

Determinación de la presencia de *Cryptosporidium* spp., en murciélagos procedentes de la cueva Macaregua, Santander, Colombia.

Juliana Noriega Noriega

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

Bacterióloga

Directora:

Rubiela Castañeda Salazar. M.V., MSc

Codirectora:

Claudia Liliana Cuervo Patiño. Biol., PhD.

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

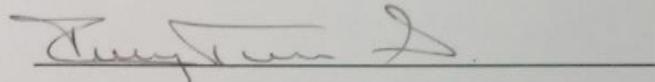
Carrera de Bacteriología

2019

Determinación de la presencia de *Cryptosporidium* spp., en murciélagos
procedentes de la cueva Macaregua, Santander, Colombia.

JULIANA NORIEGA

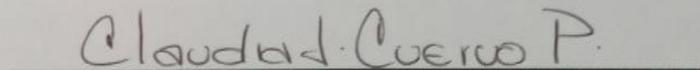
APROBADO



Rubiela Castañeda Salazar. M.V., MSc

Facultad de Ciencias

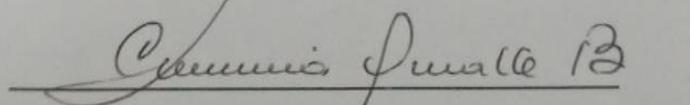
Directora



Claudia Liliana Cuervo Patiño Biol., PhD.

Facultad de Ciencias

Codirectora



Clemencia Ovalle Bact., Ph.D

Facultad de Ciencias

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, porque estoy segura que sin toda la fortaleza que puso en mi cada día para continuar plantándole cara a las dificultades que se me presentaban nada de esto habría sido posible. También a mi familia, que ha sido un motor importante para continuar luchando por mis sueños y enfrentar las dificultades con paciencia y valentía.

Al Semillero de Enfermedades Infecciosas Veterinarias y Zoonosis, por el apoyo y ser prácticamente mi casa desde el primer momento en el que llegué, especialmente a la profesora Rubiela Castañeda, que como mi Directora y más que eso siempre estuvo atenta a cada detalle, dándome ánimos para continuar con toda la dedicación y empeño. Igualmente, a la profesora Adriana Pulido, que siempre estuvo pendiente de mi proceso y aportó de manera importante a mi crecimiento profesional y personal.

Al Semillero de Inmunoparasitología Molecular en primera instancia por poner a mi disposición su laboratorio para realizar la parte experimental de mi proyecto, y claramente a todos sus integrantes por estar siempre abiertos a cualquier inquietud que se me presentara, darme ánimos y ayudar a que todos los días creciera en el ámbito académico y personal. Especialmente a la profesora Claudia Cuervo que como mi Co-Directora, siempre estuvo pendiente de mi proceso y con el ánimo de que aprendiera y creciera me retó a hacer cosas que no creía posibles.

A mis amigos de toda la vida y a los que he ido conociendo a lo largo de mi estadía en la universidad, los cuales siempre estuvieron pendientes que todo en el proceso estuviera bien y si por alguna razón se tornaban mal ahí estaban para apoyarme y brindarme cariño, sin ellos el proceso habría sido totalmente diferente.

A Kiseis de Jesús Narváz que como mi acompañante espiritual supo brindarme herramientas para enfrentar momentos difíciles, pero también para agradecer los momentos alegres y felices. A a todas las hermanas de la congregación Religiosas del Apostolado, por el ánimo y las oraciones que todo el tiempo hicieron por mí para que el resultado de todo este proceso fuera excelente.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
1. Introducción	8
2. Planteamiento del problema y justificación	9
3. Marco teórico	11
3.1 Generalidades.....	11
3.2 Ciclo de vida.....	11
3.3 Patogénesis	13
3.4 Sintomatología	14
3.5 Diagnóstico	15
3.6 Presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp. en murciélagos	18
3.7 Cueva Macaregua, Santander, Colombia	19
3.8 Criptosporidiosis en Colombia.....	20
3.9 Implicaciones en salud pública.....	21
4. Objetivos.....	23
4.1 Objetivo general.....	23
5. Metodología.....	23
5.1 Tipo de estudio: Estudio descriptivo/ experimental	23
5.2 Población de estudio y muestras	23
5.3 Extracción de ADN.....	24
5.4 Reacción de la cadena polimerasa (PCR) para el gen <i>cyt b</i>	24
5.5 PCR para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	24
5.6 PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.	25
6. Resultados y Discusión.....	26
6.1 Población de estudio y muestras	26
6.2 PCR para la detección del gen <i>Cyt b</i>	26
6.3 PCR para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	28
7. Conclusiones	34
8. Perspectivas.....	34
9. Bibliografía.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de transmisión criptosporidiosis	12
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	13
Figura 3. Mecanismo de patogénesis.....	14
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la PCR dirigida al gen Cyt b.....	27
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de las diluciones 1/10 y 1/20 de los productos PCR dirigida al gen Cyt b.	28
Figura 6. Curva de disociación. Temperatura de fusión de algunas de la muestra (MT 155) positiva para <i>Cryptosporidium</i> spp., utilizada como control positivo.	29
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa para los productos obtenidos mediante la qPCR.....	30
Figura 8. Curva de disociación. Temperatura de fusión de algunas de las muestras positivas para <i>Cryptosporidium</i> spp.	31
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa para los productos obtenidos mediante la qPCR.....	31
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para los productos obtenidos mediante la qPCR.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de <i>Cryptosporidium</i> spp. en murciélagos.....	18
Tabla 2. Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> spp., en diferentes regiones de Colombia.	21
Tabla 3. Presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp. en diferentes fuentes hídricas en Colombia.	23
Tabla 4. Cebadores y condiciones de reacción para la PRC semianidada	24
Tabla 5. Concentración de los reactivos para cada reacción de qPCR para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.	25
Tabla 6. Población de estudio según la especie, género y hábito alimenticio.	26
Tabla 7. Resultados de la Ct, Tm de la muestras (MT 155) que resultó positiva para la presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp.	29
Tabla 8. Resultados de la Ct, Tm y electroforesis de las muestras evaluadas que resultaron positivas para la presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp.	30
Tabla 9. Murciélagos positivos para <i>Cryptosporidium</i> spp.	32

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Positividad para <i>Cryptosporidium</i> spp. según especie y género.....	33
---	----

RESUMEN

Las enfermedades zoonóticas, son enfermedades que se transmiten entre animales y humanos por contacto directo o indirecto (OIE, 2019). Se ha reportado que un 60% de los agentes infecciosos son zoonóticos y que el 75% de las enfermedades infecciosas emergentes son de origen animal (OIE, 2019), estas enfermedades pueden ser causadas por virus, bacterias, hongos o parásitos, entre estos últimos encontramos a *Cryptosporidium* spp., parásito protozoo intracelular obligado, perteneciente al *phylum* apicomplexa agente causal de la criptosporidiosis, una enfermedad diarreica de gran importancia a nivel de salud pública debido a que se han presentado múltiples brotes a nivel mundial; dentro de las principales especies de *Cryptosporidium* que se han reportado como causantes de criptosporidiosis en humanos están *C. parvum* y *C. hominis*. Por otro lado, se ha demostrado que los animales silvestres, incluyendo a los murciélagos, son reservorios de una amplia variedad de agentes infecciosos entre los cuales se ha reportado la presencia de *C. hominis* y *C. parvum*, por lo que teniendo en cuenta su migración a zonas urbanas y periurbanas, es necesario evaluar su posible papel en la transmisión de esta enfermedad a los humanos. Por tanto, el objetivo de este trabajo, fue determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp., en murciélagos procedentes de la cueva Macaregua, Santander, Colombia. Para lo cual se seleccionaron 80 muestras de intestino de murciélagos de las especies *Carollia perspicillata*, *Natalus tumidirostris* y *Mormoops megalophylla* procedentes de esta cueva. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN de los intestinos seleccionados y se realizó una PCR para el gen de citocromo b (Cyt-b) con el fin de verificar la calidad del ADN extraído. Luego de esto se procedió a realizar una PCR semianidada para el gen ARNr 18S con el fin de verificar la presencia de *Cryptosporidium* spp, en el ADN extraído, sin embargo, mediante esta prueba no fue posible visualizar la banda esperada para *Cryptosporidium* spp., por lo cual, se decidió realizar una PCR en tiempo real (qPCR) para el gen ARNr 18S con el fin de confirmar o descartar la presencia del parásito. Como resultado, de las 80 muestras de ADN extraídas, el 78,75% (n=63), resultaron positivas para el gen de Citocromo b (Cyt-b), en la PCR semianidada no se detectó positividad, mientras que en la qPCR se identificaron 5 muestras positivas. Se determinó entonces la presencia de *Cryptosporidium* spp., en el 7,94% del total de las muestras analizadas, sin embargo, es necesario continuar con estudios que permitan dilucidar las especies de *Cryptosporidium* presentes en los murciélagos y de esta forma contribuir a entender el papel que los murciélagos tienen en la diseminación y transmisión de *Cryptosporidium* a los humanos y a otros animales como los domésticos o de granjas.

1. Introducción

Las enfermedades zoonóticas se definen como todas aquellas patologías infecciosas transmitidas por contacto directo o indirecto entre animales y el hombre o viceversa. Se conoce que aproximadamente el 60% de los agentes infecciosos son zoonóticos y que el 75% de las enfermedades infecciosas emergentes provienen de animales (OIE, 2019). Estas enfermedades, pueden ser causadas por virus, bacterias, hongos o parásitos; entre estos últimos encontramos a *Cryptosporidium* spp., parásito causante de la criptosporidiosis, una enfermedad diarreica de gran importancia a nivel de salud pública (CDC, 2017) tanto en países desarrollados como en países subdesarrollados, debido a que produce cuadros de diarrea aguda en pacientes inmunocompetentes (Dixon *et al.*, 2001) y se comporta como agente oportunista en pacientes inmunocomprometidos (Checkley *et al.*, 2014). *Cryptosporidium* spp., se transmite de diferentes formas, siendo la más frecuente a través del consumo de alimento o agua contaminados con heces de animales o humanos que contienen los ooquistes (forma infectante) del parásito (Titilincu *et al.*, 2010). Las especies de *Cryptosporidium* que se han reportado en casos de criptosporidiosis en humanos son *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. viatorum*, *C. felis*, y *C. canis* (Schiller *et al.*, 2016). Sin embargo, a lo largo del tiempo se ha determinado la presencia de otras especies de este parásito en humanos como los son *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, y *C. cuniculus* (Schiller *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha demostrado que los animales silvestres especialmente los murciélagos son reservorios de una amplia variedad de agentes infecciosos (Murakoshi *et al.*, 2016), entre los cuales se han reportado las especies *C. parvum* y *C. hominis* que como ya se mencionó, son las principalmente asociadas a enfermedad en el humano (Kváč *et al.*, 2015; Schiller *et al.*, 2016) y varios genotipos de *Cryptosporidium* como *Cryptosporidium* genotipo de murciélago II, aún sin identificar a nivel de especie (Wang *et al.*, 2013). También se sabe que estos animales continuamente están migrando a zonas urbanas y periurbanas, lo cual podría sugerir la posibilidad de transmisión del parásito a los humanos mediante, por ejemplo, la posible contaminación de fuentes hídricas con materia fecal de estos animales (Pérez *et al.*, 2015).

Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue determinar, mediante técnicas moleculares, la presencia de *Cryptosporidium* spp. en 3 especies de murciélagos procedentes de la cueva Macaregua, Santander, Colombia, con el fin de conocer el posible papel que pueden estar desempeñando en el ciclo de transmisión y diseminación del parásito.

2. Planteamiento del problema y justificación

La criptosporidiosis es una enfermedad zoonótica causada por el protozoo parásito *Cryptosporidium* spp., el cual afecta una amplia variedad de hospederos incluyendo insectos, aves y mamíferos (Fayer & Xiao, 2008). El principal mecanismo de transmisión al humano ocurre mediante la ingestión de ooquistes a través de agua o alimentos contaminados con materia fecal de animales infectados y/o portadores o de humanos (Fayer *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2004; Romich 2008; Dixon *et al.*, 2011).

La infección en humanos puede ocurrir a cualquier edad siendo más común en personas jóvenes, con variadas manifestaciones clínicas que van desde asintomáticos hasta cuadros diarreicos agudos (Tzipori and Ward 2002) y en algunos casos se puede presentar mortalidad en personas inmunocomprometidas con cuadros graves de diarrea (Fayer *et al.*, 1998; Lujan & Garbossa, 2008; Del Coco *et al.*, 2009).

Actualmente se han descrito 31 especies de *Cryptosporidium* spp., de las cuales aproximadamente 20 han sido reportadas en humanos, siendo las más frecuentes *Cryptosporidium Hominis* (*C. Hominis*) y *Cryptosporidium Parvum* (*C. Parvum*) (Ryan & Xiao, 2014; Ryan *et al.*, 2016). Algunas especies reportadas en animales domésticos son *C. felis* en gatos y *C. canis* en perros; en animales de producción: *C. parvum* en terneros, corderos, equinos y caprinos, *C. nasorum* en peces, *C. meleagridis* y *C. baileyi* en aves, *C. wairii* en cobayos, así como en animales silvestres, *C. serpentis* en reptiles (Fayer *et al.*, 2000; Santin, 2013), en el caso de los murciélagos se han detectado diferentes especies de *Cryptosporidium* spp., que se han descrito como: *Cryptosporidium genotipo murciélago I a XVIII* (Dubey *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1999; and Ziegler *et al.*, 2007), adicionalmente, de manera interesante, en estos mamíferos también se ha reportado la presencia de *C. parvum* y *C. hominis* (Kvác *et al.*, 2015; Schiller *et al.*, 2016), los cuales afectan comúnmente a los humanos, lo cual los convierte en potenciales transmisores y diseminadores de este patógeno al hombre (Wang *et al.*, 2013; Kvác *et al.*, 2015; Murakoshi *et al.*, 2016; Murakoshi *et al.*, 2018; Batista, *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

Los murciélagos, son uno de los grupos de mamíferos más abundantes en el mundo, pueden habitar diferentes lugares como zonas boscosas, cavidades de árboles, grietas, galerías de minas abandonadas, construcciones humanas, hojas de árboles y cuevas (Rodríguez *et al.*, 2014), además, debido a la capacidad de vuelo que tienen, esto les permite transportar y dispersar más fácilmente diferentes agentes infecciosos (Calisher *et al.*, 2006).

Uno de los hábitats para esta especie en el país es la cueva Macaregua, ubicada en el municipio de Curití, departamento de Santander, ésta fue declarada como Sitio Importante para la Conservación de Murciélagos (SICOM) por la Red

Latinoamericana para la Conservación de Murciélagos (RELCOM), ya que es el sitio en el que actualmente se encuentra la mayor cantidad de especies de este mamífero en Colombia, con alrededor de 10, pertenecientes a las familias Phyllostomidae, Vespertilionidae, Mormoopidae y Natalidae (Pérez *et al.*, 2015).

En Colombia y a nivel mundial, las cuevas se encuentran constantemente amenazadas por parte del ser humano (Rodríguez *et al.*, 2014), debido a diversas prácticas como la espeleología, el turismo, la deforestación de los ecosistemas, la urbanización, que cada día están haciendo que los murciélagos tengan que emigrar a zonas urbanas y periurbanas (Pérez *et al.*, 2015), y al hacerlo se convierten en un factor de riesgo para el ser humano, ya que como se mencionó previamente pueden dispersar agentes infecciosos; adicionalmente, prácticas como la espeleología hacen que las personas estén en riesgo de adquirir agentes patógenos, como *Cryptosporidium* spp, entre otros, teniendo en cuenta el papel de reservorio que tienen los murciélagos para este agente y la exposición de los humanos a la materia fecal de estos animales (Alvarado, 2006).

Por otra parte, debido a que los murciélagos tienen capacidad de adaptarse muy rápido a diferentes ecosistemas y se ha determinado que pueden vivir en lugares como los techos de las casas y convertirlos en su hábitat (Pérez *et al.*, 2015), esto hace que las personas estén mucho más expuestas a ellos, convirtiéndose entonces en una amenaza a nivel de salud pública, potenciando las vías de transmisión de la criptosporidiosis y afectando de esta forma la calidad de vida de las personas, lo que genera costos adicionales derivados de la atención médica y del tratamiento requerido para la infección, además se aumentan las tasas de morbilidad y mortalidad de las poblaciones más vulnerables como los pacientes inmunocomprometidos, los pacientes en estado de desnutrición, o los niños (Tzipori and Ward, 2002).

En Colombia solamente hay un reporte acerca de la presencia de *Cryptosporidium* spp., en murciélagos (Fajardo, 2018). Por tanto, Teniendo en cuenta las implicaciones de este protozoo en la salud pública y los reportes sobre la presencia de especies zoonóticas en murciélagos, junto con la existencia de diferentes especies de este mamífero en Santander, es necesario determinar el papel que están jugando estos animales en la posible diseminación del parásito en la zona de estudio.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, este estudio será la base para la realización de investigaciones posteriores, que puedan llegar a establecer la(s) especie(s) de *Cryptosporidium* presente(s) en los murciélagos, y que con esto se pueda indagar sobre su papel en la posible transmisión de este agente infeccioso a los humanos.

Esta información, a futuro permitirá a las entidades de Salud Pública, establecer medidas de prevención para las personas que puedan estar en contacto directo o indirecto con los murciélagos y/o sus heces, de tal manera que no se infecten y

con esto disminuir las fuentes de contagio, las tasas de morbilidad, mortalidad y los gastos en el tratamiento derivado de la presentación de la enfermedad.

3. Marco teórico

3.1 Generalidades

Cryptosporidium spp. es un parásito protozooario, perteneciente al *phylum* Apicomplexa clase Sporozoasida, subclase Coccidiasina, orden Eucoccidiida y suborden Eimeriina (Rojas, 2012). Es un parásito intracelular obligado, que fue descrito por primera vez por Edward Tyzzer en 1907 en glándulas gástricas de un ratón (Tyzzer, 1907); afecta una amplia variedad de hospederos incluyendo aves, peces, reptiles, anfibios y mamíferos (Fayer & Xiao, 2008). Su forma infectante es el ooquiste que contiene 4 esporozoitos en su interior, la mayoría de ooquistes tienen forma elíptica o esférica y poseen características morfológicas importantes como la doble pared, la cual les confiere tanto resistencia frente a agentes químicos que usualmente se utilizan para el mantenimiento y potabilización de las aguas, como la capacidad de permanecer en el ambiente por largos periodos de tiempo como semanas o meses (CDC, 2017).

Cada ooquiste mide aproximadamente entre 4 - 6 μm de diámetro, tamaño que le permite atravesar la mayoría de filtros utilizados en las plantas de tratamiento de agua (García *et al.*, 2004). Adicionalmente, este parásito presenta reproducción tanto asexual como sexual y contiene 8 cromosomas con uno de los genomas más pequeños entre los microorganismos unicelulares (Rodríguez & Royo, 2001). Las principales especies del género *Cryptosporidium* son *C. parvum* y *C. hominis*, las cuales son responsables de más del 90% de casos de criptosporidiosis en humanos (Chalmers *et al.*, 2011).

3.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida este parásito, inicia cuando el hospedero ingiere el ooquiste, que como ya se mencionó es la forma infectante del parásito, la principal vía de transmisión es la fecal-oral mediante la ingestión de alimento o agua contaminados con heces de animales o humanos que están eliminando las formas infecciosas (Figura 1) (Xiao & Feng, 2008); adicionalmente se han reportado casos de transmisión por inhalación en pacientes inmunocomprometidos, niños y algunos animales (Rojas, 2012; Bouzid *et al.*, 2013).

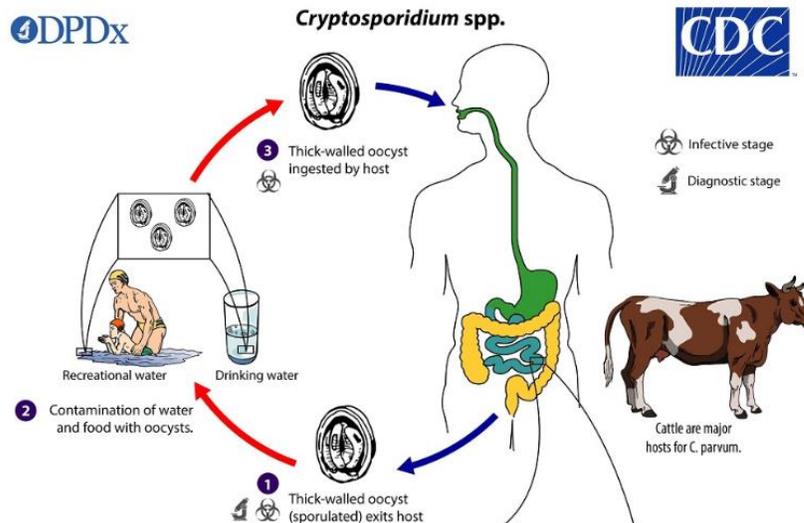


Figura 1. Vías de transmisión criptosporidiosis

Tomado de: <https://www.cdc.gov/dpdx/criptosporidiosis/index.html>

Después de la ingestión del ooquiste, éste llega al duodeno en donde por acción de las sales biliares, las enzimas pancreáticas, el pH y la temperatura, esporula liberando los esporozoítos hacia la luz intestinal, éstos se adhieren a la membrana apical de la célula epitelial induciendo la reorganización de las moléculas de actina para formar una vacuola parasitófora dando lugar a una interfase hospedero-parásito, con localización intracelular pero extracitoplasmática, allí los esporozoítos pasan a ser trofozoítos, a partir de los cuales se transforma (por merogonia) en Meronte tipo 1 que contiene 8 merozoítos, que se reproducen asexualmente, son liberados e ingresan a los enterocitos adyacentes para formar nuevos merontes tipo I o merontes tipo II que contienen 4 merozoítos. A partir de este momento inicia la fase sexual en donde los merozoítos liberados parasitan a otras células epiteliales e inician el proceso de gametogonia con la formación de microgametos (masculino) y macrogametos (femenino) (Bouزيد *et al.*, 2013), se producirá entonces la fertilización y se dará lugar a un cigoto el cual va a producir ooquistes de pared gruesa, que serán liberados junto con las heces del hospedero y son los responsables de que otras personas y/o animales se infecten mediante ingestión de alimentos o agua contaminados con ellos y, los ooquistes de pared delgada que están implicados en procesos de autoinfección, sin embargo el hecho de que este tipo de ooquiste permanezca en el organismo, depende del estado inmunitario del paciente, por lo cual se ha visto que el parásito

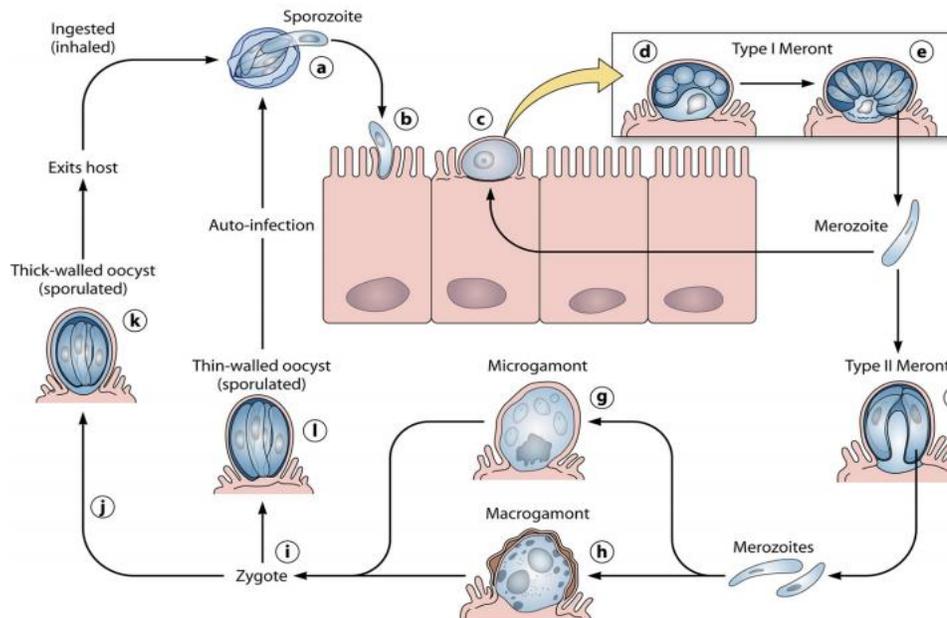


Figura 2. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

Tomado de: <https://cmr.asm.org/content/26/1/115>

afecta de una forma mucho más severa a pacientes inmunocomprometidos como por ejemplo pacientes VIH+ (Luján & Garbosa, 2008), o a pacientes trasplantados en los cuales se han reportado prevalencias que llegan a cifras de 8,4% (Ghoshal *et al.*, 2018).

3.3 Patogénesis

Después de la invasión de las células intestinales se produce atrofia y pérdida de vellosidades, junto con la pérdida de enterocitos, lo cual ocasiona en el paciente alteraciones en el proceso de absorción intestinal conduciéndolo a una diarrea que puede ser limitada o no, dependiendo de la cantidad de ooquistes ingeridos y el estado inmune del paciente (Foster and Smith, 2009).

La forma en la que el sistema inmune responde a esta enfermedad es mediante la respuesta tanto celular, como humoral, produciendo anticuerpos Ig G, Ig M, e incluso Ig E, adicionalmente se produce una infiltración de la lámina propia por células mononucleares como los linfocitos T y macrófagos dando lugar a inflamación, aumento en la permeabilidad y en algunos casos se puede llegar a producir diarrea por hipersecreción (Chen *et al.*, 2002). Es así como la diarrea que se presenta en la enfermedad se asocia a procesos de malabsorción e hipersecreción, en los cuales se considera que las prostaglandinas PGE₂ y Pgl₂ juegan un papel importante debido a que inducen un aumento en la secreción de iones (principalmente Cl⁻ o HCO₃⁻) e inhiben la absorción de NaCl⁻ adicionalmente la liberación del factor nuclear NFκB (Figura 3), está implicado en procesos inflamatorios en respuesta al parásito, sin embargo, al parecer este mismo factor promueve la supervivencia de las células infectadas lo que garantiza la

propagación del parásito en el hospedero (Chen *et al.*, 2002; Foster and Smith, 2009).

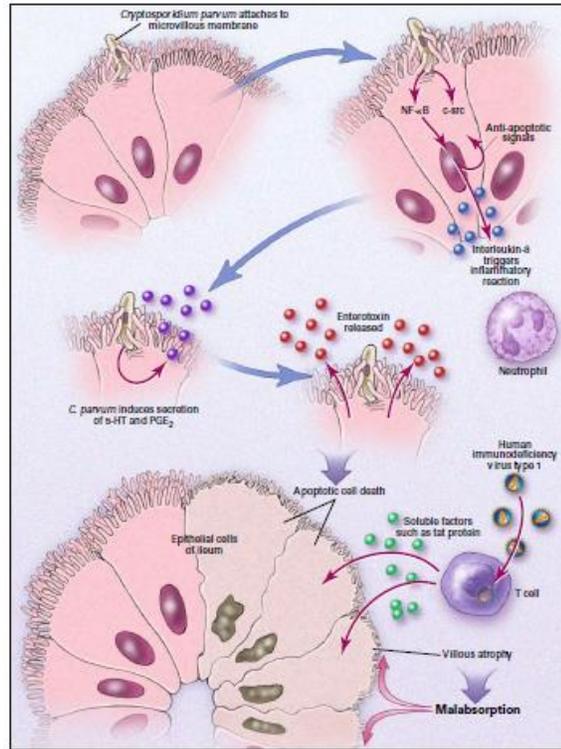


Figura 3. Mecanismo de patogénesis

Tomado de: www.nejm.org

3.4 Sintomatología

Las manifestaciones clínicas son variadas, entre las más comunes están diarrea acuosa, vómito, náuseas, dolor abdominal, desmayos, anorexia, pérdida de peso, deshidratación, entre otras; por lo general los signos y síntomas en personas inmunocompetentes son auto-limitados los cuales duran de 1 – 2 semanas (Chacín *et al.*, 2008); sin embargo, en personas inmunocomprometidas como pacientes desnutridos, positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), con cáncer y otras enfermedades, la gravedad de la infección depende del grado de deterioro del sistema inmunológico y las manifestaciones clínicas son mucho más severas produciendo diarreas prolongadas que pueden causar la muerte, incluso se han reportado casos en donde el parásito se disemina a otros

órganos como hígado, páncreas, tracto respiratorio, vesícula biliar y otros sitios extraintestinales (Fayer, 2004).

En murciélagos no se han reportado manifestaciones clínicas relacionadas con la enfermedad hasta el momento (Batista *et al.*, 2019).

3.5 Diagnóstico

Para el diagnóstico actualmente existen diferentes metodologías. En primer lugar, para facilitar la detección de los ooquistes del parásito, se utilizan muestras de materia fecal en fresco y se realiza la visualización microscópica; para mejorar la detección del parásito se utilizan técnicas de concentración como la sedimentación (García *et al.*, 2004).

- **Sedimentación:** Se utilizan entre 2 y 5 gr de heces (si la muestra es líquida se pipetea 750 ul de heces) las cuales se depositan en un tubo para centrifugar con 7 ml de formalina al 10%, posteriormente se mezcla muy bien la muestra y se filtra por medio de un tamiz y el filtrado se vuelve a depositar en otro tubo para centrifugar al cual se agregan 3 ml de acetato de etilo y se mezcla muy bien durante 30 segundos. Se lleva entonces el tubo a centrifugar a 1100 g durante 2 minutos y el sedimento se utiliza para la identificación de los ooquistes. Esta técnica no permite una visualización óptima de la presencia de los ooquistes en la muestra por lo cual se realiza la tinción de Zielh Neelsen modificada (OIE 2008; Pajuelo *et al.*, 2006)
- **Zielh Neelsen modificada:** A partir del sedimento recolectado, fijado y secado en una lámina portaobjetos, se procede a realizar la tinción con carbol fucsina durante 15 minutos, se enjuaga la lámina y se agrega metanol ácido al 1% durante 10 – 15 segundos y se enjuaga de nuevo, posteriormente se agrega fucsina fenicada fuerte durante 30 segundos, transcurrido este tiempo se decolora con alcohol – ácido, se enjuaga nuevamente la lámina y por último se agrega azul de metileno como colorante de contraste y se deja secar para su posterior visualización al microscopio. En esta tinción se espera observar los ooquistes de color rojo sobre un fondo verde (OIE, 2008).

Se ha indicado que el límite de detección por microscopía en heces no concentradas varía entre 1×10^4 y 5×10^4 ooquistes aumentando su sensibilidad al momento de realizar métodos de concentración como la sedimentación (Khurana *et al.*, 2018)

- **Inmunofluorescencia directa:** Se emplean anticuerpos anti-*Cryptosporidium* unidos a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) el cual reconoce epítopes de la superficie de los ooquistes del parásito, sin embargo, esta técnica no permite identificar en términos de especie. En esta prueba se tienen muy en encuentra los controles tanto positivos como negativos y se visualizan por medio del microscopio de fluorescencia (Fayer & Xiao 2008; Jex *et al.* 2008; OIE 2008; OIE 2018).

Para esta técnica se ha establecido una sensibilidad que se encuentra entre el 96 y 100% y una especificidad del 98.5 al 100% (Ahmed & Karanis 2018).

- **ELISA:** En el enzimoimmunoanálisis se detectan antígenos solubles de *Cryptosporidium* spp. en las heces, los cuales se denominan coproantígenos. Para esta prueba se usan anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, los cuales se encuentran en el fondo de los pocillos de la placa. Los anticuerpos anti – *Cryptosporidium* se encuentran conjugados a una enzima que en la mayoría de los casos es peroxidasa de rábano. Posteriormente se agrega un sustrato para que se acople a la enzima y finalmente una solución de parada para terminar la reacción. (Fayer & Xiao 2008; OIE 2018).
- **Inmunocromatografía:** Esta es una prueba rápida que permite la detección de antígenos de *Cryptosporidium* spp. y se basa en permitir que la muestra del paciente (suero) se movilice por un casete el cual tiene en su interior una membrana con anticuerpos fijos que van a reconocer los antígenos del parásito, si el resultado es positivo se va a reflejar con una banda de color rojo en la zona del test y control (Cisneros *et al.*, 2011; Fayer & Xiao 2008; OIE 2018).

Se ha descrito que la prueba de ELISA presenta un límite de detección que oscila entre 3×10^5 a 3×10^6 ooquistes/ ml y una especificidad del 98 % al 100%, al igual que la inmunocromatografía; aunque para esta última prueba la sensibilidad es mucho más baja (Khurana *et al.*, 2018)

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Esta técnica es mucho más sensible y específica, pues se basa en reconocer fragmentos específicos de genes del parásito; hoy en día es una de las técnicas de elección para su detección en diferentes muestras. Se ha descrito que el límite de detección de esta prueba se encuentra entre 1 y 10^6 ooquistes y además de su alta sensibilidad y especificidad permite esclarecer las vías de transmisión del parásito. Actualmente se han utilizado diferentes blancos para la identificación de *Cryptosporidium* spp. entre estos están los de menor variabilidad que son el gen de la subunidad menor del ARN

ribosomal (ADNr 18S), la proteína de la pared del ooquiste (COWP), la proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP-70), gP60, o el gen de la actina y los de mayor variabilidad como los genes de la β -tubulina o genes TRAP C1, C2 y C4. Para la detección de este parásito se realiza PCR semianidada, la cual tiene mayor sensibilidad y especificidad (Avendaño & Amaya, 2017; Batista *et al.*, 2019; OIE, 2018). En esta prueba, el objetivo principal es amplificar una secuencia específica de nucleótidos de *Cryptosporidium* spp., y sobre esta secuencia amplificada se realiza otra PCR que como su nombre lo indica, “anida”, el fragmento de ADN que ya estaba previamente amplificado. Esta técnica utiliza dos cebadores externos en la primer PCR y únicamente un cebador interno para la segunda PCR, para un total de 3 cebadores a diferencia de la PCR anidada que utiliza 4 (OIE, 2008).

Otra variación de esta técnica es la PCR en tiempo real o qPCR, la cual se basa en la medición de fluorescencia, para lo que se utilizan moléculas como SYBR GREEN o sondas, que tienen la capacidad de unirse al ADN bicatenario y emitir fluorescencia que aumenta a medida que la amplificación de ADN también lo hace. La fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de ADN bicatenario amplificado que haya en la muestra. En este caso, se utiliza una sonda, acoplada a 2 moléculas, un fluoróforo donador (reportero) y un fluoróforo aceptor (apagador). El fluoróforo donador, emite fluorescencia a una longitud de onda a la cual el fluoróforo aceptor es capaz de absorber toda esa fluorescencia cuando se encuentran cercanas. Cuando llega la DNA polimerasa, esta es capaz de hidrolizar también a la sonda y es de esta manera, como la molécula fluorescente emitirá fluorescencia libremente (Aguilera *et al.*, 2014), esta señal, es detectada por un termociclador especial que también permite cuantificar la cantidad de ADN amplificado (OIE, 2018).

La qPCR es una prueba altamente específica y sensible, ya que detecta de 1 a 10^7 equivalentes genómicos de la secuencia blanco (1 copia/uL) (Brechtbuehl *et al.* 2001), y no es necesario realizar electroforesis para visualizar el fragmento amplificado (Aguilera *et al.*, 2014). En esta técnica se tienen en cuenta 2 parámetros importantes:

La Ct o ciclo umbral, se refiere al número de ciclos que se necesitan para que cada muestra de ADN empiece a amplificar y alcance el umbral de fluorescencia y principalmente brinda información acerca de la cantidad de ADN amplificado en la muestra. Por otro lado, la Tm o temperatura de fusión, es la temperatura a la cual, durante el proceso de desnaturalización, la mitad (50%) de la secuencia de ADN se encuentra en estado bicatenario y la mitad (50%) restante, se encuentra en estado de cadena sencilla. Esta temperatura es específica de cada secuencia de ADN y depende tanto de su longitud, como de su composición y de la concentración de sales presentes en la reacción. (Khandelwal & Bhyravabhotla, 2010; Aguilera *et al.*, 2014).

3.6 Presencia de *Cryptosporidium* spp. en murciélagos

Los murciélagos pertenecen al orden Chiroptera, subórdenes Megachiroptera y Microchiroptera (Fenton & Simmons, 2014), de los cuales se ha reportado más de 1300 especies en el mundo lo que corresponde al 25% de todos los mamíferos, siendo entonces el segundo grupo más numeroso después de los roedores (Simmons, 2005). En Colombia, se han descrito alrededor de 205 especies cifra que comprende el 36% de las especies de murciélagos en el mundo (Mateus *et al.*, 2019). Una característica muy importante para esta especie es que son los únicos mamíferos capaces de ejercer el vuelo, lo cual les confiere ventajas evolutivas y brindan diferentes beneficios al hombre y a los ecosistemas (Jones & Teeling, 2006), ya que se encargan de controlar plagas, participan en la diseminación de semillas, son frugívoros, polinizadores y su materia fecal (guano) es uno de los mejores fertilizantes por ser rico en nutrientes (Hutson *et al.*, 2001).

En diferentes especies de murciélagos se ha reportado la presencia de 18 genotipos de *Cryptosporidium* spp., las cuales se han denominado como *Cryptosporidium* genotipo de murciélago I-XVIII (Wang *et al.*, 2013; Kvác *et al.*, 2015; Murakoshi *et al.*, 2016; Schiller *et al.*, 2016; Murakoshi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Batista *et al.*, 2019), sin embargo, también se ha identificado *C. parvum* y *C. hominis*, lo cual hace pensar que pueden ser posibles transmisores de la enfermedad a otros hospederos incluyendo al hombre (Kvác *et al.*, 2015; Schiller *et al.*, 2016). En Colombia actualmente existe un único reporte sobre la presencia de *Cryptosporidium* spp. en un murciélago de la especie *Carollia perspicillata* (Fajardo, 2018). Cabe aclarar que no hay información clínico – patológica acerca de la infección causada por este parásito en los murciélagos por tanto se desconoce si éste pueda afectar realmente a estos animales o si simplemente actúan como reservorios del mismo (Batista *et al.*, 2019).

Escasos estudios han sido llevados a cabo para determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en diferentes especies de murciélagos, en los cuales se ha determinado la presencia de varios genotipos específicos de estos mamíferos como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 1. Estudios de *Cryptosporidium* spp. en murciélagos.

Año	Especie/género de murciélago	Especie/ genotipo de <i>Cryptosporidium</i>	Ubicación	Referencia
1998	<i>Eptesicus fuscus</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Oregón, Estados Unidos	Dubey <i>et al.</i> , 1998
1999	<i>Myotis adversus</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Oregón, Estados Unidos	Morgan <i>et al.</i> , 1999
2007	<i>Eptesicus fuscus</i> <i>Myotis lucifugus</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Nueva York	Ziegler <i>et al.</i> , 2007

2013	Rhinolophus, Sinicus, Ascelliscus y Stoliczkanus	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélago I	China	Wang et al., 2013
2013	<i>Hipposideros Fulvus</i> , y <i>Rousettus leschenaultii</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélago II	China	Wang et al., 2013
2015	<i>Eptesicus fuscus</i> y <i>Pipistrellus pipistrellus</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélago III y IV	Estados Unidos y República Checa	Kvác et al., 2015
2015	<i>Myotis Ciliolabrum</i> y <i>Pipistrellus pipistrellus</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Estados Unidos y República Checa	Kvác et al., 2015
2016	<i>Rhinolophus inops</i> , <i>Cynopterus brachyotis</i> y <i>Eonycteris spelaea</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélago V, VI, y VII	Filipinas	Murakoshi et al., 2016
2016	<i>Pteropus spp</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i>	Australia	Schiller et al., 2016
2016	<i>P. poliocephalus</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélago VIII, IX, X y XI	Australia	Schiller et al., 2016
2018	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Colombia	Fajardo, 2018
2018	<i>Eptesicus nilssonii</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélago XII	Japón	Murakoshi et al., 2018
2019	<i>Eidolon helvum</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélago XIII, XIV y XV	Nigeria	Li et al., 2019
2019	<i>Artibeus planirostris</i> , <i>Artibeus lituratus</i> y <i>Platyrrhinus lineatus</i> .	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélagos XVI	Brasil	Batista et al., 2019
2019	<i>Artibeus obscurus</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélagos XVII	Brasil	Batista et al., 2019
2019	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>Cryptosporidium</i> genotipo de murciélagos XVIII	Brasil	Batista et al., 2019

3.7 Cueva Macaregua, Santander, Colombia

La cueva Macaregua se encuentra ubicada en el municipio de Curití, departamento de Santander, Colombia (Pérez et al., 2015). Está situada en la

zona rural del municipio en la vereda San Francisco, donde la precipitación media anual es de 1.550 mm, se caracteriza por una estación seca de noviembre a marzo, con precipitaciones que oscilan entre los 22 y los 93 mm, y una temporada de lluvias de abril a octubre. La temperatura en este municipio es de aproximadamente 12°C a 30° C. Su importancia radica en que hoy en día es la cueva con mayor diversidad de especies de murciélagos en Colombia, siendo los ejemplares más numerosos *Carollia perspicillata*, *Mormoops megalophylla* y *Natalus tumidirostris* (Pérez et al., 2015). Para el 2014, fue reconocida por la Red Latinoamericana para la Conservación de Murciélagos (Relcom), como Sitio Importante para la conservación de Murciélagos (Sicom) y a partir de esto se han venido desarrollando estudios en estos mamíferos para dilucidar cuál es el papel que están cumpliendo en la transmisión de agentes infecciosos y tratar de conservar las especies que allí se encuentran (Pérez et al., 2015).

3.8 Criptosporidiosis en Colombia

En Colombia el primer reporte de criptosporidiosis se presentó a finales de 1985 en Medellín en un grupo pacientes inmunocompetentes con una prevalencia del 2,5% (Angel et al., 1985); estudios más recientes han identificado la presencia del protozoo en Arauca en el 2006 con una prevalencia de 46,8% en niños con diarrea entre 1 mes - 12 años (De Arango et al., 2006), en Cali en niños sanos menores 10 años fue del 4% (Velez et al., 2011); en Cundinamarca, en la zona de la Sabana durante 2009 y 2010, la prevalencia en niños menores de 5 años fue de 7%, sin embargo estos hallazgos no se asociaron con la presentación de diarrea (Bayona et al., 2011). Otros estudios sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., realizados en Bucaramanga en niños inmunocomprometidos, evidenciaron valores del 42% y 40% en niños diagnosticados con cáncer y niños sanos respectivamente (Carreño et al., 2005). En 2006 y 2011 en Cali y zonas cercanas, se realizaron dos estudios en niños con VIH y niños con VIH/SIDA respectivamente, en los cuales se encontraron prevalencias de 51.4% y 29% respectivamente (Siuffi et al., 2006; Velasco et al., 2011).

Recientemente, en Florencia, Caquetá se realizó un estudio en niños sanos entre 0 y 5 años de edad en donde se encontró una prevalencia del 23,5 % para este parásito (Álvarez et al., 2015), en 2017 se determinaron prevalencias del 1,8% y 3,2% en niños de 4 comunidades indígenas del Amazonas y del departamento del Cauca respectivamente (Sánchez et al., 2017; Gaviria et al., 2017). Como se puede observar en la Tabla No 2, existen múltiples reportes sobre la presencia de este parásito en diferentes regiones del país.

Tabla 2. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp., en diferentes regiones de Colombia.

Año	Región estudiada	Población de estudio	Prevalencia	Referencia
1985	Medellín	Pacientes con enfermedad diarreica (Todos los grupos de edad)	2,5%	Angel <i>et al.</i> , 1985
1994	Bucaramanga	Todos los grupos de edad	2,91 lactantes 4,69 lactantes con diarrea	Zaraza <i>et al.</i> , 1994
1996 - 1998	Zona andina del país	Población general	Seroprevalencia 83,3%	Vergara <i>et al.</i> , 2000
2001	Bogotá	Pacientes con VIH	10,4 %	Florez <i>et al.</i> , 2001
2003	Medellín	Pacientes inmunocomprometidos (leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide crónica, VIH, otras inmunodeficiencias)	3,6 %	Botero <i>et al.</i> , 2003
2003	Cartagena	Pacientes con VIH	23,7 %	Arzuza <i>et al.</i> , 2003
2003	Arauca	Niños con diarrea (1 mes a 12 años)	46,8%	De Arango <i>et al.</i> , 2006
2004	Medellín	Pacientes con VIH	18,4 %	Botero <i>et al.</i> , 2004
2005	Bucaramanga	Niños con y sin cáncer (< 13 años)	Con cáncer : 42% Sin cáncer : 40%	Carreño <i>et al.</i> , 2005
2006	Medellín	Pacientes con VIH	21,4 %	Navarro <i>et al.</i> , 2006
2006	Cali	Niños con VIH (0 a 15 años)	51.4%	Siuffi <i>et al.</i> , 2006
2007- 2012	Neiva	Pacientes con VIH	8%	Agudelo <i>et al.</i> , 2015
2009 - 2010	Cundinamarca	Niños sanos (< 5 años)	7%	Bayona <i>et al.</i> , 2011
2011	Cali	Niños sanos (< 10 años)	4%	Velez <i>et al.</i> , 2011
2011	Cali y otros municipios del suroeste colombiano	Niños con VIH / SIDA	29%	Velasco <i>et al.</i> , 2011
2015	Florencia	Niños (0 a 5 años)	23,5%	Álvarez <i>et al.</i> , 2015
2017	Amazonas	Niños indígenas (< 15 años)	1,8%	Sánchez <i>et al.</i> , 2017
2017	Cauca	Niños	3,2 %	Gaviria <i>et al.</i> , 2017

3.9 Implicaciones en salud pública

La criptosporidiosis es una enfermedad zoonótica que tiene gran importancia a nivel de salud pública tanto en países desarrollados como en países subdesarrollados, debido a que produce cuadros de diarrea aguda en pacientes inmunocompetentes (Dixon *et al.*, 2001) y se comporta como agente oportunista en pacientes inmunocomprometidos (Checkley *et al.*, 2014).

Actualmente *Cryptosporidium* spp. es reconocido como uno de los principales agentes causales de diarrea transmitidos por agua (Karanis *et al.*, 2007). La prevalencia de este microorganismo varía y esto depende de características tanto económicas como sociales de la población, se ha reportado que las tasas de prevalencia e incidencia son altas en lugares con dificultades para el acceso al agua potable, sitios recreacionales como las piscinas, o en personas que tienen contacto directo o indirecto con mascotas u otros animales (Titolincu *et al.*, 2010).

De acuerdo con diferentes reportes, los principales brotes de esta enfermedad han sido ocasionados por contacto con aguas recreacionales contaminadas, en hospitales y centros de cuidado infantil, por contacto con animales de laboratorio, consumo de vegetales regados con agua contaminada. (Budu *et al.*, 2012; Rinaldi *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2001). Adicionalmente, en niños, una vía de transmisión importante son las visitas educativas o recreativas a granjas abiertas y zoológicos aumentando así la posibilidad de adquirir la criptosporidiosis y para esto se han implementado diferentes estrategias como impedir el contacto directo con los animales y proveer instalaciones para el correcto lavado de manos después de las actividades con ellos (Chalmers, 2003).

Esta enfermedad empezó a cobrar importancia en 1993, año en el que se produjo uno de los mayores brotes epidémicos en el mundo en Milwaukee, EE.UU., afectando más de 400.000 personas (Mackenzie *et al.*, 1994) y se reportó que tuvo un costo de 96.2 millones de dólares derivado de los tratamientos y hospitalizaciones (Garza, 2002).

Esta enfermedad, se encuentra dentro de las 6 infecciones oportunistas más frecuentes, reflejándose en diarreas que van desde el 30-50% de casos en países en desarrollo (Vergara & Quílez 2004). En Latinoamérica se han reportado diferentes prevalencias de diarrea por *Cryptosporidium* spp.: en Brasil 18,7%; Argentina 3,9%; Costa Rica 4,3%; Venezuela 10,8%; Ecuador 11,2%, Guatemala 13,8%; Haití 16,7% (Solarte *et al.*, 2006). En Colombia, se ha reportado una prevalencia entre 10,7 % y 28,3% en la población en general. En pacientes VIH positivos del 10% y en niños se encuentra entre 4 y 10% (Xiao & Ryan, 2004; Solarte *et al.*, 2006).

Durante los años 2011 y 2016, se presentaron diferentes brotes de enfermedades gastrointestinales causados por protozoarios en todo el mundo, de éstos, el 63% se atribuyó a *Cryptosporidium* spp. y se asociaron con el consumo de agua contaminada (Efstratiou *et al.*, 2017). En cuanto a Colombia, la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., en fuentes de agua es del 38,9% (Galván, 2018) y en un estudio realizado en Nariño, se determinó la presencia de *Cryptosporidium* genotipo II de murciélago, en las plantas que abastecen el agua de zonas rurales y urbanas del departamento, lo cual puede evidenciar el contacto directo que pueden estar teniendo los murciélagos con las fuentes de agua destinadas para consumo humano, como consecuencia de los procesos migratorios (Sánchez, 2017).

En Colombia, existen diferentes reportes sobre la contaminación de fuentes de agua con *Cryptosporidium* spp. como se puede observar en la tabla No 1.

Tabla 3. Presencia de *Cryptosporidium* spp. en diferentes fuentes hídricas en Colombia.

Año	Región estudiada	Fuente de agua	Concentración promedio del parásito / Prevalencia	Referencia
1999-2002	Sabana de Bogotá	Diferentes tipos de agua	0.88 ooquistes/L.	Campos <i>et al.</i> , 2008
2005	Bogotá	Aguas potables y residuales del río Bogotá	266,3 a 233,3 ooquistes/L	Alarcón <i>et al.</i> , 2005
2012	Antioquia	Suministro de agua y aguas residuales de granjas lecheras	64,75%	Rodríguez <i>et al.</i> , 2012
2016	Quindío	Agua superficial no tratada y agua tratada en planta	<i>Cryptosporidium parvum</i> (21%) <i>Cryptosporidium hominis</i> (10.5%)	Triviño <i>et al.</i> , 2016

En Colombia la criptosporidiosis no está incluida dentro del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), y tampoco es de reporte obligatorio, lo cual limita el acceso a la información de cómo se presenta la enfermedad en el país, en que zonas es más frecuente, cuales son las principales especies reportadas, limitando así el desarrollo de estrategias de concientización, control y prevención frente a este problema de salud (Hernández *et al.*, 2018).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp., en murciélagos procedentes de la cueva Macaregua, Santander, Colombia.

5. Metodología

5.1 Tipo de estudio: Estudio descriptivo/ experimental

5.2 Población de estudio y muestras

Se realizó un muestreo por conveniencia, se tomaron 80 muestras de intestino de murciélagos de las especies *Natalus tumidirostris*, *Carollia perspicillata*, y *Mormoops megalophylla*, provenientes de la cueva Macaregua, Santander, Colombia. Estas muestras se recolectaron en el año 2015 bajo el permiso marco de recolección 0546 de especímenes silvestres con fines no comerciales,

expedido por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) y se encontraban conservadas en etanol al 70% en el Banco de muestras del Museo Javeriano de Historia Natural.

5.3 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó mediante el estuche comercial “High pure PCR Template Preparation kit” (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada extracción se realizó un control de extracción (CE) (en el que se usó agua en remplazo del ADN).

5.4 Reacción de la cadena polimerasa (PCR) para el gen *cyt b*

Con el propósito de evaluar la calidad del ADN se realizó una PCR para el gen *cyt b* de mamífero (Schlegel et al, 2012), bajo las siguientes condiciones: denaturación a 94° C durante 3 minutos, 40 ciclos: 94 °C durante 1 minuto, 45 °C durante 45 segundo, 72 °C por 1 minuto, y una extensión final a 72° C durante 10 minutos. Con las siguientes condiciones de reacción: Buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPS 200 μM, 10 pM de cada oligonucleótido (*cyt b* Unifw 5' - TCATCMTGATGAAAYTTYGG-3' y *cyt b* rev 5' ACTGGYTGDCCBCCRATTCA-3') y 0.06 U/μL de Taq ADN polimerasa (Corpogen). Los productos de la amplificación se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar el fragmento esperado de 940 pb.

5.5 PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Para la detección de *Cryptosporidium* spp., se realizó una PCR semianidada dirigida al gen ARNr 18S (Ranjbar et al., 2018). Los cebadores y las condiciones de las dos reacciones se describen en la Tabla No 4, en donde se utilizaron 3 cebadores, dos externos y uno interno.

Tabla 4. Cebadores y condiciones de reacción para la PRC semianidada

Cebadores		Condiciones del programa	Fragmento esperado
Primera PCR	CRP: 5'-GGAAGG GTTGTATTTATTAGA TAAAG -3' Cr550: 5'-TGAAGG AGTAAGGAACAACCT CC -3'	95°C x 5 min 30 ciclos: 95°C x 30 s 55°C x 30 s 72°C x 30 s Extensión final: 72°C x 5 min	835 pb

Segunda PCR	Cr250: 5'- GGAATGAGTKRAGTA TAAACCCC – 3' Cr550: 5'-TGAAGGAGTAAGGAA CAA CCT CC-3'	95 x 3 min 25 ciclos: 94°C x 30 s 59°C x 30 s 72°C x 30 s Extensión final: 72°C x 5 min	530 pb
-------------	---	---	--------

Para ambas PCR se utilizó como control positivo una muestra de ADN de murciélago, positiva para *Cryptosporidium* spp., (Fajardo, 2018) y como control negativo de la reacción se usó agua en remplazo de ADN. Para verificar el producto de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.6 PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Para la detección de *Cryptosporidium* spp., se realizó una qPCR, en la cual se utilizaron los cebadores Cr250 5'- GGAATGAGTKRAGTATAAACCCC – 3' y Cr550 5' -TGAAGGAGTAAGGAACAACC CC - 3', los cuales amplifican el fragmento de 530 pb del gen ARNr 18S de *Cryptosporidium* spp. (Ranjbar *et al.*, 2018) y el estuche comercial PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher). Las condiciones de reacción se muestran en la tabla No. 5.

Tabla 5. Concentración de los reactivos para cada reacción de qPCR para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Reactivo	Concentración final
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X) (ThermoFisher)	1X
Cr250 – Fw	5 µM
Cr550-Rv	5 µM
ADN	2 µl
Agua	2 µl
Volumen final	10 µl

Las condiciones del programa fueron: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos y 40 ciclos: 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto. Para la curva de disociación: 95 °C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y 95°C por 15 segundos.

6. Resultados y Discusión

6.1 Población de estudio y muestras

De las 80 muestras procesada, el mayor número de muestras correspondió a la especie *Carollia perspicillata* (35%). Adicionalmente, cuando se evaluó el número de hembras y machos, el 57,5% de las muestras provenían de machos mientras que el 42,5% de hembras. De otra parte, el 65% de las muestras procesados fueron de murciélagos que tienen como hábito alimenticio principal, ser insectívoros (tabla 6).

Tabla 6. Población de estudio según la especie, género y hábito alimenticio.

Especie	Hábitos alimenticios	N	H	M
<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro	28 (35%)	12 (15%)	16 (20%)
<i>Natalus tumidirostris</i>	Insectívoro	26 (32,5%)	10 (12,5%)	16 (20%)
<i>Mormoops megalophylla</i>	Insectívoro	26 (32,5%)	12 (15%)	14 (17,5%)
Total		80 (100%)	34 (42,5%)	46 (57,5%)

N= Total de muestras H= Hembras M= Machos

6.2 PCR para la detección del gen *Cyt b*

Luego de realizar la extracción de ADN, se evaluó la calidad del ADN obtenido. Para esto se realizó una PCR dirigida al gen *cyt b* de mamífero. De las 80 muestras evaluadas, 40 (50%) fueron positivas para la PCR de *cyt b*, como se muestra en la Figura 5, se esperaba la amplificación de un fragmento de 940 pb.

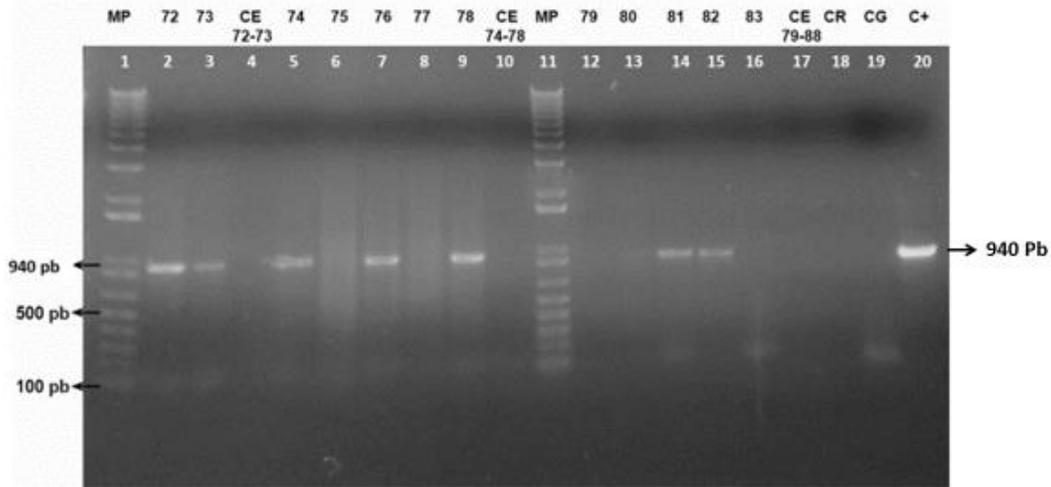


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la PCR dirigida al gen *Cyt b*.

Carriles 1 y 11: marcador de peso molecular 100 kb (MP), carriles 2, 3, 5, 7, 9, 14 y 15: Muestras positivas (MT 72, MT 73, MT 74, MT 76, MT 78, MT 81, MT 82) Carriles 6, 8, 12, 13 y 16: Muestras negativas (MT 75, MT 77, MT 79, MT 80, MT 83), carril 4, 10, y 17: controles de extracción para las muestras (CE 72-73, CE 74-78, CE 79-88) carril 18: control de reacción (agua en lugar de ADN), carril 19: control gris (agua colocada en el sitio de adición de la muestra), carril 20: control positivo (ADN de murciélago).. A la izquierda y derecha se indican los pesos moleculares de algunas de las bandas del MP.

Dado que solo el 50% de las muestras fueron positivas para esta PCR, se realizaron diluciones 1/10 y 1/20 a las muestras negativas y a estas se les realizó nuevamente la PCR. De las 40 muestras procesadas, 23 muestras fueron positivas de las cuales 17 resultaron positivas para ambas diluciones, 4 resultaron positivas únicamente para la dilución 1/10 y las 2 muestras resultaron positivas únicamente para la dilución 1/20. Así, para la detección de *Cryptosporidium* sp. se procesaron un total de 63 muestras (78,75%) (Figura 6). Aguilera *et al* 2014, reportan que, en caso de inhibición de la PCR, se sugiere realizar diluciones con el fin de diluir alguna sustancia que no permita la perfecta amplificación de la muestra.

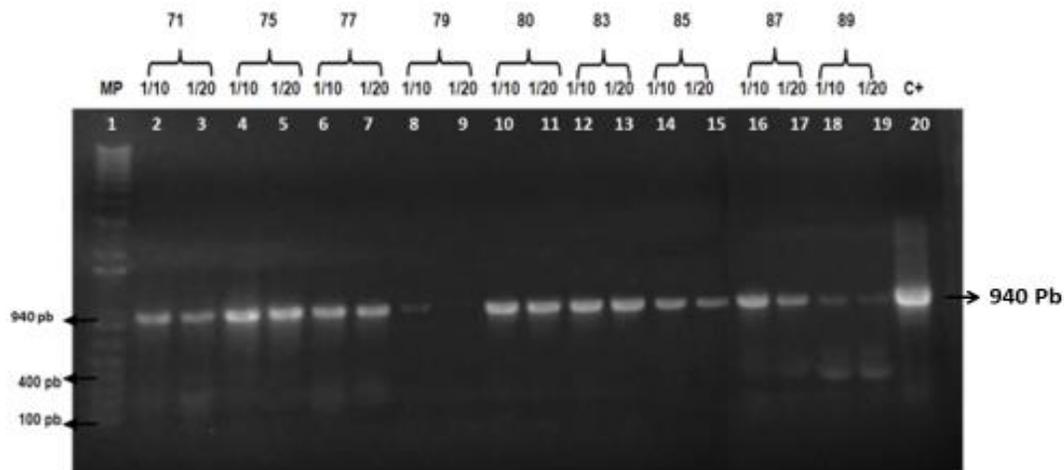


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de las diluciones 1/10 y 1/20 de los productos PCR dirigida al gen *Cyt b*.

Carril 1: Marcador de peso molecular 100 kb (MP), carriles pares: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 Diluciones 1/10, carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19: Diluciones 1/20 de las muestras, carril 20: control positivo (C+).

El hecho de que las 17 muestras restantes de ADN extraído hayan resultado negativas para el gen *Cyt b*, pudo estar asociado a la presencia de inhibidores de la PCR, o estado de degradación avanzado de los tejidos. Según lo reportado por Espinosa, 2007, las PCR que se realizan para ADN extraído de tejidos, pueden verse inhibidas por degradación de los mismos, o por la existencia de proteínas, grasas, fluidos u otros componentes presentes en este tipo de muestras.

Teniendo en cuenta estos resultados, las otras pruebas moleculares para la detección de *Cryptosporidium* sp. se realizaron en las 63 muestras que fueron positivas para la PCR *cyt b*.

6.3 PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp.

Para la detección de *Cryptosporidium* sp. en las muestras de intestino de murciélago se realizó una PCR semianidada, de acuerdo con lo reportado por (Ranjbar *et al.*, 2018), sin embargo, todas las muestras resultaron negativas.

Teniendo en cuenta que la qPCR tiene una mayor sensibilidad de detección que la PCR convencional, se decidió realizar la PCR reportada Ranjbar *et al.*, 2018, que amplifican un fragmento de 530 pb de los genes ARNr 18S, usando SYBR™ Green como reportero.

Teniendo en cuenta que se desconocen los valores de T_m (Temperatura de disociación) de los fragmentos a amplificar, se tuvo en cuenta el análisis

bioinformático realizado por Fajardo, 2018 de los fragmentos del gen ARNr 18S amplificados por la PCR. Para esto, a partir de las secuencias reportadas en la base de datos del GenBank para *C. parvum* (GenBank No: S40330.1), *C. muris* (GenBank No: X64342) *C. andersoni* (GenBank: AB089285.2) y *C. canis* (GenBank: AF112576), se encontró que las Tm esperadas para los fragmentos son: 73,9°C; 73,7°C; 73,9°C y 72,1°C, respectivamente, por lo que se esperaba que el fragmento amplificado a partir de las muestras de murciélagos tuviera una Tm entre 72 y 74 °C, aproximadamente.

Con estos datos se realizó la qPCR bajo las condiciones descritas en la metodología y usando una muestra de ADN de un murciélago positivo para la presencia de *Cryptosporidium* spp. (MT155), obtenida en estudios previos (Fajardo, 2018). Los resultados para la amplificación de esta muestra se observan en la figura No 6 y tabla No 7.

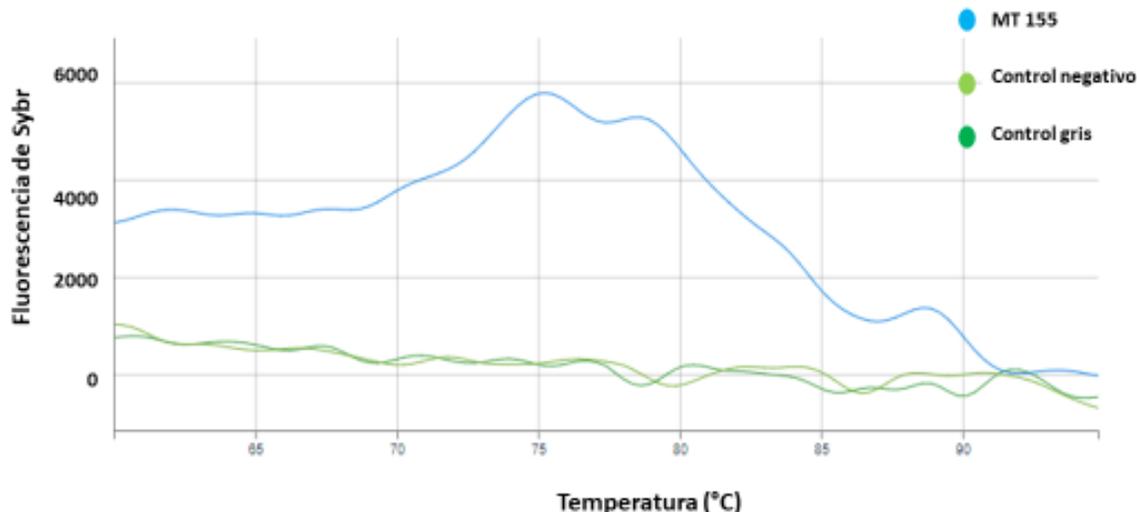


Figura 6. Curva de disociación. Temperatura de fusión de algunas de la muestra (MT 155) positiva para *Cryptosporidium* spp., utilizada como control positivo.

Tabla 7. Resultados de la Ct, Tm de la muestras (MT 155) que resultó positiva para la presencia de *Cryptosporidium* spp.

Muestra	Ct	Tm (°C)
MT 155	31,16	75,21 y 78,47
Control negativo	No amplificó	
Control Gris	No amplificó	

Teniendo en cuenta que la muestra MT155 previamente identificada como positiva mostró dos fragmentos de amplificación (75,21 °C y 78,47 °C), el producto amplificado se corrió junto con otras muestras en un gel de electroforesis. Como se observa en la figura 7, para la muestra MT155 se visualiza la banda esperada de 530 pb. Con estos resultados, y luego de confirmar la amplificación esperada se continuo con el montaje de las demás muestras. La muestra MT155 se usó como control positivo.

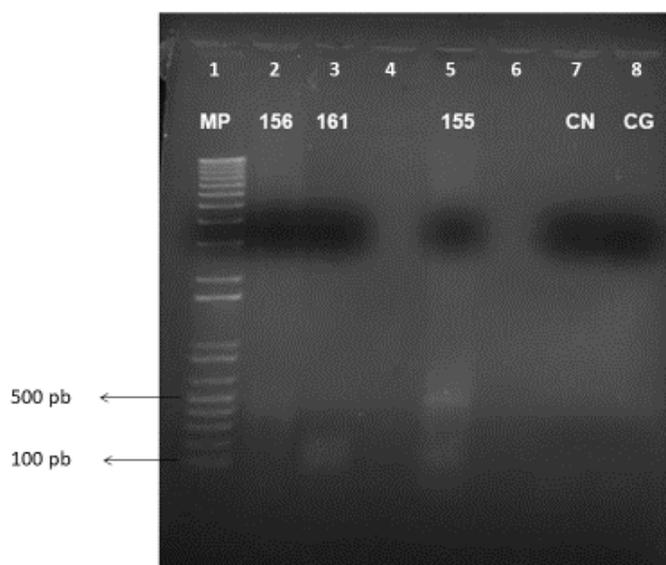


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa para los productos obtenidos mediante la qPCR.

Carril 1: Marcador de peso molecular 100 kb (MP), Carril 2: MT 156, Carril 3: MT 161, Carril 4: Blanco, Carril 5: MT 155 (Muestra positiva para *Cryptosporidium* spp., utilizada como control positivo), Carril 6: Blanco, Carril 7: Control negativo (Agua en lugar de ADN), Carril 8: Control gris (Agua en lugar de ADN).

Como se observa en la tabla 8 de las 63 muestras procesadas, 5 muestras fueron positivas (valor Ct) y mostraron tener un producto de amplificación con una Tm entre 74,95 y 79,69 °C (Figura 8). Para estas muestras, también se realizó electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación (figura 9).

Tabla 8. Resultados de la Ct, Tm y electroforesis de las muestras evaluadas que resultaron positivas para la presencia de *Cryptosporidium* spp.

Muestra	Ct	Tm (°C)	Electroforesis
MT 155 (Muestra utilizada como control positivo)	31,01	75,21	Se detectó la presencia del fragmento esperado (530 pb) en algunas corridas
MT 74	34,87	79,25	Se detectó la presencia del fragmento esperado (530 pb)
MT 76	38,25	79,69	Se detectó la presencia del

			fragmento esperado (530 pb)
MT 156	23,67	75,68	No se detectó la presencia del fragmento esperado (530 pb)
MT 161	32,25	75,52	No se detectó la presencia del fragmento esperado (530 pb)
MT 176	30,65	74,95	Se detectó la presencia del fragmento esperado (530 pb)

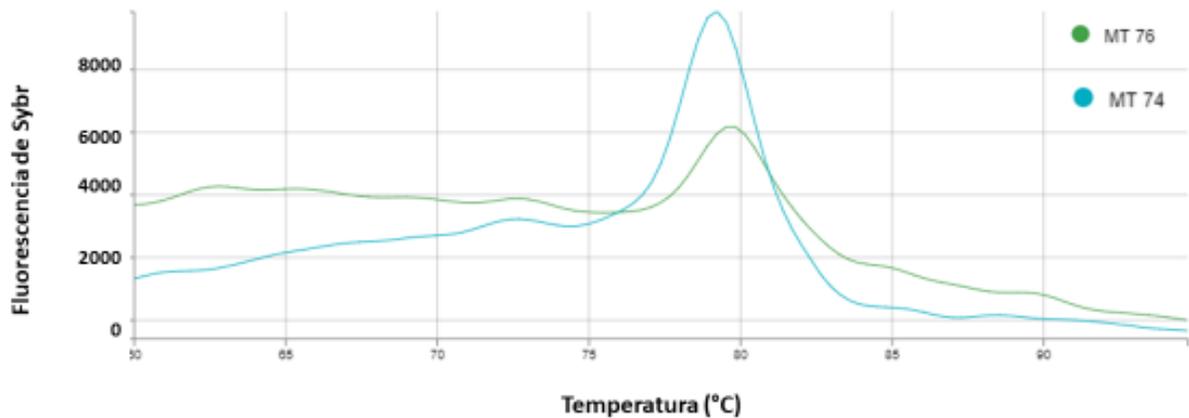


Figura 8. Curva de disociación. Temperatura de fusión de algunas de las muestras positivas para *Cryptosporidium* spp.

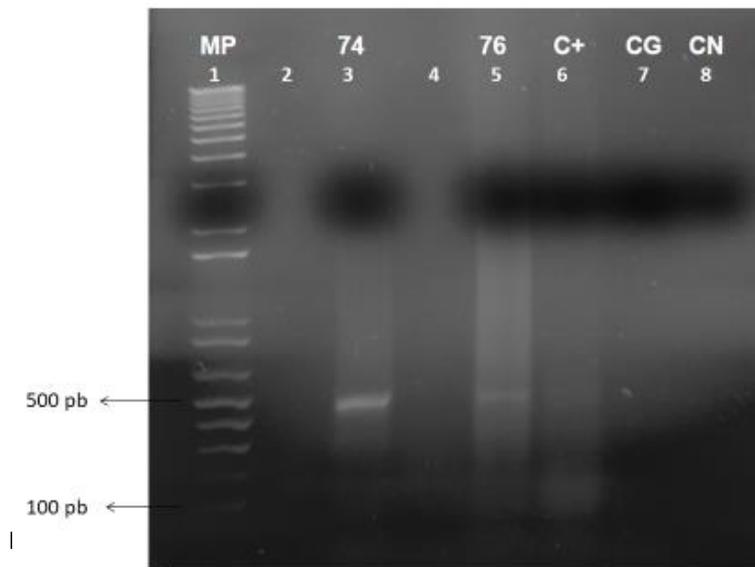


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa para los productos obtenidos mediante la qPCR

Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 kb (MP), Carril 3, 5: muestras de ADN de murciélago positivas para *Cryptosporidium* spp (MT 74, MT 76), Carril 6: Control positivo (C+) Carril 7: control gris (Agua en lugar de ADN), Carril 8: control negativo (Agua en lugar de ADN)

De acuerdo con los resultados obtenidos, y a pesar de que no todos los productos de amplificación pudieron ser observados mediante la electroforesis en gel de agarosa, las 5 muestras fueron consideradas positivas para la presencia de *Cryptosporidium* sp. Según lo reportado por Paiva *et al.*, 2010 la detección de los fragmentos de ADN en una electroforesis ya sea en gel de agarosa o poliacrilamida, se puede ver afectada por falta de capacidad cuantitativa de la misma (Baja sensibilidad), afectando así la reproducibilidad de los resultados.

De otra parte y aunque algunas de las Tm observadas en la qPCR, tuvieron valores por encima de lo esperado, es importante tener en cuenta que este valor es específico para cada secuencia de ADN, y depende de la longitud y la composición en ácidos nucleicos (Khandelwal & Bhyravabhotla, 2010; Aguilera *et al.*, 2014).

Los genes amplificados (ARNr 18S), han sido ampliamente usados como marcadores moleculares debido al grado de polimorfismo que poseen (Liu, *et al* 1995), razón por la cual era de esperar que los fragmentos amplificados variaran respecto a su secuencia. Adicionalmente, existen pocos estudios respecto a las especies de *Cryptosporidium* presentes en los murciélagos, por tanto, valores de Tm cercanos a los esperados, pueden corresponder a especies diferentes a las que se tuvieron en cuenta para el cálculo de la Tm.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante la qPCR para los genes ARNr 18S, la frecuencia de *Cryptosporidium* sp. en la población de murciélagos de la cueva Macaregua, evaluada fue de 7,94% (5/63). Con respecto a la frecuencia por especie se encontró que en la especie *Carollia perspicillata* 3 de 63 individuos (4,77%) fueron positivos para *Cryptosporidium* spp., mientras que en la especie *Natalus tumidirostris* 2 de 63 individuos (3,17%) fueron positivos. (n=2). Para la especie *Mormoops megalophylla*, no se detectó ningún individuo positivo. (Tabla No 9).

Tabla 9. Murciélagos positivos para *Cryptosporidium* spp.

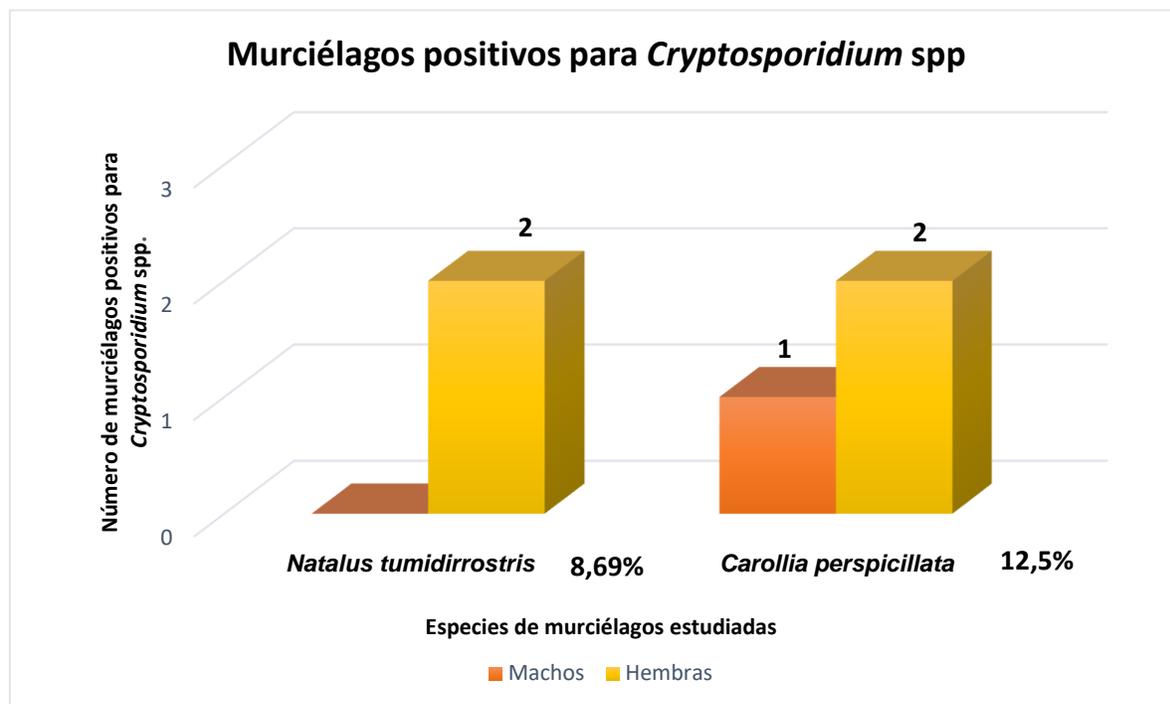
Especie de murciélagos	Número de muestras (%)	No de murciélagos positivos para <i>Cryptosporidium</i> spp	Frecuencia
<i>Mormoops megalophylla</i>	16 (25,40%)	0	0
<i>Natalus tumidirostris</i>	23 (36,50%)	2	3,17 %
<i>Carollia perspicillata</i>	24 (38,10%)	3	4,77 %
Total	63 (100%)	5	7,94%

Frecuencia = (No de murciélagos positivos para *Cryptosporidium* spp. de la especie /total de los murciélagos estudiados) X 100

Wang *et al.*, 2013 y Murakoshi *et al.*, 2016 reportaron prevalencias de *Cryptosporidium* spp., de 7,7% y 8,9% en poblaciones de murciélagos de China y Japón, respectivamente. Otros estudios realizados en varias especies de murciélagos han determinado prevalencias para *Cryptosporidium* que oscilan entre el 2,8 % y el 16, 3%. Kvac *et al.*, 2015; reportaron una prevalencia *Cryptosporidium* del 2,8% en murciélagos de las especies *Eptesicus fuscus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Myotis Ciliolabrum* y *Pipistrellus pipistrellus* ubicados en Oregón, Estados Unidos. Schiller *et al.*, 2016; reportaron una prevalencia del 3,2% en murciélagos del género *Pteropus* spp en Australia.

Li *et al.*, 2019; Ziegler *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2019. Reportaron prevalencias de 5,5%, 7,2% y 16,8% en Nigeria, Nueva York y Brasil respectivamente. A pesar de que la frecuencia por nosotros encontrada (7,94%), es similar a las previamente reportadas en otras poblaciones de murciélagos, es importante tener en cuenta que los datos obtenidos en estos estudios han utilizado otros métodos de detección del parásito. Y en nuestro estudio realizamos un muestreo por conveniencia, razón por la cual no determinamos la prevalencia de *Cryptosporidium* en la población.

En cuanto al género se pudo evidenciar 4 hembras positivas mientras que solo un macho resulto positivo para el parásito (Gráfica No 1). Y respecto a los hábitos alimenticios, tanto murciélagos frugívoros como insectívoros fueron positivos para la presencia del parásito.



Gráfica 1. Positividad para *Cryptosporidium* spp. según especie y género.

Finalmente, y al realizar un análisis de frecuencia por especie de murciélago, de los 24 individuos de la especie *Carollia perspicillata* evaluados, el 12,5% (3/24) fueron positivos para *Cryptosporidium* spp., en un estudio realizado en Brasil, se encontró que un 8,3% (1/12) de murciélagos de la especie *Carollia perspicillata* fueron positivos para *Cryptosporidium* spp. (Batista *et al.*, 2019). En cuanto a los murciélagos de la especie *Natalus tumidirostris*, de un total de 23 animales evaluados, el 8,69% (2/23) fueron positivos para la presencia de *Cryptosporidium* spp. Es importante resaltar que para la especie *N. tumidirostris* este es el primer reporte de infección por el parásito.

Este es el primer estudio que se realiza en Colombia, para determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp., en tres especies que se encuentran de manera permanente en la Cueva Macaregua, una de las cuevas más representativas para Colombia por albergar a la mayor cantidad de especies de murciélagos presentes en el país, abriendo de esta manera las puertas para más investigaciones que contribuyan a determinar las especies de parásitos presentes en estos mamíferos y por consecuencia, su papel en el ciclo de transmisión de *Cryptosporidium*.

7. Conclusiones

- Se encontró una frecuencia de *Cryptosporidium* sp. de 7,94 % en los murciélagos de la cueva Macaregua, Santander.
- Las especies de murciélagos *Natalus tumidirostris* y *Carollia perspicillata* fueron positivas para la presencia de *Cryptosporidium* spp.

8. Perspectivas

Es necesario continuar con estudios que permitan dilucidar las especies de *Cryptosporidium* presentes en los murciélagos y de esta forma contribuir a entender el papel que los murciélagos tienen en la diseminación y transmisión de *Cryptosporidium* a los humanos y a otros animales como los domésticos o de granjas.

9. Bibliografía

Agudelo-Gonzalez S, Murcia-Sanchez F, Salinas D, Osorio J. Infecciones oportunistas en pacientes con VIH en el hospital universitario de Neiva, Colombia. 2007-2012. *Infectio*. 2015;19(2):52–9.

Aguilera P, Ruiz Tachiquín M, Rocha Munive MG, Pineda Olvera B, Cháñez Cárdenas ME. PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología, aspectos teóricos y prácticos. 2014 Libro electrónico, p 176 – 197 Disponible

en:[http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

Ahmed SA, Karanis P. Comparison of current methods used to detect *Cryptosporidium* oocysts in stools. *Int J Hyg Environ Health*. 2018; 221(5):743-763.

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.

Álvarez J, Bedoya L, Lucero-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(Supl. 4):74.

Angel VE, Franco L, Jaramillo JC, Medina LA, Ochoa FL, Velez AM, *et al*. Prevalencia de *Cryptosporidium* en muestras fecales diarreicas en 6 laboratorios de Medellín. *Biomedica*. 1985;5(3–4):53–61.

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.

Avendaño C & Amaya A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* parvum and *Cryptosporidium* hominis GP60 subtypes worldwide. *Rev.MVZ Córdoba*. 2017; 22(3):6339-6354. Disponible en: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1138>

Batista JM, De Carvalho C, Pedro WA, Santana BN, Camargo VS, Ferrari ED, Nascimento IG, Meireles MV. Identification of *Cryptosporidium* bat genotypes XVI–XVIII in bats from Brazil. *Parasitol Res*. 2019; 793, 16050-680. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06342-6>

Bayona M, Avendaño C, Amaya Á. Caracterización epidemiológica de la criptosporidiosis en población infantil de la región Sabana centro (Cundinamarca). *Rev UDCA Act & Div Cient*. 2011;14(1):7–13

Botero 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 Sao Paulo*. 2003;45(4):197–200. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1590/S0036-46652003000400004>.

Botero JH, Montoya MN, Vanegas AL, Díaz A, Navarro-i-Martínez LBF, Izquierdo F, et al. Frequency of intestinal microsporidian infections in HIV-positive patients, as diagnosis by quick hot gram chromotrope staining and PCR. *Biomedica*. 2004;24(4):375–84.

Bouzig M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence *Clin. Microbiol. Rev.* 2013 26(1):115. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00076-12>.

Brechtbuehl K., S. A. Whalley, G. M. Dusheiko y N. A. Saunders. 2001. A rapid realtime quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods* 93: 105-113.

Budu AE, Greenwood SJ, Dixon BR, Barkema HW, McClure JT. *Giardia* and *Cryptosporidium* on Dairy Farms and the Role these Farms May Play in Contaminating Water Sources in Prince Edward Island, Canada. *J. of Veterinary Internal Medicine*. 2012; 26 (3): 668-673.

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes K.V. y T. Schountz, “Bats: important reservoir hosts of emerging viruses”. *Clinical microbiology reviews*. 2006 19:(3) 531-545.

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.

Carreño M, Velasco CA, Rueda E. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in children with cancer, younger than 13 years old [Spanish]. *Colomb Med*. 2005;36(2):6–9.

Center for Disease Control and Prevention noviembre de 2017 [citado 23 Mar 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>

Chacín Bonilla L, Cheng Ng R, Criptosporidiosis en pacientes con el virus de la inmuodeficiencia humana. *Interciencia*. 2008 Oct; 33 (10) pp. 708-716.

Chalmers RM, Smith R, Elwin K, Clifton-Hadley FA, Giles M. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004-2006. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139:700 –712.

Chalmers RM. *Cryptosporidium* as a Public Health Challenge. *Cryptosporidium: From Molecules to Disease*. 2003; 13:103-104.

Checkley W, White C, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, *et al.* A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics and vaccine targets for cryptosporidiosis. *The Lancet Inf. Dis.* 2014; 15 pp. 85-94

Chen XM, Keithly JS, Paya CV, Larusso NF. Criptosporidiosis. *N Engl J Med.* 2002 May; 346 (22): 2-4.

Cisneros MJ, Martínez-Ruiz RM, Subirats M, Merino FJ, Millán R, Fuentes I. Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(3):201–203.

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.

Del Coco VF, Cordoba MA, Basualdo JA. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev Argent Microbiol.* 2009; 41(3):185-196.

Dixon B, Parrington L, Cookb A, Pintarb K, Pollari F, Kelton D, Farbera J. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario. *Canada Veterinary Parasitology.* 2011;175: 20–26.

Dubey JP, Hamir AN, Sonn RJ, Topper MJ. Cryptosporidiosis in a bat (*Eptesicus fuscus*). *J Parasitol.* 1998; 84:622–623

Efstratiou A, Ongerth JE, & Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research.* 2017; 114, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>

Espinosa Asuar L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología molecular.* 2007. Libro electrónico, p 517-139. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/258129643 Ecologia Molecular](https://www.researchgate.net/publication/258129643_Ecologia_Molecular)

Fajardo Herman RF. Detección de *Cryptosporidium* sp. En murciélagos de la especie *Carollia perspicillata* procedentes de la cueva Macaregua, Santander, Colombia. [tesis de pregrado en Internet] Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana 2018 15p. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/39138/Detecci%C3%B3n%20de%20Cryptosporidium%20en%20murcielagos.%20Documento%20final..pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, Canals A, Almeria S and Zarlenga D. *Cryptosporidium* parvum infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 49-56.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol. 2000; 30:1305-1322.

Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2 ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 2008; 560 pp.

Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol. 2004; 126: 37–56.

Fenton MB & Simmons N. Bats: a world of science and mystery. University of Chicago Press. 2014; 240 pp.

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.

Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. Vet Clin Food Anim. 2009; 25:13–36.

Galván-Díaz AL. Cryptosporidiosis in Colombia: a Systematic Review. Curr Trop Med Rep. 2018 5: 144. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1007/s40475-018-0149-3>

García Tapia AM, Fernández Gutiérrez del Álamo C, López García C, García Martos P, Marín Casanova P. Brotes epidémicos de Criptosporidiosis. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2004. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Brotcripto.pdf>

Garza, AV. Agua y salud: *Cryptosporidium* parvum agente causal de una nueva enfermedad relacionada con el agua. S. Pública y Nutr. 2002; 3:16-18.

Gaviria L, Soscue D, Campo-Polanco L, Cardona-Arias JG-DAL. Prevalence of intestinal parasites, anemia and malnutrition among the children of a Nasa indigenous reservation, Cauca-Colombia, 2015. Rev Fac Nac Salud Pública. 2017;35(3):390–9.

Ghoshal U, Ranjan P, Dey A, Ghoshal UC. Intestinal cryptosporidiosis in renal transplant recipients: Prevalence, species detection and comparative evaluation of SSU rRNA and *Cryptosporidium* oocyst wall protein genes. Indian J Med Microbiol. 2018; 36: 247-250

Hernández Gallo N, Hernández Flórez LJ, Cortés Vecino JA. Criptosporidiosis y «Una Salud». Rev salud pública. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/rsap.V20n1.69959>

Hutson AM, Mickleburgh SP & Racey PA. Microchiropteran bats: global status survey and conservation plan IUCN/SSC Chiropteran Specialist Group. IUCN

Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom. 2001. Disponible en: <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2001.SSC-AP.1.en>

Jex AR, Rachel M, Chalmers HV, Smith GW, Vicent McDonald and Robin BG. Cryptosporidiosis in Zoonoses, Biology. Clinical practice and Public Health Control, OXFORD. 2008 pp 539-568.

Jones G & Teeling E. The evolution of echolocation in bats. Trends in Ecology and Evolution. 2006; 21(3): 149-156.

Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J. Water Health. 2007; 5:1–38.

Khandelwal G, Bhyravabhotla J. A Phenomenological Model for Predicting Melting Temperatures of DNA Sequences. PLoS ONE. 2010; 5: 8

Khurana S, Chaudhary P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. Trop Parasitol. 2018;8(1):2–7. doi:10.4103/tp.TP_34_17

Kváč M, Hořická A, Sak B, Prediger J, Salát J, Širmarová J, Bartonička T, Clark M, Chelladurai JR, Gillam E, MČevoy J. Novel *Cryptosporidium* bat genotypes III and IV in bats from the USA and Czech Republic. Parasitol. 2015; 114:3917–3921. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4654-1>

Li N, Aynmode AB, Zhang H, Feng Y, Xiao L. Host-adapted *Cryptosporidium* and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in straw-colored fruit bats in Nigeria. Int J Parasitol Parasites. 2019; 8:19–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.12.001>

Liu ZL, Domier LL, Sinclair JB. Polymorphism of genes coding for nuclear 18S rRNA indicates genetic distinctiveness of anastomosis group 10 from other groups in the *Rhizoctonia solani* species complex. Appl Environ Microbiol. 1995;61(7):2659–2664.

Luján N, Garbossa G. *Cryptosporidium*: Cien años después. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2008; 42(2):195-201.

Mackenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME et al. A massive outbreak in milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. New Engl J Med. 1994; 331:161-167.

Mateus J, Gómez N, Herrera-Sepúlveda MT, Hidalgo M, Pérez-Torres J, Cuervo C. Bats are a potential reservoir of pathogenic *Leptospira* species in Colombia. J Infect Dev Ctries. 2019; 13:278-283.

Morgan UM, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Sargent KD, Elliot A, Thompson RC. Sequence and PCR–RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. Parasitology. 1999; 118:49–58

Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Elliot A, Thompson RC. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology*. 1998; 117:31–37

Murakoshi F, Koyama K, Akasaka T, Horiuchi N, Kato K. Molecular and histopathological characterization of *Cryptosporidium* and *Eimeria* species in bats in Japan. *J Vet Med Sci*. 2018; 80:1395–1399. Disponible en: <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0130>

Murakoshi F, Recuenco FC, Omatsu T, Sano K, Taniguchi S, Masangkay JS, Alviola P, Eres E, Cosico E, Alvarez J, Une Y, Kyuwa S, Sugiura Y, Kato K. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Eimeria* species in Philippine bats. *Parasitol Res*. 2016; 115:1863–1869. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4926-4>

OIE Organización Mundial de Sanidad Animal (2019). Un mundo. Una salud. Disponible en: <https://www.oie.int/es/para-los-periodistas/editoriales/detalle/article/one-world-one-health/>

OIE Organización Mundial de Sanidad Animal, Manual de la OIE sobre animales terrestres, Capítulo 2.9.4 Criptosporidiosis. 2008. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.04.%20Criptosporidiosis.pdf. Consultado noviembre 4 2013.

OIE Organización Mundial de Sanidad Animal, Manual de la OIE sobre animales terrestres, Capítulo 3.09.4 Criptosporidiosis. 2018. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2018/3.09.04.%20Criptosporidiosis.pdf. Consultado Abril 2019.

Olson M, O’Handley R, Ralston B, McAllister T and Thompson R. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol*. 2004; 20(4): 185 – 191.

Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva CG, Gomes YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2010; 16: 537-542.

Pajuelo Camacho G, Luján Roca D, Paredes Pérez B, Tello Casanova R. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. *Rev Mex Patol Clin*. 2006; 53: 114-118.

Peist R, Honsel D, Twieling G, Loffert D. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *Qiagen news*. 2001; 3:7-9.

Pérez Torres J, Martínez Medina D, Peñuela Salgado M, Ríos Blanco MC, Estrada Villegas S, and Martínez Luque L. Macaregua: The cave with the highest bat richness in Colombia. *Check List*. 2015 March; 11(2): 1616. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15560/11.2.1616201>

Ranjbar R, Mirhendi H, Izadi M, Behrouz B, Mohammadi R. Molecular Identification of *Cryptosporidium* spp. in Iranian Dogs Using Seminested PCR: A First Report. Vector-borne and zoonotic diseases. 2018; 18 (2): 1-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2017.2136>

Rinaldi L, Maurelli MP, Musella V, Veneziano V, Paone M and Cringoli G. Giardia and *Cryptosporidium* in canine faecal samples contaminating an urban area. Res. Vet. Sci. 2007; 23: 47-52.

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;427–428:314–8. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1016/j.scitotenv.2012.03.052>.

Rodríguez JC, Royo-García G. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2001; 13:31-35

Rodríguez San Pedro A, Allendes JL, Carrasco Lagos P & Moreno RA Murciélagos de la Región Metropolitana de Santiago, Chile. Seremi del Medio Ambiente Región Metropolitana de Santiago, Universidad Santo Tomás y Programa para la Conservación de los Murciélagos de Chile (PCMCh). 2014; 51 pp.

Rojas Cruz C. *Cryptosporidium* spp: Un parásito emergente asociado a diarrea. Revista Gastrohnp. 2012; 1: S20-S24

Romich J. Understanding Zoonotic Diseases. Ed. Thomson Delmar Learning. 2008; 701 pp
Ryan U, Xiao L. Taxonomy and molecular taxonomy. In *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer, Vienna 2014. pp 3–41.

Ryan U, Zahedi A, Piprini A. *Cryptosporidium* in humans and animals-a one health approach to prophylaxis. Parasite Immunol. 2016; 38: 535-547.

Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, Restrepo C, Ruíz M, Reyes P, Qian Y, Xiao L, López MC, Ramírez JD Molecular epidemiology of Giardia, Blastocystis and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon Basin. Front Microbiol. 2017; 8:248. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.3389/fmicb.2017.00248>.

Sánchez Ortega CA. Detección y caracterización molecular de los parásitos de interés en salud pública: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolytica*, en agua cruda y tratada de cuatro plantas potabilizadoras del Departamento de Nariño (Colombia). [tesis de maestría en internet] Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2017: 79p. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/64871/1/Tesis%20de%20Maestr%C3%ADa%20-%20Claudia%20S%C3%A1nchez.pdf>

Schiller SE, Webster KN, Power M. Detection of *Cryptosporidium hominis* and novel *Cryptosporidium* bat genotypes in wild and captive Pteropus hosts in Australia. *Infect Genet Evol.* 2016; 44:254–260. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.002>

Schlegel M, Ali H, Stieger N, Groschup M, Wolf R, Ulrich R. Molecular identification of Small Mammal species using novel Cytochrome b gene derived degenerated primers. *Biochem genet.* 2012; 50:440-447.

Scott R, May E, Atsushita E, and Warren A. Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewaters in constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 2001; 20: 123-127.

Simmons NB. Order Chiroptera. Third Edition in: *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic.* Johns Hopkins University Press. 2005 Pp. 312-529.

Siuffi M, Angulo M, Velasco CA, López P, Dueñas VH, Rojas C. Relation between viral load and CD4 versus *Cryptosporidium* spp. in feces of children with AIDS. *Colomb Med.* 2006;37(1):15–20. 6p

Solarte Y, Peña M, Madera C. Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colomb. Med.* 2006; 37: 71-82.

Titilincu A, Mircean V, Achelarietei D, Cozama V. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic dogs by ELISA and risk factors associated with infections. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara.* 2010;17(1): 7-12.

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. <https://doi-org.ezproxy.javeriana.edu.co/10.1007/s00436-016-4917-5>.

Tyzzer, EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1907; 5:12–13.

Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 2002; 4: 1047–1058.

Velasco CA, Méndez F, López P. Cryptosporidiosis in Colombian children with HIV/AIDS infection. *Colomb Med.* 2011;42(4):418–29.

Velez-Velasquez DM, Velasco-Benitez C, Rojas C, Dueñas-Rivera D, Neuta P. *Cryptosporidium* spp. en niños menores de 10 años de la comuna 18 de Cali, Colombia. *Rev Gastrohup.* 2011;13(2): S4–10.

Vergara C, Quílez J. Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria MVZ-Córdoba. 2004; 9(1):363-372.

Vergara-Castiblanco CA, Santos Nuñez S, Freire Santos F, Ares Mazas E. La criptosporidiosis en la región andina de Colombia: seroprevalencia y reconocimiento de antígenos. *Rev Panam Salud Publica*. 2000;8(6):373–9.

Wang W, Cao L, He B, Li J, Hu T, Zhang F, Fan Q, Tu C, Liu Q. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in bats from Yunnan province, southwestern China. *J Parasitol*. 2013; 99:1148–1150. Disponible en: <https://doi.org/10.1645/13-322.1>

Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS ImmunolMed Microbiol*. 2008; 52: 309-323

Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Infect Dis* 2004; 17: 483-490.

Zaraza C, Díaz L, Vargas L, Santos R, Sepúlveda J, Pinto M, et al. Prevalencia de *Cryptosporidium* en muestras de materia fecal llevadas a diez laboratorios del Área Metropolitana de Bucaramanga, Colombia. *Med UIS*. 1994; 8: 2–5.

Ziegler PE, Wade SE, Schaaf SL, Stern DA, Nadeski CA, Mohammed HO. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York state. *Vet Parasitol*. 2007; 147:176–184.

