5 nucleótidos diferentes. |
| <b>Número de sitios segregantes (S)</b>                 | -                       | Número total de sitios segregantes o polimórficos, teniendo en cuenta todos los sitios que tienen las secuencias evaluadas.  |
| <b>Número promedio de diferencias nucleotídicas (K)</b> | -                       | Número promedio de diferencias nucleotídicas en toda la secuencia, comparando dos secuencias.  |
| <b>Índice de fijación génica (F<sub>st</sub>)</b>       | 0-1                     | Diferencias génicas poblacionales por pares. Entre más cercano de 1 sea el valor, las poblaciones presentan mayor relación génica.   |



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Muestras incluidas en el trabajo.

En total se incluyeron 28 muestras con base en los criterios establecidos y se categorizaron de la siguiente manera:

- Diez Niños Antioquia **(NA)** nombrados del 1 al 10
- Diez Niños Santander **(NS)** nombrados del 1 al 10
- Ocho pacientes VIH positivos de Antioquia **(VA)** nombrados del 1 al 8

Como se explicó en la metodología las muestras de materia fecal de los niños provenían de trabajos previos y colaborativos con el grupo de Investigación en Manejo Clínico de la Universidad de Santander; y las muestras de materia fecal de los pacientes VIH positivos, fueron obtenidas por búsqueda activa en la ejecución del proyecto macro de este trabajo, “Estudio de prevalencia, diversidad genética y genómica de *Cryptosporidium* en población VIH positiva de Antioquia”; la obtención de estas muestras positivas para *Cryptosporidium* spp., tomó alrededor de 18 meses y se realizó en el periodo comprendido entre marzo de 2018 y septiembre de 2019.

### 6.2. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp.

#### 6.2.1. Análisis unilocus de secuencia

Después de tener todos los procedimientos de las diferentes PCR protocolizados y adaptados a las condiciones del laboratorio, se obtuvo para todas las muestras analizadas resultados positivos de estabilidad de ADN total purificado a partir de las muestras fecales, y en las amplificaciones específicas para cada marcador, siempre los resultados de control de la técnica arrojaron los resultados esperados: amplificación (C+) o no amplificación (C-).

#### 6.2.1.1. Identificación de especies de *Cryptosporidium* con base en la secuencia parcial del gen 18S rRNA

Se logró la amplificación, secuenciación y posterior análisis de la región de aproximadamente 830pb del gen 18S rRNA de *Cryptosporidium* spp., en las 28 muestras procedentes de la población objeto de estudio y con base en los análisis de secuencia, se identificaron cinco especies de *Cryptosporidium*: *C. hominis* en el 57,1% (16/28), *C. parvum*

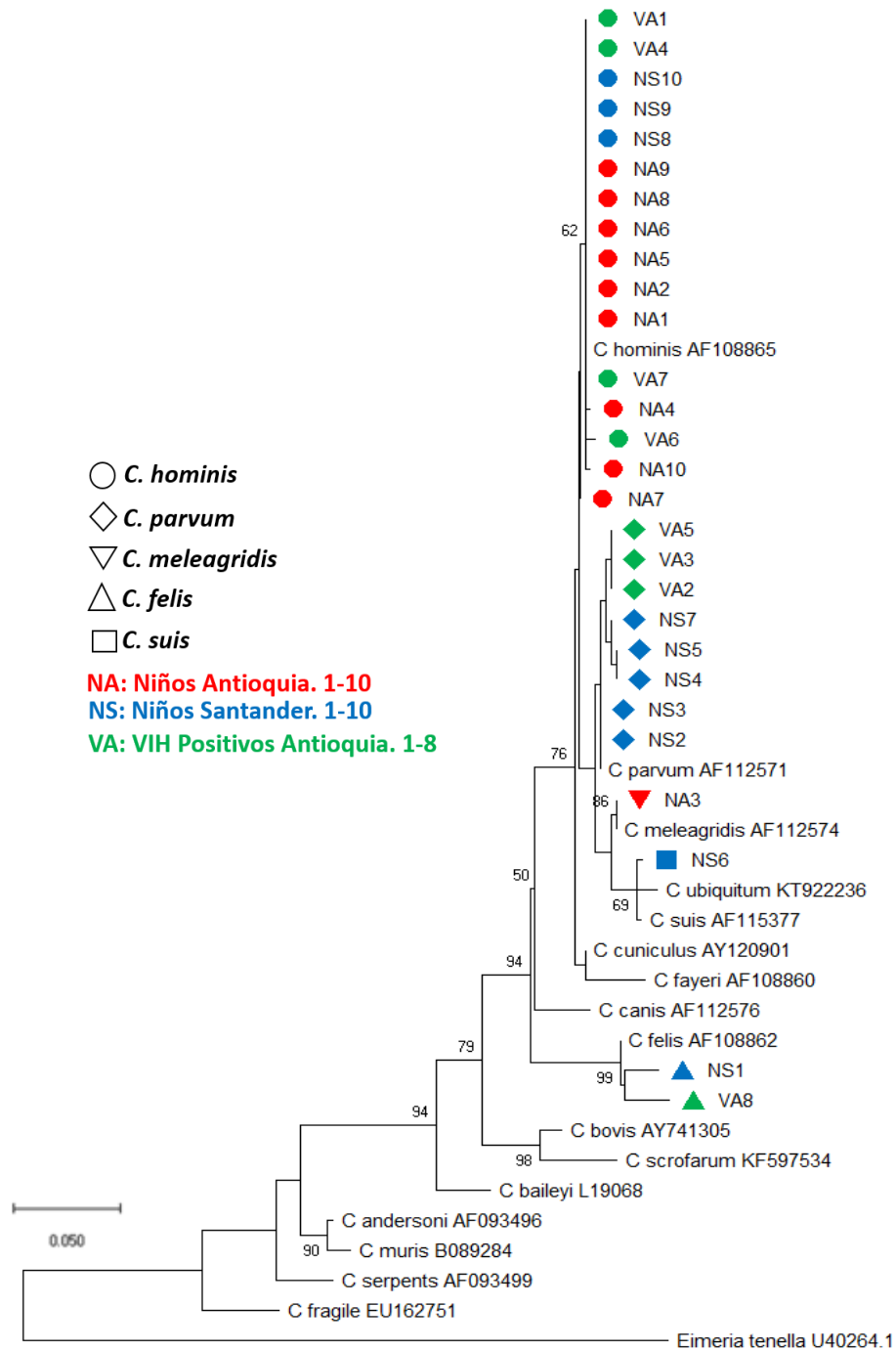
en el 28,6% (8/28), *C. felis* en el 7,1% (2/28), *C. meleagridis* y *C. suis* en el 3,6% con una muestra positiva para cada una de estas especies. Se resalta que, el hallazgo de *C. meleagridis* y *C. suis*, se establecen como el primer reporte para Colombia de estas especies identificadas en muestras humanas (262), hospedadores donde estas infecciones se asocian con una ruta de transmisión zoonótica. Además, fue notable la diferencia encontrada entre los Niños Antioquia (NA) y Niños Santander (NS) siendo *C. hominis* más frecuente en NA (9 /10) y *C. parvum* en NS (5/10). También es necesario destacar que, en la población de los NS se encontraba una de las muestras positivas para *C. felis* (NS1) y la muestra *C. suis* (NS6), y que la segunda muestra positiva para *C. felis* correspondía a un paciente VIH positivo (VA8), especies que al igual que *C. parvum*, tienen potencial zoonótico (Tabla 8) (Figura 5).

**Tabla 8. Identificación de las especies de *Cryptosporidium* con base en la secuencia parcial del gen 18S rRNA**

|   | Niños en edad escolar        |                              | Pacientes VIH positivos Antioquia<br>VA (1-8) | Total     |
|---|------------------------------|------------------------------|---|-----------|
|   | Niños Antioquia<br>NA (1-10) | Niños Santander<br>NS (1-10) |   |           |
| <b><i>C. hominis</i></b><br>16/28 (57,1%)   | n = 9<br>NA1- 2, 4-10        | n = 3<br>NS8-10              | n = 4<br>VA1, 4, 6, 7                         | 16        |
| <b><i>C. parvum</i></b><br>8/28 (28,6%)     | -                            | n = 5<br>NS2-5, 7            | n = 3<br>VA2-3, 5                             | 8         |
| <b><i>C. felis</i></b><br>2/28 (7,1%)       | -                            | n = 1<br>NS1                 | n = 1<br>VA8                                  | 2         |
| <b><i>C. meleagridis</i></b><br>1/28 (3,6%) | n = 1<br>NA3*                | -                            | -   | 1         |
| <b><i>C. suis</i></b><br>1/28 (3,6%)        | -                            | n = 1<br>NS6*                | -   | 1         |
| <b>Total</b>                                | <b>10</b>                    | <b>10</b>                    | <b>8</b>                                      | <b>28</b> |

\*Primer reporte para Colombia – humanos

**Figura 5. Árbol de máxima verosimilitud. Especies de *Cryptosporidium* identificadas con base en la secuencia parcial del gen 18S rRNA**



**Figura 5.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias parciales del gen 18S rRNA de especies de *Cryptosporidium* depositadas en GenBank y las secuencias obtenidas de los parásitos identificados en este trabajo. Se usó el método de máxima verosimilitud con el software Mega v7, el modelo de sustitución Tamura 3 parámetros y la distribución gamma para modelar las diferencias de velocidad evolutiva. Como outgroup se usó la secuencia de referencias de *Eimeria tenella* y la fiabilidad del árbol se obtuvo con 10.000 réplicas y el porcentaje de los taxones que se agrupan en el árbol se muestran junto a las ramas (>50%). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Las figuras geométricas hacen referencia a la especie y los colores a las diferentes poblaciones incluidas en el trabajo.

### 6.2.1.2. Identificación de subgenotipos dentro de las especies *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*, con base en la secuencia parcial del gen gp60, como único marcador

Se consideró necesaria la subgenotipificación unilocus, usando como marcador a gp60, dado que es el marcador frecuentemente empleado para este tipo de análisis y para el único que se tiene una nomenclatura establecida y aceptada en el ámbito mundial. El análisis se realizó para las muestras identificadas con las especies *C. hominis* (n= 16), *C. parvum* (n=8) y *C. meleagridis* (n= 1), dado que para *C. felis* y *C. suis* a la fecha de la realización de esta estrategia experimental (septiembre de 2019), no se contaba con primers ni información para el diseño de estos.

En *C. hominis* se identificaron cuatro familias alélicas (**Ia, Ib, Id, Ie**) y dentro de estas, seis subgenotipos, siendo el subgenotipo **IbA10G2** el más frecuente con 68,75% (11/16) de los casos. Adicionalmente, se identificaron dos subgenotipos no reportados en la literatura a la fecha de escritura de este trabajo, **IaA13R6** y **IaA11R3** que pertenece la muestra NA6 y NS9 respectivamente. (Tabla 9) (Figura 6A).

En cuanto a la especie *C. parvum*, se identificaron dos familias alélicas (**Ila y Ilic**) encontrando que siete de las ocho muestras se agruparon en la familia alélica **Ila**, dentro de la cual el subgenotipo más frecuente fue el **IlaA20G6R1** con el 37,5% de los casos (3/8), además, se identificó el subgenotipo **IlaA19G5R1** en las muestras NS4 y VA3, el cual a la fecha no ha sido reportado en la literatura. Otro hallazgo importante dentro de los parásitos clasificados en esta especie fue la identificación del subgenotipo **IlicA5G3a** en la muestra VA2, que corresponde también al primer reporte de este subgenotipo para Colombia en humanos. (Tabla 9) (Figura 6A). Para la única muestra *C. meleagridis* se identificó el subgenotipo **IIlbA26G1R1**, detectado frecuentemente en aves, y menos frecuente en humanos (Tabla 9) (Figura 6B).

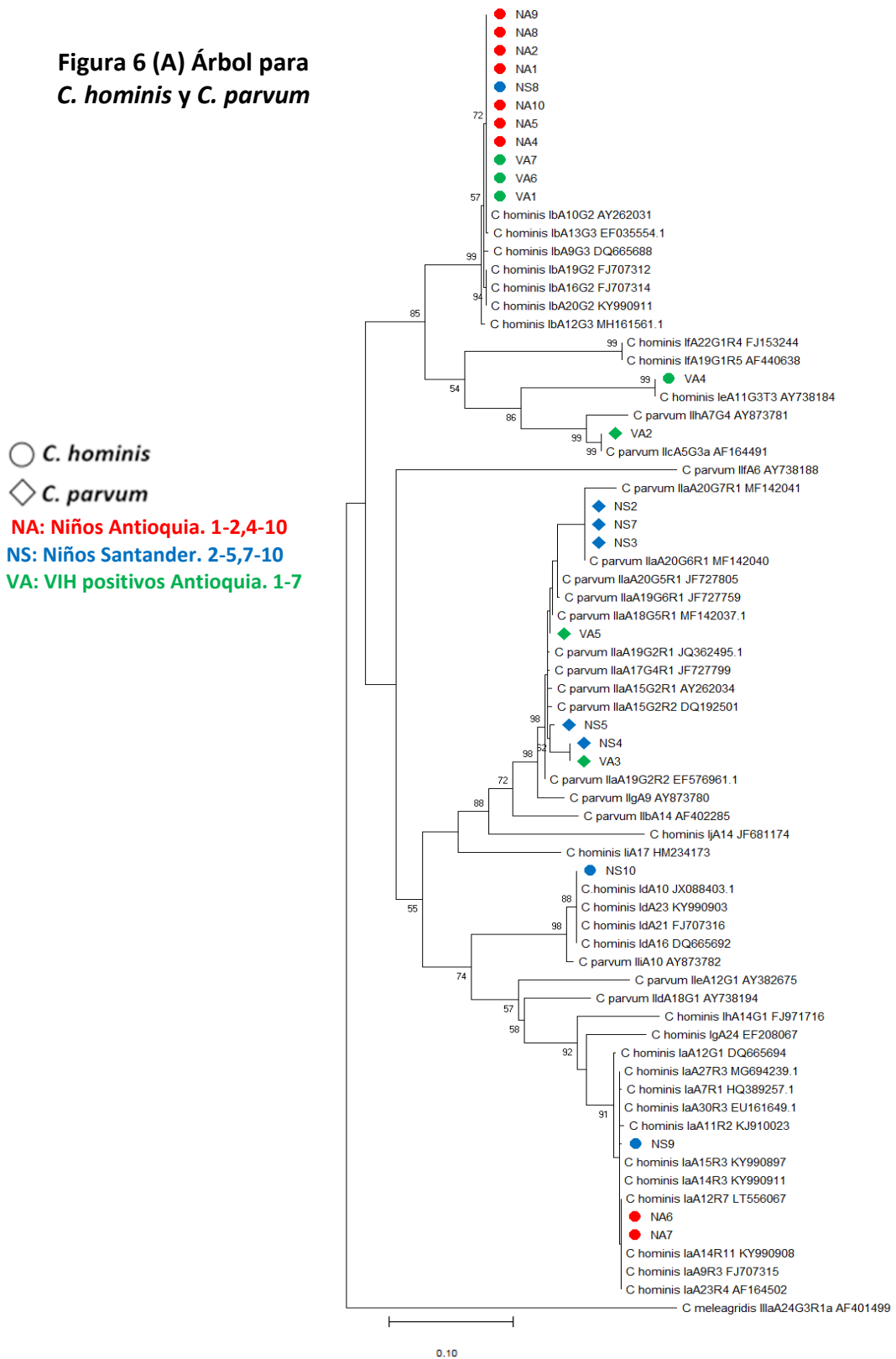
Todas las secuencias de los marcadores 18S rRNA y gp60, obtenidas de los parásitos identificados en el estudio, previa confirmación por varias estrategias, se depositaron en la

base de datos nucleotídica del GenBank. Los respectivos códigos de acceso se comparten en la Tabla 1 de información complementaria.

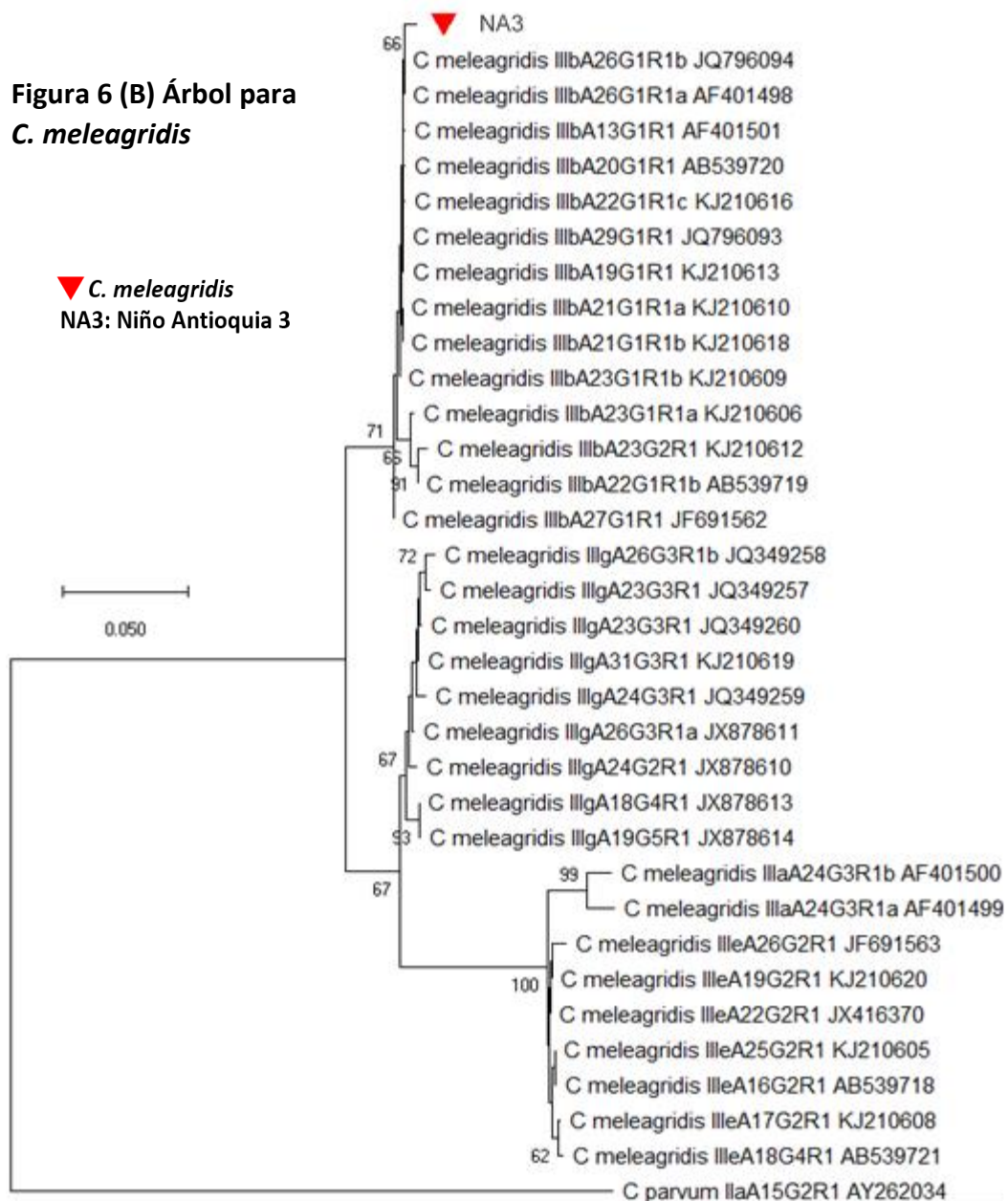
**Tabla 9. Subgenotipos intra-especie *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*, con base en el análisis unilocus de la secuencia parcial del gen gp60**

|                                      | Subgenotipos                     | Niños en edad escolar        |                              | Pacientes VIH positivos Antioquia<br>VA (1-8) | Total     |
|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|---|-----------|
|                                      |                                  | Niños Antioquia<br>NA (1-10) | Niños Santander<br>NS (1-10) |   |           |
| <b><i>C. hominis</i></b><br>16/25    | <b>IbA10G2</b><br>11/16 (68.75%) | n = 7<br>NA1-2,4-5,8-10      | n = 1<br>NS8                 | n = 3<br>VA1, 6-7                             | <b>16</b> |
|                                      | <b>IaA13R6</b><br>1/16 (6.25%)   | n = 1<br>NA6                 | -                            | -   |           |
|                                      | <b>IaA13R7</b><br>1/16 (6.25%)   | n = 1<br>NA7                 | -                            | -   |           |
|                                      | <b>IaA11R3</b><br>1/16 (6.25%)   | -                            | n = 1<br>NS9                 | -   |           |
|                                      | <b>IeA11G3T3</b><br>1/16 (6.25%) | -                            | -                            | n = 1<br>VA4                                  |           |
|                                      | <b>Ida10</b><br>1/16 (6.25%)     | -                            | n = 1<br>NS10                | -   |           |
| <b><i>C. parvum</i></b><br>8/25      | <b>IlaA20G6R1</b><br>3/8 (37.5%) | -                            | n = 3<br>NS2-3, 7            | -   | <b>8</b>  |
|                                      | <b>IlaA19G5R1</b><br>2/8 (25%)   | -                            | n = 1<br>NS4                 | n = 1<br>VA3                                  |           |
|                                      | <b>IlaA18G5R1</b><br>1/8 (12.5%) | -                            | n = 1<br>NS5                 | -   |           |
|                                      | <b>IlaA17G4R1</b><br>1/8 (12.5%) | -                            | -                            | n = 1<br>VA5                                  |           |
|                                      | <b>IlcA5G3a</b><br>1/8 (12.5%)   | -                            | -                            | n = 1<br>VA2                                  |           |
| <b><i>C. meleagridis</i></b><br>1/25 | <b>IIlbA26G1R1</b><br>1/1 (100%) | n = 1<br>NA3                 | -                            | -   | <b>1</b>  |
| <b>Total</b>                         | -                                | <b>10</b>                    | <b>8</b>                     | <b>7</b>                                      | <b>25</b> |

Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud. Subgenotipos intra-especie para *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*, identificados con base en gp60.



**Figura 6 (B) Árbol para *C. meleagridis***



**Figura 6.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias de referencia de gp60 para *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis* depositadas en GenBank y las secuencias obtenidas de las 28 muestras del estudio. En (A) se observan los resultados para las muestras *C. hominis* y *C. parvum*, y en (B) para *C. meleagridis*. Se usó el método de máxima verosimilitud con el software Mega v7, el modelo de sustitución Tamura Nei y la distribución gamma para modelar las diferencias de velocidad evolutiva. Como outgroup para el árbol de las especies *C. hominis* y *C. parvum* se usó *C. meleagridis* IIIa y para el de *C. meleagridis* se usó *C. parvum* IIa. La fiabilidad del árbol se obtuvo con 10.000 réplicas y el porcentaje de los taxones que se agrupan en el árbol se muestran junto a las ramas (>50%). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas medidas en el número sustituciones por sitio. Las figuras hacen referencia a la especie y los colores a las diferentes poblaciones clínicas incluidas en el trabajo.

## 6.2.2. Análisis multilocus de secuencias (MLST)

### 6.2.2.1. Validación inicial de marcadores con secuencias micro o minisatélites seleccionados para los MLST

Después de la estrategia de búsqueda y los criterios de selección descritos en la metodología, se decidió incluir para los análisis MLST siete marcadores: **CP47, gp60, ML2, MS9, MS5, MSC6-7 y TP14**. De los marcadores gp60 y CP47 se sabe que son genes que codifican para proteínas implicadas en procesos de invasión a la célula hospedadora, de ML2 que es un gen que codifica para una proteína de adhesión transmembranal y de MSC6-7 que codifica para una proteína probablemente antigénica con repeticiones de serina. Los marcadores MS9, TP14 y MS5 codifican para proteínas hipotéticas, de las que aún no se tiene anotación precisa de su función biológica en *Cryptosporidium* spp. (Tabla 4).

Los marcadores están ubicados en los cromosomas 5, 6 y 8; cinco de ellos poseen secuencias microsatélites y dos secuencias minisatélites. El rango del tamaño de los amplicones esperados de los siete marcadores está entre 200-850pb; siendo ML2 el marcador con el amplicón más pequeño (175-237pb) y la secuencia microsatélite más pequeña (2pb) y gp60 el marcador con el producto amplificado más grande 800-850pb. Es importante resaltar que el gen completo de gp60 tiene un tamaño de 1000pb y que los primers empleados amplifican más del 80% del gen, lo que es muy diferente con la mayoría de los marcadores, donde se amplifican regiones de tamaño mucho más pequeño, excepto con MSC6-7 que presenta una situación similar (Tablas 4).

Dado que aún no existe un protocolo para los análisis MLST de *Cryptosporidium*, en este trabajo decidimos utilizar la información de los genomas depositados en base datos públicas, para hacer una identificación y una validación inicial de los marcadores seleccionados antes de proceder al análisis de las muestras objeto de estudio. Este abordaje permitió la identificación de las secuencias nucleotídicas de los siete marcadores (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14), en cinco genomas depositados en la base de datos CryptoDB y 10 genomas de la base de datos SRA del NCBI (Tabla 10), los cuales cumplieron con los criterios para la inclusión. Dentro de estos genomas, no sólo están de las dos



especies más frecuentes en causar procesos infecciosos en humanos (*C. hominis* y *C. parvum*), sino también de especies como *C. meleagridis* y *C. tyzzeri*.

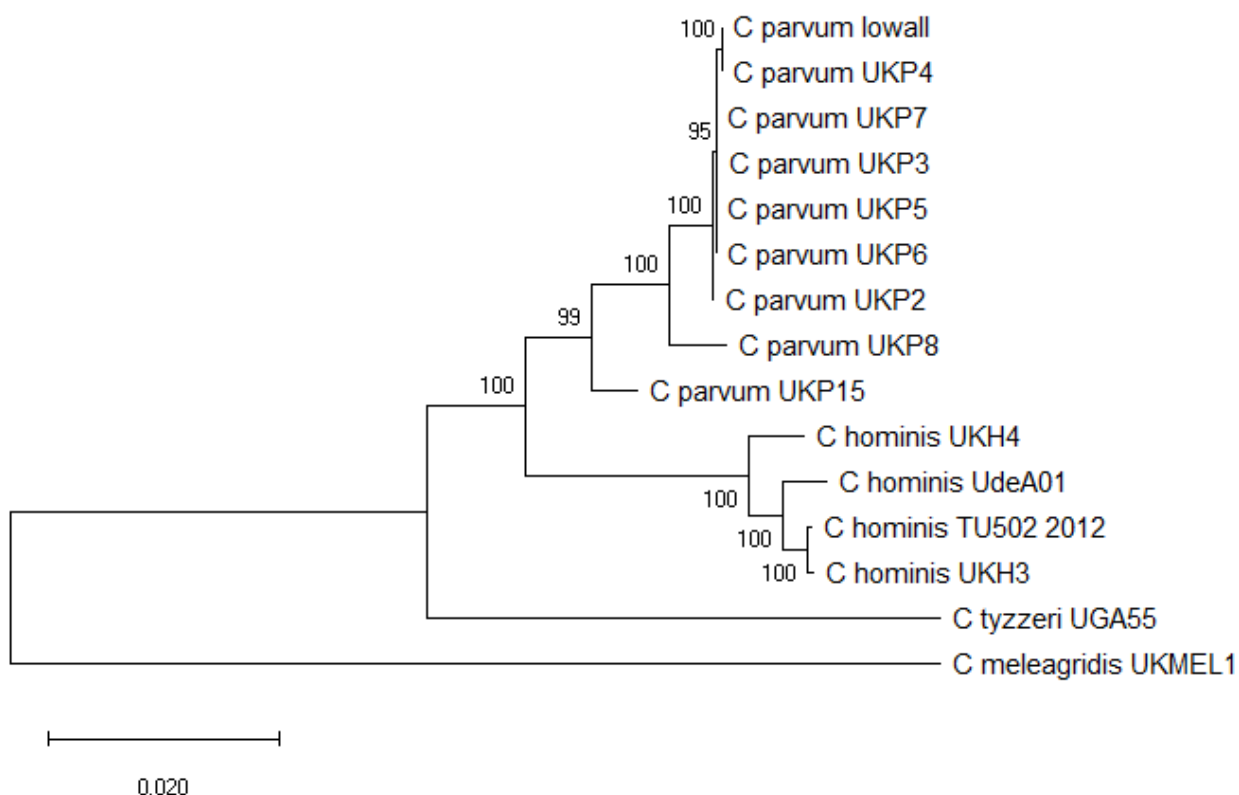
**Tabla 10. Información de los genomas de *Cryptosporidium* spp. seleccionados para la estrategia de validación de los marcadores para los análisis MLST**

| <b>Genomas seleccionados de la base de datos CryptoDB</b>  |  |  |
|--|--|--|
| <b>Query:</b> Secuencias parciales de referencia de cada marcador, obtenidas del GenBank. <ul style="list-style-type: none"> <li>• CP47 (AF384127.1)</li> <li>• gp60 (AY262031)</li> <li>• ML2 (AF344880.1)</li> <li>• MS5 (JX413499.1)</li> <li>• MS9 (KP172519.1)</li> <li>• MSC6-7 (GU933484.1)</li> <li>• TP14 (KP172516.1)</li> </ul> | <b>Subject:</b> Genomas de la base de datos CryptoDB, incluidos en el análisis | Subgenotipos unilocus con base en gp60 |
|  | <i>C. hominis</i> UdeA01   | IeA11G3T3                              |
|  | <i>C. hominis</i> TU502-2012   | IbA10G2                                |
|  | <i>C. parvum</i> Iowa II   | IlaA15G2R1                             |
|  | <i>C. meleagridis</i> UKMEL1   | IIIBa22G1R1                            |
|  | <i>C. tyzzeri</i> UGA55  | IXA6                                   |
| <b>Genomas seleccionados de la base de datos SRA del NCBI</b>  |  |  |
| <b>Query:</b> Secuencias completas de cada marcador obtenidas del genoma <i>C. hominis</i> UdeA01 (33)   | <b>Subject:</b> Genomas de la base de datos SRA, incluidos en el análisis.     | Subgenotipos unilocus con base en gp60 |
|  | <i>C. hominis</i> UKH3 (SRX3244036)  | IbA10G2                                |
|  | <i>C. hominis</i> UKH4 (SRX3255852)  | IAA14R3                                |
|  | <i>C. parvum</i> UKP2 (SRX3230187)   | IlaA19G1R2                             |
|  | <i>C. parvum</i> UKP3 (SRX3259521)   | IlaA18G2R1                             |
|  | <i>C. parvum</i> UKP4 (SRX3259624)   | IlaA15G2R1                             |
|  | <i>C. parvum</i> UKP5 (SRX3259631)   | IlaA15G2R1                             |
|  | <i>C. parvum</i> UKP6 (SRX3259988)   | IlaA15G2R1                             |
|  | <i>C. parvum</i> UKP7 (SRX3260007)   | IlaA17G1R1                             |
|  | <i>C. parvum</i> UKP8 (SRX3260278)   | IIdA22G1                               |
| <i>C. parvum</i> UKP15 (SRR6813719)  | IICa5G3a   |  |

Con las secuencias nucleotídicas de los siete marcadores para cada genoma, se construyó una secuencia consenso o concatenada (SC) y se generó un “data set”, usado para construir un árbol de máxima verosimilitud. Los resultados obtenidos muestran una resolución taxonómica y un agrupamiento mejor con las SC al que se logra con el análisis unilocus usando 18S rRNA, especialmente entre las especies *C. hominis* y *C. parvum* (Figura 5 y 7). Se observaron dos cladas principales con soportes estadísticos altos (100), una de ellas agrupa las SC de los genomas *C. hominis* y la otra las SC de *C. parvum*. Las SC de los

genomas de *C. tyzzeri* y de *C. meleagridis* se separan muy bien de las otras especies. La SC de los siete marcadores, también logra separar la especie de *C. parvum* asociadas con transmisión antroponótica (UKP15) de los *C. parvum* zoonóticos, y los diferentes subgenotipos con base en gp60, de los genomas *C. hominis* (Tabla 10) (Figura 7).

**Figura 7. Análisis filogenético con las secuencias consenso de los siete marcadores en los 15 genomas de *Cryptosporidium* usados para la validación.**



**Figura 7.** Relaciones filogenéticas entre las 15 secuencias consenso (SC) de los siete marcadores (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14), construidas con la información de cada uno de los 15 genomas incluidos en el análisis MLST de validación. El árbol se construyó con el método de máxima verosimilitud en el software Mega v7, el modelo de sustitución General Time Reversible y la distribución gamma para modelar las diferencias de velocidad evolutiva. La fiabilidad del árbol se obtuvo con 100 réplicas y el porcentaje de los taxones que se agrupan en el árbol se muestran junto a las ramas (>50%). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas medidas en el número de sustituciones por sitio.

#### 6.2.2.2. Muestras, especies de *Cryptosporidium* y marcadores con secuencias micro o minisatélites incluidos en el análisis MLST

El proceso de estandarización para la amplificación de los siete marcadores en las 28 muestras y la construcción académica de un riguroso y apropiado flujo de trabajo para

abordar la información de las secuencias obtenidas (aproximadamente 160 archivos con información cruda de las secuencias), permitió inicialmente establecer que **22 muestras y seis marcadores (CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14)** cumplieran con los requisitos descritos en la metodología para ser incluidos en los análisis MLST y los demás análisis de variabilidad genética (Tabla 6). De las 22 muestra se obtuvo amplificación e información de secuencia adecuadas para los seis marcadores. Además, las secuencias se depositaron en la base de datos nucleotídica del GenBank. Los respectivos códigos de acceso se comparten en la Tabla 1 de información complementaria.

Se incluyeron sólo las muestras de las especies *C. hominis* 16/28 y *C. parvum* 8/28, por ser las especies que se identificaron en la mayoría de las muestras 24/28 y por su importancia clínica y epidemiológica en humanos. Las muestras identificadas como *C. meleagridis* 1/28, *C. felis* 2/28 y *C. suis* 1/28, se excluyeron dado su bajo “n” y, además, debido que para *C. felis* y *C. suis* al momento del desarrollo metodológico de este trabajo, no se contaba con información genómica que permitiera el diseño de primers específicos de especie para los seis marcadores. De las 16 muestras identificadas como *C. hominis* fue necesario excluir las muestras NA1 y NA5, ya que no amplificaron con el marcador MS9, quedando finalmente 14 muestras *C. hominis* y 8 de *C. parvum*. Se excluye también del análisis el marcador ML2, debido a que sólo se logró la amplificación en el 37,5% (9/24) de las muestras identificadas como *C. hominis* o *C. parvum* (Tabla 6).

### **6.2.2.3. Análisis individual de los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14: análisis filogenéticos, identificación de alelos y tratamiento estadístico**

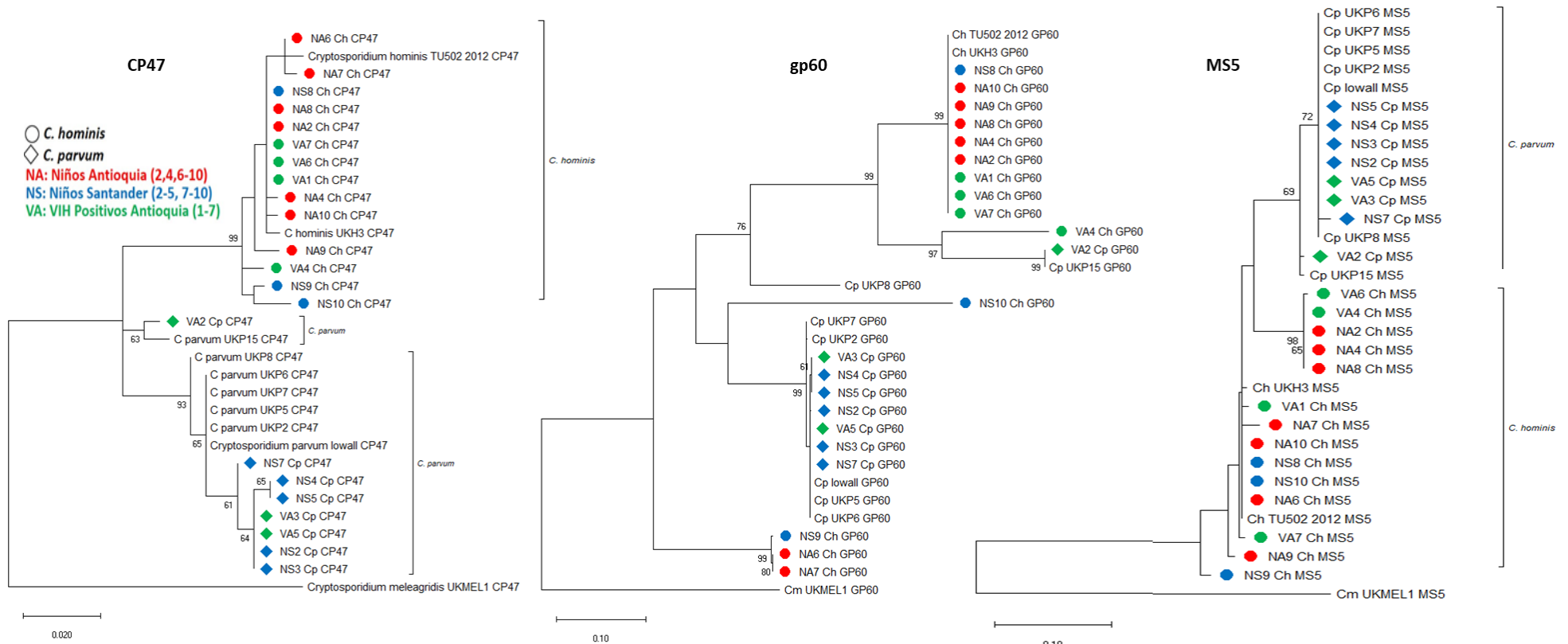
Después de la inclusión final de las muestras y los marcadores, se quiso evaluar si los marcadores de manera individual permitían una resolución taxonómica que agrupara adecuadamente las especies *C. hominis* y *C. parvum*, comparando el poder discriminatorio con el observado mediante el análisis del gen 18S rRNA, para lo cual se establecieron las relaciones filogenéticas para cada marcador construyendo un árbol de máxima verosimilitud.

En la figura 8 se presentan los árboles, en los que claramente se evidencia que todos los marcadores hacen adecuadamente la clasificación taxonómica de especie, con respeto al dato inicialmente obtenido con 18S rRNA, y que todos logran separar las cladas, para los parásitos identificados como *C. hominis* y *C. parvum*, resultado concordante con lo observado en la filogenia de las SC de los genomas de referencias usados en la validación inicial (Figura 7), pero como dato importante se observa que los marcadores CP47, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14, logran un mejor agrupamiento y separación de las especies *C. hominis* y *C. parvum* comparado con gp60, ya que en este marcador se pueden observar cladas principales con aislados de ambas especies.

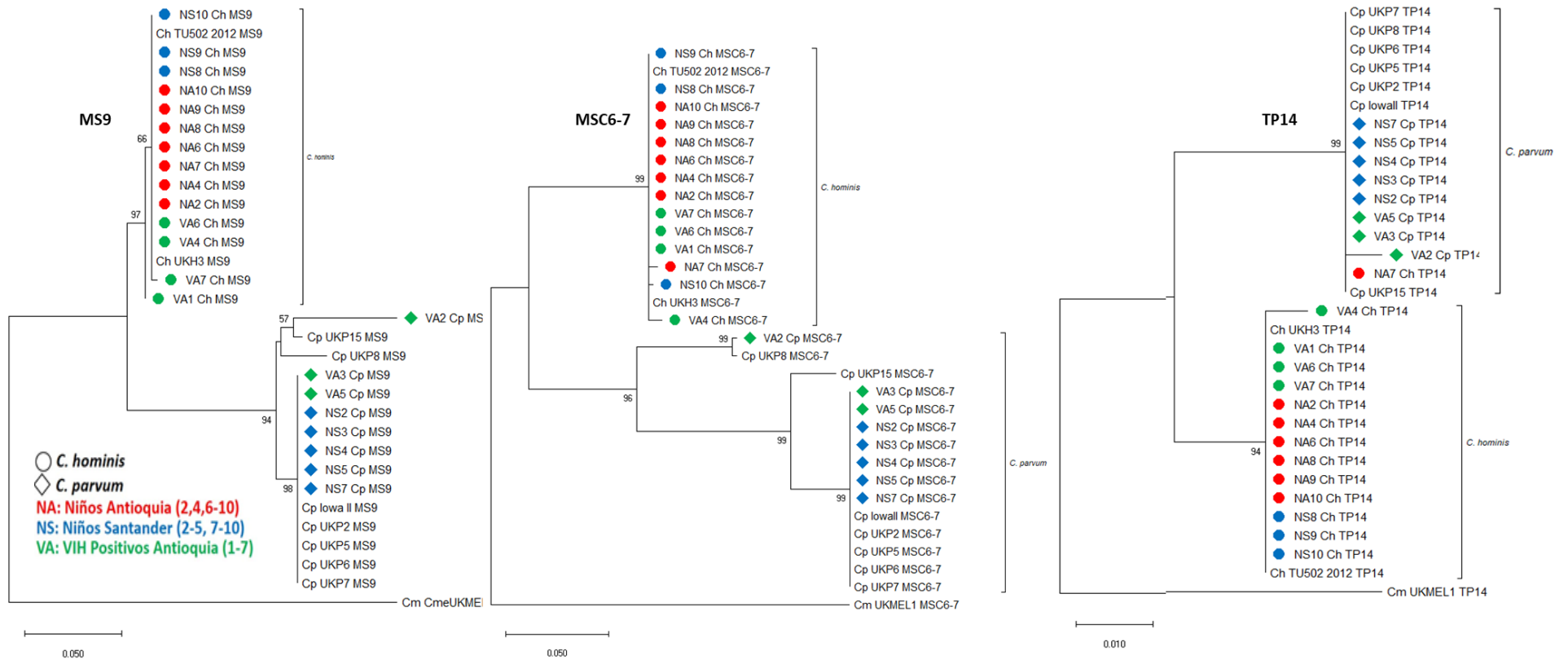
En todos los árboles construidos se observa que la muestra VA2 de *C. parvum*, se separa de la clada que agrupa a las demás muestras identificadas con esta especie, y que en todos los árboles y para ambas especies, el marcador CP47 muestra un mayor número de subcladas intra-especies y los marcadores MS9, MSC6-7 y TP14 un menor número de subcladas. Las muestras NA2 y NA8 de *C. hominis*, siempre se ubicaron en la misma clada en los árboles construidos para cada marcador (Figura 8).

**Figura 8. Árboles filogenéticos de cada marcador (CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14) construidos con las secuencias de las 14 muestras *C. hominis* y 8 *C. parvum***

**A. Árboles para los marcadores CP47, gp60 y MS5**



## B. Árboles para los Marcadores MS9, MSC6-7 y TP14



**Figura 8.** Relaciones filogenéticas entre las secuencias de los seis marcadores de las 14 muestras *C. hominis* y 8 *C. parvum*. En (A): CP47, gp60 y MS9 y en (B): MS9, MSC6-7 y TP14. Para todos los árboles se usó el método de máxima verosimilitud con el software Mega v7, el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano para CP47, MS5, MS9 y TP14, Tamura 3-parámetros para MSC6-7 y Tamura Nei y distribución gamma para modelar las diferencias de velocidad evolutiva para gp60. Como outgroup se usó la secuencia correspondiente a cada marcador obtenida del genoma *C. meleagridis* UKMEL1. La fiabilidad del árbol se obtuvo con 10.000 réplicas y el porcentaje de los taxones que se agrupan en el árbol se muestran junto a las ramas (>50%). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Las figuras geométricas hacen referencia a la especie y los colores a las diferentes poblaciones incluidas en el trabajo.

Como medida individual (por muestra) del conjunto de variaciones de secuencias nucleotídicas en la región de interés de cada marcador, o como la combinación de alelos en un sólo marcador, se procedió a la identificación de los alelos intra e inter-especie (*C. hominis* y *C. parvum*), relacionados con cada uno de los marcadores en las 22 muestras. Para este análisis se usaron las secuencias nucleotídicas previamente alineadas y normalizadas y el programa DNAsp (<http://www.ub.edu/dnasp/>).

En los análisis intra-especies, para las 14 muestras identificadas como *C. hominis*, se observó una naturaleza polimórfica en los seis marcadores, evidenciando a MS9 como el menos polimórfico mientras que en CP47 y MS5 se identificaron el mayor número de alelos 9 y 10 respectivamente, además, CP47 fue el marcador que mayor número de subcladas intra-especies presentó, como se mencionó anteriormente (Tabla 11A) (Figura 8A). Se resalta también, que sólo las muestras NA2 y NA8 presentaron el mismo perfil alélico con todos los marcadores (Tabla 11A), y siempre se ubicaron en la misma clada en los árboles filogenéticos construidos para cada marcador (Figura 8). También se observó que tres de los marcadores con el comportamiento más polimórfico (CP47, gp60 y MS5) presentaron alelos diferentes y únicos en tres de las 14 muestras (NA6, NA7 y NS9) (Tabla 11A).

Por otro lado, en las ocho muestras identificadas como *C. parvum*, se mantiene CP47 como el marcador más polimórfico y MSC6-7 como el menos polimórfico, se identificó, además, la muestra VA2 como la única que presentó un perfil de alelos únicos y diferentes en todos los marcadores con respecto a las demás muestras evaluadas, la cual se separa en todos los árboles de la clada que agrupa a las demás muestras identificadas como *C. parvum*. (Tabla 11B) (Figura 8)

**Tabla 11. Alelos para cada uno de los seis marcadores en las 14 muestras identificadas como *C. hominis* y las 8 identificadas como *C. parvum***

| <b>A. <i>C. hominis</i></b>                         |                | <b>Marcadores con secuencias micro/minisatélites</b> |             |            |            |               |             |
|---|----------------|--|-------------|------------|------------|---------------|-------------|
| <b>Hospedador</b>                                   | <b>Muestra</b> | <b>CP47</b>  | <b>GP60</b> | <b>MS5</b> | <b>MS9</b> | <b>MSC6-7</b> | <b>TP14</b> |
| <b>Niños Antioquia<br/>NA<br/>n = 7</b>             | NA2            | Alelo1   | Alelo1      | Alelo1     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo1      |
|   | NA4            | Alelo2   | Alelo1      | Alelo1     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo1      |
|   | NA6            | Alelo3   | Alelo2      | Alelo2     | Alelo2     | Alelo2        | Alelo2      |
|   | NA7            | Alelo4   | Alelo3      | Alelo3     | Alelo1     | Alelo3        | Alelo3      |
|   | NA8            | Alelo1   | Alelo1      | Alelo1     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo1      |
|   | NA9            | Alelo5   | Alelo1      | Alelo4     | Alelo1     | Alelo2        | Alelo4      |
|   | NA10           | Alelo6   | Alelo1      | Alelo5     | Alelo1     | Alelo2        | Alelo4      |
| <b>Niños Santander<br/>NS<br/>n = 3</b>             | NS8            | Alelo1   | Alelo1      | Alelo6     | Alelo1     | Alelo2        | Alelo4      |
|   | NS9            | Alelo7   | Alelo4      | Alelo7     | Alelo1     | Alelo2        | Alelo4      |
|   | NS10           | Alelo8   | Alelo5      | Alelo5     | Alelo1     | Alelo4        | Alelo5      |
| <b>Pacientes VIH<br/>Antioquia<br/>VA<br/>n = 4</b> | VA1            | Alelo1   | Alelo1      | Alelo8     | Alelo3     | Alelo2        | Alelo4      |
|   | VA4            | Alelo9   | Alelo6      | Alelo1     | Alelo1     | Alelo5        | Alelo6      |
|   | VA6            | Alelo1   | Alelo1      | Alelo9     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo1      |
|   | VA7            | Alelo1   | Alelo1      | Alelo10    | Alelo4     | Alelo2        | Alelo4      |
| <b>Número de alelos diferentes / marcador</b>       |                | <b>9</b>   | <b>6</b>    | <b>10</b>  | <b>4</b>   | <b>5</b>      | <b>6</b>    |

| <b>B. <i>C. parvum</i></b>                      |                | <b>Marcadores con secuencias mini/microsatélites</b> |             |            |            |               |             |
|---|----------------|--|-------------|------------|------------|---------------|-------------|
| <b>Hospedador</b>                               | <b>Muestra</b> | <b>CP47</b>  | <b>GP60</b> | <b>MS5</b> | <b>MS9</b> | <b>MSC6-7</b> | <b>TP14</b> |
| <b>Niños Santander<br/>NS<br/>n = 5</b>         | NS2            | Alelo1   | Alelo1      | Alelo1     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo1      |
|   | NS3            | Alelo2   | Alelo1      | Alelo1     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo2      |
|   | NS4            | Alelo3   | Alelo2      | Alelo1     | Alelo1     | Alelo2        | Alelo1      |
|   | NS5            | Alelo4   | Alelo3      | Alelo1     | Alelo2     | Alelo1        | Alelo3      |
|   | NS7            | Alelo5   | Alelo1      | Alelo2     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo1      |
| <b>Pacientes VIH<br/>Antioquia<br/>VA n = 3</b> | VA2            | Alelo6   | Alelo4      | Alelo3     | Alelo3     | Alelo3        | Alelo4      |
|   | VA3            | Alelo1   | Alelo2      | Alelo4     | Alelo4     | Alelo1        | Alelo1      |
|   | VA5            | Alelo7   | Alelo5      | Alelo4     | Alelo1     | Alelo1        | Alelo5      |
| <b>Número de alelos diferentes / marcador</b>   |                | <b>7</b>   | <b>5</b>    | <b>4</b>   | <b>4</b>   | <b>3</b>      | <b>5</b>    |



Como un abordaje diferente al establecimiento de los alelos de acuerdo con las diferencias en las secuencias nucleotídicas encontradas entre las muestras para cada marcador, se construyó una matriz de distancias o similitudes, usando el programa MEGA versión 7 (<http://www.megasoftware.net/>), para comparar la secuencia nucleotídica de cada marcador por muestra, con la secuencia nucleotídica correspondiente a su especie dentro de los genomas de referencia *C. hominis* TU502-2012 y *C. parvum* Iowa II. Debe tenerse presente para la interpretación de esta información, que la comparación de secuencias que hace esta matriz no arroja datos de variabilidad genética sino de cercanía filogenética, dado que, en la construcción de esta, no se tienen en cuenta los posibles “gaps” que podrían generarse con respecto al número de repeticiones de las secuencias micro o minisatélites en las regiones amplificadas, lo que podría subvalorar los datos de variabilidad (Tabla 12).

Esta comparación por pares evidenció que en las muestras clasificadas como *C. hominis*, los marcadores CP47 y MS5, mostraron distancias génicas en casi todas las muestras, pero con valores bajos, mientras que gp60 mostró distancias génicas sólo en cinco de las 14 muestras (NA6, NA7, NS9, NS10 y VA4), con valores de diferencia entre las secuencias más altos (Tabla 12A). Con respecto a *C. parvum*, se observó que CP47 fue el único marcador que arrojó diferencias entre las muestras y la referencia, y que la muestra VA2, fue la única que presentó distancias genéticas y perfil alélico diferente con todos los marcadores (Tabla 12B). Como ya se mencionó, los marcadores CP47 y MS5 para las 14 muestras *C. hominis* y CP47 para las ocho *C. parvum*, fueron los marcadores que más alelos mostraron en las comparaciones (Tabla 11).

**Tabla 12. Matriz de distancias para cada marcador en cada una de las 22 muestras comparadas con las secuencias del genoma *C. hominis* TU502-2012 y *C. parvum* Iowa II**

| <b>A. Distancias filogenéticas: entre las secuencias de las muestras <i>C. hominis</i> y las secuencias del genoma <i>C. hominis</i> TU502-2012 (IbA10G2 o Alelo1 para gp60)</b> |             |             |            |            |               |             |
|--|-------------|-------------|------------|------------|---------------|-------------|
| <b>Código muestras <i>C. hominis</i></b>   | <b>CP47</b> | <b>gp60</b> | <b>MS5</b> | <b>MS9</b> | <b>MSC6-7</b> | <b>TP14</b> |
| NA2  | 0.007       | 0.000       | 0.054      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NA4  | 0.010       | 0.000       | 0.054      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NA6  | 0.003       | 0.393       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NA7  | 0.007       | 0.404       | 0.016      | 0.000      | 0.005         | 0.036       |
| NA8  | 0.007       | 0.000       | 0.054      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NA9  | 0.013       | 0.000       | 0.017      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NA10   | 0.010       | 0.000       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NS8  | 0.007       | 0.000       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NS9  | 0.017       | 0.394       | 0.046      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NS10   | 0.010       | 0.404       | 0.000      | 0.000      | 0.002         | 0.000       |
| VA1  | 0.007       | 0.000       | 0.007      | 0.003      | 0.000         | 0.000       |
| VA4  | 0.013       | 0.239       | 0.054      | 0.000      | 0.007         | 0.006       |
| VA6  | 0.007       | 0.000       | 0.058      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| VA7  | 0.007       | 0.000       | 0.007      | 0.003      | 0.000         | 0.000       |

Niños Antioquia: NA (2,4,6-10)

Niños Santander: NS (8-10)

Pacientes VIH positivos Antioquia: VA (1,4,6-7)

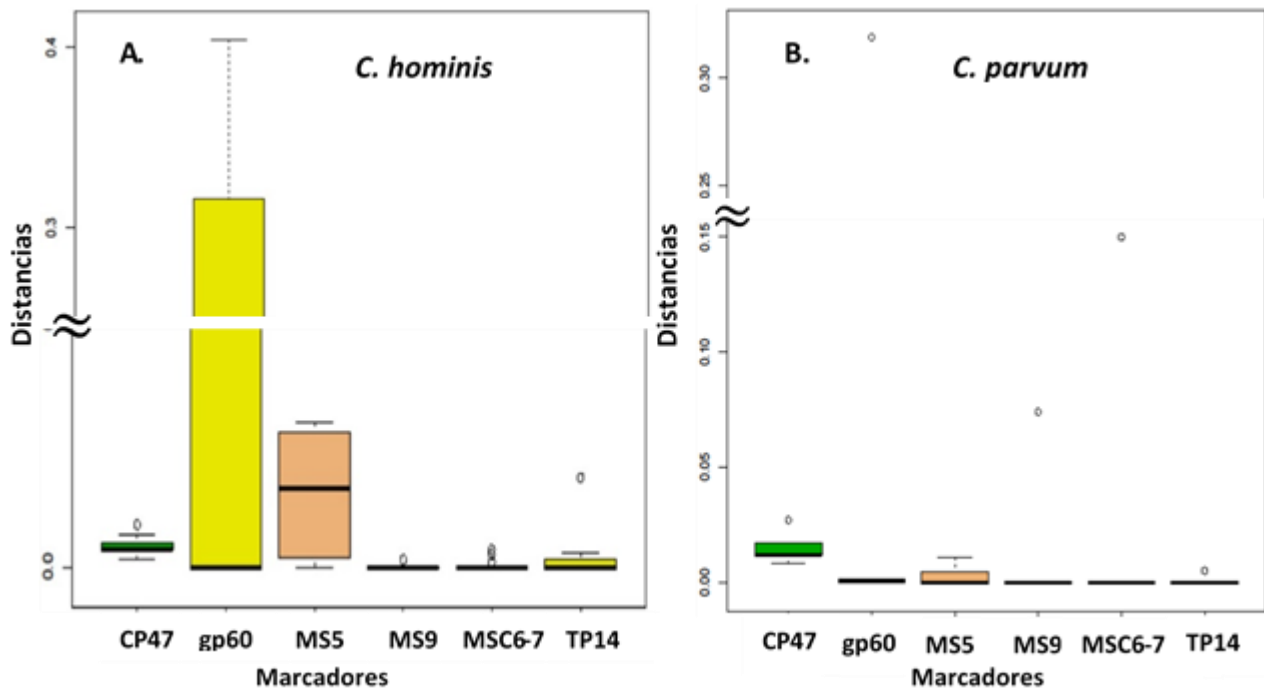
| <b>B. Distancias filogenéticas: entre las secuencias de las muestras <i>C. parvum</i> y las secuencias del genoma <i>C. parvum</i> Iowa II (IIaA15G2R1 o Alelo1 para gp60)</b> |             |             |            |            |               |             |
|--|-------------|-------------|------------|------------|---------------|-------------|
| <b>Código muestras <i>C. parvum</i></b>  | <b>CP47</b> | <b>gp60</b> | <b>MS5</b> | <b>MS9</b> | <b>MSC6-7</b> | <b>TP14</b> |
| NS2  | 0.012       | 0.000       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NS3  | 0.012       | 0.000       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NS4  | 0.017       | 0.001       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NS5  | 0.017       | 0.001       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| NS7  | 0.008       | 0.000       | 0.011      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| VA2  | 0.027       | 0.319       | 0.009      | 0.074      | 0.150         | 0.005       |
| VA3  | 0.012       | 0.001       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |
| VA5  | 0.012       | 0.000       | 0.000      | 0.000      | 0.000         | 0.000       |

Niños Santander NS (2-5, 7)

Pacientes VIH positivos Antioquia: VA (2-3, 5)

Para graficar los datos de la matriz de distancias y evidenciar con mayor facilidad eventos o comportamientos particulares, se realizó un boxplot, para los resultados obtenidos con las especies *C. hominis* y *C. parvum* (Figura 9). En las gráfica correspondiente a las muestras identificadas como *C. hominis*, resalta la barra del marcador gp60, esto por las diferencias en las distancias génicas encontradas para las muestras NA6, NA7, NS9, NS10, y VA4 con respecto a *C. hominis* TU502-2012 (IbA10G2), IbA10G2 o Alelo1 para gp60), tres de estas muestras (NA6, NA7, NS9), como ya se mencionó mostraron alelos diferentes y únicos para los tres marcadores más polimórficos (CP47, gp60 y MS5), lo que concuerda con la identificación de diferentes subgenotipos para estas muestras con base en análisis unilocus convencional con gp60 (Tabla 9, 11A y 12A) (Figura 9A). Resalta también un dato atípico con el marcador TP14, el cual corresponde a la muestra NA7 para la cual se identificó el Alelo3 en este marcador (Tabla 11A) (Figura 9A).

**Figura 9. Boxplot: comparación de distancias génicas de cada marcador para *C. hominis* y *C. parvum***



**Figura 9.** Boxplot que ilustra los resultados de la matriz de distancias, donde se realizaron comparaciones por pares entre las secuencias de los seis marcadores para cada una de las 14 muestras identificadas como *C. hominis*, y las secuencias de los marcadores del genoma de referencia *C. hominis* TU502-2012 (A), y para cada una de las 8 muestras identificadas como *C. parvum* y las secuencias de los marcadores del genoma de referencia *C. parvum* Iowa II (B).

En los análisis de las ocho muestras *C. parvum*, de una manera general se presentaron menores distancias génicas en las comparaciones por pares de los marcadores en cada muestra y las secuencias del genoma de referencia *C. parvum* Iowa II (IIaA15G2R1), inclusive para gp60. En la gráfica, además, resalta notablemente un dato atípico en todos los marcadores que pertenece a la muestra VA2, muestra para la cual se obtuvo un perfil alélico único, donde todos los alelos para cada uno de los marcadores fueron diferentes, y para la cual también se obtuvieron distancias genéticas o diferencias nucleotídicas con todos los marcadores (Tabla 11B y 12B) (Figura 9B).

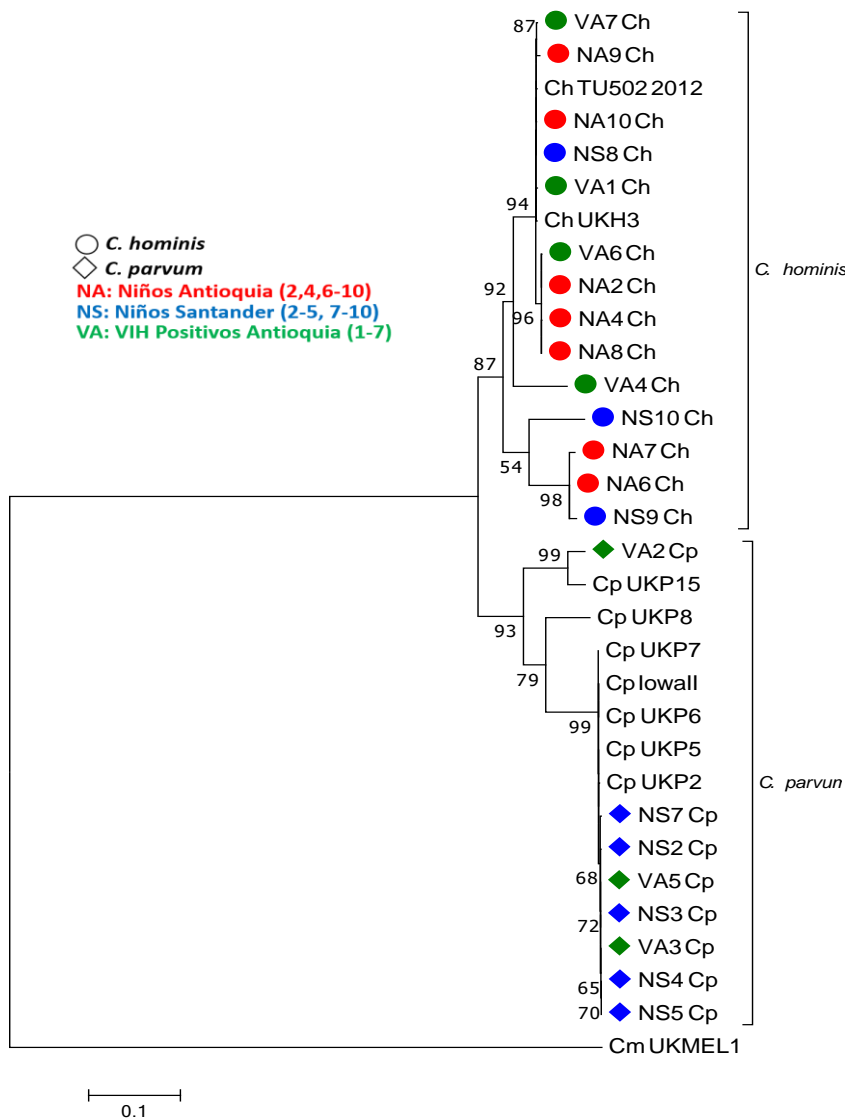
#### **6.2.2.4. Análisis multilocus de secuencia (MLST) con los marcadores CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14**

Para los análisis MLST finales y de interés notable en este trabajo, las secuencias normalizadas de los seis marcadores de cada una de las 22 muestras identificadas como *C. hominis* y *C. parvum*, se concatenaron en una sola secuencia, generando las 22 secuencias consenso (SC) que fueron usados para la construcción de árboles de máxima verosimilitud, identificación de genotipos multilocus de secuencias (MLG), construcción de una red de genotipos MLG, y para realizar algunos análisis descriptivos básicos sobre la diversidad o variabilidad genética encontrada en los parásitos *C. hominis* y *C. parvum* identificados en las muestras de los pacientes colombianos analizados.

Lo primero que se hizo con las 22 SC, fue establecer las relaciones filogenéticas entre los parásitos identificados en las 22 muestras, para lo cual se construyó un árbol de máxima verosimilitud. En el árbol se puede observar que todas las especies identificadas en las muestras se resuelven apropiadamente, generándose dos grupos monofiléticos, uno al que pertenecen las 14 muestras *C. hominis* y otro que agrupa las ocho muestras *C. parvum*, en ambos casos soportados por valores altos del bootstrap para cada clada (Figura 10). Además, se observa la formación de subcladas intra-especies y evidencia de formación de grupos polifiléticos entre estas, como efecto de las variaciones o diferencias nucleotídicas encontradas principalmente en los tres marcadores identificados con comportamiento más

polimórfico (CP47, MS5 y gp60). El árbol no aporta evidencia de comportamientos particulares intra-especie, asociados con procedencia geográfica (Antioquía y Santander), ni con la población clínica (niños y VIH positivos), pero sí inter-especies, como ya se había descrito, toda vez que en los NS se identificaron un mayor número de casos de *C. parvum* comparados con los NA donde se identificó un mayor número de casos de *C. hominis* (Figura 10)

**Figura 10. Análisis filogenético con las secuencias consenso de los seis marcadores para las 22 muestras de pacientes colombianos identificadas como *C. hominis* y *C. parvum***



**Figura 10.** Relaciones filogenéticas entre las Secuencias Consenso de los seis marcadores para cada una de las 14 muestras *C. hominis* y las 8 muestras *C. parvum*. Se usó como control o referencia la SC de los genomas TU502-2012 y UKH3 para *C. hominis*, para *C. parvum* se usaron UKP2, UKP2, UKP5, UKP6, UKP7, UKP15 y Iowa II. El árbol se construyó con el método de máxima verosimilitud en el software Mega v7, el modelo de sustitución Tamura Nei y la distribución gamma para modelar las diferencias de velocidad evolutiva, además el modelo permitió que algunos sitios fueran invariantes. Como outgroup se usó *C. meleagridis* UKMEL1. La fiabilidad del árbol se obtuvo con 10.000 réplicas y el porcentaje de los taxones que se agrupan en el árbol se muestran junto a las ramas (>50%). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Las figuras geométricas hacen referencia a la especie y los colores a las diferentes poblaciones clínicas incluidas en el trabajo.

Las mismas SC usadas para la construcción del árbol de máxima verosimilitud, se usaron para la identificación de los genotipos multilocus de secuencias (MLG). Los dos programas utilizados para las comparaciones de las 22 SC (DNAsp y Network), permitieron la identificación de 13 MLG en las 14 muestras *C. hominis* y 8 MLG en las ocho muestras *C. parvum*. En este análisis sólo dos muestras de niños dentro de las muestras *C. hominis*, presentaron igual MLG (NA2 y NA8), resultado esperado, dado que sólo en estas muestras se observó el mismo perfil alélico en las comparaciones individuales de los marcadores entre muestras. La muestra VA2 mantiene un comportamiento diferente y único con respecto a las demás muestras de la misma especie (Tabla 11, 13 y 14).

**Tabla 13. Genotipos multilocus con base en la secuencia consenso para los parásitos *C. hominis* y *C. parvum* identificados en las muestras de pacientes colombianos**

| A. Genotipo Multilocus/ Subgenotipo gp60 para las muestras <i>C. hominis</i>  |                     |             |                              |
|---|---------------------|-------------|------------------------------|
| Código muestra  | Genotipo Multilocus | Alelos gp60 | Subgenotipo tradicional gp60 |
| NA2   | MLG1                | Alelo1      | IbA10G2                      |
| NA4   | MLG2                | Alelo1      | IbA10G2                      |
| NA6   | MLG3                | Alelo2      | IaA13R6                      |
| NA7   | MLG4                | Alelo3      | IaA13R7                      |
| NA8   | MLG1                | Alelo1      | IbA10G2                      |
| NA9   | MLG5                | Alelo1      | IbA10G2                      |
| NA10  | MLG6                | Alelo1      | IbA10G2                      |
| NS8   | MLG7                | Alelo1      | IbA10G2                      |
| NS9   | MLG8                | Alelo4      | IaA11R3                      |
| NS10  | MLG9                | Alelo5      | IdA10                        |
| VA1   | MLG10               | Alelo1      | IbA10G2                      |
| VA4   | MLG11               | Alelo6      | IeA11G3T3                    |
| VA6   | MLG12               | Alelo1      | IbA10G2                      |
| VA7   | MLG13               | Alelo1      | IbA10G2                      |
| <b>14</b>   | <b>13</b>           | <b>6</b>    | <b>6</b>                     |
| Niños Antioquia: NA (2,4,6-10)<br>Niños Santander: NS (8-10)<br>Pacientes VIH positivos Antioquia: VA (1,4,6-7)<br>Niños Santander: NS (2-5, 7) |                     |             |                              |

| B. Genotipo Multilocus/ Subgenotipo gp60 para las muestras <i>C. parvum</i>                          |                     |             |                              |
|--|---------------------|-------------|------------------------------|
| Código muestra   | Genotipo Multilocus | Alelos gp60 | Subgenotipo Tradicional gp60 |
| NS2  | MLG4*               | Alelo1*     | IlaA20G6R1                   |
| NS3  | MLG5*               | Alelo1*     | IlaA20G6R1                   |
| NS4  | MLG6*               | Alelo2*     | IlaA19G5R1                   |
| NS5  | MLG7*               | Alelo3*     | IlaA18G5R1                   |
| NS7  | MLG8*               | Alelo1*     | IlaA20G6R1                   |
| VA2  | MLG1*               | Alelo4*     | IlcA5G3a                     |
| VA3  | MLG2*               | Alelo2*     | IlaA19G5R1                   |
| VA5  | MLG3*               | Alelo5*     | IlaA17G4R1                   |
| <b>8</b>   | <b>8</b>            | <b>5</b>    | <b>5</b>                     |
| <b>Se marca con asterisco (*) los MLG y los alelos correspondiente a la especie <i>C. parvum</i></b> |                     |             |                              |
| Niños Santander NS (2-5, 7)<br>Pacientes VIH positivos Antioquia: VA (2-3, 5)                        |                     |             |                              |

Las variaciones nucleotídicas que permitieron la designación de los 21 MLG en las 22 muestras objeto de estudio, estuvieron dadas principalmente por las repeticiones en tándem de las secuencias micro/minisatélites, no obstante, se presentaron polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en otras zonas diferentes a las de la región repetitiva, especialmente en los marcadores CP47, gp60 y MS5 (Figura 11). También se observó que las muestras NA4, NS8, VA6 (*C. hominis*) y VA3 (*C. parvum*), tenían diferencia en la SC consenso sólo para uno de los marcadores y la cual fue suficiente para la identificación de un MLG particular (Tabla 11, 13 y 14). Con la construcción de la secuencia consenso fue notoria la visualización de las diferencias que presentaba la muestras VA2 (*C. parvum*) con respecto a las demás SC, VA2 presentó alelos únicos para cada marcador con diferencias no sólo en las repeticiones en tándem de las secuencias micro/minisatélites y la presencia de SNPs, sino que también presentó inserciones y deleciones en diferentes zonas de la secuencia analizada (Figura 11).



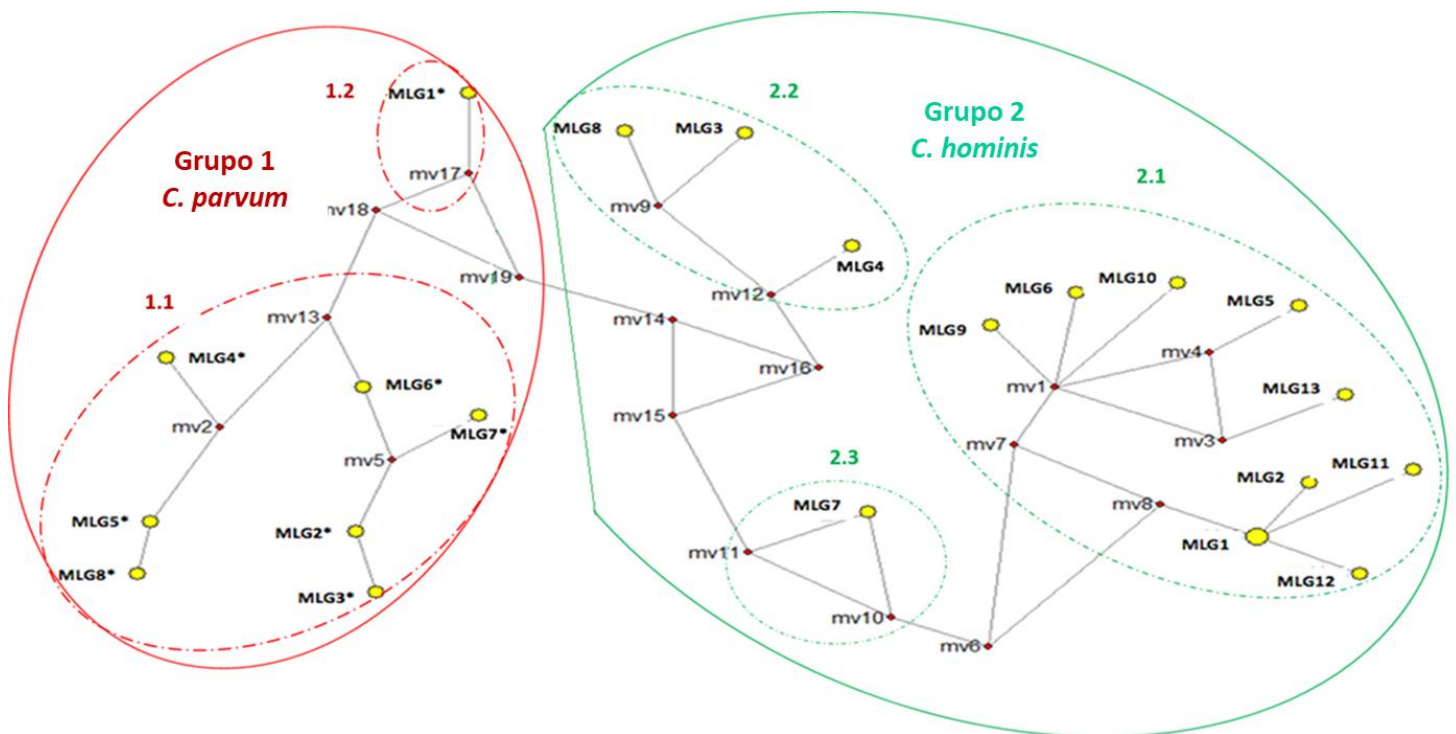


Continuando con la estrategia de análisis MLST, las SC que permitieron la identificación de los MLG en las muestras *C. hominis* y *C. parvum*, también se usaron para construir una red de genotipos multilocus, la cual permitió analizar gráficamente las relaciones evolutivas en forma de árboles multifurcados, representando conexiones entre los genotipos por eventos coalescentes (Figura 12). En la red generada, lo primero que hay que resaltar es la evidente formación de dos grupos identificados con círculos continuos, el de color rojo corresponde al grupo 1 del cual hacen parte todas las muestras *C. parvum* (MLG 1-8\*) y el grupo 2 en color verde, del cual hacen parte todas las muestras *C. hominis* (MLG 1-13). Sin embargo, dentro del grupo 1 (*C. parvum*) también se evidencian dos grupos internos delimitados con círculos rojos discontinuos, uno del cual hacen parte 7 de los 8 MLG\* *C. parvum* (NS2-5, NS7, VA3 y VA5) y el otro alejado hacia la periferia donde se encuentra sólo el MLG1\*, que corresponde a la muestra VA2, la cual desde el inicio de los análisis ha mostrado un comportamiento único. VA2 muestra diferencias nucleotídicas en todos los marcadores con respecto a las demás muestras, ubicándola periféricamente y aislándola de las demás muestras *C. parvum*, pero acercándola al grupo 2 (*C. hominis*) (Figura 10 y 12) (Tabla 11).

En el grupo 2 (*C. hominis*) se presenta una clara separación de las muestras NA6, NA7 y NS9, a las que pertenecen los MLG 3, 4 y 8 respectivamente (Figura 12). Este dato es concordante con que estas tres muestras tuvieron diferencias nucleotídicas únicas en la SC en los tres marcadores que mostraron ser más polimórficos (CP47, gp60 y MS5), evidenciando alelos únicos con estos tres marcadores (Tabla 11). En este grupo 2, también se observa un comportamiento particular del MLG7 que corresponde a la muestra NS8 (Figura 12), que puede ser explicado por presentar una secuencia única para el marcador MS5, donde se evidenció un menor número de repeticiones en tándem de la secuencia minisatélite con respecto a las demás muestras del haplogrupo (Tabla 11). Finalmente, en la distribución de los MLG en el haplogrupo se identifica el MLG1 (NA2 y NA8) como un genotipo multilocus ancestral, por frecuencia y porque de este, claramente se desprenden otros tres MLG (2, 11 y 12), que corresponden a las muestras NA4, VA4 y VA6 respectivamente (Figura 12).

Es importante resaltar que en la red de genotipos multilocus también se pueden observar varios genotipos hipotéticos (median vectors “mv”), generalmente considerados genotipos ancestrales, que no se encuentran en las muestras analizadas y que se requieren para conectar los genotipos existentes dentro de la red (Figura 12).

**Figura 12. Red de Genotipos Multilocus construida con las secuencias consenso de los seis marcadores para las 14 muestras *C. hominis* y las 8 *C. parvum***



**Figura 12.** Red de genotipos multilocus construida con las Secuencias Consenso de CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP1, para las 22 muestras positivas para *Cryptosporidium* provenientes de pacientes colombianos. Se usó el programa Network v. 10.0 y el algoritmo *median-joining*. La gráfica muestra rombos pequeños coloreados de color rojo que representan los genotipos hipotéticos (mv), círculos continuos coloreados de amarillo que representan los diferentes MLG identificados en las poblaciones clínicas de estudios (su tamaño es proporcional a la frecuencia del MLG en la población). Los círculos grandes continuos rojo y verde agrupan los dos haplogrupos principales y los círculos discontinuos agrupan los haplogrupos internos. En la tabla 13, se puede observar la muestra para la cual corresponde cada uno de los genotipos multilocus (MLG).

Finalmente, el “data set” de las SC correspondientes a los MLG identificados, se usó para hacer una aproximación estadística descriptiva y básica de la diversidad genética encontrada en las muestras *C. hominis* y *C. parvum*, calculando el índice de diversidad haplotípica (Hd), de diversidad nucleotídica (Pi), el número de sitios polimórficos o

segregantes (S) y el número promedio de diferencias nucleotídicas (K). También se evaluaron las diferencias poblacionales por pares, mediante el cálculo del índice de fijación génica ( $F_{st}$ ). Los análisis se realizaron para cada especie (*C. hominis* o *C. parvum*) y dentro de cada especie se compararon las dos poblaciones clínicas (niños y pacientes VIH positivos), además, se hicieron comparaciones de los datos estadísticos cuando se usó la SC de los seis marcadores incluidos en los análisis MLST y de la SC excluyendo el marcador gp60 de la misma (Tabla 14).

El primer dato analizado fue el de diversidad haplotípica ( $H_d$ ), en las 14 muestras *C. hominis*, para las cuales se obtuvo un valor de 0,99 +/- 0,03, dato que perfectamente se asocia con la cantidad de MLG encontrados en las muestras *C. hominis* (13 MLG / 14 *C. hominis*) y para *C. parvum* la  $H_d$  fue 1,0 +/- 0,06. (8 MLG / 8 muestras *C. parvum*). Sin embargo, se encontró un dato de  $P_i$  mayor entre las muestras *C. hominis* que entre las muestras *C. parvum*,  $P_i$ : 0,09 y 0,06 respectivamente, indicando mayor diversidad en las muestras *C. hominis*; igualmente, se identificó mayor número de sitios segregantes y mayor cantidad de diferencias nucleotídicas comparado con las muestras *C. parvum* (Tabla 14).

En las comparaciones intra-especie por poblaciones clínicas se encontró que en las 14 muestras *C. hominis*, los tres NS presentaron un mayor valor  $P_i$ , S y K, comparado con los seis NA y los cuatro VA (Tabla 14A). Pero en las comparaciones por población en *C. parvum*, se observó mayor variabilidad en las muestras VA que en las muestras NS con notable diferencia probablemente, debido a la variabilidad observada en la muestra VA2, la cual repetidas veces se ha mencionado presentó un perfil MLST con diferencias únicas en todos los marcadores (Tabla 14B). Tanto para las muestras *C. hominis* como para las *C. parvum* cuando se realizaron los análisis excluyendo a gp60 de la SC, se mantuvo el número de genotipos multilocus y la  $H_d$ , pero disminuyeron los valores de  $P_i$ , S y K, manteniéndose las proporciones entre las poblaciones clínicas (NS, NA, VA) (Tabla 14).

**Tabla 14. Índices de variabilidad genética intra-especies e intra-poblaciones clínicas**

| <b>A. Muestras <i>C. hominis</i>: Índices de variabilidad génica con base en la Secuencia Consenso de los seis marcadores usados para los MLST</b> |                 |                |               |          |                   |
|--|-----------------|----------------|---------------|----------|-------------------|
|  | <b># de MLG</b> | <b>Hd</b>      | <b>Pi</b>     | <b>S</b> | <b>K</b>          |
| <b>Total de muestras <i>C. hominis</i> (14)</b>  | 13              | 0,99 +/- 0,03  | 0,09 +/- 0,05 | 715      | 220,77 +/- 100,63 |
| <b>NA (7)</b>  | 6               | 0,95 +/- 0,096 | 0,08 +/- 0,05 | 459      | 201,81 +/- 98,78  |
| <b>NS (3)</b>  | 3               | 1,0 +/- 0,27   | 0,15 +/- 0,11 | 520      | 361,67 +/- 216,5  |
| <b>VA (4)</b>  | 4               | 1,0 +/- 0,18   | 0,07 +/- 0,04 | 292      | 154,17 +/- 84,6   |
| <b>Índices de variabilidad génica con base en la Secuencia Consenso de los marcadores usados para los MLST excluyendo a gp60</b>                   |                 |                |               |          |                   |
| <b>Total de muestras <i>C. hominis</i> (14)</b>  | 13              | 0,99 +/- 0,03  | 0,05 +/- 0,02 | 296      | 76,1 +/- 34,9     |
| <b>NA (7)</b>  | 6               | 0,95 +/- 0,09  | 0,04 +/- 0,03 | 183      | 70,7 +/- 34,8     |
| <b>NS (3)</b>  | 3               | 1,0 +/- 0,3    | 0,07 +/- 0,05 | 158      | 105,67 +/- 63,5   |
| <b>VA (4)</b>  | 4               | 1,0 +/- 0,18   | 0,04 +/- 0,03 | 115      | 65,67 +/- 36,24   |

| <b>B. Muestras <i>C. parvum</i>: Índices de variabilidad génica con base en la Secuencia Consenso de los seis marcadores usados para los MLST</b> |                 |              |                 |          |                  |
|---|-----------------|--------------|-----------------|----------|------------------|
|   | <b># de MLG</b> | <b>Hd</b>    | <b>Pi</b>       | <b>S</b> | <b>K</b>         |
| <b>Total de muestras <i>C. parvum</i> (8)</b>   | 8               | 1,0 +/- 0,06 | 0,06 +/- 0,03   | 479      | 128,36 +/- 61,8  |
| <b>NS (5)</b>   | 5               | 1,0 +/- 0,13 | 0,005 +/- 0,003 | 23       | 10,8 +/- 5,9     |
| <b>VA (3)</b>   | 3               | 1,0 +/- 0,27 | 0,13 +/- 0,09   | 467      | 311,33 +/- 186,4 |
| <b>Índices de variabilidad génica con base en la Secuencia Consenso de los marcadores usados para los MLST excluyendo a gp60</b>                  |                 |              |                 |          |                  |
| <b>Total de muestras <i>C. parvum</i> (8)</b>   | 8               | 1,0 +/- 0,06 | 0,04 +/- 0,02   | 261      | 70,07 +/- 33,9   |
| <b>NS (5)</b>   | 5               | 1,0 +/- 0,13 | 0,003 +/- 0,002 | 22       | 9,2 +/- 5,1      |
| <b>VA (3)</b>   | 3               | 1,0 +/- 0,27 | 0,1 +/- 0,07    | 246      | 164,0 +/- 98,3   |

Cuando se usó el índice de fijación génica ( $F_{st}$ ), para las comparaciones por pares entre las poblaciones clínicas (niños y pacientes VIH positivos), se observó al interior de las muestras *C. hominis* que los índices  $F_{st}$  fueron bajos y sin significancia estadística, sugiriendo que las poblaciones en comparación están relacionadas, es decir, con cercanía evolutiva o con ancestros comunes recientes, las dos poblaciones muestran muy poca diferenciación genética con poca diversidad compartida. Por su parte, las comparaciones entre las

poblaciones NS y VA en *C. parvum* mostraron diferenciación génica en la comparación pareada ( $F_{st}$ : 0,23;  $p = 0,018$ ) como evidencia de una menor cercanía evolutiva. La comparación de estas dos poblaciones también mostró la mayor divergencia de secuencias, la cual pareciera estar determinada por la muestra VA2 principalmente. Cuando se determinó este estimativo para ambas especies excluyendo a gp60 de la SC, se obtuvieron resultados similares a los observados cuando gp60 está en la SC y los datos no cambian la interpretación anterior (Tabla 15).

**Tabla 15. Índice de fijación génica ( $F_{st}$ ) intra-especies e inter-poblaciones clínicas**  
\* Significativo ( $p \leq 0.05$ )

| <b>A. Muestras <i>C. hominis</i></b>  |                                      |                                       |               | <b>B. Muestras <i>C. parvum</i></b>   |   |               |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------|---|---|---------------|
| <b><math>F_{st}</math> con la Secuencias Consenso de los seis marcadores usados para los MLST</b> |                                      |                                       |               | <b><math>F_{st}</math> con la Secuencias Consenso de los seis marcadores usados para los MLST</b> |   |               |
| <b>Poblaciones clínicas</b>   | <b>NA (7)</b>                        | <b>NS (3)</b>                         | <b>VA (4)</b> | <b>Poblaciones clínicas</b>   | <b>NS (5)</b>                           | <b>VA (3)</b> |
| <b>NA (7)</b>   | -                                    |                                       |               | <b>NS (5)</b>   | -                                       |               |
| <b>NS (3)</b>   | 0                                    | -                                     |               | <b>VA (3)</b>   | 0,23<br><i><math>p = 0,018^*</math></i> | -             |
| <b>VA (4)</b>   | 0                                    | 0,104<br><i><math>p = 0,12</math></i> | -             | <b><math>F_{st}</math> <i>C. parvum</i> Secuencia Conceso MLST excluyendo a gp60</b>              |   |               |
| <b><math>F_{st}</math> <i>C. hominis</i> Secuencia Conceso MLST excluyendo a gp60</b>             |                                      |                                       |               | <b>Poblaciones clínicas</b>   | <b>NS (5)</b>                           | <b>VA (3)</b> |
| <b>Poblaciones clínicas</b>   | <b>NA (7)</b>                        | <b>NS (3)</b>                         | <b>VA (4)</b> | <b>NS (5)</b>   | -                                       |               |
| <b>NA (7)</b>   | -                                    |                                       |               | <b>VA (3)</b>   | 0,24<br><i><math>p = 0,01^*</math></i>  | -             |
| <b>NS (3)</b>   | 0,04<br><i><math>p = 0,3</math></i>  | -                                     |               |   |   |               |
| <b>VA (4)</b>   | 0,05<br><i><math>p = 0,54</math></i> | 0,04<br><i><math>p = 0,2</math></i>   | -             |   |   |               |

## 7. DISCUSIÓN

La situación actual de las enfermedades infecciosas humanas, relacionada con la aparición de nuevos agentes infecciosos, saltos de patógenos de hospedadores animales a los humanos asociados con eventos antropogénicos, y un sin número de enfermedades reemergentes que se pensaban controladas, a pesar de la disposición de vacunas y tratamientos farmacológicos, sin mencionar la fármaco-resistencia o la no disponibilidad de medicamentos efectivos; ponen de manifiesto cambios en los conceptos de la epidemiología de las enfermedades infecciosas, que cada vez considera más importante dar respuesta a preguntas biológicas relacionadas con la forma en la que se expanden las poblaciones de microorganismos en la naturaleza y la naturaleza misma de las variaciones genéticas que llevan a la aparición de nuevos patógenos y que necesariamente modulan las relaciones que estos establecen con sus hospedadores (246,275,276).

La variabilidad genética da cuenta de las diferencias o variaciones en el material genético entre individuos o entres poblaciones y se relaciona directamente con la evolución; cuantos más alelos existan para un gen, más probabilidad hay de que uno de ellos se imponga o se fije, lo que implica que cuanto más variabilidad genética exista en una población, mayor será el ritmo de la evolución. Los cambios en la composición genética de las poblaciones se asocian con distintos procesos genéticos como mutaciones, recombinación, migración, deriva génica y selección natural y para explicar de forma sencilla la estructura poblacional y la evolución de las poblaciones, los estudios de genética de poblaciones establecen los modelos extremos de clonalidad y panmixia (Figura 4) (246–249).

En el contexto anterior, para las enfermedades producidas por parásitos de transmisión tanto zoonótica como antroponótica, como lo es *Cryptosporidium* spp., cada vez se hace más necesaria la caracterización molecular de las especies y/o genotipos, no sólo como una estrategia diagnóstica mucho más sensible y específica, sino para el establecimiento o levantamiento de datos epidemiológicos, que permitan dilucidar las rutas

de transmisión y con estas las posibles fuentes de infección en determinada región geográfica. El uso de herramientas con mayor poder de detección, resolución taxonómica y genotipificación, además, de la implementación y continuo avance de las estrategias que permiten obtener información genómica de *Cryptosporidium*, han permitido detectar e interpretar eventos evolutivos particulares, establecer la presencia de infecciones por varias especies y/o genotipos en un mismo hospedador, relacionar variantes genéticas con patogénesis, y entre otros aspectos incriminar determinados genotipos parasitarios con eventos epidemiológicos de brotes o epidemias, sin contar con todos los avances en descubrir *per se* quién es “*Cryptosporidium*” (44,191,242,277).

En el presente trabajo se muestran los resultados que describen la genotipificación y variabilidad genética de parásitos del género *Cryptosporidium*, identificados en muestras de pacientes colombianos categorizados en las dos poblaciones clínicas en las que se reporta mayor frecuencia y gravedad de las infecciones causadas por este parásito, niños y pacientes infectados con el VIH. La variabilidad se abordó usando la estrategia de análisis multilocus, toda vez que es considerada la más adecuada para los análisis de variabilidad genética en estudios poblacionales.

En la etapa de clasificación taxonómica, se identificaron cinco especies de *Cryptosporidium* circulando en niños de Antioquia (NA), niños de Santander (NS) y pacientes VIH positivos de Antioquia (VA): *C. hominis* 16/28, *C. parvum* 8/28, *C. felis* 2/28, *C. meleagridis* 1/28 y *C. suis* 1/28. Resaltamos la notoria diferencia entre NA y NS con respecto a la frecuencia de las especies, en los NA el 90% de los casos fue por *C. hominis* y no se presentó ningún caso de *C. parvum*, pero en los NS *C. parvum* fue la especie más frecuente. Importante también que en las tres poblaciones NA, NS y VA, se identificó en al menos un paciente, una especie asociada con transmisión zoonótica diferente a *C. parvum* (Tabla 8).

Los datos de multiplicidad de especies encontrados en nuestro trabajo también se han reportado en otros trabajos colombianos tanto en humanos como en animales o

fuentes hídricas. En humanos por ejemplo el estudio realizado por Higuera y col. en 2020 reportó 7 especies de *Cryptosporidium*: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. muris*, *C. ubiquitum* y *C. felis*; en el trabajo realizado por Sánchez y col. en 2017, identificaron además de *C. hominis* y *C. parvum* a *C. viatorum* (único reporte para Colombia). En fuentes hídricas el trabajo realizado por Sánchez y col. en 2018 reportó la identificación de *C. parvum*, *C. galli*, *C. molnari*, *Cryptosporidium* genotipo II de murciélagos y *Cryptosporidium* genotipo VIII de aves. Otros estudios reportados en aguas además han informado la presencia de *C. hominis*. En animales, aunque en estudios independientes, se han reportado infecciones por *C. parvum*, *C. felis* y *C. muris* (161,172,176,180,185,187,278).

En este trabajo de acuerdo con nuestro conocimiento, se hace el primer reporte para Colombia de dos especies de transmisión zoonótica, *C. meleagridis* (infectando un niño de Antioquia) (262), especie más prevalente en ganado vacuno de China, pero que también infecta aves y humanos en países en vía de desarrollo particularmente pacientes VIH positivos y niños (44,270), y *C. suis* (infectando un niño de Santander), especie para la que hay muy pocos reportes en el ámbito mundial (44).

El hecho epidemiológico de encontrar en este trabajo cinco especies de *Cryptosporidium* en una población de 28 pacientes, refleja diferentes rutas de transmisión para la población colombiana estudiada, con posibilidad de transmisión antroponótica preferencialmente para *C. hominis* y zoonótica para las otras especies. La diversidad de especies de *Cryptosporidium* reportada en humanos de muchos departamentos de Colombia, animales y fuentes hídricas, son fuerte evidencia de condiciones eco-epidemiológicas, asociadas con el mecanismo de infección oro-fecal y la facilidad de dispersión del parásito en la naturaleza, que favorecen su transmisión asociada con malos hábitos higiénicos y sanitarios, inadecuada eliminación de excretas, y contaminación de aguas de consumo humano y animal.



No existen en Colombia un estudio que permita relacionar con evidencia científica las rutas de transmisión ni fuentes de infección de los hospedadores humanos ni animales y a pesar de que la transmisión parece ser constante, con reportes de detección del parásito en muestras de materia fecal de humanos desde 1980 hasta la época, no se ha reportado para Colombia ningún brote epidémico de criptosporidiosis humana ni animal asociado con fuentes hídricas. No se conocen tampoco para Colombia, estudios de otros animales que puedan servir de fuentes de infección como moluscos bivalvos filtradores, como si ha sido reportado en otros países, ni tampoco se reportan trabajos con hallazgos de *Cryptosporidium* spp. en biopelículas (115,162,279).

Dado el uso tradicional, mundial y referente del marcador gp60 para la tipificación de diferentes especies de *Cryptosporidium* especialmente en estudios epidemiológicos, y sobre todo, dado que es un marcador muy bien caracterizado con un alto nivel de variación genética que permitiría las comparaciones entre los análisis unilocus y los multilocus, en el presente trabajo se usó este marcador para la identificación inicial de los subgenotipo intra-especies para *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*.

Dentro de las muestras *C. hominis* (16/28), se identificaron seis subgenotipos distribuidos en cuatro familias alélicas, (**la**, **lb**, **ld**, **le**), todos asociados preferencialmente con una transmisión antroponótica; el subgenotipo más frecuente fue el **lbA10G2** con el 68.75% (11/16) de los casos, lo que está de acuerdo con los reportes en el ámbito mundial. Este subgenotipo se ha encontrado asociado tanto con casos esporádicos como con brotes donde se asume una fuente de infección hídrica, y aunque se ha detectado en infecciones animales, parece ser menos virulento en estos hospedadores. Se resalta que el subgenotipo **ldA10** identificado en el NS10, también se ha reportado en población infantil de otros países y que el **leA11G3T3** identificado en un paciente VA parece sólo presentarse en países en desarrollo (18,217,244,280–282). Además, que los subgenotipos **laA13R6** y **laA11R3** identificados en NA6 y NS9 respectivamente, de acuerdo con nuestro conocimiento, no han sido reportados previamente en la literatura científica (Tabla 9).

Para *C. parvum*, 7 de las 8 muestras se identificaron dentro de la misma familia alélica **Ila**, con cuatro subgenotipos diferentes dentro de esta, identificándose nuestro trabajo por primera vez, de acuerdo con la revisión de la literatura científica, el subgenotipo **IlaA19G5R1**. Esta familia alélica es la más frecuentemente reportada en ganado vacuno, pero con reportes también en humanos, con una expansión poblacional panmítica que da cuenta de la variabilidad dentro de esta. La muestra VA2 *C. parvum*, se identificó con el subgenotipo **IlaA5G3a**, el cual está asociado con una transmisión antroponótica, hecho biológico importante toda vez que los parásitos de la especie *C. parvum*, se asocian preferencial pero no exclusivamente con una transmisión zoonótica, donde el hospedador primario es el ganado vacuno (Tabla 9). Esta reportado que *C. parvum* familia alélica **Ila** “antroponótica” presenta pocas variantes internas y predomina principalmente en países de bajos ingresos con saneamiento deficiente y en personas VIH positivas (18,277,283).

Para iniciar los análisis multilocus basados en las diferencias nucleotídicas, MLST, dado que aún no existe un protocolo para los análisis “MLST- *Cryptosporidium*”, en el presente trabajo decidimos implementar una estrategia de identificación y validación de los marcadores con secuencias micro y minisatélites seleccionados con base en los criterios descritos en la metodología, utilizando la información de los genomas depositados en bases de datos públicas, antes de proceder al análisis de las muestras objeto de estudio. Este abordaje permitió la identificación de las secuencias nucleotídicas de los siete marcadores (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14), en cinco genomas depositados en la base de datos CryptoDB y 10 genomas de la base de datos SRA del NCBI (Tabla 4 y 10).

Se construyeron las secuencias consenso (SC) de los siete marcadores para los 15 genomas dentro de los cuales están secuencias, no sólo de *C. hominis* (4), *C. parvum* (9), sino también de *C. meleagridis* (1) y *C. tyzzeri* (1); lo que consideramos importante dado que los marcadores usados en este trabajo podrían ser tenidos en cuenta para análisis MLST de estas especies con transmisión zoonótica en humanos. Las 15 SC obtenidas se usaron para construir un árbol filogenético en el que se observó una mejor discriminación y agrupamiento de las especies a las que correspondían los 15 genomas, especialmente para

*C. hominis* y *C. parvum* (Figura 7), lo que no se logra con el marcador 18S rRNA solo. El marcador 18S rRNA rutinariamente usado para la identificación de género y especie, generalmente no puede discriminar con un soporte adecuado o suficiente, parásitos de las especies *C. hominis* y *C. parvum* (Figura 5); lo que tiene una explicación enmarcada en el alto porcentaje de identidad de secuencias de estas dos especies de *Cryptosporidium* (entre el 95 y 97%), siendo muy claro e importante, como el análisis de múltiples locus favorecen la adecuada identificación de estas dos especies (33,191,284).

A pesar de que los genomas UKH5 y TU502 cumplieron con los parámetros iniciales para ser incluidos en el análisis, se excluyeron porque para *C. hominis* UKH5 no se logró la anotación completa de algunos genes con problemas especialmente en las zonas de los micro o minisatélites, probablemente por errores de secuenciación que generaban fragmentaciones en las lecturas de estas zonas (285) y el genoma *C. hominis* TU502 porque presentó notorias diferencias con el genoma *C. hominis* TU502-2012, los cuales inclusive fueron clasificados en dos familias alélicas diferentes, TU502 dentro de la familia alélica **Ia** y a TU502-2012 dentro de la familia alélica **Ib** (32,232).

En la búsqueda de las secuencias parciales de referencia de los siete marcadores, usadas como “query” en los BLAST para los genomas de la base de datos CryptoDB, se identificó que sólo se encontraban publicadas secuencias para los siete marcadores proveniente de parásitos *C. parvum*, para ninguna de las otras especies se encontraron publicaciones de secuencia para todos los marcadores. Por ejemplo, no se encontraron secuencias de referencia para el marcador MS9 obtenidos de parásitos *C. hominis*, por tanto, el presente trabajo sería el primero en reportar secuencias de MS9 para *C. hominis* y el primero que usa MS9 en análisis MLST para esta especie (Tabla material suplementario).

Como información adicional encontramos que el gen gp60 tiene un tamaño de 1000pb y que se amplifica el 80% de este en el fragmento usado para los análisis, diferente a lo que pasa con el resto de los genes utilizados, para los cuales se amplifica sólo entre el 4.1% y el 26.7 % de la secuencia completa del gen, excepto para MSC6-7 que por su tamaño

(579pb) se amplifica el 97% del gen. Amplificar el 80 % de gp60, podría tener una explicación basada no sólo en su tamaño, sino en que gp60 se puedan encontrar más sitios variables y parsimoniosamente informativos distribuidos en toda la secuencia del gen, comparado con todos los demás marcadores donde los polimorfismos pueden estar en sitios más puntuales, con base en lo cual se selecciona la región a amplificar (189,194).

La efectividad en la amplificación de los marcadores seleccionados para los análisis MLST, estuvo precedida de adaptaciones de datos reportados previamente, a las condiciones de nuestras muestras y nuestro laboratorio, las cuales exitosamente permitieron la amplificación de seis (CP47, gp60, MS5, MSC6-7, MS9 y TP14) de los siete marcadores, excepto ML2, en 14 muestras *C. hominis* y 8 *C. parvum* (Tabla 6), favorablemente además, de las 22 muestras se obtuvieron datos de secuencias con una alta calidad, que permitieron su análisis confiable.

El marcador ML2, excluido por su bajo porcentaje de amplificación (Tabla 6), es un marcador frecuentemente utilizado en trabajos con *C. parvum* identificado en muestras de ganado vacuno, y análisis de diferencias de tamaño en fragmentos amplificados (MLFT). Este marcador de los siete analizados es el que tiene una región de amplificación más pequeña (175pb), lo que corresponde aproximadamente al 9.7% del gen completo. En nuestro trabajo sólo se logró amplificar a ML2 en 3 de las 14 muestras *C. hominis* y 6 de las 8 *C. parvum*, lo que estaría de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde parece haber una mayor eficacia en la amplificación de este marcador en la especie *C. parvum* comparada con las *C. hominis*. A pesar de que se tienen las secuencias de este marcador, se excluyó de los análisis MLST dado que nuestro criterio de elegibilidad para cada marcador era que tuviese amplificación con el 100% de las muestras (225).

En los análisis filogenéticos individuales de los marcadores, no sólo se obtuvo concordancia con los resultados de 18S rRNA con respecto a las especies de los parásitos encontrados en todas las muestras, si no que adicionalmente todos los marcadores lograron agrupar y separar mucho mejor a los parásitos de las especies *C. hominis* y *C. parvum*; sin

embargo, gp60 tuvo un comportamiento diferente para *C. hominis* dado que agrupó las muestras NA6, NA7 y NS9 (familia alélica gp60 **Ia**) en una misma clada y las separó de las demás muestras *C. hominis*, la mayoría de las cuales son de la familia alélica **Ib** (Figura 6). El árbol de gp60 también separó en una clada las muestras VA4 *C. hominis* (gp60: Alelo6, familia alélica **Ie**) y VA2 *C. parvum* (gp60: Alelo4, familia alélica **Iic**), cercana a la mayoría de las muestras *C. hominis*; sin embargo, con los demás marcadores estas muestras se ubicaron en cladas independientes y bien separadas por especie (Tabla 9 y 11) (Figura 6, 8 y 10). Este comportamiento filogenético de gp60 separando los subgenotipos de las familias alélicas **Ia** y **Ib** está ampliamente reportado para este marcador, y parece tener un sustento evolutivo donde probablemente estos subgenotipos segregan incluso mucho antes que las especies de *Cryptosporidium* (194,277).

Los análisis para hallar los perfiles alélicos por muestra y por marcador, mostraron que había diferencias nucleotídicas en todos los marcadores entre las muestras analizadas, mostrando una variedad de perfiles alélicos por muestra (Tabla 11). Estos resultados muestran seis alelos diferentes para gp60 en las 14 muestras *C. hominis*, entre los cuales el alelo 1 (que corresponde a los subgenotipos **IbA10G2**), fue el más común encontrándose en nueve de las 14 muestras; sin embargo, cuando se analizaron los otros cinco marcadores en estas mismas nueve muestras, se encontró diversidad de alelos en todas ellas, ampliando obviamente el perfil de variabilidad alélica. El mismo comportamiento se observó en los análisis para *C. parvum* y las muestras que presentaron el alelo1 (**IlaA20G6R1**) y el alelo2 (**IlaA19G5R1**) para gp60. Este estudio, además de ser el primero realizado en muestras de pacientes colombianos, apoya lo ya reportado por otros autores sobre el aumento en la detección de variabilidad génica con los análisis de múltiples loci, inclusive a lo observado con gp60 (190).

Para *C. hominis* los marcadores con mayor número de polimorfismos de secuencia entre las muestras, fueron CP47 y MS5 y para *C. parvum* también fue CP47, para ambas especies el polimorfismo con estos marcadores fue incluso mayor a lo observado con gp60, y en los análisis filogenéticos individuales el marcador CP47 fue el que mayor número de

subcladas intra-especies presentó (Tabla 11) (Figura 8). Nuestros hallazgos están de acuerdo con lo encontrado por otros estudios realizados en humanos y vacunos para *C. hominis* y *C. parvum* que muestran a CP47 con un comportamiento polimórfico (207,212,216,217,219), sin embargo, en el trabajo realizado por Gatei y col. en 2008, contrario a lo observado en este y otros trabajos con muestras humanas, encontraron un comportamiento monomórfico para CP47 en parásitos identificados en pacientes VIH positivos (214). En especies como *C. meleagridis* de humanos y aves, también se ha observado un comportamiento polimórfico, pero para *C. cuniculus* de conejos se ha observado un comportamiento monomórfico en este marcador (223,228). Por otro lado, para MS5 en humanos, así como lo observado en este trabajo, se reporta un comportamiento polimórfico, pero en vacunos se ha observado tanto un comportamiento monomórfico como polimórfico (209,211,225,253).

Esta descrito que el marcador CP47 puede presentar mutaciones escalonadas en las secuencias de trinucleótidos del microsatélite, diferencias en la repetición en tándem del microsatélite y además diferencias nucleotídicas fuera de la región del microsatélite (207). De acuerdo con la literatura y en concordancia con nuestros resultados, CP47 ofrece una buena alternativa para tipificar a *C. hominis* y *C. parvum* y además parece que a diferencia de gp60, CP47 tiene alta resolución tanto para la tipificación basada en polimorfismo de longitud como en MLST (207,210,219).

Cuando se analizaron los alelos de los seis marcadores en cada muestra por población clínica o zona geográfica no se encontró una distribución relacionada con estas variables, pero si se encontraron alelos únicos por población clínica. Para las muestras *C. hominis* NA2 y NA8 se encontró el mismo perfil alélico con todos los marcadores, sin embargo, no se halló ninguna relación con los síntomas que presentaron los niños de los que procedían las muestras, el niño NA2 no presentaba síntomas gastrointestinales mientras que el niño NA8 presentaba diarrea y no se evidenció ningún tipo de asociación de convivencia dado que los niños fueron captados para el estudio en años diferentes (Tabla 11). Para *C. parvum* se encontró que la muestra VA2 presentó un perfil alélico

completamente diferente a todas las demás muestras y que ninguna de las muestras presentó un perfil alélico igual. Todos estos datos en conjunto son difíciles de comparar con otros resultados dado que no hay otro estudio que use exactamente los mismos marcadores ni tampoco los mismos análisis basados en diferencias de secuencia, sin embargo, los datos como tal son evidencia clara de variabilidad en las especies de parásitos de *Cryptosporidium* identificadas en este trabajo, lo que está de acuerdo en un contexto amplio con lo reportado por otros autores (18).

Aunque los análisis de distancias realizados para las comparaciones por pares entre las secuencias de cada marcador por muestra y las secuencias de genoma de referencia TU502-2012 (**IbA10G2**) para *C. hominis* y Iowa II (**IlaA15G2R1**) para *C. parvum*, no arrojan datos de variabilidad génica si no de distancias génicas y relaciones filogenéticas, estos análisis nos permitieron observar que los marcadores CP47 y MS5 que presentaron mayor número de alelos entre las muestras, fueron los únicos que mostraron distancias génicas en casi todas las muestras comparadas con la referencia, pero con valores bajos, mientras que gp60 mostró distancias génicas solo en cinco de las 14 muestras (NA6, NA7, NS9, NS10 y VA4), pero con valores de diferencia entre las secuencias más altos, lo que está relacionado con que estas muestras tenían un subgenotipo diferente para este marcador con respecto al del genoma usado de referencia, y fue de cero en aquellas muestras en las que el alelo fue el mismo 9/14 (**IbA10G2**). Las muestras NA6, NA7 y NS9 mostraron perfiles alélico único con los tres marcadores más polimórficos encontrados en este trabajo (CP47, gp60, MS5). Con respecto a *C. parvum*, se observó un menor número de muestras que presentaban distancias génicas entre las secuencias de las muestras y el genoma de referencia, debido a que la mayoría de las muestras pertenecían a la misma familia alélica a la que pertenece el genoma de referencia (**Ila**), y claramente la muestras VA2 de *C. parvum*, que pertenecía a una familia alélica diferente (**Ilc**) a la del genoma de referencia, fue la única que mostró distancia génicas y además, diferentes alelos con todos los marcadores incluido gp60 (Tabla 11 y 12) (Figura 9).

Un dato adicional encontrado con la matriz de distancias y la gráfica boxplot, fue el comportamiento atípico del marcador TP14 en la muestra NA7. Esta muestra presentó un alelo único para este marcador (Alelo3), en el cual se observaron diferencias no sólo de las repeticiones de la región del microsatélite (CAA), sino también, varias diferencias de un sólo nucleótido (SNPs), en zonas diferentes de toda la región amplificada, lo cual no ocurrió en ninguna de las otras muestras de *C. hominis*, lo que se evidencia en el boxplot, como un comportamiento inusual o particular para esta muestra. La secuencia correspondiente a este Alelo3 de TP14, también fue evidenciada en niños de Zaragoza-España por Ramo y col. en 2015 (225); es probable que este hallazgo se asocie con frecuencia de presentación en niños. La secuencia de Ramo y col. está depositada en el GenBank con número de acceso KM222508.1 y la nuestra con el número de acceso MT240802 (Tabla material suplementario) (Tabla 11 y 12) (Figura 9).

Luego de los análisis individuales se construyeron la secuencias concatenadas o consenso (SC) de los seis marcadores para cada muestra (22 SC), con las que se identificaron 21 genotipos multilocus de secuencia (MLG) y se construyó un árbol de máxima verosimilitud para establecer las relaciones filogenéticas entre ellas. En el árbol se resalta además de la formación de dos soportados grupos monofiléticos (*C. hominis* y *C. parvum*) que las muestras NA6 (MLG 3), NA7 (MLG3) y NS9 (MLG8) tipificadas dentro de la familia alélica “**la**,” (Alelos 2, 3 y 4 respectivamente con base en gp60), se ubicaron dentro del grupo monofilético de *C. hominis* pero en un clada independiente, y que la muestra VA2 de *C. parvum* también se ubicó en una clada independiente y alejada de la clada principal que agrupa a todas las otras muestras *C. parvum*. Además, se observó que la muestra VA4 - MLG11 (Alelo6, familia alélica “**le**”), y NS10 -MLG9 (alelo5, familia alélica “**ld**”), en este árbol de SC y en los árboles individuales estuvieron cercanas a los parásitos *C. hominis* identificados dentro de la familia alélicas “**lb**” (Figura 8 y 10) (Tabla 13).

Como era esperado con base en resultados previos, los perfiles MLG observados en este trabajo, son muchos más en número a los observados con análisis unilocus con base en gp60, 13 MLG para las 14 muestras *C. hominis* comparado con 6 identificados con base



en gp60 y 8 MLG para las muestras *C. parvum*, comparado con 5 alelos para gp60; sin embargo, las diferencias no fueron sólo con gp60, inclusive el marcador más polimórfico para las dos especies que fue CP47, tuvo menor número de alelos a lo observado con la SC. En las muestras *C. hominis* la mayoría 9/14 se tipificaron dentro del Alelo1 (**IbA10G2**), y todas estas, excepto las muestras NA2 y NA8 fueron clasificadas con un MLG diferente con base en la SC, el mismo comportamiento se observó con las muestras *C. parvum*, donde se identificó un MLG diferente para cada una de las muestras, independiente de si algunas de ellas compartían el mismo alelo para gp60 (Tabla 13).

Como lo encontramos en nuestro trabajo, otros autores también han reportado variabilidad intra subgenotipos gp60, usando el análisis de otros marcadores, es decir, se está enmascarando la diversidad génica al usar no sólo un marcador, sino particularmente a gp60 como ese único marcador. Algunos autores dicen que gp60 puede separar en grandes subgenotipos a las especies de *Cryptosporidium* y que los cambios dentro de estos subgenotipos relacionados con otros marcadores, ocurren posteriores a los cambios en el gen gp60. Parece ser que los cambios evolutivos en gp60, se presentaron en eventos anteriores a los que han tenido los demás genes o marcadores, e incluso probablemente antes de que se diera la diferenciación de especies; además, que el alto grado de polimorfismo de gp60, impide que represente un patrón en todo el genoma, indicando la incapacidad de asignar genotipos con base en este solo marcador (189,193,194).

La red construida con los genotipos multilocus obtenidos de los análisis de la SC para cada muestra (Figura 12) aportó información valiosa para analizar gráficamente las relaciones evolutivas en forma de árboles multifurcados, en el cual se observan dos grupos principales, mismos grupos monofiléticos observados con el árbol de máxima verosimilitud de las SC (Figura 10). En el grupo 2 (*C. hominis*) se presenta una clara separación de los MLG 3, 4 y 8 que pertenecen a las muestras NA6, NA7 y NS9 respectivamente (Alelos 2, 3 y 4, familia alélica **la** según gp60), este dato es concordante con que estas tres muestras tuvieron diferencias nucleotídicas únicas en la SC en los tres marcadores que mostraron ser más polimórficos (CP47, gp60 y MS5), además, estas tres muestras también se agruparon

en una clada separada en el árbol de SC dentro de *C. hominis*, pero interesantemente, se observa en la red de genotipos multilocus que el MLG4 tiene un ancestro evolutivo diferente al de MLG3 y MLG8, lo que podría tener relación con que sólo para la muestra NA7 (MLG4) se observaron diferencias nucleotídicas particulares en el marcador TP14 (Figura 9 y 12) (Tabla 11 y 12). La familia alélica **la** se ha descrito principalmente en transmisiones de tipo antroponótica, sin embargo, se han reportado algunos casos en otros hospedadores como *Macacus Rhesus* (18,244,286).

Por otro lado el grupo interno 2.3 de *C. hominis*, compuesto por el MLG7 que corresponde a la muestra NS8 (Alelo1-**lb**A10G2 con base en gp60) (Figura 12) (Tabla 13), se separa evolutivamente de las demás muestras de este subgenotipo gp60, todas ubicadas dentro del grupo interno 2.1, evento asociado con que esta muestra tiene una secuencia nucleotídica más parecida (con menos repeticiones en tándem del minisatélite) a los alelos MS5 encontrados en las muestras de la familia alélica **la** comparado con la **lb** y probablemente un ancestro diferente, relacionado con un evento de segregación geográfica, toda vez que esta fue la única muestra de este subgenotipo identificado en los NS (Tabla 11). Los MLG9 (NS10-**ld**A10) y MLG11 (VA4-**le**A11G3T3) se ubicaron dentro del grupo interno 2.1, con los MLG relacionados con la familia alélica **lb**, con los cuales el MLG11 parece tener una mayor cercanía evolutiva comparado con **la**, puesto que este tuvo un ancestro común con los MLG2 (NA4-**lb**A10G2) y MLG12 (VA6-**lb**A10G2) (Tabla 13) (Figura 12). Nuestros resultados son concordantes con otros reportes de la literatura que muestran más cercano evolutiva y filogenéticamente las familias alélicas **le** con la **lb** y más alejada la **la**, que parece más cercana a la especie *C. parvum* (5). Además, otros estudios multilocus realizado con *C. hominis*, *C. parvum* y otras especies como *C. meleagridis*, *C. cuniculus* y *C. ubiquitum*, han mostrado también resultados que evidencian separación de linajes influenciados por subgenotipos dados por gp60, pero con diferencias en otros marcadores que muestran variabilidad génica que aporta datos importantes de evolución (221,223,228).

Dentro del grupo 1 (*C. parvum*) es notable la separación del MLG1\* del resto de los genotipos multilocus. Este MLG1\* corresponde a la muestra VA2 (Alelo4- **IIcA5G3a**), la cual desde el inicio de los análisis ha mostrado un comportamiento único, ubicándola periféricamente y aislándola de las demás muestras *C. parvum*, pero acercándola al grupo 2 (*C. hominis*) (Tabla 13) (Figura 12). Todos los resultados obtenidos en nuestro trabajo con esta muestra (VA2) y en general en lo observado con la separación en dos grupos de *C. parvum*, son concordantes con los reportes en la literatura, los cuales pueden resumirse en el trabajo de genómica comparativa realizado por Nader y col. en 2019, quienes mostraron que *C. parvum* se divide en dos subtipos (antroponótico y zoonótico) y que el subtipo **IIc-a** asociado con antroponosis comparte loci con *C. hominis*. Además, muestran que el subtipo **IIc-a** presentan niveles elevados de mutaciones (inserciones y deleciones) en genes subteloméricos lo que está descrito en otros subtipos especializados y donde se localizan las proteínas MEDLE y proteasas similares a la insulina (234–237,277).

Nader y col. en 2019, también remarcan que el intercambio genético inter-especies e intra-genotipos de esta, ejerce un papel importante sobre la evolución de *Cryptosporidium* spp. Reportan también evidencia de que en las regiones “recombinantes” se encuentran genes con selección positiva relacionados posiblemente como factores de virulencia como gp60, CP47, indicando fenómenos de introgresión adaptativa o movimiento de un gen (flujo génico) entre subgenotipos y especies, lo cual ocurre en un periodo largo de tiempo y puede en alguna medida ser facilitado por acción antropogénica (277)

En general nuestra red de MLG necesitó de la inclusión de varios “median vectors” (mv) o genotipos hipotéticos, probablemente por el “n” pequeño (22 muestras) de nuestro trabajo, en el cual es muy probable que falten muestras que representen genotipos ancestrales; sin embargo, y aunque es obvia la necesidad de trabajos a mayor escala, donde se incluyan no sólo un “n” mayor, sino también muestras de diferentes hospedadores y fuentes de infección provenientes de varias zonas geográficas de Colombia; cabe la posibilidad de que estos genotipos hipotéticos aún no hayan sido introducidos en las diferentes poblaciones o ya lo fueron, pero desaparecieron con el tiempo (287).

Por otra parte, para evaluar la diversidad genética en las muestras *C. hominis* y *C. parvum*, con base en las secuencias consenso de los MLST, realizamos análisis de estadística descriptiva básica, empleando los estimativos Hd, Pi, S, K y  $F_{st}$ . En estos análisis se realizaron comparaciones intra e inter-especies por poblaciones clínicas. Los análisis intra-especie mostraron una alta diversidad haplotípica promedio tanto para las muestras *C. hominis* como para las muestras *C. parvum*, siendo mayor para *C. parvum* (Hd:1), donde para las 8 muestras de esta especie, se identificó un genotipo multilocus (MLG) diferente; sin embargo, las muestras *C. hominis* en promedio presentaron una mayor diversidad nucleotídica (Pi: 0,09), un mayor S y K comparado con las muestras *C. parvum* (Tabla 14), datos que muestran que en las comparaciones entre las especies de nuestro trabajo, una mayor Hd no “necesariamente” tiene que ver con una mayor diversidad nucleotídica (Pi).

En las comparaciones intra-especie por poblaciones clínicas (Tabla 14), se encontró que en las 14 muestras *C. hominis*, los tres NS presentaron un mayor valor Hd, Pi, S y K, comparado con los siete NA, cada muestra de NS presentó un MLG único (MLG7-9), dentro de los cuales se observaron diferencias no sólo en gp60 (**IbA10G2**, **IaA11R3**, **IdA10**), sino también mínimo en dos de los otros marcadores especialmente en CP47 y MS5. De los siete NA la mayoría tuvieron el alelo1–**IbA10G2** con base en gp60, pero se observan diferencias en otros marcadores especialmente en los más polimórficos CP47 Y MS5, lo que hace que las muestras se categoricen en MLG diferentes excepto NA2 y NA8 que tuvieron el mismo (MLG1) (Tabla 11 y 13). La población VA dentro de la especie *C. hominis* mostró alto Hd, pero fue la población clínica para la que se obtuvo valores más bajos en los demás índices de variabilidad génica (Pi, S y K). En las comparaciones intra-especie para las 8 muestras *C. parvum* y las poblaciones NS y VA se presentó una Hd:1.0, pero con diferencias muy marcadas en los valores de Pi, S y K, mostrando datos mayores para las muestras VA (Tabla 14).

Teniendo presente la diversidad que podría aportar el marcador gp60 a la SC de cada muestra, no sólo por el tamaño de la secuencia sino por lo polimórfica que esta puede ser,

se realizaron los cálculos de los estimativos de diversidad genética excluyendo este marcador de la SC, para ver como influencia este marcador los resultados. Estos análisis arrojaron que no hay cambios en el índice de Hd, en ninguna de las dos especies ni dentro de ninguna de las poblaciones, cuando se excluye a gp60, indicando que la Hd no está dada por gp60, sino por la combinación de las diferencias encontradas en los loci asociados con cada marcador de la SC y que el número de diferencias encontradas en gp60 también fue encontrada por otros marcadores (Tabla 14).

Sin embargo, e interesantemente, se encontró que para las dos especies e intra poblaciones clínicas, los valores de  $P_i$ ,  $S$  y  $K$  disminuyeron más de la mitad cuando gp60 no estaba en la SC, mostrando el aporte en las diferencias nucleotídicas de gp60, pero también que evidentemente no es el único marcador que aporta información de variabilidad nucleotídica en la SC, toda vez que, aunque menor, sigue habiendo diversidad nucleotídica y en la misma proporción, que la que se observa cuando gp60 está en la SC. Debe recordarse que gp60 aporta aproximadamente 800 bases nucleotídicas a las SC que puede tener un tamaño de 2.562pb y que el análisis de la secuencia amplificada y analizada para gp60 representa más del 80% del gen completo, donde se encuentran diferencias no sólo en las repeticiones del microsatélite, sino en otras regiones de la secuencia amplificada, con presencia de SNPs (106,188,189,288).

Diferencias evidentes y significantes estadísticamente en el índice de fijación génica ( $F_{ST}$ ) calculado para las muestras de nuestro trabajo, mostró que entre las poblaciones clínicas (NA, NS, VA) incluidas en las muestras *C. hominis* (Tabla 15A) se presenta una mayor relación o cercanía evolutiva, con ancestros comunes recientes, estas poblaciones clínicas muestran muy poca diferenciación genética con poca diversidad compartida. Por su parte, las comparaciones entre las poblaciones NS y VA en *C. parvum* mostraron diferencias con un  $p$  significativa (Tabla 15B), indicando que los genotipos multilocus (MLG) correspondientes a estas muestras, tienen una menor cercanía evolutiva y mayor divergencia de secuencias, la cual pareciera estar determinada por la muestra VA2 principalmente. Cuando se evaluó este estimativo  $F_{ST}$  para ambas especies excluyendo a

gp60 de la SC, se obtuvieron resultados similares a los observados cuando gp60 está en la SC, manteniendo un valor de  $p$  significativa por lo que la interpretación de los datos no cambia.

Es importante mencionar que con las estrategias usadas en el presente trabajo no fue posible detectar si había infecciones mixtas o múltiples en las muestras analizadas, sin embargo, como una aproximación en este sentido y dado que está reportado por otros investigadores (223), decidimos usar los mismo oligonucleótidos para amplificar todos los marcadores no sólo en las muestras identificadas como *C. hominis* y *C. parvum* sino, en todas las otras especies, *C. felis*, *C. meleagridis* y *C. suis* (Tabla 8), y no se obtuvo amplificación en ninguna de ellas para ninguno de los marcadores, además, se realizó un análisis minucioso de los electroferogramas iniciales recibidos después de la secuenciación de cada marcador y cada muestra, para verificar que no hubiesen picos múltiples que quizás pudieran relacionarse con infecciones por varias especies de *Cryptosporidium*. Esta aproximación para la detección de infecciones mixtas claramente es mejor abordada desde el uso de tecnologías NGS, no obstante, para *Cryptosporidium* en la mayoría de los casos es necesaria la concentración de ADN extraído previo a la NGS, dado que en muchos casos la cantidad de ooquistes eliminados en la materia fecal es baja y dificulta los análisis con marcadores de “amplio espectro”. Esta detección de infecciones mixtas en algunos casos también ha sido llevado a cabo por análisis de diferencias en tamaños de fragmentos amplificados para un marcador específico, y en el caso de haber infecciones mixtas podrían verse varios fragmentos con diferente tamaño, pero esta sigue siendo una aproximación cualitativa (198,243).

Para Colombia sólo se ha reportado un trabajo de análisis de múltiples locus, pero basado en diferencias de tamaño del fragmento amplificado (MLFT) y en ganado vacuno, en el cual dentro de los subgenotipos unilocus con base en gp60, reportaron tres subgenotipos de *C. parvum* que también fueron identificados en el presente trabajo (IIaA17G4R1, IIaA20G6R1 y IIaA18G5R1), resultado que aporta evidencia del potencial zoonótico y la importancia de los vacunos en la transmisión en Colombia. En los análisis

MLFT que estos investigadores llevaron a cabo, incluyeron diez marcadores dentro de los que estaban cinco de los que usamos en nuestro trabajo (CP47, gp60, ML2, MSC6-7 y TP14), particularmente para estos autores el marcador ML2, que fue excluido de nuestros análisis por su bajo porcentaje total de amplificación, fue el marcador que presentó mayor número de alelos, de acuerdo con diferencias de tamaño en el producto amplificado. Para estos autores TP14 fue el único marcador que mostró una naturaleza monomórfica, resultado diferente al encontrado en nuestro trabajo; aunque claramente la diferencia en los resultados puede estar debida a que en nuestro trabajo utilizamos diferencias de secuencias y parásitos de muestras humanas. Una conclusión que encontramos interesante en el estudio que llevaron a cabo estos investigadores es que infieren que el hecho de haber identificado nuevos subgenotipos en su trabajo (hacen el primer reporte para Colombia de **IlaA20G6R1**), no reportados antes en América latina, sería un indicio de segregación geográfica (229).

Por último, queremos mencionar que la muestra VA4, corresponde a la muestra del genoma colombiano *C. hominis* UdeA01 (33), por tal motivo en los análisis de MLST y de comparaciones con las 22 muestras incluida VA4, no se usó este genoma como referencia, además, que esta muestra tiene un genotipo unilocus gp60 (**IeA11G3T3**) que no corresponde al más frecuentemente reportado en procesos infecciosos en humanos y habría un sesgo en las comparaciones, por tal motivo siempre se usó el genoma TU502-2012, cuyo subgenotipo unilocus gp60 es **IbA10G2**, subgenotipo más frecuente para esta especie, en el ámbito mundial (217,281).

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- En el presente trabajo se identificaron cinco especies de *Cryptosporidium* circulantes en dos regiones de Colombia (Antioquia y Santander): *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* y *C. suis*; lo que refleja la posible participación, además de los humanos, de vacunos, aves, felinos y cerdos en una transmisión zoonótica. Dentro de las especies identificadas, *C. hominis* y *C. parvum* fueron las más frecuentes, lo que está de acuerdo con lo reportado en el ámbito mundial con respecto a los procesos infecciosos en humanos. Sin embargo, fue notoria la diferencia de la frecuencia de estas especies encontrada en niños Antioquia y niños Santander.
- La subgenotipificación unilocus con base en gp60, evidenció cuatro familias alélicas en *C. hominis* (**Ia, Ib, Id, Ie**), las cuales están implicadas principalmente en transmisión de tipo antroponótica, sin embargo, se ha documentado la presencia de estas en otros hospedadores, como primates no humanos. El subgenotipo **IbA10G2** fue el más frecuente en nuestro estudio, lo que también está de acuerdo con los reportes en la literatura en el ámbito mundial. En cuanto a *C. parvum*, se identificaron dos familias alélicas, **Ila** y **Ilc**, siendo más frecuente la familia **Ila**, la cual se ha reportado principalmente en transmisiones de tipo zoonótica, en las cuales el ganado vacuno juega un papel importante y las **Ilc** asociada con transmisión antroponótica.
- Se presenta, bajo nuestro conocimiento el primer trabajo realizado en Colombia y quizá en latino américa, sobre variabilidad genética de parásitos del género *Cryptosporidium* identificados en muestras de pacientes humanos. El presente trabajo basó su análisis en diferencias nucleotídicas encontradas en las secuencias obtenidas de los productos amplificados previamente por PCR de punto final o PCR anidada, de siete marcadores (CP47, gp60, ML2, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14) con secuencias micro o minisatélites, lo que ameritó un proceso de estandarización y protocolización previo y posterior a la obtención de las secuencias para los análisis bioinformáticos.



- Los análisis comparativos de los resultados con los marcadores individuales y las estrategias unilocus gp60 y multilocus (CP47, gp60, MS5, MS9, MSC6-7 y TP14), muestran claramente una diversidad de especies de *Cryptosporidium* (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis*, *C. meleagridis* y *C. suis*) circulando en Colombia, variabilidad genotípica unilocus especialmente con CP47, MS5 y gp60, y una gran diversidad genotípica multilocus independiente de gp60, con variabilidad genética probablemente influenciada en nuestros análisis por gp60, pero no dada exclusivamente por este marcador.
- Los análisis de diversidad génica muestran a gp60, como un marcador que puede modular algunos eventos biológicos relacionados con agrupaciones filogenéticas y ancestros evolutivos, sin embargo, los resultados presentados en este trabajo muestran que es evidente el aporte y necesidad de otros marcadores que permitan un análisis más fino y minucioso para aportar datos filogenéticos con mayor detalle y de diversidad genética que puedan explicar algunos eventos que gp60, como único marcador no permite.
- Dado el “n” pequeño del presente trabajo, 22 muestras para los análisis MLST, no se pueden extrapolar los comportamientos observados con niños y pacientes VIH positivos a toda Colombia, pero si son claras las diferencias encontradas entre los niños de Antioquia y los niños de Santander con respecto a las especies de parásitos que los están infectando y la diversidad intra-especie de estos, lo cual podría tener probablemente una asociación con rutas y fuentes infección diferentes.
- Claramente, nuestro trabajo muestra diferencias entre el subgenotipo *C. parvum* antroponótico, muestra VA2 MLG1\* (Alelo4, IIcA5G3a para gp60) y zoonóticos muestras NS2-5, NS7, VA3 y 5 (MLG2-8\*, todas IIa para gp60), mostrando el único dato de lejanía intra-especie con un  $F_{ST}$  con soporte estadístico en las comparaciones por poblaciones clínicas, sin embargo, nuevamente queremos resaltar como se ha observado a lo largo del desarrollo de este trabajo, que la muestra VA2 no mostró un comportamiento único

y diferente sólo con gp60, este comportamiento se observó con todos los marcadores analizados, lo que se refleja claramente en los resultados del índice de fijación génica en el análisis de la SC con y sin gp60.

- En general los valores de diversidad e índice de fijación génica obtenidos en este trabajo reflejan cambios en la composición genética de los parásitos del género *Cryptosporidium*, identificados en pacientes colombianos, que podrían ser debidos a distintos procesos de mutaciones, recombinación, migración, deriva génica y selección natural, los cuales necesitan ser estudiados con mayor detalle y especialmente en un número mayor de muestras, para poder hacer asociaciones que reflejen un comportamiento en el ámbito nacional, que podrían estar ampliamente relacionados con eventos antropogénicos y eco-epidemiológicos afines a las condiciones sanitarias y de salubridad de nuestra población.
- Con base en los resultados de este trabajo, tanto con los análisis individuales por marcador y los análisis MLST con la SC de los mismos, proponemos el uso para Colombia de los marcadores CP47, MS5, MSC6-7 y TP14, en los MLST para las especies *C. hominis* y *C. parvum*, dado que estos marcadores además de haber amplificado en todas las muestras analizadas, fueron los más informativos junto con gp60, marcador que debería incluirse dada su aparente evolución individual y anterior a la de otros marcadores, además, de su uso convencional en los análisis unilocus.
- Aunque es ambicioso, especialmente en un país como Colombia donde el apoyo a proyectos de investigación, que se salgan de los modelos tradicionales de trabajo, bajo un profundo desconocimiento del impacto que parásitos como *Cryptosporidium* spp. pueden tener en la salud humana y veterinaria, además del impacto económico sobre la producción animal; consideramos necesario la realización de trabajos multicéntricos e inter disciplinarios, en diferentes hospedadores (humanos y animales) y procedentes de diferentes áreas geográficas de Colombia, involucrando además, la información obtenida de parásitos identificados en diferentes fuentes hídricas y de alimentos, para

ampliar la información sobre variabilidad genética, evolución, dinámica de transmisión, genética de poblaciones y en general, de la epidemiología molecular de *Cryptosporidium* spp., que nos permitan establecer una herramienta eficaz para la vigilancia y control de la criptosporidiosis en Colombia.

- Es importante resaltar que dentro de las poblaciones de estudio deberían ser incluidos tanto individuos sintomáticos gastrointestinales como asintomáticos, dado que está reportado, e incluso en el presente trabajo se observó especialmente en niños, que muchos de ellos no presentaban síntomas, convirtiéndose los infectados asintomáticos en fuente de infección al no ser diagnosticados. La mayoría de los niños de Antioquia fueron asintomáticos mientras que los niños Santander y los pacientes VIH positivos, presentaban diarrea como síntoma gastrointestinal. Esto es relevante ya que es probable que los pacientes infectados, sintomáticos y asintomáticos, además de tener un fenotipo clínico y de patogénesis diferente, pueden tener también un genotipo diferente asociado con adaptación y coevolución con su hospedador.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907;5(261):12–3.
2. Tyzzer EE. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *J Med Res.* 1910;23(3):487-510.3.
3. Tyzzer EE. *Cryptosporidium parvum* (sp nov), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd.* 1912;26:394–412.
4. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000;30(12–13):1305–22. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00135-1
5. Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Second Edi. Vol. 1. New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2008.
6. Barer M, Wright A. *Cryptosporidium* and water. *Lett Appl Microbiol.* 1990;11:271–7.
7. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):72–97. doi: 10.1128/CMR.17.1.72–97.2004
8. Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. 4ta edició. London: The International Trust for Zoological Nomenclature; 1999.
9. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute Enterocolitis in a Human Being Infected with the Protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology.* 1976;70(4):592–8. doi: 10.1016/S0016-5085(76)80503-3
10. Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming Watery Diarrhea Associated with a *Cryptosporidium* in an Immunosuppressed Patient. *Gastroenterology.* 1976;70(6):1156–60. doi: 10.1016/S0016-5085(76)80331-9
11. DuPont HL, Chappel CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med.* 1995;332(13):855–9.
12. Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, et al. *Cryptosporidium hominis*: Experimental challenge of healthy adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(5):851–7. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.851
13. Navin TR, Hardy AM. Cryptosporidiosis in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1987;155(1):150. doi: 10.1093/infdis/155.1.150
14. Weisburer W, Hutcheon D, Al E. Cryptosporidiosis in an Immunosuppressed Renal-transplant Recipient with IgA Deficiency. 1979;72(3):473–8.
15. Centers for Disease Control (CDC). Epidemiologic Notes and Reports Cryptosporidiosis: Assessment of Chemotherapy of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) [Internet]. 1982. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001187.htm>
16. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol.* 2010;124(1):80–9. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.018
17. Xiao L, Feng Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food Waterborne Parasitol.* 2017;8–9:14–32. doi: 10.1016/j.fawpar.2017.09.002
18. Feng Y, Ryan UM, Xiao L. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol.* 2018;34(11):997–1011. doi: 10.1016/j.pt.2018.07.009
19. Juranek DD. Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention. *Clin Infect Dis.* 1995;21:57–61. doi: 10.1093/clinids/21.Supplement\_1.S57
20. Zahedi A, Papparini A, Jian F, Robertson I, Ryan U. Public health significance of zoonotic

- Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2016;5(1):88–109. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.12.001
21. MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus S, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. New Engl J Med Downloaded. 1994;331:161–7.
  22. Medema G, Teunis P, Blokker M, Deere D, Davison A, Charles P, et al. WHO Guidelines for Drinking Water Quality *Cryptosporidium*. 2006. 1–138 p.
  23. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2004–2010. Water Res. 2011;45(20):6603–14. doi: 10.1016/j.watres.2011.10.013
  24. Moreira NA, Bondelind M. Safe drinking water and waterborne outbreaks. J Water Health. 2017;15(1):83–96. doi: 10.2166/wh.2016.103
  25. Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach MJ. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. Emerg Infect Dis. 1999;5(4):579–84. doi: 10.3201/eid0504.990425
  26. Peletz R, Mahin T, Elliott M, Montgomery M, Clasen T. Preventing cryptosporidiosis: the need for safe drinking water. Clin Infect Dis. 2013;91:238–238A. doi: 10.1086/591539
  27. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” Trends Parasitol. 2006;22(5):203–8. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.015
  28. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. 4th editio. Switzerland: World Health Organization; 2011. doi: 10.1007/978-1-4020-4410-6\_184
  29. Mead JR, Arrowood MJ, Current WL, Sterling CR. Field Inversion Gel Electrophoretic Separation of *Cryptosporidium* spp. Chromosome-Sized DNA. J Parasitol. 1988;74(3):366–9. doi: 10.2307/3282039
  30. Hays MP, Mosier DA, Oberst RD. Enhanced karyotype resolution of *Cryptosporidium parvum* by contour-clamped homogeneous electric fields. Vet Parasitol. 1995;58(4):273–80. doi: 10.1016/0304-4017(94)00728-U
  31. Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, et al. Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. Science (80- ). 2004;304(5669):441–5. doi: 10.1126/science.1094786
  32. Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki LS, Alves JM, Serrano MG, et al. The genome of *Cryptosporidium hominis*. Nature. 2004;431(7012):1107–12. doi: 10.1038/nature02977
  33. Isaza JP, Galvan AL, Polanco V, Huang B, Matveyev A V., Serrano MG, et al. Revisiting the reference genomes of human pathogenic *Cryptosporidium* species: Reannotation of *C. parvum* Iowa and a new *C. hominis* reference. Sci Rep. 2015;5:1–14. doi: 10.1038/srep16324
  34. Heiges M, Wang H, Robinson E, Aurrecochea C, Gao X, Kaluskar N, et al. CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. Nucleic Acids Res. 2006;34(90001):419–22.
  35. Leinonen R, Sugawara H, Shumway M. The sequence read archive. Nucleic Acids Res. 2011;39(Suppl. 1):2010–2.
  36. Chalmers RM, Davies AP, Tyler K. *Cryptosporidium*. Microbiology. 2019;165(5):500–2. doi: 10.1099/mic.0.000764
  37. Zhu G, Marchewka MJ, Keithly JS. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. Microbiology. 2000;146(2):315–21. doi: 10.1099/00221287-146-2-315
  38. Isaac-Renton JL, Fogel D, Stibbs HH, Ongerth JE. *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water. Lancet. 1987;1:973–4. doi: 10.1016/s0140-6736(87)90313-8.
  39. Hijjawi NS, Meloni BP, Ryan UM, Olson ME, Thompson RCA. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: Evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. Vol. 32, International Journal

- for Parasitology. 2002. p. 1719–26. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00199-6
40. Clode PL, Koh WH, Thompson RCA. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? Trends Parasitol. 2015;31(12):614–24. doi: 10.1016/j.pt.2015.08.005
  41. Howe AD, Forster S, Morton S, Marshall R, Osborn KS, Wright P, et al. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. Emerg Infect Dis. 2002;8(6):619–24. doi: 10.3201/eid0806.010271
  42. Koh W, Clode PL, Monis P, Thompson RCA. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. Parasites and Vectors. 2013;6(270):1–11. doi: 10.1186/1756-3305-6-270
  43. Koh W, Thompson A, Edwards H, Monis P, Clode PL. Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: Tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. BMC Microbiol. 2014;14(281):1–12. doi: 10.1186/s12866-014-0281-8
  44. Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. Parasitology. 2014;141(13):1667–85. doi: 10.1017/S0031182014001085
  45. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, et al. A higher level classification of all living organisms. PLoS One. 2015;10(4):1–60. doi: 10.1371/journal.pone.0119248
  46. Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. Acta Trop. 2018;184:1–14. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.10.023
  47. Zhu G, Keithly JS, Philippe H. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? Int J Syst Evol Microbiol. 2000;50(4):1673–81. doi: 10.1099/00207713-50-4-1673
  48. Hijjawi N., Meloni B., Ng'anzo M, Ryan U., Olson M., Cox P., et al. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. Int J Parasitol. 2004 Jun 1;34(7):769–77. doi: 10.1016/J.IJPARA.2004.04.001
  49. Valigurová A, Hofmannová L, Koudela B, Vávra J. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. J Eukaryot Microbiol. 2007;54(6):495–510. doi: 10.1111/j.1550-7408.2007.00291.x
  50. Cavalier-Smith T. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. Eur J Protistol. 2014;50(5):472–95. doi: 10.1016/j.ejop.2014.07.002
  51. Ryan U, Papparini A, Monis P, Hijjawi N. It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? Water Res. 2016;105:305–13. doi: 10.1016/j.watres.2016.09.013
  52. Fall A, Thompson RCA, Hobbs RP, Morgan-Ryan U. Morphology Is Not a Reliable Tool for Delineating Species Within *Cryptosporidium*. J Parasitol. 2003;89(2):416–8. doi: 10.1645/0022-3395(2003)089
  53. Bonnin A, Fourmaux MN, Dubremetz JF, Nelson RG, Gobet P, Harly G, et al. Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. FEMS Microbiol Lett. 1996;137(2):207–11. doi: 10.1016/0378-1097(96)00056-0
  54. Carraway M, Tzipori S, Widmer G. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. Appl Environ Microbiol. 1996;62(2):712–6. doi: 10.1128/aem.62.2.712-716.1996
  55. Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC, et al. Genetic Polymorphism among *Cryptosporidium parvum* Isolates: Evidence of Two Distinct Human Transmission Cycles. Emerg Infect Dis. 1997;3(4):567–73. doi: 10.3201/eid0304.970423
  56. Morgan UM, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Sargent KD, et al. Sequence and

- PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitology*. 1999;118(1):49–58. doi: 10.1017/S0031182098003412
57. Morgan UM, Fall A, Ward L, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *J Eukaryot Microbiol*. 2002;50(1):1–2. doi: 10.1111/j.1550-7408.2003.tb00098.x
  58. Jiang J, Xiao L. An Evaluation of Molecular Diagnostic Tools for the Detection and Differentiation of Human-Pathogenic *Cryptosporidium* spp. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50:542–7. doi: 10.1111/j.1550-7408.2003.tb00623.x
  59. Li N, Neumann NF, Ruecker N, Alderisio KA, Sturbaum GD, Villegas EN, et al. Development and evaluation of three real-time PCR assays for genotyping and source tracking *Cryptosporidium* spp. in water. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(17):5845–54. doi: 10.1128/AEM.01699-15
  60. Slavin D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol*. 1955;65(3):262–6. doi: 10.1016/S0368-1742(55)80025-2
  61. Iseki M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. *J Parasitol* [Internet]. 1979;28:285–397. Available from: <https://www.gbif.org/es/species/102321276>
  62. Ryan U., Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, et al. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J Parasitol*. 2004;90(4):769–73. doi: 10.1645/GE-202R1 BioOne
  63. Ren X, Zhao J, Zhang L, Ning C, Jian F, Wang R, et al. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol*. 2012;130(3):274–81. doi: 10.1016/j.exppara.2011.07.012
  64. Inman LR, Takeuchi A. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet Pathol*. 1979;16(1):89–95. doi: 10.1177/030098587901600109
  65. Robinson G, Wright S, Elwin K, Hadfield SJ, Katzer F, Bartley PM, et al. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. *Int J Parasitol*. 2010;40(13):1539–48. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.05.010
  66. Lindsay DS, Upton SJ, Owen DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Cattle, *Bos taurus*. *Eukaryot Microbiol*. 2000;47(1):91–5. doi: 10.1007/978-3-662-43978-4\_4592
  67. Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lal AA, Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol*. 2001;87(6):1415–22. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[1415:CCNSFD]2.0.CO;2
  68. Fayer R, Santín M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* N. Sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Cattle (*Bos Taurus*). *J Parasitol*. 2005;91(3):624–9. doi: 10.1645/ge-3435
  69. Ryan UM, Power M, Xiao L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55(1):22–6. doi: 10.1111/j.1550-7408.2007.00299.x
  70. Fayer R, Santín M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol*. 2009;164:192–200. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.011
  71. Fayer R, Santín M, Macarisin D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol*. 2010;172:23–32. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.028
  72. Alvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int J Parasitol*. 2002;32(8):1007–21. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00058-9
  73. Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. *Cryptosporidium viatorum* n. sp.

- (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int J Parasitol.* 2012;42(7):675–82. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.04.016
74. Kváč M, Kestřánová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, et al. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol.* 2013;191(3–4):218–27. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.005
  75. Kváč M, Hofmannová L, Hlásková L, Květoňová D, Vítovec J, McEvoy J, et al. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet Parasitol.* 2014;201(1–2):9–17. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.01.014
  76. Jirků M, Valigurová A, Koudela B, Křížek J, Modrý D, Šlapeta J. New species of *Cryptosporidium tyzzer*, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: Morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol (Praha).* 2008;55(2):81–94. doi: 10.14411/fp.2008.011
  77. Power ML, Ryan UM. A New Species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Eastern Grey Kangaroos (*Macropus giganteus*). *J Parasitol.* 2008;94(5):1114–7. doi: 10.1645/ge-1508.1
  78. Fayer R, Santín M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol.* 2008;156(3–4):191–8. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.05.024
  79. Ryan UM, Xiao L, Read C, Sulaiman IM, Monis P, Lal AA, et al. A Redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) From Birds. *J Parasitol.* 2003;89(4):809–13. doi: 10.1645/ge-74ri
  80. Pavlásek I. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Mikrobiol [Internet].* 1999;3:290–301. Available from: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Remedia+Klin.+Mikrobiol.&volume=3&publication\\_year=1999&pages=290&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Remedia+Klin.+Mikrobiol.&volume=3&publication_year=1999&pages=290&)
  81. Vetterling JM, Jervis HR, Merrill TG, Sprinz H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea Pig *Cavia porcellus*, with an Emendation of the Genus. *J Protozool.* 1971;18(2):243–7.
  82. Levine ND. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol [Internet].* 1980;66(5):830–834. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7463253/>
  83. Current WL, Upton SJ, Haynes TB. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) Infecting Chickens. *J Protozool.* 1986;33(2):289–96.
  84. Pavlásek I, Lávicková M, Horák P, Král J, Král B. *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. *Gazella [Internet].* 1995;22:99–108. Available from: [https://scholar.google.com/scholar?cluster=9608984072737847494&hl=es&as\\_sdt=2005&scioldt=0,5](https://scholar.google.com/scholar?cluster=9608984072737847494&hl=es&as_sdt=2005&scioldt=0,5)
  85. Xunde L, Pereira M das GC, Larsen R, Xiao C, Phillips R, Striby K, et al. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2015;4(3):343–50. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.08.005
  86. Ryan U, Papparini A, Tong K, Yang R, Gibson-Kueh S, O'Hara A, et al. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Exp Parasitol.* 2015;150:31–5. doi: 10.1016/j.exppara.2015.01.009
  87. Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňková T, Kanděra J, Ježková J, et al. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric cryptosporidium of mammals. *PLoS One.* 2016;11(1):1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0147090
  88. Zahedi A, Durmic Z, Gofton AW, Kueh S, Austen J, Lawson M, et al. *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Vet Parasitol.* 2017;245:92–101. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.08.014



89. Holubová N, Sak B, Horčíčková M, Hlásková L, Květoňová D, Menchaca S, et al. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol Res.* 2016;115(6):2243–51. doi: 10.1007/s00436-016-4967-8
90. Ježková J, Horcicková M, Hlásková L, Sak B, Dana Kvetonová, Novák J, et al. *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise* genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitol (Praha).* 2016;63(035):1–10. doi: 10.14411/fp.2016.035
91. Čondlová Š, Horčíčková M, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, Konečný R, et al. *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *Eur J Protistol.* 2018;63:1–12. doi: 10.1016/j.ejop.2017.12.006
92. Kváč M, Vlnatá G, Ježková J, Horčíčková M, Konečný R, Hlásková L, et al. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *Eur J Protistol.* 2018;63:96–104. doi: 10.1016/j.ejop.2018.02.001
93. Horčíčková M, Čondlová Š, Holubová N, Sak B, Květoňová D, Hlásková L, et al. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology.* 2018;146(2):220–33. doi: 10.1017/S0031182018001142
94. Holubová N, Zikmundová V, Limpouchová Z, Sak B, Konečný R, Hlásková L, et al. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *Eur J Protistol.* 2019;69:70–87. doi: 10.1016/j.ejop.2019.03.001
95. Fleta J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, Quílez J. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Vet Parasitol.* 1995;59(3–4):201–5. doi: 10.1016/0304-4017(94)00758-5
96. Cimon KY, Oberst RD, Upton SJ, Mosier DA. Biliary cryptosporidiosis in two corn snakes (*Elaphe guttata*). *J Vet Diagnostic Investig.* 1996;8:398–9.
97. Clark DP. New insights into human Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):554–63. doi: 10.1128/cmr.12.4.554
98. de Souza L do R, Rodrigues MAM, Morceli J, Kemp R, Mendes RP. Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37(2):182–5.
99. Mercado R, Buck GA, Manque PA, Ozaki LS. *Cryptosporidium hominis* Infection of the Human Respiratory Tract. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):462–4.
100. Zeeland AYRA Van, Schoemaker NJ, Kik MJL, Giessen JWB Van Der, Zeeland YRA Van, Schoemaker ABNJ, et al. Upper Respiratory Tract Infection Caused by *Cryptosporidium baileyi* in Three Mixed-Bred Falcons (*Falco rusticolus* × *Falco cherrug*). *Avian Dis.* 2008;52(2):357–63. doi: 10.1637/8121-100207-Case.1
101. Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: Biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;117(1):11–25. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00328-0
102. Wetzel DM, Schmidt J, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP, Sibley LD. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect Immun.* 2005;73(9):5379–87. doi: 10.1128/IAI.73.9.5379-5387.2005
103. Reduker DW, Speer CA, Blixt JA. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* Oocysts and Excysting Sporozoites as Revealed by High Resolution Scanning Electron Microscopy. *J Protozool.* 1985;32(4):708–11.
104. Smith H V, Nichols RAB, Grimason AM. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Tre.* 2005;21:133–42. doi: 10.1016/j.pt.2005.01.007
105. Riggs M, Stone AL, Yount PA, Langer RC, Arrowood MJ, Bentley DL. Protective Monoclonal

- Antibody Defines a Circumsporozoite-Like Glycoprotein Exoantigen of *Cryptosporidium parvum* Sporozoites and Merozoites. J Immunol [Internet]. 1997;158(4):1787–95. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/158/4/1787>
106. Spano F, Putignani L, Naitza S, Puri C, Wright S, Crisanti A. Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. Mol Biochem Parasitol. 1998;92(1):147–62. doi: 10.1016/S0166-6851(97)00243-0
  107. Umemiya R, Fukuda M, Fujisaki K, Matsui T. Electron Microscopic Observation of the Invasion Process of *Cryptosporidium parvum* in Severe Combined Immunodeficiency Mice. J Parasitol. 2005;91(5):1034–9. doi: 10.1645/ge-508r.1
  108. O'Donoghue P. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Parasitol Int. 1995;25(2):139–95.
  109. Tzipori S, Griffiths JK. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. Adv Parasitol. 1998;40:5–36.
  110. Cacciò S, Spano F, Pozio E. Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. Int J Parasitol. 2001;31(10):1082–6. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00233-8
  111. Cacciò SM, de Waele V, Widmer G. Geographical segregation of *Cryptosporidium parvum* multilocus genotypes in Europe. Infect Genet Evol. 2015;31:245–9. doi: 10.1016/j.meegid.2015.02.008
  112. Morris A, Robinson G, Swain MT, Chalmers RM. Direct Sequencing of *Cryptosporidium* in Stool Samples for Public Health. Front Public Heal. 2019;7(December). doi: 10.3389/fpubh.2019.00360
  113. Current WL, Reese NC. A Comparison of Endogenous Development of Three Isolates of *Cryptosporidium* in Suckling Mice. J Protozool. 1986;33(1):98–108.
  114. Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás E. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. J Food Prot. 2006;69(1):185–90. doi: 10.4315/0362-028X-69.1.185
  115. Schets FM, Van Den Berg H, De Roda Husman AM. Determination of the recovery efficiency of *Cryptosporidium* oocysts and giardia cysts from seeded bivalve mollusks. J Food Prot. 2013;76(1):93–8. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-326
  116. Masangkay FR, Milanez GD, Tsiami A, Somsak V, Kotepui M, Tangpong J, et al. First report of *Cryptosporidium hominis* in a freshwater sponge. Sci Total Environ. 2019;134447. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134447
  117. Wingender J, Flemming H. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int J Hyg Environ Health. 2011;214(6):417–423. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.05.009
  118. Mathieu E, Levy DA, Veverka F, Parrish MK, Sarisky J, Shapiro N, et al. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(5):582–9. doi: 10.4269/ajtmh.2004.71.582
  119. Innes EA, Chalmers RM, Wells B, Pawlowic MC. A One Health Approach to Tackle Cryptosporidiosis. Trends Parasitol. 2020;36(3):290–303. doi: 10.1016/j.pt.2019.12.016
  120. Gentile G, Venditti M, Micozzi A, Caprioli A, Donelli G, Tirindelli C, et al. Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. Rev Infect Dis. 1991;13(5):842–6. doi: 10.1093/clinids/13.5.842
  121. Tanyüksel M, Gün H, Doganci L. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. In patients with neoplasia and diarrhea. Scand J Infect Dis. 1995;27(1):69–70. doi: 10.3109/00365549509018975
  122. Sreedharan AA, Jayshree RS, Sridhar H, Journal S, September N. Cryptosporidiosis Among Cancer Patients : An Observation. J Diarrhoeal Dis Res. 1996;14(3):211–3.

123. Manabe YC, Clark DP, Moore RD, Lumadue JA, Dahlman HR, Belitsos PC, et al. Cryptosporidiosis in Patients with AIDS : Correlates of Disease and Survival. *Clin Infect Dis*. 1998;27(3):536–42.
124. Turkcapar N, Kutlay S, Nergizoglu G, Atli T, Duman N. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron*. 2002;90(3):344–6. doi: 10.1159/000049072
125. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):145–54. doi: 10.1128/CMR.15.1.145-154.2002
126. Jokipii L, Jokipii AMM. Timing of Symptoms and Oocyst Excretion in Human Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1643–7.
127. Navin TR. Cryptosporidiosis in humans: Review of recent epidemiologic studies. *Eur J Epidemiol*. 1985;1(2):77–83. doi: 10.1007/BF00141796
128. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: Biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*. 2002;4(10):1047–58. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01629-5
129. Fayer R, Orlandi P, Perdue ML. Virulence factor activity relationships for hepatitis E and *Cryptosporidium*. *J Water Health*. 2009;7(SUPPL. 1):55–63. doi: 10.2166/wh.2009.044
130. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):115–34. doi: 10.1128/CMR.00076-12
131. Okhuysen PC, Rich SM, Chappell CL, Grimes KA, Widmer G, Feng X, et al. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* Isolate of Cervine Origin for Healthy Adults and Interferon- $\gamma$  Knockout Mice . *J Infect Dis*. 2002;185(9):1320–5. doi: 10.1086/340132
132. Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract*. 2009;25(1):13–36. doi: 10.1016/j.cvfa.2008.10.013
133. Wyatt CR, Riggs MW, Fayer R. Cryptosporidiosis in Neonatal Calves. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract*. 2010;26(1):89–103. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.001
134. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol*. 2010;124(1):138–46. doi: 10.1016/j.exppara.2009.02.003
135. Checkley W, White Jr AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen X-M, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *J Autism Dev Disord*. 2015;15(1):85–94. doi: 10.1097/CCM.0b013e31823da96d.Hydrogen
136. Chalmers RM, Campbell BM, Crouch N, Charlett A, Davies AP. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J Med Microbiol*. 2011;60(11):1598–604. doi: 10.1099/jmm.0.034181-0
137. Khurana S, Chaudhary P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Trop Parasitol* [Internet]. 2018;8(1):2–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5991046>
138. Ma P, Soave R. Three-Step Stool Examination for Cryptosporidiosis in 10 Homosexual Men with Protracted Watery Diarrhea. *J Infect Dis*. 2017;147(5):824–8.
139. Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, Rooyen MAA Van, et al. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1220–3. doi: 10.1128/JCM.42.3.1220
140. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):915–25. doi: 10.1128/JCM.02674-14
141. Pfaller MA. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123(11):1007–10. doi: 10.1043/0003-9985(1999)123<1007:MEITCO>2.0.CO;2
142. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*.

- 2005;366:941–51. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67322-9
143. Zaidi N, Konstantinou K, Zervos M. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(9):1098–105. doi: 10.1043/1543-2165(2003)127<1098:TROMBA>2.0.CO;2
  144. Singh A, Goering R V., Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):512–30. doi: 10.1128/CMR.00025-05
  145. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *Lancet.* 2013;382(9888):209–22. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2
  146. Siwila J, Phiri IGK, Enemark HL, Nchito M, Olsen A. Seasonal prevalence and incidence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* and associated diarrhoea in children attending pre-school in Kafue, Zambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(2):102–8. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.10.004
  147. Wang R jun, Li J qiang, Chen Y cai, Zhang L xian, Xiao L hua. Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. *Acta Trop.* 2018;187(August):257–63. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.08.018
  148. Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Rich SM, Widmer G, et al. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago Hospital, Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(6):710–5. doi: 10.4269/ajtmh.2003.68.710
  149. Opintan JA, Newman MJ, Ayeh-Kumi PF, Affrim R, Gepi-Attee R, Sevilleja JEAD, et al. Pediatric diarrhea in Southern Ghana: Etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(4):936–43. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0792
  150. Shirley D-AT, Moonah SN, Kotloff KL, Kotloff K. Burden of disease from Cryptosporidiosis HHS Public Access. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25(5):555–63. doi: 10.1097/QCO.0b013e328357e569
  151. Liu HLL, Johnson J, Perin M, Li M, Black RE, London M, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet.* 2012;379(379):2151–61. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60560-1
  152. Sulżyc-Bielicka V, Kołodziejczyk L, Jaczewska S, Bielicki D, Safranow K, Bielicki P, et al. Colorectal cancer and *Cryptosporidium* spp. infection. *PLoS One.* 2018;13(4):1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0195834
  153. Esteghamati A, Khanaliha K, Bokharaei-Salim F, Sayyahfar S, Ghaderipour M. Prevalence of intestinal parasitic infection in cancer, organ transplant and primary immunodeficiency patients in Tehran, Iran. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2019;20(2):495–501. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.2.495
  154. de Arango M, Rodríguez DA, Prada NE. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en materia fecal de niños entre un mes y trece años en un hospital local colombiano. *Colomb Med.* 2006;37(2):121–5. doi: 10.2510/colomb.
  155. Vélez DM, Velasco CA, Rojas C, Dueñas VH, Neuta P. *Cryptosporidium* spp. en niños sanos menores de 10 años de la Comuna 18 de Cali, Colombia. *Gastrohnutp.* 2011;13(2):S4–10.
  156. Bayona MR, Avendaño C V, Amaya ÁM. Epidemiologig characterization of cryptosporidiosis in infant population at the Sabana Centro (Cundinamarca). *Rev UDCA Act Div Cient.* 2011;14(1):7–13.
  157. Álvarez J, Bedoya L, Garzón T. Parasitosis intestinal en niños de 0 a 5 años de edad, inscritos en centros de atención integral ubicados en las comunas sur y nororiental del municipio de

- Florencia, Caquetá (Colombia). *Biomedica*. 2015;35(Suple4):74.
158. Gaviria LM, Soscue D, Campo-Polanco LF, Cardona-Arias J, Galván-Díaz AL. Prevalencia de parasitosis intestinal, anemia y desnutrición en niños de un resguardo indígena Nasa, Cauca, Colombia, 2015. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 2017;35(3):390–9. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v35n3a09
  159. Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, et al. Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Front Microbiol*. 2017;8(FEB):1–14. doi: 10.3389/fmicb.2017.00248
  160. 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;19(1):1–11. doi: 10.1186/s12879-019-3810-0
  161. 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;8(8554):1–26. doi: 10.7717/peerj.8554
  162. Galván-Díaz AL. Cryptosporidiosis in Colombia: a Systematic Review. *Curr Trop Med Reports*. 2018;5(3):144–53. doi: 10.1007/s40475-018-0149-3
  163. Florez AC, Garcia DA, Moncada L, Beltran M. Prevalence of microsporidia and other intestinal parasites in patients with HIV infection, Bogota, 2001. *Biomedica*. 2003;23(3):274–82.
  164. Arzuza O, Arroyo B, Villegas S, Rocha A, Díaz H. Infecciones parasitarias intestinales en pacientes positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia. *Infectio*. 2003;7(2):58–63.
  165. Botero Garcés JH, Castaño A, Montoya MN, Ocampo NE, Hurtado MI, Lopera MM. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2003;45(4):197–200.
  166. Carreño M, Velasco CA, Rueda E. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en niños menores de 13 años con afecciones oncológicas. *Colomb Med*. 2005;36(2):6–9.
  167. Navarro-I-Martinez L, Da Silva AJ, Botero Garces JH, Montoya Palacio MN, Del Aguila C, Bornay-Llinares FJ. Cryptosporidiosis in HIV-positive patients from Medellín, Colombia. *J Eukaryot Microbiol*. 2006;53(SUPPL. 1):37–9. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00167.x
  168. Siuffi M, Angulo M, Velasco CA, López P, Dueñas VH, Rojas C. Relación entre los niveles de carga viral y los niveles de linfocitos CD4 en el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. en heces de niños de la Clínica pediátrica de VIH/SIDA del Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia. *Colomb Med*. 2006;37(1):15–20.
  169. Velasco CA, Méndez F, López P. Cryptosporidiosis in Colombian children with HIV/AIDS infection. *Colomb Med*. 2011;42:418–29. doi: 10.25100/cm.v42i4.942
  170. Vergara-Castiblanco CA, Quílez-Cinca J, Freire-Santos F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazás ME. Serological response to *Cryptosporidium parvum* in adult cattle from the Andean region of Colombia. *Parasitol Res*. 2001;87(6):500–4. doi: 10.1007/s004360100375
  171. Vergara-Castiblanco CA, Freire-Santos F, Oteiza-López AM, Ares-Mazás ME. Viability and infectivity of two *Cryptosporidium parvum* bovine isolates from different geographical location. *Vet Parasitol*. 2000;89(4):261–7. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00210-7
  172. Santín M, Trout JM, Vecino JAC, Dubey JP, Fayer R. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Vet Parasitol*. 2006;141(3–4):334–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.004
  173. Rodríguez E, Manrique-Abril F, Martín Pulido M, Ospina-Díaz J. Frequency of *Cryptosporidium* spp in canine from city of Tunja - Colombia. *Rev MVZ Cordoba*. 2009;14(2):1697–704.

174. Avendaño C. Prevalencia de *Cryptosporidium* en terneros en el Valle de Ubaté - Chiquinquirá (Colombia). Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2010;13(1):41–7. doi: 10.31910/rudca.v13.n1.2010.707
175. Montaña J, Avendaño C. Contribución al conocimiento de la epidemiología de la criptosporidiosis bovina en el Valle de Chiquinquirá. Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2012;15(2):391–8. doi: 10.31910/rudca.v15.n2.2012.840
176. Ocampo RJ, Rivera FA, López GA, Álvarez ME, Cardozo LA, Pérez JE. Primer reporte de *Cryptosporidium parvum* en terneros Holstein (*Bos taurus*) de Manizales, Caldas, Colombia. Rev la Fac Med Vet y Zootec. 2012;59(3):159–64.
177. Pardo D, Oliver O. Identification of infectious agents associated with Bovine Neonatal Diarrhea in the Sabana de Bogotá. Rev MVZ Cordoba. 2012;17(3):3162–8.
178. Montoya C, Oyola N, Ocampo M, Polanco D, Ríos S, Molina P, et al. Evaluación del parasitismo intestinal en monos aulladores rojos (*Alouatta seniculus*) en rehabilitación en el CAVR Ecosantafé, Jericó, Colombia. Rev Lasallista Investig. 2013;10(2):25–34.
179. Pulido-Medellín MO, Andrade-Becerra RJ, Iván Rodríguez-Vivas R, Garcia-Corredor DJ. Prevalence and possible risk factors for *Cryptosporidium* spp oocyst excretion in dairy cattle in Boyacá, Colombia. Rev Mex Ciencias Pecu. 2014;5(3):357–64.
180. 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;117(5):1317–23. doi: 10.1007/s00436-018-5818-6
181. Cadavid-Betancur, D. A. Giraldo-Echeverri, C.A. Sierra-Bedoya S, Montoya-Pino, M Chaparro-Gutierrez, J. J. Restrepo-Botero JE. Bovine neonatal diarrhea in a herd in the northern Antioquia (Colombia) highlands, a descriptive study. Vet y Zootec. 2014;8(2):120–9.
182. Alarcón MA, Beltrán M, Cárdenas ML, Campos MC. Presence and viability of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water and wastewater in the high basin of Bogotá river. Biomedica. 2005;25(3):353–65. doi: 10.7705/biomedica.v25i3.1360
183. Campos-Pinilla C, Cárdenas-Guzmán, M. Guerrero-Cañizares A. Performance of Faecal contamination indicators in different type of waters from the Sabana of Bogotá ( Colombia). Univ sci. 2008;13:103–8.
184. Rodríguez DC, Pino N, Peñuela G. Microbiological quality indicators in waters of dairy farms: Detection of pathogens by PCR in real time. Sci Total Environ. 2012;427:314–8. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.052
185. Triviño-Valencia J, Lora F, Zuluaga JD, Gomez-Marin JE. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. Parasitol Res. 2016;115(5):1789–97. doi: 10.1007/s00436-016-4917-5
186. Lora-Suarez F, Rivera R, Triviño-Valencia J, Gomez-Marin JE. Detection of protozoa in water samples by formalin/ether concentration method. Water Res. 2016;100:377–81. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.038
187. Sánchez C, López MC, Galeano LA, Qvarnstrom Y, Houghton K, Ramírez JD. Molecular detection and genotyping of pathogenic protozoan parasites in raw and treated water samples from southwest Colombia. Parasites and Vectors. 2018;11(1):1–11. doi: 10.1186/s13071-018-3147-3
188. O'Connor RM, Wanyiri JW, Cevallos AM, Priest JW, Ward HD. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. Mol Biochem Parasitol. 2007;156(1):80–3. doi: 10.1038/jid.2014.371
189. Strong W, Gut J, Nelson RG. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of tts 15- And 45-kilodalton zoite surface antigen products. Infect Immun. 2000;68(7):4117–34.

- doi: 10.1128/iai.68.7.4117-4134.2000
190. Widmer G, Lee Y. Comparison of single- and multilocus genetic diversity in the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(19):6639–44. doi: 10.1128/AEM.01268-10
  191. Robinson G, Chalmers RM. Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp Parasitol*. 2012;132:200–15. doi: 10.1016/j.exppara.2012.06.016
  192. Chalmers R, Cacció S. Towards a consensus on genotyping schemes for surveillance and outbreak investigations of *Cryptosporidium*, Berlin, June 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(37):1–4. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.37.30338
  193. Chalmers RM, Pérez-Cordón G, Cacció SM, Klotz C, Robertson LJ. *Cryptosporidium* genotyping in Europe: The current status and processes for a harmonised multi-locus genotyping scheme. *Exp Parasitol*. 2018;191:25–30. doi: 10.1016/j.exppara.2018.06.004
  194. Abal-Fabeiro JL, Maside X, Bello X, Llovo J, Bartolomé C. Multilocus patterns of genetic variation across *Cryptosporidium* species suggest balancing selection at the gp60 locus. *Mol Ecol*. 2013;22(18):4723–32. doi: 10.1111/mec.12425
  195. Gilchrist CA, Cotton JA, Burkey C, Arju T, Gilmartin A, Lin Y, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium hominis* in a bangladeshi community as revealed by whole-genome sequencing. *J Infect Dis*. 2018;218(2):259–64. doi: 10.1093/infdis/jiy121
  196. Vogt P. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on highly conserved chromatin foldin code. *Hum Genet* [Internet]. 1990;84(4):301–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2407640/>
  197. Barker GC. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(Suppl.1):21–4.
  198. Quílez J, Hadfield SJ, Ramo A, Vergara-Castiblanco C, Chalmers RM. Validation of fragment analysis by capillary electrophoresis to resolve mixed infections by *Cryptosporidium parvum* subpopulations. *Parasitol Res*. 2014;113(5):1821–5. doi: 10.1007/s00436-014-3828-6
  199. Jarne P, Lagoda PJJ. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol*. 1996;11(10):424–429.
  200. Goldstein, D.B. y Schlötterer C. Microsatellites: evolution and applications. *Heredity (Edinb)*. 1999;83:633–4.
  201. Pasqualotto AC, Denning DW, Anderson MJ. A cautionary tale: Lack of consistency in allele sizes between two laboratories for a published multilocus microsatellite typing system. *Clin Microbiol Infect*. 2007;45(2):522–7.
  202. Díaz P, Hadfield SJ, Quílez J, Soilán M, López C, Panadero R, et al. Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in north west Spain. *Vet Parasitol*. 2012;186(3–4):188–95. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.039
  203. Widmer G, Cacció SM. A comparison of sequence and length polymorphism for genotyping *Cryptosporidium* isolates. *Parasitology*. 2015;142(8):1080–5. doi: 10.1017/S0031182015000396
  204. Tanriverdi S, Widmer G. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infect Genet Evol*. 2006;6(2):113–22. doi: 10.1016/j.meegid.2005.02.002
  205. Feng X, Rich SM, Akiyoshi D, Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, et al. Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(8):3344–9.
  206. Aiello AE, Xiao L, Limon JR, Charles R, Abrahamsen MS. Microsatellite analysis of the human

- and bovine genotypes of *Cryptosporidium parvum*. Eukaryot Microbiol [Internet]. 1999;46(5):46S–47S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10519243/>
207. Gatei W, Das P, Dutta P, Sen A, Cama V, Lal AA, et al. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. Infect Genet Evol. 2007;7(2):197–205. doi: 10.1016/j.meegid.2006.08.006
  208. Caccio S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology. 2000;120:237–44.
  209. Mallon M, MacLeod A, Wastling J, Smith H, Reilly B, Tait A. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. J Mol Evol. 2003;56(4):407–17. doi: 10.1007/s00239-002-2412-3
  210. Gatei W, Hart CA, Gilman RH, Das P, Cama V, Xiao L. Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. J Eukaryot Microbiol. 2006;53(SUPPL. 1):43–8. doi: 10.1111/j.1550-7408.2006.00169.x
  211. Morrison LJ, Mallon ME, Smith H V., MacLeod A, Xiao L, Tait A. The population structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Scotland: A complex picture. Infect Genet Evol. 2008;8(2):121–9. doi: 10.1016/j.meegid.2007.10.010
  212. Yadav P, BR M, Makharia GK, Chaudhry R. Multilocus sequence typing of *Cryptosporidium hominis* from northern India. Indian J Med Res. 2017;145:102–11. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1064\_14
  213. Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, et al. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. Int J Parasitol. 2008;38(7):809–17. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.10.014
  214. Gatei W, Barrett D, Lindo JF, Eldemire-Shearer D, Cama V, Xiao L. Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. Emerg Infect Dis. 2008;14(5):841–3. doi: 10.3201/eid1405.071277
  215. Wang R, Jian F, Zhang L, Ning C, Liu A, Zhao J, et al. Multilocus sequence subtyping and genetic structure of *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. PLoS One. 2012;7(8):1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0043782
  216. Feng Y, Tiao N, Li N, Hlavsa M, Xiao L. Multilocus sequence typing of an emerging *Cryptosporidium hominis* subtype in the United States. J Clin Microbiol. 2014;52(2):524–30. doi: 10.1128/JCM.02973-13
  217. Li N, Xiao L, Cama VA, Ortega Y, Gilman RH, Guo M, et al. Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. Emerg Infect Dis. 2013;19(10):1573–82. doi: 10.3201/eid1910.121361.
  218. Zhao GH, Ren WX, Gao M, Bian QQ, Hu B, Cong MM, et al. Genotyping *Cryptosporidium andersoni* in Cattle in Shaanxi Province, Northwestern China. PLoS One. 2013;8(4):1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0060112
  219. Feng Y, Torres E, Li N, Wang L, Bowman D, Xiao L. Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. Int J Parasitol. 2013;43(14):1141–7. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.09.002
  220. Wang R, Zhang L, Axén C, Bjorkman C, Jian F, Amer S, et al. *Cryptosporidium parvum* IId family: Clonal population and dispersal from Western Asia to other geographical regions. Sci Rep. 2014;4(4208):1–5. doi: 10.1038/srep04208
  221. Tang Y, Li N, Song M, Roellig DM, Feng Y, Xiao L. Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution subtyping and genetic structure characterization of *Cryptosporidium ubiquitum*. Infect Genet Evol. 2016;45:256–61. doi: 10.1016/j.meegid.2016.09.011
  222. Zhao W, Wang R, Zhang W, Liu A, Cao J, Shen Y, et al. MLST subtypes and population genetic



- structure of *Cryptosporidium andersoni* from dairy cattle and beef cattle in Northeastern China's Heilongjiang Province. PLoS One. 2014;9(7):1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0102006
223. Wang Y, Yang W, Cama V, Wang L, Cabrera L, Ortega Y, et al. Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: Evidence for cross-species transmission. Int J Parasitol. 2014;44(8):515–21. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.03.003
  224. Wagnerová P, Sak B, McEvoy J, Rost M, Perec Matysiak A, Ježková J, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. including novel identification of the *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium tyzzeri* in horses in the Czech Republic and Poland. Vol. 114, Parasitology Research. 2015. p. 1619–24. doi: 10.1007/s00436-015-4353-y
  225. Ramo A, Quílez J, Vergara-Castiblanco C, Monteagudo L, Del Cacho E, Clavel A. Multilocus typing and population structure of *Cryptosporidium* from children in Zaragoza, Spain. Infect Genet Evol. 2015;31:190–7. doi: 10.1016/j.meegid.2015.01.023
  226. Qi M, Wang R, Jing B, Jian F, Ning C, Zhang L. Prevalence and multilocus genotyping of *Cryptosporidium andersoni* in dairy cattle and He cattle in Xinjiang, China. Infect Genet Evol. 2016;44:313–7. doi: 10.1016/j.meegid.2016.07.022
  227. Deng L, Li W, Zhong Z, Gong C, Cao X, Song Y, et al. Occurrence and Genetic Characteristics of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium andersoni* in Horses from Southwestern China. J Eukaryot Microbiol. 2017;64(5):716–20. doi: 10.1111/jeu.12399
  228. Yang Z, Yang F, Wang J, Cao J, Zhao W, Gong B, et al. Multilocus sequence typing and population genetic structure of *Cryptosporidium cuniculus* in rabbits in Heilongjiang Province, China. Infect Genet Evol. 2018;64:249–53. doi: 10.1016/j.meegid.2018.07.006
  229. Avendaño C, Ramo A, Vergara-Castiblanco C, Monteagudo L V., Sánchez-Acedo C, Quílez J. Multilocus fragment analysis of *Cryptosporidium parvum* from pre-weaned calves in Colombia. Acta Trop. 2019;192:151–7. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.02.005
  230. Sivashankari S, Shanmughavel P. Comparative genomics - A perspective. Bioinformation. 2007;1(9):376–8. doi: 10.6026/97320630001376
  231. Alharbi KK, Khan IA, Tejaswini Y, Devi YA. The Role of Genome Sequencing in the Identification of Novel Therapeutic Targets. J Glycomics Lipidomics. 2014;04(02):10–3. doi: 10.4172/2153-0637.1000112
  232. Ifeonu OO, Chibucos MC, Orvis J, Su Q, Elwin K, Guo F, et al. Annotated draft genome sequences of three species of *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium meleagridis* isolate UKMEL1, *C. baileyi* isolate TAMU-09Q1 and *C. hominis* isolates TU502 2012 and UKH1. Pathog Dis. 2016;74(7):1–5. doi: 10.1093/femspd/ftw080
  233. Guo Y, Tang K, Rowe LA, Li N, Roelling DM, Knipe K, et al. Comparative genomic analysis reveals occurrence of genetic recombination in virulent *Cryptosporidium hominis* subtypes and telomeric gene duplication in *Cryptosporidium parvum*. BMC Genomics. 2015;16(320):1–18. doi: 10.1186/s12864-015-1517-1
  234. Liu S, Roellig DM, Guo Y, Li N, Frace MA, Tang K, et al. Evolution of mitosome metabolism and invasion-related proteins in *Cryptosporidium*. BMC Genomics. 2016;17(1):1–16. doi: 10.1186/s12864-016-3343-5
  235. Li B, Wu H, Li N, Su J, Jia R, Jiang J, et al. Preliminary Characterization of MEDLE-2, a Protein Potentially Involved in the Invasion of *Cryptosporidium parvum*. Front Microbiol. 2017;8:1–7. doi: 10.3389/fmicb.2017.01647
  236. Fei J, Wu H, Su J, Jin C, Li N, Guo Y, et al. Characterization of MEDLE-1, a protein in early development of *Cryptosporidium parvum*. Parasit Vectors. 2018;11(312):1–9. doi: 10.1186/s13071-018-2889-2
  237. Xu Z, Guo Y, Roellig DM, Feng Y, Xiao L. Comparative analysis reveals conservation in genome organization among intestinal *Cryptosporidium* species and sequence divergence in potential

- secreted pathogenesis determinants among major human-infecting species. BMC Genomics. 2019;20(1):1–15. doi: 10.1186/s12864-019-5788-9
238. Sikora P, Andersson S, Winięcka-krusnell J, Alsmark C, Troell K, Beser J, et al. Genomic Variation in IbA10G2 and Other Patient-Derived *Cryptosporidium hominis* Subtypes. J Clin Microbiol. 2017;55(3):844–58. doi: 10.1128/JCM.01798-16
  239. Beser J, Hallström BM, Advani A, Andersson S, Östlund G, Winięcka-Krusnell J, et al. Improving the genotyping resolution of *Cryptosporidium hominis* subtype IbA10G2 using one step PCR-based amplicon sequencing. Infect Genet Evol. 2017;55:297–304. doi: 10.1016/j.meegid.2017.08.035
  240. Grinberg A, Biggs PJ, Dukkipati VSR, George TT. Extensive intra-host genetic diversity uncovered in *Cryptosporidium parvum* using Next Generation Sequencing. Infect Genet Evol. 2013;15:18–24. doi: 10.1016/j.meegid.2012.08.017
  241. Paparini A, Gofton A, Yang R, White N, Bunce M, Ryan UM. Comparison of Sanger and next generation sequencing performance for genotyping *Cryptosporidium* isolates at the 18S rRNA and actin loci. Exp Parasitol. 2015;151–152:21–7. doi: 10.1016/j.exppara.2015.02.001
  242. Grinberg A, Widmer G. *Cryptosporidium* within-host genetic diversity: systematic bibliographical search and narrative overview. Int J Parasitol. 2016;46(8):465–71. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.03.002
  243. Zahedi A, Gofton AW, Jian F, Paparini A, Oskam C, Ball A, et al. Next Generation Sequencing uncovers within-host differences in the genetic diversity of *Cryptosporidium* gp60 subtypes. Int J Parasitol. 2017;47(10–11):601–7. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.03.003
  244. Widmer G, Köster PC, Carmena D. *Cryptosporidium hominis* infections in non-human animal species: revisiting the concept of host specificity. Int J Parasitol. 2020;50(4):253–62. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.01.005
  245. HEDRICK PW. Genetics of Populations. Fourth Edi. China: Jones and Bartlett Publishers; 2010. 704 p.
  246. Fontdevila A, Moya A. Introducción a la genética de poblaciones. First Edit. España: Editorial Síntesis, S. A.; 2007. 349 p.
  247. Futuyama DJ. Evolutionary Biology. Sinauer Associates, Sunderland. Third edit. Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland; 1998.
  248. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(10):4348–43488.
  249. Smith JM, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. Bioessays. 2000;22(12):1115–22.
  250. Tanriverdi S, Grinberg A, Chalmers RM, Hunter PR, Petrovic Z, Akiyoshi DE, et al. Inferences about the global population structures of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. Appl Environ Microbiol. 2008;74(23):7227–34. doi: 10.1128/AEM.01576-08
  251. Mallon ME, MacLeod A, Wastling JM, Smith H, Tait A. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: Population genetics and sub-structuring. Infect Genet Evol. 2003;3(3):207–18. doi: 10.1016/S1567-1348(03)00089-3
  252. Drumo R, Widmer G, Morrison LJ, Tait A, Grelloni V, D'Avino N, et al. Evidence of host-associated populations of *Cryptosporidium parvum* in Italy. Appl Environ Microbiol. 2012;78(10):3523–9. doi: 10.1128/AEM.07686-11
  253. 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;78(22):8096–101. doi: 10.1128/AEM.02105-12
  254. de Waele V, Van den Broeck F, Huyse T, McGrath G, Higgins I, Speybroeck N, et al. Panmictic

- structure of the *Cryptosporidium parvum* population in irish calves: Influence of prevalence and host movement. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(8):2534–41. doi: 10.1128/AEM.03613-12
255. Ramo A, Monteagudo L V., Cacho E Del, Sánchez-Acedo C, Quílez J. Intra-species genetic diversity and clonal structure of *Cryptosporidium parvum* in sheep farms in a confined geographical area in northeastern Spain. *PLoS One.* 2016;11(5):1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0155336
  256. Ramo A, Quílez J, Monteagudo L, Del Cacho E, Sánchez-Acedo C. Intra-species diversity and panmictic structure of *Cryptosporidium parvum* populations in cattle farms in Northern Spain. *PLoS One.* 2016;11(2):1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0148811
  257. Quílez J, Vergara-Castiblanco C, Monteagudo L, del Cacho E, Sánchez-Acedo C. Multilocus fragment typing and genetic structure of *Cryptosporidium parvum* isolates from diarrheic preweaned calves in Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(21):7779–86. doi: 10.1128/AEM.00751-11
  258. Quílez J, Vergara-Castiblanco C, Monteagudo L, Cacho E, Sánchez-Acedo C. Host association of *Cryptosporidium parvum* populations infecting domestic ruminants in Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(17):5363–71. doi: 10.1128/AEM.01168-13
  259. Feng Y, Yang W, Ryan U, Zhang L, Kváč M, Koudela B, et al. Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):34–41. doi: 10.1128/JCM.01329-10
  260. Liu A, Zhang J, Zhao J, Zhao W, Wang R, Zhang L. The first report of *Cryptosporidium andersoni* in horses with diarrhea and multilocus subtype analysis. *Parasites and Vectors.* 2015;8(1):2–5. doi: 10.1186/s13071-015-1102-0
  261. Galvan AL, Garcia GM, Alzate JF. Detección y caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp., en población infantil inmunocompetente del área metropolitana del valle de Aburrá., Universidad de Antioquia, Proyecto CODI, CIMB-119-2015; 2015.
  262. Galvan-Diaz AL, Bedoya-Urrego K, Medina-Lozano A, Uran-Velasquez J, Alzate JF, Garcia-Montoya G. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in children attending day-care centers in Medellín , Colombia. *Parasitol Res.* 2020;1–7. doi: 10.1007/s00436-020-06782-5
  263. Farfán-García AE, Zhang C, Imdad A, Arias-Guerrero MY, Sánchez-Alvarez NT, Shah R, et al. Case-Control Pilot Study on Acute Diarrheal Disease in a Geographically Defined Pediatric Population in a Middle Income Country. *Int J Pediatr.* 2017;2017:1–10. doi: 10.1155/2017/6357597
  264. Galvan AL, Garcia GM, Alzate JF. Estudio de prevalencia, diversidad genética y genómica de *Cryptosporidium* en población VIH positiva de Antioquia. Universidad de Antioquia, Proyecto Colciencias 117-77757608; 2017.
  265. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(8):2461–70. doi: 10.1128/AEM.02272-07.
  266. 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;65(4):1578–83.
  267. Rojas-Lopez L, Elwin K, Chalmers RM, Enemark HL, Beser J, Troell K. Development of a gp60-subtyping method for *Cryptosporidium felis*. *Parasites and Vectors.* 2020;13(1):1–8. doi: 10.1186/s13071-020-3906-9
  268. Yang X, Huang N, Jiang W, Wang X, Li N, Guo Y, et al. Subtyping *Cryptosporidium ryanae*: A common pathogen in bovine animals. *Microorganisms.* 2020;8(8):1–11. doi: 10.3390/microorganisms8081107

269. 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;41(6):2744–7. doi: 10.1128/JCM.41.6.2744.
270. Stensvold CR, Beser J, Axén C, Lebbad M. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2311–9. doi: 10.1128/JCM.00598-14
271. Hotchkiss EJ, Gilray JA, Brennan ML, Christley RM, Morrison LJ, Jonsson NN, et al. Development of a framework for genotyping bovine-derived *Cryptosporidium parvum*, using a multilocus fragment typing tool. *Parasites and Vectors.* 2015;8(1):1–11. doi: 10.1186/s13071-015-1107-8
272. Vázquez, E., Castañeda, S., Garrido, T., Gutiérrez T. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Rev Chil Hist Nat.* 2009;82:277-297.
273. Vázquez-Domínguez E, Domínguez-Domínguez E. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Anim Biodivers Conserv.* 2009;32.1:48.
274. Avise JC. Phylogeography: Retrospect and prospect. *J Biogeogr.* 2009;36(1):3–15. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
275. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science* (80- ). 2000;287(5452):443–9. doi: 10.1126/science.287.5452.443
276. Fernando-Rodríguez E. The jump of the species barrier in the growing emergency of zoonoses. *An Ranm.* 2018;135(02):136–40. doi: 10.32440/ar.2018.135.02.rev04
277. Nader JL, Mathers TC, Ward BJ, Pachebat JA, Swain MT, Robinson G, et al. Evolutionary genomics of anthroponosis in *Cryptosporidium*. *Nat Microbiol.* 2019;4(5):826–36. doi: 10.1038/s41564-019-0377-x
278. Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, et al. Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Front Microbiol.* 2017;8(248):1–14. doi: 10.3389/fmicb.2017.00248
279. Leoni F, Mallon ME, Smith H V., Tait A, McLauchlin J. Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* isolates from sporadic livestock cases in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3286–94. doi: 10.1128/JCM.02536-06
280. Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, et al. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(10):1567–74. doi: 10.3201/eid1410.071273
281. Cacciò SM, Chalmers RM. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(6):471–80. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.021
282. Squire SA, Ryan U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasites and Vectors.* 2017;10(1):1–32. doi: 10.1186/s13071-017-2111-y
283. King P, Tyler KM, Hunter PR. Anthroponotic transmission of *Cryptosporidium parvum* predominates in countries with poorer sanitation: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):1–13. doi: 10.1186/s13071-018-3263-0
284. Widmer G, Sullivan S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunol.* 2012;34(2–3):61–71. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01301.x
285. Tørresen OK, Star B, Mier P, Andrade-Navarro MA, Bateman A, Jarnot P, et al. Tandem repeats lead to sequence assembly errors and impose multi-level challenges for genome and protein databases. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(21):10994–1006. doi: 10.1093/nar/gkz841
286. Ye J., Xiao L., Ma J., Guo M., Liu L. FY. Anthroponotic enteric parasites in monkeys in public

- park, China. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(10):1640–3. doi: 10.3201/eid1810.120653
287. Kong S, Sánchez-Pacheco SJ, Murphy RW. On the use of median-joining networks in evolutionary biology. *Cladistics.* 2016;32(6):691–9. doi: 10.1111/cla.12147
288. Widmer G. Meta-analysis of a polymorphic surface glycoprotein of the parasitic protozoa *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Epidemiol Infect.* 2009;137(12):1800–8. doi: 10.1017/S0950268809990215

## 10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla. Códigos de acceso para cada una de las secuencias depositadas en el GenBank

| Código Muestras  | Especie               | 18S rRNA | gp60     | CP47     | MS5      | MS9      | MSC6-7   | TP14     |
|--|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>22 muestras incluidas en los análisis MLST</b>  |                       |          |          |          |          |          |          |          |
| NA2  | <i>C. hominis</i>     | MN661182 | MN661177 | MT292559 | MT152384 | MT009633 | MT113935 | MT118815 |
| NA4  | <i>C. hominis</i>     | MN661183 | MN661178 | MT292560 | MT152385 | MT009634 | MT113936 | MT118816 |
| NA6  | <i>C. hominis</i>     | MN661185 | MN661180 | MT304857 | MT252991 | MT009635 | MT025008 | MT118817 |
| NA7  | <i>C. hominis</i>     | MN661186 | MN688137 | MT304858 | MT223181 | MT009636 | MT025009 | MT240802 |
| NA8  | <i>C. hominis</i>     | MT648487 | MN984300 | MT292563 | MT152387 | MT009637 | MT113938 | MT118818 |
| NA9  | <i>C. hominis</i>     | MT648488 | MN984301 | MT292565 | MT162478 | MT009638 | MT025010 | MT118819 |
| NA10   | <i>C. hominis</i>     | MT648489 | MN984302 | MT292566 | MT162479 | MT009639 | MT025011 | MT118820 |
| NS2  | <i>C. parvum</i>      | MT648477 | MT009624 | MT341584 | MT180459 | MT025000 | MT137333 | MT103364 |
| NS3  | <i>C. parvum</i>      | MT648478 | MT009625 | MT341585 | MT180460 | MT025001 | MT137334 | MT103365 |
| NS4  | <i>C. parvum</i>      | MT648479 | MT009628 | MT341586 | MT180461 | MT025002 | MT137335 | MT103366 |
| NS5  | <i>C. parvum</i>      | MT648480 | MT024996 | MT341587 | MT180462 | MT025003 | MT137336 | MT103367 |
| NS7  | <i>C. parvum</i>      | MT648481 | MT009626 | MT341588 | MT180463 | MT025004 | MT137337 | MT103368 |
| NS8  | <i>C. hominis</i>     | MT648490 | MN984298 | MT292564 | MT223182 | MT009640 | MT025012 | MT118821 |
| NS9  | <i>C. hominis</i>     | MT648491 | MT009623 | MT311158 | MT263150 | MT009641 | MT025013 | MT118822 |
| NS10   | <i>C. hominis</i>     | MT648492 | MT024997 | MT314432 | MT162480 | MT009642 | MT272827 | MT118823 |
| VA1  | <i>C. hominis</i>     | MT648493 | MN984299 | MT292562 | MT162476 | MT009629 | MT025006 | MT118811 |
| VA2  | <i>C. parvum</i>      | MT648482 | MT024994 | MT345597 | MT372487 | MT375485 | MT407457 | MT425057 |
| VA3  | <i>C. parvum</i>      | MT648483 | MT009627 | MT353685 | MT247675 | MT024999 | MT137331 | MT103363 |
| VA4  | <i>C. hominis</i>     | MT648494 | MT024998 | MT333777 | MT152381 | MT009630 | MT270452 | MT118812 |
| VA5  | <i>C. parvum</i>      | MT648484 | MT024995 | MT341583 | MT247676 | MT025005 | MT137332 | MT103369 |
| VA6  | <i>C. hominis</i>     | MT648495 | MN984303 | MT292567 | MT152382 | MT009631 | MT113933 | MT118813 |
| VA7  | <i>C. hominis</i>     | MT648496 | MN984304 | MT292568 | MT162477 | MT009632 | MT025007 | MT118814 |
| <b>Muestras que no amplificaron con al menos uno de los marcadores por lo que se excluyeron de los análisis MLST</b> |                       |          |          |          |          |          |          |          |
| NA1  | <i>C. hominis</i>     | MN661181 | MN661176 | MT292558 | MT152383 | NA       | MT113934 | MT240800 |
| NA5  | <i>C. hominis</i>     | MN661184 | MN661179 | MT292561 | MT152386 | NA       | MT113937 | MT240801 |
| NA3  | <i>C. meleagridis</i> | MN661187 | MN746323 | -        | -        | -        | -        | -        |
| NS1  | <i>C. felis</i>       | MT648500 | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| NS6  | <i>C. suis</i>        | MT645275 | -        | -        | -        | -        | -        | -        |
| VA8  | <i>C. felis</i>       | MT648501 | -        | -        | -        | -        | -        | -        |

\*NA: marcador con el que no se obtuvo amplificación, por tanto, no hay secuencia.

## 11. AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Máter, por ser casa, por permitirme ser y crecer. A las directivas y personal de la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas-CCBB y la Corporación Académica para el Estudio de las Patologías Tropicales - CAEPT, gracias por su disposición y diligencia siempre oportuna. A la Corporación para las Investigaciones Biológicas- CIB y el Hospital La María de Medellín, gracias por ayudarnos en la búsqueda de pacientes para este trabajo. A Colciencias, entidad financiera de este proyecto (código 1115-777-57608) (264).

A mi tutora, Dra. Gisela García Montoya, gracias por el acompañamiento, criterio, confianza y paciencia durante este proceso, por cada consejo, por cada situación vivida; de todo esto he sacado un aprendizaje que tendré siempre presente. A los miembros del comité tutorial, Dra. Ana Luz Galván, Dra. Angela Magnet y Dr. Juan Fernando Alzate, gracias por el conocimiento compartido para llevar a cabo este trabajo; fue muy valioso y enriquecedor académicamente, tener diferentes puntos de vista. A los miembros del grupo de Parasitología y el Centro Nacional de Secuenciación Genómica - CNSG, gracias por recibirme en sus laboratorios, por compartir jornadas académicas y de esparcimiento. A la Dra. Ana Elvira Farfán, gracias por facilitar y permitirnos llevar a cabo un trabajo conjunto con su grupo. Al Dr. Winston Rojas, gracias por brindarme asesorías, tiempo y conocimiento en pro de este trabajo.

A mis compañeros de maestría y ahora amigos, que fortuna encontrar personas como ustedes, compartir sueños, metas y contar con su apoyo. A Cristian Vera y Juan Pablo Isaza, gracias por escucharme, brindarme sus consejos, por compartir sus conocimientos y experiencias de vida. A otras tantas personas especiales que no alcanzo a mencionar, gracias por compartir, por su apoyo, por estar pendientes y por motivar.

A Camilo, a ti infinitas gracias por ser, por estar, por creer, por crecer, por querer. Y finalmente, pero no menos importante, a mi familia. A mi madre y abuela, que siempre serán motivo para querer avanzar y mi apoyo fundamental. A todos aquellos que sé, estarían felices de ver cada logro alcanzado.