



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**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)**

**Claudia Andrea Sánchez Ortega**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades  
Bogotá, Colombia

2017



**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)**

**Claudia Andrea Sánchez Ortega**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencias, Microbiología**

Directora:

MSc. Myriam Consuelo López Páez  
Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Ph.D. Juan David Ramírez Gonzales  
Universidad del Rosario

Línea de Investigación:

Biología Molecular de Agentes Infecciosos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades  
Bogotá, Colombia

2017



***A Dios***

***A mi abuelita Ana María y mi madre Teresa***

***A mis hermanos***

***A mis sobrinos***

***A mis demás familiares***

***A Pedro***

*Por ser el motor de mi vida y la motivación para lograr mis metas, porque compartir mi vida a su lado es mi mayor inspiración.*

*Quienes no pueden sentirse atraídos por nuevas experiencias, no podrán desarrollarse más allá del punto en el camino donde descansan ahora.*

*Clarissa Pinkola Estés*



# Agradecimientos

A Dios

Al proyecto “*Desarrollo y aplicación de la Tecnología de Oxidación Avanzada PCFH para mejorar la calidad del agua potable en el Departamento de Nariño*”, financiado por el Fondo de CTeI del Sistema General de Regalías al Departamento de Nariño (BPIN 2014000100020), por la financiación de este trabajo de investigación.

A la Gobernación de Nariño, a la Fundación Centro de Estudios Interdisciplinarios Básicos y Aplicados - CEIBA y al programa “*Fortalecimiento de capacidades regionales en investigación, desarrollo tecnológico e innovación en el Departamento de Nariño*”, por la beca de maestría de la cual fui beneficiaría.

A las plantas de tratamiento de agua para consumo humano de los municipios de Pasto, Ipiales y Túquerres y a los acueductos veredales de Ipiales y Tumaco, por su colaboración en la recolección de las muestras de agua.

A los profesores Myriam Consuelo López y Juan David Ramírez, quienes dirigieron este trabajo de tesis, por su asesoría, sus valiosos conocimientos, por el tiempo dedicado, por su paciencia y por la confianza que siempre me brindaron. Un agradecimiento especial a la profesora Consuelo por enseñarme el amor por la ciencia, sin olvidar el amor por la vida misma y al profesor Juan David por ser un ejemplo de disciplina y liderazgo.

A la profesora Milena Guerrero por su asesoría, su labor y su acompañamiento en mi beca de maestría.

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Maestría en Ciencias - Microbiología y a cada uno de sus docentes, por la formación recibida y por todas las experiencias que permitieron mi enriquecimiento personal, académico y profesional.

A la profesora Marta Fontanilla por todas sus enseñanzas y sus valiosos consejos, y a Socorrito Prieto por su apoyo, su colaboración y su amistad.

A todos los profesores y compañeros del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, por hacerme parte de su grupo, por su colaboración, su tiempo, sus enseñanzas y su cariño.

Al Grupo de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Rosario – GIMUR y a todos sus integrantes, por sus valiosos conocimientos, por su colaboración y por ser ejemplo de un buen equipo de trabajo con un gran compromiso por la ciencia.

Al Instituto de Biotecnología - IBUN, al laboratorio de Caracterización Molecular, al profesor Fabio Aristizábal y a todos los integrantes del IBUN, por su apoyo, su colaboración y por facilitarme las instalaciones para llevar a cabo gran parte del trabajo experimental de éste proyecto.

Al Grupo de Investigación en Materiales Funcionales y Catálisis – GIMFC de la Universidad de Nariño, a su director Luis Alejandro Galeano, al equipo de muestreo y a todos los demás integrantes, por los valiosos aportes que hicieron a mi trabajo, por facilitarme las herramientas para llevar a cabo este proyecto, por su acompañamiento y por las experiencias compartidas.

Al profesor Fabio Rivas por su asesoría en el diseño de muestreo y los aportes realizados en el componente metodológico.

Al profesor Arsenio Hidalgo por su asesoría en el análisis estadístico de los datos obtenidos en esta investigación.

A mi familia por ser mi mayor motivación, por ser mi fuerza y mi templanza, por su amor y por su confianza en mí.

A Pedro, por ser un compañero de vida, por ser un cómplice y guía, por compartir la realización de nuestros sueños, por su apoyo y comprensión, pero sobre todo por el amor que me ha brindado.

A todos los que permitieron que este trabajo fuera posible.

A todos ellos muchas gracias!

## Resumen

Los protozoarios se encuentran entre los patógenos parasitarios más comunes presentes en las muestras ambientales, siendo considerados un problema importante de salud pública debido a su asociación con numerosos brotes de enfermedades transmitidas por el agua en todo el mundo. Además, la presencia de este tipo de microorganismos en fuentes hídricas representa un gran reto en la producción de agua potable, debido a que sus formas quísticas son altamente persistentes en el ambiente y resistentes a los tratamientos de desinfección convencionales aplicados para la producción de agua apta para el consumo humano.

En este trabajo, el objetivo fue detectar la presencia de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolytica*, e identificar las subpoblaciones de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., en agua cruda y tratada de cuatro plantas de tratamiento para la producción de agua potable del Departamento de Nariño, Colombia. Para ello, se analizaron 110 muestras de agua de 10 L, a partir de las cuales se realizó la recuperación y detección mediante PCR en tiempo real de punto final (qPCR) de los parásitos protozoarios en estudio, encontrando la presencia de *G. duodenalis* en 35/110 (31,8 %) de las muestras y *Cryptosporidium* spp. en 9/110 (8,2 %) de las muestras; no se encontró ninguna muestra positiva para *T. gondii*, *E. histolytica* y *C. cayetanensis*. *G. duodenalis* se detectó tanto en agua cruda (PTAP: 47,83 %; AV: 18,42 %) como en agua colectada post-tratamiento fisicoquímico (26,09 %) y posterior a la desinfección con cloro (50,0 %), en contraste *Cryptosporidium* spp., únicamente se detectó en agua cruda (PTAP: 17,39 %; AV: 13,16 %). Los dos agentes patógenos se detectaron tanto en plantas que abastecen agua a la zona urbana, como en acueductos que abastecen agua a zonas rurales. Las muestras positivas por qPCR para estos dos microorganismos fueron analizadas mediante PCR y análisis de secuenciación, encontrando los ensamblajes AI, AII y H de *G. duodenalis* y la presencia de *C. parvum*, *C. galli*, *C. molnari*, *Cryptosporidium* sp. genotipo II de murciélagos, y *Cryptosporidium* sp. genotipo VIII de aves. Características fisicoquímicas del agua como pH, temperatura del agua, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, turbiedad y carbono orgánico total (COT) no presentaron ninguna relación estadísticamente significativa con los resultados de la detección molecular.

**Palabras clave:** Parásitos protozoarios, agua cruda, agua tratada, qPCR, análisis de secuenciación.

# Abstract

Protozoan parasites are considered a major public-health problem because they are associated with numerous outbreaks of waterborne diseases throughout the world. They represent a great challenge to the systems producing and distributing water for human consumption because their cystic forms are extremely robust, conferring great resistance to the disinfection methods conventionally used for their control.

In this study, we investigated the presence of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, and *Entamoeba histolytica* in both raw and treated water samples for production of drinking water in Nariño Department, southwest Colombia. We collected 110 water samples of 10 L each, and analyzed them with real-time PCR (qPCR). We detected *G. duodenalis* in 35/110 (31.8 %) of the samples and *Cryptosporidium* spp. in 9/110 (8.2 %) of the samples; no sample was positive for *T. gondii*, *E. histolytica*, or *C. cayetanensis*. *Giardia duodenalis* was detected in samples of both raw water (PTAP: 47.83 %; AV: 18.42 %) and water collected either after conventional physicochemical treatment (26.09 %) or after disinfection by chlorine (50 %), whereas *Cryptosporidium* spp. were only detected in raw waters (PTAP: 17.39 %; AV: 13.16 %). Such couple of pathogens were detected in both types of treatment plants supplying water to urban areas and to rural zones. The qPCR-positive samples for both microorganisms were analyzed with PCR and DNA sequencing, which identified assemblages AI, AII, and H of *G. duodenalis* and *C. parvum*, *C. galli*, *C. molnari*, *Cryptosporidium* sp. genotype II of bats, and *Cryptosporidium* sp. genotype VIII of birds. The physicochemical characteristics of the water, including its pH, ambient temperature, water temperature, electrical conductivity, dissolved oxygen, turbidity, and total organic carbon, showed no statistically significant relationships with the molecular microbe analysis

**Keywords:** Protozoan parasites, raw water, drinking water, qPCR, sequencing analysis.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>III</b>
<b>Lista de graficas.....</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>V</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>VII</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Capítulo 1: Generalidades.....</b>	<b>7</b>
1.1 Microorganismos transmitidos a través del agua .....	7
1.2 Parásitos protozoarios de importancia en salud pública, transmitidos por el agua..9	9
1.2.1 <i>Giardia spp.</i> .....	11
1.2.2 <i>Cryptosporidium spp.</i> .....	17
1.2.3 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
1.2.4 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	23
1.2.5 <i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	26
1.3 Remoción de parásitos protozoarios en las plantas de producción de agua potable.....	31
1.4 Detección de parásitos protozoarios en agua.....	33
<b>2. Capítulo 2: Objetivos.....</b>	<b>43</b>
2.1 Objetivo general.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
<b>3. Capítulo 3: Metodología.....</b>	<b>45</b>
3.1 Área de estudio.....	45
3.2 Toma de muestras.....	46
3.3 Procesamiento de las muestras.....	48
3.3.1 <i>Filtración, elución y concentración de parásitos</i> .....	50
3.3.2 <i>Extracción de ADN</i> .....	50
3.3.3 <i>Detección de los parásitos mediante PCR en tiempo real de punto final</i> .....	51
3.3.4 <i>Identificación de los ensamblajes de Giardia duodenalis y especies de Cryptosporidium spp</i> .....	54
3.4 Análisis de datos .....	58

<b>4. Capítulo 4: Resultados .....</b>	<b>61</b>
4.1 Detección de parásitos protozoarios en muestras de agua mediante PCR en tiempo real de punto final.....	61
4.2 Correlación de los resultados de la detección de <i>Giardia duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium</i> mediante qPCR con algunas variables consideradas en el estudio .....	62
4.2.1 Análisis entre los resultados de la detección molecular de <i>Giardia duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> , y el lugar de muestreo y el tipo de agua.....	62
4.2.2 Análisis entre los resultados de la detección molecular de <i>Giardia duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> , y la temporada de muestreo .....	64
4.2.3 Análisis entre los resultados de detección molecular de <i>Giardia duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i> , y características fisicoquímicas.....	65
4.3 Identificación de las sub-poblaciones de <i>Giardia duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium spp.</i>	67
4.3.1 Identificación de los ensamblajes de <i>Giardia duodenalis</i> .....	67
4.3.2 Identificación de las especies de <i>Cryptosporidium spp.</i> .....	68
<b>5. Capítulo 5: Discusión de resultados .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>81</b>
6.1 Conclusiones.....	81
6.2 Recomendaciones.....	84
<b>A. Anexo: Divulgación.....</b>	<b>85</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>87</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1:</b> Vías de transmisión y ejemplos de agentes patógenos relacionados con el agua.....	7
<b>Figura 1-2:</b> Ciclo biológico de <i>Giardia</i> spp.....	16
<b>Figura 1-3:</b> Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	19
<b>Figura 1-4:</b> Ciclo biológico de <i>T. gondii</i> .....	22
<b>Figura 1-5:</b> Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .....	25
<b>Figura 1-6:</b> Ciclo biológico de <i>C. cayetanensis</i> .....	28
<b>Figura 3-1:</b> Mapa del Departamento de Nariño, señalando los municipios en los cuales se llevó a cabo el estudio.....	46
<b>Figura 3-2:</b> Puntos de muestreo en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano que abastecen agua a zonas urbanas.....	47
<b>Figura 3-3:</b> Diagrama de flujo con los pasos metodológicos desarrollados.....	49
<b>Figura A-1:</b> Certificado de participación en XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología.....	85
<b>Figura A-2:</b> Certificado de participación en la VI Conferencia Internacional de <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i> .....	86

## Lista de graficas

	Pág.
<b>Grafica 4-1:</b> Detección de los parásitos en estudio mediante PCR en tiempo real.....	62
<b>Grafica 4-2:</b> Detección molecular de <i>G. duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium</i> spp.....	64
<b>Grafica 4-3:</b> Porcentaje de muestras positivas para <i>G. duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium</i> spp. en las 2 temporadas de muestreo.....	65

# Lista de tablas

Pág.

<b>Tabla 1-1:</b>	Agentes patógenos transmitidos por el agua y su importancia en los sistemas de abastecimiento de agua.....	8
<b>Tabla 1-2:</b>	Parásitos protozoarios detectados en muestras de agua en Colombia.....	11
<b>Tabla 1-3:</b>	Ensamblajes de <i>G. duodenalis</i> .....	13
<b>Tabla 1-4:</b>	Especies y genotipos de <i>Cryptosporidium</i> patógenos de humanos.....	18
<b>Tabla 1-5:</b>	Detección de parásitos protozoarios mediante técnicas moleculares.....	38
<b>Tabla 3-1:</b>	Plan de muestreo llevado a cabo en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano y en los acueductos veredales en estudio.....	48
<b>Tabla 3.2:</b>	Información de las secuencias de los iniciadores y sondas usados en los ensayos de qPCR.....	52
<b>Tabla 3-3:</b>	Componentes de reacción de la qPCR para la detección de los parásitos protozoarios en estudio.....	53
<b>Tabla 3-4:</b>	Perfil térmico utilizado para la detección de cada uno de los parásitos en estudio.....	53
<b>Tabla 3-5:</b>	Información de las secuencias de los iniciadores que serán usados en las PCRs. Fuente: esta investigación.....	55
<b>Tabla 3-6:</b>	Componentes de reacción de la PCR para la detección de las sub-poblaciones de <i>G. duodenalis</i> y <i>Cryptosporidium</i> spp.....	56
<b>Tabla 3-7:</b>	Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen <i>gdh</i> para la detección de <i>G. duodenalis</i> .....	56
<b>Tabla 3-8:</b>	Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen <i>tpi</i> para la detección de <i>G. duodenalis</i> .....	56
<b>Tabla 3-9:</b>	Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen SSU ARNr para la detección de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	57

<b>Tabla 4-1:</b>	Número y porcentaje de muestras positivas por cada parásito protozoario y por sitio de muestreo.....	63
<b>Tabla 4-2:</b>	Correlación entre los resultados de la detección molecular de <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i> y características fisicoquímicas del agua.....	66
<b>Tabla 4-3:</b>	Ensamblajes de <i>G. duodenalis</i> identificados con los marcadores <i>gdh</i> y <i>tpi</i> en cada sitio de muestreo.....	67
<b>Tabla 4-4:</b>	Especies de <i>Cryptosporidium</i> spp., identificadas en cada sitio de muestreo.....	68

# Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASPC	Agencia de Salud Pública de Canadá
AV	Acueductos veredales
bg	$\beta$ -giardina
CDC	Centro para Control y Prevención de Enfermedades
CI	Control interno
COT	Carbono orgánico total
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DIC	Microscopía de contraste diferencial de interferencia
ECDC	Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades
ef1 $\alpha$	Factor de elongación 1 alfa
Fw	Sentido <i>forward</i>
gdh	Glutamato deshidrogenasa
HPA	Agencia de la Protección de la Salud del Reino Unido
IDEAM	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia
IRCA	Índice de riesgo de la calidad del agua para consumo humano
ITFC	Isotiocianato de fluoresceína
ITS	Regiones espaciadoras internas transcritas
MEC	Matriz extracelular
NESID	Vigilancia Epidemiológica Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón
NNDSS	Sistema Nacional de Vigilancia de Enfermedades de Declaración Obligatoria de Australia
OMS	Organización mundial de la salud
PCFH	Peroxidación catalítica en fase húmeda
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POAs	Procesos de oxidación avanzada
PTACH	Plantas de tratamiento de agua para consumo humano
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
Rv	Sentido <i>reverse</i>
SSU ARNr	Subunidad menor del ARN ribosomal
tpi	Triosa fosfato isomerasa
USEPA	Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos
Vma	Valores máxima aceptables



## Introducción

El agua es un recurso esencial en el desarrollo de la vida, por esta razón actualmente el acceso al agua de calidad segura se considera como un derecho fundamental y los problemas relacionados con este recurso representan un objetivo de primordial importancia (1-3). Sin embargo, todavía más de mil millones de personas carecen de acceso a agua potable en todo el mundo, convirtiéndose en un factor de riesgo para los problemas de salud (4-6). En los países en vía de desarrollo, las enfermedades relacionadas por la falta de agua o calidad inadecuada, ocasionan la muerte anual de aproximadamente 5 millones de personas, de las cuales cerca de 1,8 millones mueren por enfermedades diarreicas, siendo el 90 % niños menores de cinco años (7).

En Colombia, aunque en promedio el 78 % de la población tiene acceso a agua potable, existen grandes diferencias de cobertura entre la zona urbana y rural, y se ha reportado que alrededor de 1.300 niños mueren al año por enfermedades diarreicas causadas por el consumo de agua de calidad insegura (7). Nariño es uno de los cinco departamentos que de acuerdo con su índice de riesgo de la calidad del agua para consumo humano (IRCA) de 50,27, se encuentra en alto riesgo en el país. En este Departamento, entre los problemas de salud relacionados con el agua, la enfermedad diarreica aguda, presenta una tasa de incidencia de 65,8 casos por 1.000 habitantes y una tasa de mortalidad de 18,2 casos por 1.000.000 habitantes (8).

El riesgo más común y extendido asociado con el agua, es la contaminación por microorganismos patógenos como virus, bacterias, protozoarios y helmintos, los cuales pueden ser transmitidos a los cuerpos de agua cuando estos reciben vertimientos de aguas residuales, biosólidos, heces de animales domésticos y silvestres, escorrentía urbana o escorrentía agrícola (9-12), siendo por ello el agua de calidad insegura considerada como un importante vehículo para la transmisión de éstos agentes patógenos (4,13,14).

---

Entre los microorganismos patógenos que pueden ser transmitidos por el agua, los parásitos protozoarios son de especial relevancia, debido a que son de distribución mundial y tanto en países desarrollados, como en vía de desarrollo constituyen una de las principales razones para cerca de 4 mil millones de casos de diarrea, que causan anualmente 1,6 millones de muertes, siendo por ello consideradas como un problema importante de salud pública (15–18). Además, este tipo de microorganismos han sido responsables de un gran número de brotes alrededor del mundo (19–25). De acuerdo con Efstratiou et al., (2017), en el periodo comprendido entre 2011 – 2016 se han reportado al menos 381 brotes a nivel mundial causados por la transmisión de protozoos parásitos a través del agua (26). *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* son los agentes etiológicos comunes en la mayoría de éstos brotes, seguidos por *T. gondii*, *Acanthamoeba* spp., *C. cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Blastocystis* spp., *Sarcocystis* spp., *Naegleria* spp., y *Balantidium coli* (15,27–29).

Así mismo, los parásitos protozoarios representan un gran reto en la producción de agua apta para el consumo humano debido a que sus formas quísticas son altamente resistentes a diversos factores ambientales y a los desinfectantes convencionales empleados en el tratamiento para la producción de agua potable, como por ejemplo la cloración, el cual si bien es el método de desinfección más ampliamente utilizado alrededor del mundo, tiene una eficacia limitada frente a este tipo de microorganismos (5,30–36). La resistencia de estos parásitos protozoarios se debe principalmente a la compleja composición y arreglo de los componentes de la pared de los quistes y de los ooquistes (1,37,38). La eficacia de la desinfección también puede ser insatisfactoria frente a patógenos presentes en flóculos o partículas que los protegen de la acción del desinfectante (16). Se ha descrito que una turbidez elevada en el agua puede proteger a los microorganismos de los efectos de la desinfección, estimular la proliferación de patógenos y generar una demanda significativa de cloro (39,40). En este sentido, en los procesos de potabilización además de desinfección con cloro también juegan un papel fundamental los medios de remoción físicos de la materia orgánica y de los microorganismos, siendo por tanto necesario asegurar el correcto funcionamiento de las distintas etapas del tratamiento para la producción de agua apta para consumo humano.

En el caso de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. cabe resaltar que se han descrito varios genotipos asociados con diferentes hospederos. En cuanto a *G. duodenalis*, se han reportado 8 ensamblajes que van desde el A hasta el H, de los cuales el A y el B son los que se han asociado a la infección en humanos y además se han encontrado en primates, gatos, perros y otros mamíferos; los demás ensamblajes se han considerado hospedero-específicos (41–44). Con respecto a *Cryptosporidium* spp. actualmente son reconocidas 31 especies, de las cuales 16 infectan al humano, entre éstas se encuentran *C. hominis* y la especie con potencial zoonótico *C. parvum*, responsables del 90 % de las infecciones de criptosporidiosis y asociados a la mayoría de brotes hídricos (45–47). *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis*, *C. muris*, *C. fayeri*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus* y *C. viatorum* también se han reportado en la infección en humanos (48,49). La identificación de los diferentes genotipos de estos parásitos protozoarios en fuentes de agua, puede ser útil para determinar las posibles fuentes de contaminación mediante su asociación con el tipo de hospedero que parasitan.

En el país teniendo en cuenta la importancia de los parásitos protozoarios transmitidos por el agua y los reportes a nivel mundial sobre el tema, la normatividad vigente (Decreto 1575 de 2007 del Ministerio de la Protección Social y su normatividad conexas) incluyó además del seguimiento de coliformes totales y *Escherichia coli*, el monitoreo de los quistes/ooquistes de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. dentro de los parámetros de control de calidad microbiológica del agua en las plantas encargadas de la distribución de agua potable. En esta normatividad también se establece que deben realizarse investigaciones acerca de la presencia de otros microorganismos patógenos que representen riesgo para la salud humana, con el fin de realizar mapas de riesgo más precisos a partir de los cuales se puedan tomar medidas de control más apropiadas y seleccionar indicadores de calidad microbiológica del agua que garanticen su inocuidad. Entre estos microorganismos patógenos tenemos otros parásitos protozoarios como *E. histolytica*, *T. gondii* y *C. cayetanensis* (50,51). Sin embargo, a pesar de la existencia de esta normatividad, en Colombia aún son pocos los estudios relacionados con la presencia de parásitos protozoarios en fuentes de agua, que permitan conocer las especies circulantes, así como su comportamiento y asociación con variables como niveles de precipitación, otros microorganismos y características fisicoquímicas que puedan afectar su presencia, distribución y transmisión (52–54).

---

Por otro lado, es importante tener en cuenta que para cumplir con los requerimientos normativos en la vigilancia microbiológica a cargo de las entidades prestadoras del servicio de agua para consumo humano, así como para el estudio en general de parásitos protozoarios como *Giardia* y *Cryptosporidium* en agua, es necesario contar con metodologías eficientes para la detección y seguimiento de este tipo de microorganismos en muestras ambientales, donde pueden estar presentes en concentraciones reducidas (6,47,55-59). En el país, la confirmación de las formas quísticas de estos parásitos se realiza mediante la identificación por microscopía de inmunofluorescencia de los quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*, siguiendo el método validado en los Estados Unidos por la *Environmental Protection Agency* - USEPA 1623 (18,39,60). No obstante, esta metodología presenta algunas desventajas como la alta experiencia requerida en la diferenciación microscópica de las formas quísticas por el personal encargado, los parásitos protozoarios pueden ser confundidos con partículas o algas que también presentan fluorescencia, está sujeto a la interferencia resultante de la presencia de iones en la muestra (manganeso, hierro y calcio), demanda mayor inversión económica inicial para la adecuación del laboratorio, adquisición de equipos y los consumibles requeridos constantemente (18,28,61-64). Las técnicas de biología molecular representan una alternativa metodológica en el estudio de parásitos protozoarios, debido a su mayor sensibilidad y especificidad. Entre estas, la qPCR presenta ventajas como el gran número de muestras que se pueden procesar en un corto periodo de tiempo, es menos laboriosa en comparación con técnicas como la PCR convencional, ya que no se requiere la manipulación de las muestras posterior a su amplificación, y tiene gran potencial para eliminar los resultados falsos positivos o falsos negativos encontrados mediante las técnicas de microscopía (5,44,57,65); adicionalmente, esta técnica presenta una alta sensibilidad que permite incluso la detección de pequeñas cantidades de ADN de las formas quísticas de los parásitos protozoarios, lo que es de gran utilidad en muestras ambientales (34,65). Así mismo, técnicas como la PCR anidada, análisis de secuenciación de genes específicos amplificados por PCR, técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción - RFLP, permiten discriminar entre los genotipos de los parásitos protozoarios (34,66).

Con base en todo lo anterior, se hace necesaria la detección de parásitos protozoarios de interés en salud pública tanto en agua cruda como tratada y la identificación de subpoblaciones

---

de microorganismos como *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., en el Departamento de Nariño, de tal manera que se genere información que aporte al conocimiento de la caracterización microbiológica de fuentes de agua utilizadas para el abastecimiento de plantas de tratamiento de agua para consumo humano y acueductos veredales, que contribuya a comprender el comportamiento de los parásitos protozoarios circulantes a nivel regional y que permita estimar posibles focos de contaminación del agua, información que podría servir como base a las empresas encargadas de la distribución de agua potable, así como a las entidades territoriales, para tomar medidas que favorezcan la remoción de dichos microorganismos y se prevengan los riesgos para la salud pública que implican la presencia de parásitos protozoarios en ambientes acuáticos.



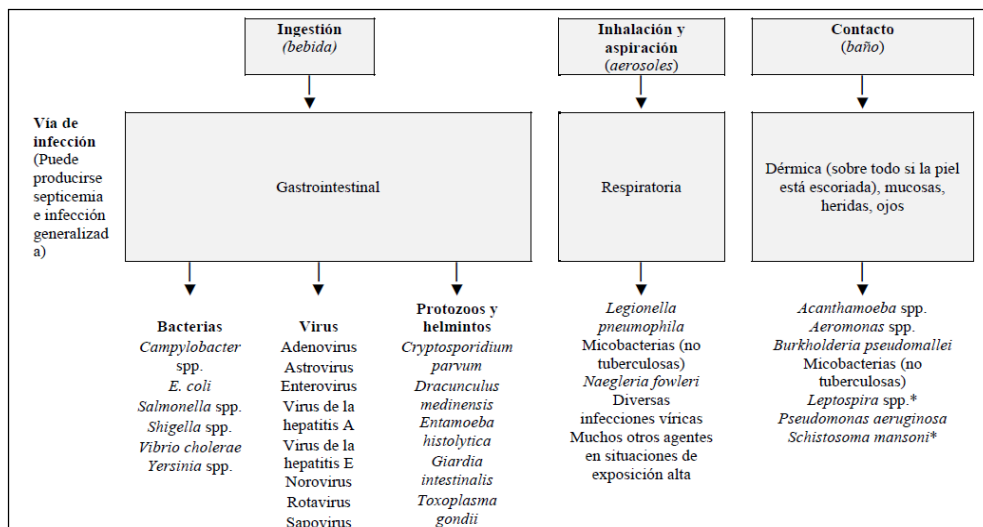
# 1. Capítulo 1: Generalidades

## 1.1 Microorganismos transmitidos a través del agua

El consumo de agua contaminada ha sido ampliamente asociada con brotes de enfermedades como: gastroenteritis, Hepatitis (A, E), giardiasis, criptosporidiosis, entre otras, causadas por microorganismos transmitidos a través del agua (4,5,17). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la gran mayoría de enfermedades diarreicas (88 %) y el 3,1 % de las muertes anuales en todo el mundo es atribuible a la insalubridad del agua, falta de saneamiento básico e higiene, condiciones bajo las cuales se favorece la interacción entre patógenos entéricos y la población (1,67).

Los agentes patógenos que pueden transmitirse por el agua de consumo contaminada son de diversos tipos. En la figura 1-1 y en la tabla 1-1 se presenta información general sobre agentes patógenos importantes en la gestión de sistemas de abastecimiento de agua de consumo.

**Figura 1-1:** Vías de transmisión y ejemplos de agentes patógenos relacionados con el agua  
Fuente: (16)



**Tabla 1-1:** Agentes patógenos transmitidos por el agua y su importancia en los sistemas de abastecimiento de agua. Fuente: adaptada de (16)

Agente patógeno	Importancia para la salud	Persistencia en los sistemas de abastecimiento de agua	Resistencia al cloro	Infectividad relativa	Fuente animal importante
<b>Bacterias</b>					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Baja	Puede proliferar	Baja	Baja	No
<i>Campylobacter jejuni</i>	Alta	Moderada	Baja	Moderada	Si
<i>E. coli</i> patógena	Alta	Moderada	Baja	Baja	Si
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Alta	Moderada	Baja	Alta	Si
<i>Legionella</i> spp.	Alta	Prolifera	Baja	Moderada	No
Micobacterias no tuberculosas	Baja	Prolifera	Alta	Baja	No
<i>Pseudomonas aeruginosae</i>	Moderada	Puede proliferar	Moderada	Baja	No
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Moderada	Baja	Baja	No
Otras salmonelas	Alta	Puede proliferar	Baja	Baja	Si
<i>Shigella</i> spp.	Alta	Corta	Baja	Moderada	No
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Corta	Baja	Baja	No
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Alta	Larga	Baja	Baja	Si
<b>Virus</b>					
Adenovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Enterovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Virus de la hepatitis A	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
Virus de la hepatitis E	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencial
Norovirus y sapovirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	Potencial
Rotavirus	Alta	Larga	Moderada	Alta	No
<b>Protozoos</b>					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	Si
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	No
<i>Giardia intestinalis</i>	Alta	Moderada	Alta	Alta	Si
<i>Naegleria fowleri</i>	Alta	Puede proliferar	Alta	Alta	Si
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alta	Larga	Alta	Alta	Si
<b>Helmintos</b>					
<i>Dracunculus medinensis</i>	Alta	Moderada	Moderada	Alta	No
<i>Schistosoma</i> spp.	Alta	Corta	Moderada	Alta	Si

La gama de estos agentes patógenos puede cambiar en función de factores variables como el aumento de las poblaciones de personas y animales, el incremento del uso de aguas residuales,

los cambios de los hábitos de la población o de las intervenciones médicas, las migraciones y viajes de la población, y presiones selectivas que favorecen la aparición de agentes patógenos nuevos o mutantes, o de recombinaciones de los agentes patógenos existentes(16). También existe una considerable variabilidad en la inmunidad de las personas, ya sea adquirida por contacto con un agente patógeno o determinada por factores como la edad, el sexo, el estado de salud y las condiciones de vida (16).

La vigilancia de agua para consumo, generalmente se realiza mediante el seguimiento a microorganismos indicadores (68). *E. coli* es el patógeno entérico más ampliamente utilizado para este fin. Sin embargo, hay muchos patógenos entéricos que se comportan diferente a *E. coli*, particularmente con respecto a la resistencia a la desinfección y persistencia en el medio ambiente, como es el caso de helmintos, protozoarios y algunos virus. En este sentido, es importante aclarar que no hay microorganismos indicadores universales, sino que deben considerarse indicadores apropiados para cada grupo de patógenos con características similares, que representen un potencial riesgo para la salud (17,69).

## **1.2 Parásitos protozoarios de importancia en salud pública, transmitidos por el agua**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 3,4 millones de personas, principalmente niños, mueren anualmente debido a enfermedades relacionadas con el agua, y que 2,2 millones de personas mueren anualmente debido a enfermedades diarreicas asociadas con la falta de saneamiento, precarias condiciones higiénicas y suministros inadecuados de agua (18,58). Entre las enfermedades de transmisión hídrica, es de gran relevancia tener en cuenta las que son causadas por parásitos protozoarios, considerados como un problema importante de salud pública tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo (12,66,70). Esto se debe a que éstos microorganismos están ampliamente distribuidos en el ambiente, representan riesgo para la salud incluso cuando se encuentran en bajas cantidades y presentan formas quísticas que les confieren una gran capacidad de sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales y no puede inactivarse completamente mediante la cloración y otros procesos de desinfección convencionalmente usados, en los mismos tiempos de contacto y dosis con los cuales se logra la eliminación de otros microorganismos como bacterias y virus, características que han facilitado que sean responsables de un gran número

---

de brotes hídricos a nivel mundial (5,66). Los brotes asociados con el agua potable son particularmente preocupantes debido a su capacidad de causar infección simultánea en un gran número de personas (9). En este sentido, los protozoos transmitidos por el agua representan un gran desafío para los sistemas productores y distribuidores de agua para consumo humano (18,53).

Entre los protozoos parásitos que contaminan el agua, *Cryptosporidium* y *Giardia* son reconocidos por ser los principales agentes etiológicos de brotes transmitidos por el agua en todo el mundo, causando infecciones gastrointestinales tanto en los seres humanos, como en animales. El riesgo para la salud pública no solo está asociado a su alta incidencia en los cuerpos de agua, sino también a su elevada persistencia en el ambiente y resistencia al tratamiento convencional del agua, características atribuidas en gran parte a la compleja composición y arreglo de los componentes de la pared de sus formas quísticas, que además les facilita su diseminación por el agua (1,40). Las dosis infectivas de *Cryptosporidium* y *Giardia* han sido estimadas en > 10 (oo)quistes y el riesgo de infección por ingestión accidental de estos microorganismos durante el baño con > 2 x 10<sup>-1</sup> L, fue > 1/10.000 individuos inmunocompetentes (71,72). En cuanto a su distribución puede variar dependiendo de la estación climática, reportándose frecuencias y densidades más altas de estos microorganismos durante las temporadas de lluvia (73,74). Sin embargo, también existen estudios que reportan que el mayor número de quistes/ooquistes fue registrado en primavera y verano (9).

Además de estos dos patógenos, parásitos como *E. histolytica*, *C. cayetanensis* y *T. gondii*, también han sido reportados como microorganismos transmitidos frecuentemente por el agua, responsables de la amebiasis, ciclosporiasis y toxoplasmosis, respectivamente (15,17). De los brotes reportados en el periodo 2004 - 2010 a nivel mundial causados por protozoos parásitos, *Cryptosporidium* spp. fue el agente etiológico en el 60,3 % de los casos, *G. duodenalis* en el 35,2 % y otros protozoos en el 4,5 %. Cuatro brotes (2 %) fueron causados por *T. gondii*, tres (1,5 %) por *C. cayetanensis* y dos (1 %) por *Acanthamoeba* spp. En el continente americano, los brotes hídricos ascienden a 33,1 % (66) de los brotes hídricos en todo el mundo. De estos, 60 brotes ocurrieron en los Estados Unidos (30,1 %), 1 en Canadá (0,5 %), dos en Perú (1 %), dos en Brasil (1 %) y un brote en la Guayana Francesa (0,5 %) (15). Hay reportes que indican

que la mayoría de brotes causados por *Giardia* ocurren en América Latina, África y Asia, con 5 x 10<sup>5</sup> nuevos casos cada año (75). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la prevalencia de las infecciones por protozoos parásitos se han hecho en los países desarrollados, donde la infraestructura de laboratorios es más accesible que en los países en desarrollo, en los cuales hace falta llevar a cabo un mayor número de investigaciones sobre el tema (15,76).

En Colombia, hasta ahora son pocos los estudios llevados a cabo sobre parásitos protozoarios transmitidos por el agua y la mayoría de ellos se han centrado en la detección de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. En la tabla 1-2, se presentan algunos de ellos.

**Tabla 1-2:** Parásitos protozoarios detectados en muestras de agua en Colombia. Fuente: adaptada de: (53,52,54)

Ubicación	Resultados obtenidos	Técnica de detección empleada	Referencia clave
Eje cafetero	- <i>Giardia</i> en 40 % de las muestras (31/77) - <i>Cryptosporidium</i> en 36 % de las muestras (28/77)	Método de concentración de formalina-éter e identificación por prueba de inmunofluorescencia	(52)
Quindío	<i>Giardia</i> en 23 % de las muestras (9/38) <i>Cryptosporidium</i> en 21 % de las muestras (8/38)	Método de concentración de formalina-éter e identificación por prueba de inmunofluorescencia	(53)
	- <i>G. duodenalis</i> , ensamblaje A en 5,2 % de las muestras (2/38) y ensamblaje B en 13,1 % (5/38) - <i>C. parvum</i> en 21 % de las muestras (8/38) y <i>C. hominis</i> 10,5 % (4/38) - <i>T. gondii</i> en 58,6 % (27/46)	Método de concentración de formalina-éter e identificación por PCR	
Bogotá	- <i>Giardia</i> en 16,7 % de las muestras (4/24) - <i>Cryptosporidium</i> en 8,3 % de las muestras (2/24)	Filtración a través del sistema Envirochek, concentración por flotación percoll -sacarosa, e identificación mediante prueba de inmunofluorescencia	(54)

A continuación se presentan algunos parásitos protozoarios comúnmente transmitidos a través del agua:

### 1.2.1 *Giardia* spp.

*Giardia* es un parásito protozoario cosmopolita, agente causal de la giardiasis, con una amplia gama de hospederos, que incluyen al humano, animales domésticos y silvestres (22,41,43,77). La giardiasis es una de las enfermedades parasitarias más comunes en diferentes áreas

---

geográficas del mundo; en países de Asia, África y América Latina aproximadamente 200 millones de personas presentan giardiasis sintomática, y tanto en los países desarrollados como en vía de desarrollo, *Giardia* se ha asociado con numerosos brotes diarreicos (10,42). El espectro de manifestaciones clínicas en humanos es amplio, desde molestias intestinales breves, leves y transitorias, que se resuelven por completo, hasta un conjunto de síntomas más complejos, que incluyen diarrea aguda, calambres abdominales, hinchazón, fatiga, flatulencias, náuseas, anemia, mala absorción de nutrientes y pérdida de peso, que duran hasta 7 semanas (38,78,79). También se han presentado manifestaciones extraintestinales de la giardiasis, como erupción maculopapular, urticaria, aftas, poliartiritis, colangitis, asma bronquial, iridociclitis y retinitis (80). El período de incubación en la giardiasis sintomática oscila entre 3 y 45 días. En algunos casos, la infección puede ser episódica con periodos sintomáticos recurrentes durante varios años, así mismo, en algunos hospederos desnutridos y en los niños, la infección puede tornarse crónica con diarrea, pérdida de peso, malabsorción grave, que tienen un impacto adverso en el crecimiento y desarrollo cognitivo y psicosocial (53,81). No obstante, los casos de la giardiasis asintomática ocurren con frecuencia, especialmente en los países en vía de desarrollo, e incluso se ha sugerido que algunas personas pueden beneficiarse de su estado de portador, sin ninguna desventaja con respecto a personas que no presentan el parásito (10). Aún no es claro por qué algunos individuos desarrollan giardiasis clínica mientras que otros permanecen asintomáticos, sin embargo, esto se ha relacionado con factores del huésped como el estado inmunológico, estado nutricional, edad, infecciones entéricas concurrentes y factores ambientales, así como las diferencias en virulencia y patogenicidad de cepas de *Giardia* (44,80).

La prevalencia de individuos con resultados positivos para *Giardia* en muestras de heces es del 2 - 5 % en países desarrollados y hasta del 20 - 30 % en países en vía de desarrollo (82). En países como Argentina, Perú y Colombia, las tasas de infección de *Giardia*, varían entre 6 % y 42 % (28). En Colombia, de acuerdo con algunos estudios realizados en niños, la prevalencia de *Giardia* oscila entre el 11 % y el 61 %, lo que representa una gran preocupación en términos de salud pública (81). Además, en el país, un estudio retrospectivo, en el cual se buscó describir la incidencia de la giardiasis durante el periodo comprendido entre 2009 - 2013, reveló un

informe de 15.851 casos, de los cuales el 50,3 % correspondió a mujeres, el 58,4 % tenían menos de 10 años y el 14,8 % tenían entre 10 – 19 años (49).

Por otro lado, *Giardia* también es un parásito entérico muy común en el ganado y los animales de compañía, siendo por tanto igualmente importante para la salud veterinaria (10). Además, la infección por éste microorganismo se ha asociado con pérdidas económicas, debido a la ocurrencia de diarrea en animales productivos y a la muerte de rumiantes domésticos neonatales (83).

Hasta ahora, dentro del género *Giardia* se distinguen 6 especies basadas en características morfológicas y electrocariotípicas. Cinco están representadas por aislamientos de anfibios (*G. agilis*), aves (*G. ardeae*, *G. psittaci*), roedores (*G. muris*) y ratones de campo (*G. microti*). La sexta especie corresponde a cepas de *Giardia* aisladas de una gran variedad de hospederos mamíferos, agrupados en una sola especie porque comparten características morfológicas y, en particular, tienen las estructuras corporales medianas similares. Esta especie ha sido denominada como *G. duodenalis*, también conocida como *G. intestinalis* y *G. lamblia* (44,65,82). *G. duodenalis* constituye una especie genéticamente compleja, que en base a análisis filogenéticos de un gran conjunto de datos de secuencias de nucleótidos de los genes: subunidad ribosomal pequeña rRNA, glutamato deshidrogenasa (*gdh*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*),  $\beta$ -giardina (bg), factor de elongación 1 alfa (*ef1 $\alpha$* ) agrupa 8 distintos ensamblajes o genotipos (A – H) (10). De estos ensamblajes, el A y el B son zoonóticos, mientras que los ensamblajes C, D, E, F, G y H se han definido como hospedero-restringido (81). En la tabla 1-3 se presentan los ensamblajes y sus respectivos hospederos.

**Tabla 1-3:** Ensamblajes de *G. duodenalis*. Fuente: (44)

Ensamblaje	Hospedero
A	Humanos y otros primates, perros, gatos, ganado, roedores y algunos mamíferos silvestres
B	Humanos y otros primates, perros y algunos mamíferos silvestres
C/D	Perros y otros cánidos
E	Ganado vacuno y ganado con pezuñas
F	Gatos
G	Roedores
H	Focas y gaviotas

En este sentido, un aspecto importante de la epidemiología de la giardiasis es comprender el rango de hospedadores de diferentes especies y ensamblajes de *Giardia*, el potencial de transmisión de especies cruzadas y los factores ambientales y de riesgo involucrados en la exposición del patógeno. Esto es particularmente importante para determinar el potencial zoonótico de las infecciones por *Giardia* en animales domésticos y para determinar la carga de morbilidad humana atribuible a parásitos de origen animal (10).

Por otro lado, además de la importancia médica y veterinaria de *Giardia*, éste parásito protozoario también es de gran interés en el área de las ciencias biológicas, debido a que es una de las células eucariotas más primitivas que se conocen (80). Entre sus principales características se destacan su organización intracelular sencilla, con elementos estructurales como dos núcleos diploides, transcripcionalmente activos y membrana nuclear bien definidos, citoesqueleto relativamente desarrollado y sistema de endomembranas polifuncional, carece de órganos como nucléolos, mitocondrias y peroxisomas, y presenta un organelo de fijación único: el disco de succión ventral. Este microorganismo, se considera aerotolerante o microaerofílico, sin producción de hidrógeno molecular, su metabolismo energético es fermentativo, está basado en la glucólisis que conduce a la producción de acetato, etanol, alanina y CO<sub>2</sub>, no realiza ciclo de Krebs, ya que carece de mitocondrias y de enzimas mitocondriales, no hay citocromos, ni evidencia de fosforilación oxidativa. Con respecto a su genoma, este es compacto en estructura y contenido, contiene pocos intrones o vestigios mitocondriales y posee una maquinaria simplificada para la replicación del ADN, la transcripción, el procesamiento del ARN y varias vías de señalización metabólicas (43,77). La reproducción de *Giardia* es asexual, no obstante, hay algunos estudios genómicos que indican que este microorganismo ha mantenido al menos parte de la maquinaria meiótica y la capacidad de los cromosomas para cruzarse, además han proporcionado evidencia de eventos de recombinación (84). Sin embargo, aún se requiere un mayor número de estudios que soporten estos hallazgos.

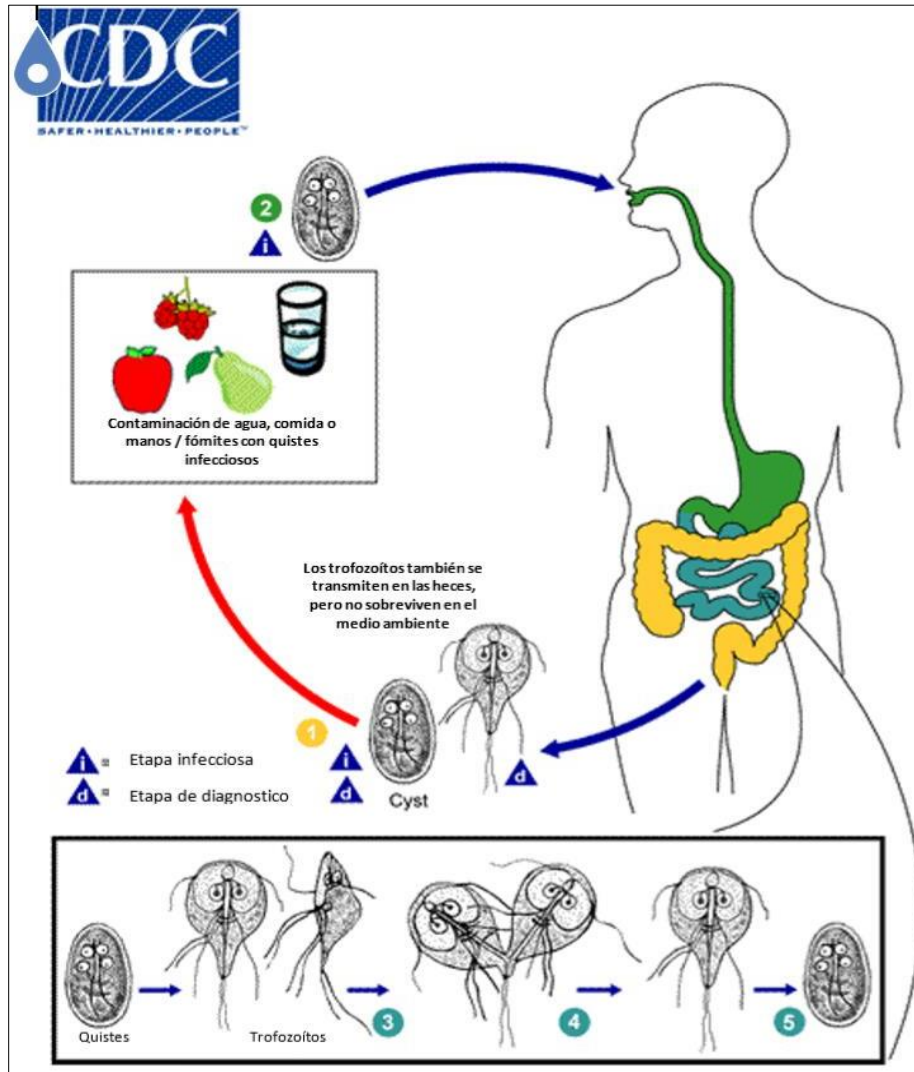
El ciclo de vida de *Giardia* es directo e involucra dos estadios, el trofozoíto que es el estadio replicativo y el quiste que es el estadio infectante y de resistencia (85). La infección se inicia ya sea por el consumo de alimentos o agua contaminados o por la vía fecal-oral a través del

contacto persona a persona, animal a animal o animal-persona (78,86). Una vez los quistes ingresan en el hospedero, la exposición al entorno ácido del estómago proporciona los estímulos necesarios para la exquistación de los trofozoítos en el duodeno del intestino delgado. Los trofozoítos se someten a una división mitótica repetida y finalmente forman quistes resistentes al medio ambiente en respuesta a las condiciones biliares del intestino delgado, que luego se desprenden en el material fecal. Los quistes son inmediatamente infecciosos cuando se excretan en las heces, son notablemente estables y pueden sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente (10,87). Como resultado de esto, la contaminación ambiental puede conducir a la contaminación de alimentos y de fuentes de agua (56,87). En la figura 1-2 se presenta el ciclo biológico de *Giardia* spp.

El agua es una de las principales rutas de transmisión de *Giardia*, cuyas formas quísticas están ampliamente distribuidas en fuentes hídricas. Por esta razón, este microorganismo es uno de los patógenos con mayor prevalencia en brotes de enfermedades transmitidas por el agua (1,15). Desde principio del siglo pasado hasta el año 2016, se han notificado 340 brotes de giardiasis transmitidos por el agua en todo el mundo (28). La contaminación de las fuentes de agua puede ser el resultado de actividades de origen humano, animales de granja y animales de vida silvestre (10).

*Giardia* representa una gran preocupación para las autoridades sanitarias y para las entidades responsables de la producción de agua potable, debido a que por un lado, es necesario un bajo número de quistes para inducir infección (71) y además, éste parásito protozoario presenta resistencia a los desinfectantes oxidativos como el cloro y cloraminas, generalmente utilizados en el tratamiento convencional del agua para consumo y son los suficientemente pequeños para penetrar la barreras físicas del tratamiento (1,16,32,68,82,88).

**Figura 1-2:** Ciclo biológico de *Giardia* spp. Fuente: (89)



Con respecto a las metodologías utilizadas para la detección y concentración de los quistes de *Giardia* en muestras de agua, comúnmente son costosas y engorrosas, lo que limita la cantidad de datos que se pueden recolectar (1). Por lo general, éstas metodologías incluyen los siguientes pasos: (i) recolección de muestras, (ii) segregación de partículas y (iii) detección de quistes (84). En Colombia, el monitoreo de los quistes de *Giardia* en las plantas encargadas de la distribución de agua potable se reglamentó mediante el Decreto 1575 de 2007 y la

Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de la Protección Social, y se realiza utilizando el método de la USEPA 1623.

### **1.2.2 *Cryptosporidium spp.***

Los protozoarios del género *Cryptosporidium*, son los agentes causales de la criptosporidiosis (47,90). Esta infección parasitaria afecta las células epiteliales de las vías gastrointestinales, biliares y respiratorias de los seres humanos y de diferentes especies de vertebrados, incluidos: aves de corral, peces, reptiles, pequeños mamíferos (roedores, gatos, perros), y grandes mamíferos (en particular ganado vacuno y ovino) (91,92). El principal síntoma de la criptosporidiosis es la diarrea, que puede ir acompañada de deshidratación, pérdida de peso, dolor abdominal, fiebre, náuseas y vómitos (45). Sin embargo, la patogénesis de la infección depende del estado inmunitario del hospedero, que varía desde una diarrea grave pero autolimitada en individuos inmunocompetentes hasta una infección prolongada debilitante y potencialmente mortal en individuos inmunocomprometidos y en niños menores de 5 años (21,91). El curso de la infección puede ser intra y extraintestinal, sintomático y asintomático (49). En Suramérica, la prevalencia general de *Cryptosporidium* se ha reportado entre el 1 % y el 37 % en estudios de heces de pacientes con gastroenteritis (28).

Hasta ahora se han descrito más de 31 especies de *Cryptosporidium* (55), de las cuales *C. parvum* y *C. hominis* son consideradas responsables de más del 90 % de los casos de criptosporidiosis en humanos, el porcentaje restante se atribuye a *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. felis*. No obstante, algunos países en vía de desarrollo presentan una alta prevalencia de estas especies inusuales. En Lima, Perú y Bangkok, Tailandia, *C. meleagridis* es tan prevalente en humanos como *C. parvum*, responsable del 10 – 20 % de los casos de criptosporidiosis (48). En la tabla 1-4 se presentan algunas de las especies de *Cryptosporidium* reportados en infecciones en humanos.

**Tabla 1-4:** Especies y genotipos de *Cryptosporidium* patógenos de humanos. Fuente: tomado de (93)

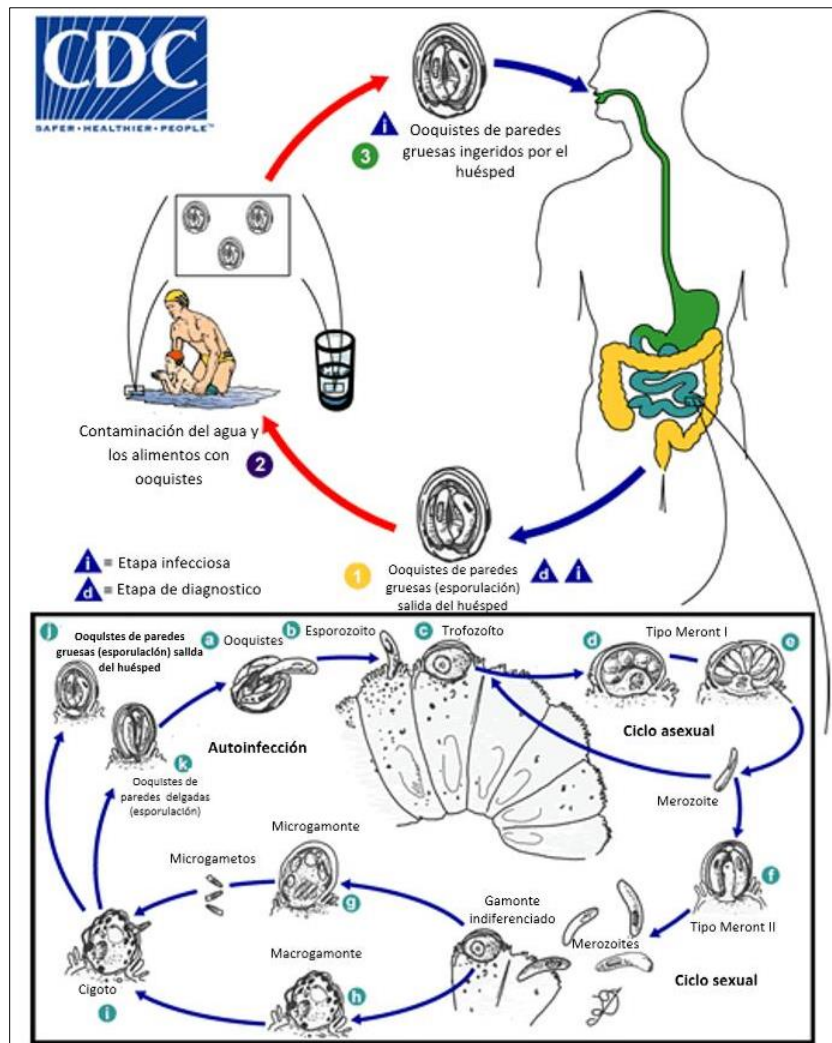
Especies/genotipo	Hospedero principal	Número de casos en humanos
<i>C. hominis</i>	Humanos, caballos	Especie común
<i>C. parvum</i>	Rumiantes	Especie común
<i>C. meleagridis</i>	Galliformes	Numerosos casos
<i>C. felis</i>	Gatos	Numerosos casos
<i>C. canis</i>	Perros	Numerosos reportes
<i>C. ubiquitum</i>	Pequeños rumiantes, roedores, primates	59
<i>C. cuniculus</i>	Conejos	47
<i>C. viatorum</i>	Humanos	32
Chipmunk genotipo I	Ardillas, ardillas grises, ratones ciegos	28
<i>C. muris</i>	Roedores	18
<i>C. andersoni</i>	Ganado vacuno y otros bovinos	7
<i>C. suis</i>	Cerdos	5
<i>C. bovis</i>	Ganado vacuno y otros bovinos	4
Horse genotipo	Caballos	4
<i>C. xiaoi</i>	Ovejas y cabras	2
Skunk genotipo	Roedores	2
Mink genotipo	Visón, nutrias, armiños	2
<i>C. erinacei</i>	Erizos	1
<i>C. fayeri</i>	Marsupiales	1
<i>C. scrofarum</i>	Cerdos	1
<i>C. tyzzeri</i>	Ratones	1

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* involucra tanto reproducción sexual como asexual, y se lleva a cabo dentro de un hospedero individual en dos días. La transmisión se realiza a través de los ooquistes, que corresponden a la forma infectante del parásito y, se completa a través de la ruta fecal-oral (6,47). En la figura 1-3 se presenta el ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. Los ooquistes tienen un tamaño aproximado de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro y son ligeramente ovoides, con una pared protectora resistente que les permite sobrevivir bajo una gran variedad de condiciones ambientales (37,46,56,94). La ingestión de un pequeño número de ooquistes viables (tan pocos como 10 ooquistes) son suficientes para causar infección (24).

La transmisión de los ooquistes puede ocurrir de persona a persona, de animal a animal, de humano a animal, de animal a humano, a través del agua, alimentos y posiblemente a través del aire (80,92,95). La transmisión hídrica es de gran relevancia, debido a que *Cryptosporidium* es considerado el principal agente etiológico de numerosos brotes causados por parásitos

protozoarios transmitidos por el agua a nivel mundial (15,35). Estos brotes se han asociado principalmente con aguas superficiales filtradas y no filtradas, aguas subterráneas, sistemas de distribución contaminados, agua potable, aguas recreativas y piscinas cloradas (31,90).

**Figura 1-3:** Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. Fuente: (89)



Además, *Cryptosporidium* es considerado como uno de los principales microorganismos transmitidos por el agua y categorizado como un patógeno de referencia para la evaluación de la calidad del agua potable, debido a que presenta gran resistencia a las técnicas convencionales de desinfección basadas en cloro, e incluso a la desinfección con UV, y además, también puede pasar a través de los procesos físicos de tratamiento del agua (31,35,59). Por estas razones, el análisis de los indicadores microbiológicos generalmente utilizados para

---

garantizar la calidad del agua de consumo (coliformes totales, fecales y termotolerantes) es insuficiente para determinar la presencia o ausencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en los sistemas de abastecimiento de agua potable, siendo necesario el estudio y monitoreo de este protozoo en la producción de agua para consumo humano (16). En Colombia, el monitoreo de los ooquistes de *Cryptosporidium* en las plantas encargadas de la distribución de agua potable, al igual que en el caso de los quistes de *Giardia*, se reglamentó mediante el Decreto 1575 de 2007 y la Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de la Protección Social, y se realiza utilizando el método de la USEPA 1623.

### **1.2.3 *Toxoplasma gondii***

*T. gondii* es un parásito protozoario zoonótico distribuido a nivel mundial, agente causal de la toxoplasmosis (96). Los hospederos definitivos de este patógeno son los gatos y otros felinos, no obstante, puede infectar prácticamente a todos los animales de sangre caliente como hospederos intermediarios, incluidos los seres humanos, animales domésticos y animales silvestres (36). Los síntomas más comunes de la toxoplasmosis son la hinchazón de los ganglios linfáticos, el dolor muscular y la fiebre, sin embargo, la infección puede variar de asintomática a severa, dependiendo de la cepa del parásito y del estado inmune del hospedero (28,33,97). En personas inmunocomprometidas la infección puede resultar en toxoplasmosis diseminada fatal a partir de la multiplicación del parásito en el músculo, los pulmones y el tejido neural. Además, la infección de mujeres embarazadas puede llevar al aborto y a efectos graves debido a la infección fetal a través de la placenta (36). Si la infección ocurre durante el primer trimestre del embarazo, el resultado es aborto espontáneo, muerte fetal o defectos congénitos graves como retraso mental y problemas de la visión. Si la infección ocurre después del primer trimestre, las manifestaciones de la enfermedad incluyen epilepsia, encefalitis, discapacidades de aprendizaje, enfermedades oculares y otros trastornos neurológicos (98).

La prevalencia de la infección puede variar según la localización geográfica, y se estima que corresponde a 50 % en Europa y a 85 % en América Central y del Sur (96). Estudios de Venezuela, Argentina y Cuba, han encontrado que la prevalencia de infección por *T. gondii* en niños se encuentra entre el 15 % y 58 % (28). Cabe resaltar, que en algunas comunidades la prevalencia de la infección por *Toxoplasma* es superior al 90 %, lo que fue reportado en un

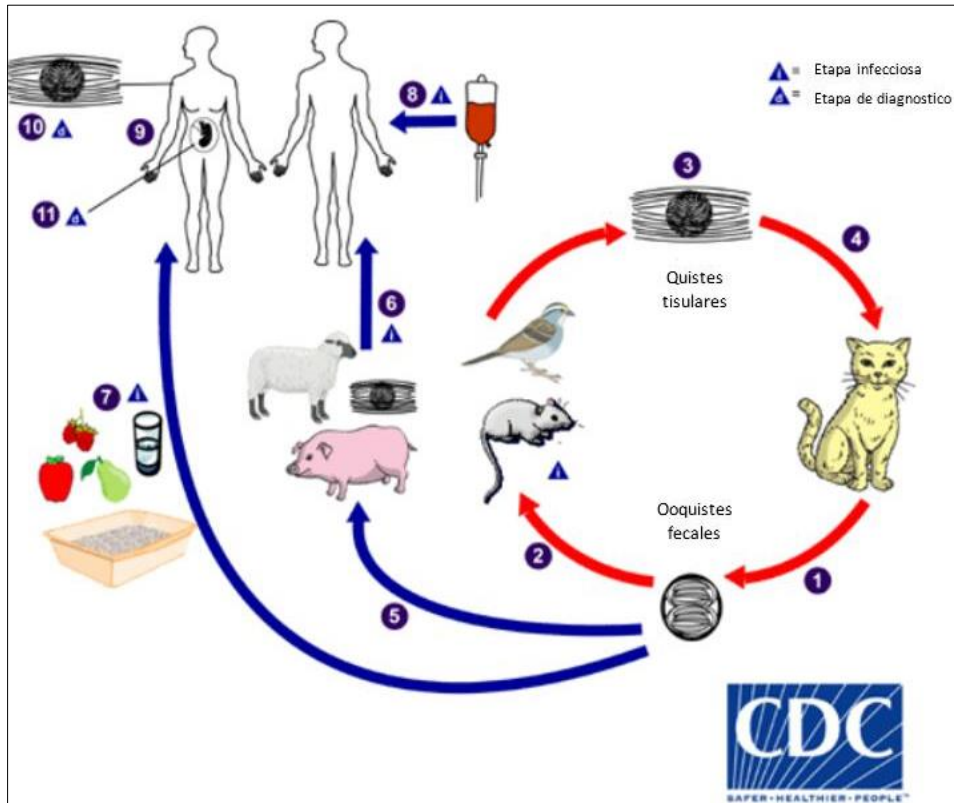
estudio llevado a cabo en Brasil, donde el riesgo de exposición estuvo asociado con el consumo de agua no filtrada (36).

Hasta ahora se han descrito 3 linajes clonales de *T. gondii*, denominados tipo I, II o III (96). Las cepas de tipo II, se han reportado como las más prevalentes, patógenas para fetos inmaduros y para pacientes inmunocomprometidos, pero también responsables de muchos casos de toxoplasmosis asintomática en Europa. Las cepas de tipo I se consideran altamente patógenas y se han asociado con la enfermedad ocular adquirida en pacientes con toxoplasmosis congénita diseminada, aunque también se sugiere que pueden ser responsables de infecciones asintomáticas en pacientes inmunocompetentes. Además de éstos 3 linajes clonales, aunque no es muy frecuente, también se han descrito cepas atípicas, como por ejemplo genotipos aislados en África, denominados como África 1, 2 y 3 (97). En la infección en animales se han reportado únicamente las cepas Tipo I (96).

En los hospederos definitivos, el parásito se ubica en el epitelio intestinal, donde se lleva a cabo la fase sexual del ciclo vital de *T. gondii*, lo que resulta en la excreción fecal de un gran número de ooquistes durante 10 a 20 días o rara vez por mayor tiempo. Los ooquistes expulsados esporulan y se tornan infectantes de uno a 5 días después, y pueden permanecer infectivos por largos periodos de tiempo en agua o en suelos húmedos, la infección puede ocurrir incluso con una cantidad mínima de ooquistes (97).

La principal vía de transmisión de *T. gondii* en el humano y en los animales es por vía oral, debido al consumo de carne cruda o mal cocida con presencia de quistes o al ingerir alimentos o agua contaminados con ooquistes (23). La transmisión de éste parásito protozoario también puede ocurrir de madre a hijo durante el embarazo, cuando ésta tiene los taquizoítos en fase de división rápida circulando por el torrente sanguíneo, generalmente durante la infección primaria. En la figura 1-4 se presenta el ciclo biológico de *T. gondii*.

**Figura 1-4:** Ciclo biológico de *T. gondii*. Fuente: (89)



A nivel mundial se han documentado varios casos de brotes de toxoplasmosis que se debieron al consumo de agua contaminada con ooquistes (28,33). En Colombia, se reportó un brote por éste patógeno en personal militar durante el desarrollo de operaciones de selva en la Macarena, Meta. Los síntomas más importantes fueron fiebre prolongada, adenopatías y compromiso pulmonar y gastrointestinal. Los 18 casos reportados se confirmaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) de anticuerpos IgG anti-toxoplasma. Este brote se atribuyó posiblemente al consumo de agua contaminada con ooquistes de una cepa silvestre del parásito, aunque en el estudio no realizaron el aislamiento y tipificación de las cepas involucradas (23).

La transmisión de *T. gondii* a través del agua y los brotes reportados, ha incrementado el interés en la investigación de la presencia de éste parásito protozoarios en agua para el

consumo humano, así como su resistencia a las condiciones ambientales y a los tratamientos aplicados en las plantas productoras de agua potable (33). Actualmente, ya se ha descrito que diversos productos químicos y métodos de desinfección, como la cloración, la aplicación de tabletas de yodo, el ozono, la radiación UV y el calentamiento por radiofrecuencia, son ineficaces en la inactivación completa de ooquistes de *T. gondii* (36).

Sin embargo, la detección de éste parásito patógeno en ambientes acuáticos sigue siendo un desafío, debido a la falta de métodos estandarizados para la detección de ooquistes de *Toxoplasma* en agua. Por lo general, se recomienda el uso de las mismas técnicas empleadas para la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en agua, como la USEPA 1623; no obstante, hasta ahora no hay kits comerciales de inmunofluorescencia disponibles para la detección de los ooquistes de éste microorganismo. Se ha propuesto aprovechar la capacidad de autofluorescencia que presenta la pared quística de este parásito protozoario, utilizando luz ultravioleta y filtros de emisión, que ha sido útil para la identificación de ooquistes purificados a partir de heces (33,36). También se han desarrollado varias técnicas basadas en PCR, las cuales hacen uso de las secuencias génicas más conservadas entre diferentes cepas de *T. gondii*, como el gen B1, el gen P30 (SAG1) y el ADN ribosómico (98).

#### **1.2.4 *Entamoeba histolytica***

*E. histolytica* es un parásito protozoario cosmopolita responsable de la amebiasis humana, la cual es una de las enfermedades parasitarias más comunes en todo el mundo, que cada año afecta a aproximadamente 50 millones de personas y causa 100.000 muertes a nivel mundial (99,100). En la mayoría de los casos las infecciones causadas por este patógeno son asintomáticas (90 %) y los factores que determinan su patogenicidad aún no están definidos, aunque posiblemente están asociados con elementos dependientes del hospedero, del parásito y del ambiente (101). En las personas sintomáticas, la amebiasis se puede presentar a nivel intestinal (disentería amebiana, rectocolitis aguda, colitis no disintérica crónica, ameboma) y extraintestinal (absceso hepático amebiano, absceso cerebral, enfermedad genitourinaria y cutánea) (102–104).

La amebiasis es común en áreas tropicales y subtropicales con precarias condiciones sanitarias y escasa educación en temas de salud, así como en países con una alta densidad poblacional (100). El riesgo de infección por *E. histolytica* puede variar dependiendo del lugar de

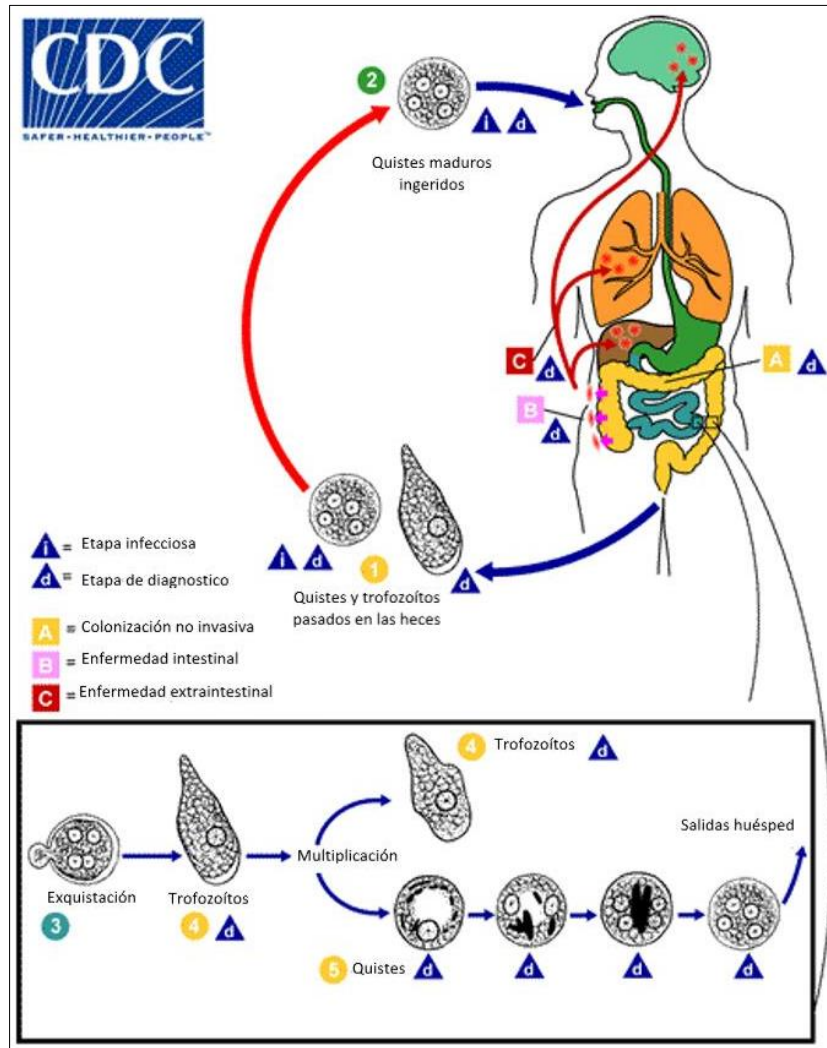
---

residencia, la edad, la ingestión de vegetales crudos, la calidad del agua consumida, hábitos de higiene y la infección por otros parásitos protozoarios (105).

El ciclo de vida de *E. histolytica* incluye dos fases o estadios: el trofozoito, que corresponde a la forma vegetativa, responsable de las manifestaciones clínicas y, el quiste, que corresponde a la forma de resistencia o infecciosa, responsable de la transmisión del parásito (106). El proceso de infección inicia con la ingestión de los quistes, los cuales son conducidos hasta el intestino delgado, donde ocurre el proceso de exquistación, durante el cual se observan trofozoítos ameboides móviles, que se mueven y establecen la enfermedad en el intestino grueso. El proceso invasivo conduce a la destrucción del parénquima intestinal, debido a actividades líticas del parásito y una respuesta inflamatoria del hospedero. Estas enzimas degradan la capa de moco, la matriz extracelular (MEC) y las uniones celulares. Paso seguido, el parásito puede cruzar la capa epitelial del intestino, entrar en el sistema circulatorio y establecer una infección extraintestinal, alcanzando órganos como el hígado, los pulmones e incluso el cerebro (106–108). Alternativamente, en respuesta a señales aún no definidas, los trofozoítos forman quistes infecciosos (enquistación) que se liberan del huésped, los cuales se caracterizan por medir entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, poseer una pared quística rígida y contener hasta cuatro núcleos (109). Los quistes son transmitidos por vía fecal-oral, ya sea por ingestión directa, al haber estado en contacto con objetos contaminados con heces o a través de la ingestión de alimentos o agua previamente infectados con los quistes (16). Recientemente, las fuentes de agua constituyen uno de los vehículos de mayor interés en la transmisión de *E. histolytica*, debido a que los quistes de éste parásito protozoario son relativamente resistentes a los tratamientos de desinfección aplicados generalmente en la producción de agua para consumo humano (16).

En la figura 1-5 se presenta el ciclo biológico de *E. histolytica*.

**Figura 1-5:** Ciclo biológico de *E. histolytica*. Fuente: (89)



Por otro lado, la amebiasis representa un desafío diagnóstico, ya que los humanos pueden infectarse con otras dos especies de *Entamoeba*, que corresponden a *E. dispar* y *E. moshkovskii*, que son morfológicamente indistinguibles de *E. histolytica*, lo que lleva en muchos casos a la sobrestimación de éste parásito protozoario y al uso de medicamentos innecesarios (110,111). Por ello, para realizar la adecuada diferenciación del complejo *E. histolytica/E. dispar/E. moshkovskii* se deben usar técnicas diferentes a las basadas en microscopia. Entre estas técnicas se encuentran la caracterización de patrones isoenzimáticos, inmunoensayos basados en la presencia de anticuerpos monoclonales y de antígenos de superficie distintos en la especie patógena y no patógena, la presencia o ausencia de adhesina, o mediante técnicas moleculares como la PCR, la cual es la más recomendada por la OMS (109,110,112).

---

### 1.2.5 *Cyclospora cayetanensis*

*C. cayetanensis* es un parásito protozoario mundialmente reconocido como un patógeno humano emergente, agente causal de la ciclosporiasis (113). Este microorganismo ha sido reportado en muchas regiones geográficas, pero parece ser endémico en áreas tropicales y subtropicales (114,115). Las manifestaciones clínicas de la ciclosporiasis, al igual que en las enfermedades causadas por otros parásitos protozoarios, están relacionadas con el estado de inmunosupresión de los pacientes (116); generalmente incluyen: diarrea acuosa, sin sangre, a menudo prolongada y grave, acompañada de pérdida de peso, anorexia, astenia, adinamia, dolor abdominal, náuseas y deshidratación, con menos frecuencia estreñimiento, vómito y fiebre leve (25,117). Al igual que con *Cryptosporidium*, la infección por *C. cayetanensis* se ha asociado con una variedad de secuelas, como el síndrome de Guillain-Barré, el síndrome de artritis reactiva (síndrome de Reiter) y la colecistitis acalculosa (25,56).

Los estudios basados en la comunidad sobre la distribución por edades de *C. cayetanensis* son escasos. Es posible que el mayor riesgo de infección y diarrea corresponda con los primeros 5 años de vida, no obstante, en estudios llevados a cabo en países como Nepal, Guatemala, Venezuela y Perú, las infecciones por *Cyclospora* no fueron detectadas, fueron poco frecuentes o asintomáticas en niños menores de 18 meses, lo que puede deberse a la presencia de anticuerpos maternos o a una exposición ambiental limitada en este grupo de edad. En otros estudios llevados a cabo en Guatemala, Honduras, Haití, Cuba, Venezuela, Nepal y Turquía la infección fue más frecuente en escolares menores a los 10 años de edad (116).

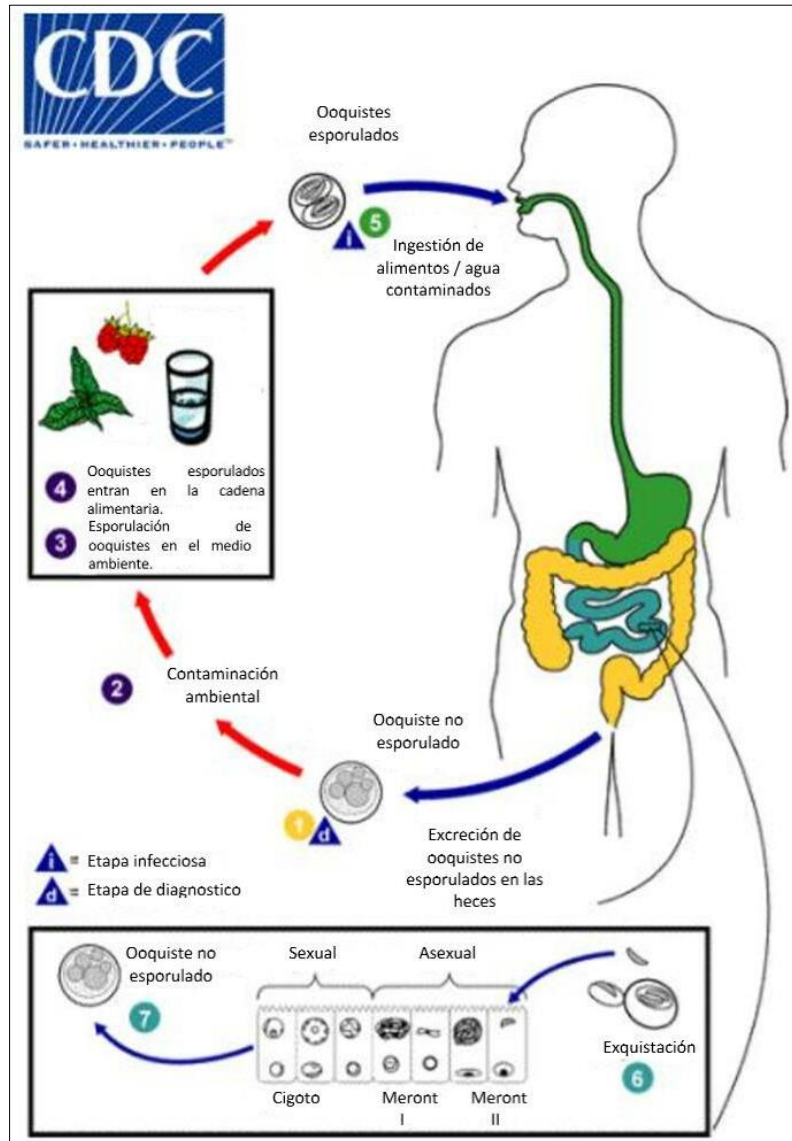
Hasta ahora los humanos parecen ser el único huésped natural de *C. cayetanensis* (32), ya que aún no se han confirmado otras especies animales como reservorios o huéspedes intermediarios del parásito en el medio ambiente (56), y aunque hay estudios que han descrito la presencia de ooquistes que se asemejan a los de *C. cayetanensis* en varios animales, incluidos pollos, patos, ratones, ratas, perros y primates, mediante técnicas de microscopía convencional, los hallazgos obtenidos aún son contradictorios e inciertos (97).

El ciclo de vida de *C. cayetanensis* aún no está completamente caracterizado, al parecer requiere un único hospedero para completar todo el ciclo, en el cual se desarrollan tanto los

estadios asexuales como sexuales y, sigue los mismos patrones descritos para otros coccidios entéricos (116). La infección en el humano inicia con la ingestión de ooquistes esporulados, una vez en el yeyuno los esporozoitos de los ooquistes son liberados y penetran el enterocito, ocasionando la división asexual, responsable de los daños titulares y la sintomatología, además ocurre la reproducción sexual dando lugar a ooquistes no esporulados que son excretados en la materia fecal al medio ambiente, necesario para llevar a cabo el proceso de maduración y esporulación (25). Las condiciones ambientales para la esporulación aún no están claras, es posible que los ooquistes requieran unos días a semanas, dependiendo de los factores climáticos que favorezcan su maduración. En condiciones experimentales, la esporulación se ha llevado a cabo usando 2,5 % de dicromato de potasio y ocurre en 7 - 13 días a temperaturas entre 22 y 32 °C (56). En la figura 1-6 se presenta el ciclo biológico de *C. cayetanensis*.

La forma de transmisión de *C. cayetanensis* son los ooquistes, los cuales se han descrito como parecidos a esferas, de superficie lisa, doble pared, de 8 - 10 µm de diámetro, caracterizados por presentar autofluorescencia azul o verde bajo filtros dicromáticos de 365 nm o 490 nm (118). Los ooquistes contienen dos esporoquistes ovoides, cada uno de los cuales contiene dos esporozoítos (113). Estas formas quísticas pueden persistir en el ambiente por periodos prolongados de tiempo, manteniendo su infectividad incluso en condiciones ambientales adversas. Algunas características observadas son: pueden sobrevivir en el agua a 4 °C durante 2 meses y a 37 °C durante 7 días, la esporulación de los ooquistes no puede inducirse después de la congelación a -18 °C durante 24 h y después de calentamiento a 60 °C durante 1 h, son muy resistentes a muchos desinfectantes, incluida la cloración a niveles utilizados en el tratamiento del agua, pero son muy sensibles a la desecación; la pared del ooquiste se rompe después de 15 minutos. Los ooquistes requieren tiempo, humedad y temperatura moderada para volverse infectivos (97,115,116).

**Figura 1-6:** Ciclo biológico de *C. cayetanensis*. Fuente: (89)



Con relación a las rutas de transmisión de éste parásito protozoario, los alimentos, el agua y el suelo contaminados con ooquistes esporulados son los principales modos de diseminación (32,90,95). La transmisión directa de persona a persona a través de la exposición fecal es poco probable, debido a que como se mencionó previamente, los ooquistes no son infecciosos en las heces recién excretadas (20). En la mayoría de países desarrollados, la ciclosporiasis se ha asociado principalmente con el consumo de productos importados, principalmente frutas

(frambuesas, moras) y vegetales (lechugas, perejil), y casos de diarrea del viajero, en el último caso siendo de gran importancia la región visitada, así como el periodo del año en que se viaja. El parásito se ha aislado con mayor frecuencia de los viajeros a Asia, África y Latinoamérica (114,115,117). Por otro lado, en zonas en vía de desarrollo, se han realizado pocos estudios para abordar las vías de propagación de la infección, sin embargo, es posible que haya múltiples rutas de transmisión. En países como Guatemala, Nepal, Vietnam y Egipto, la fuente de contaminación de *C. cayetanensis* correspondió a agua potable o a fuentes de agua utilizadas para consumo (116). El agua posiblemente juega un papel fundamental en la transmisión de éste parásito protozoario, debido a que la contaminación de los alimentos puede provenir del agua de riego empleada, del agua utilizada para el lavado de los alimentos y también del agua potable (118).

En Latinoamérica, de 1979 a 2015, se notificaron 16 brotes de protozoos transmitidos por el agua, de los cuales *C. cayetanensis* fue considerado el agente etiológico del 35,3 % (28). En Colombia, hasta la fecha, se han detectado principalmente casos aislados de ciclosporiasis y un solo brote en la Ciudad de Medellín, entre abril y mayo de 2002, en el cual se analizaron las muestras de heces procedentes de 56 pacientes con problemas gastrointestinales, cuya presentación clínica más importante fue astenia, adinamia y diarrea acuosa prolongada, con deshidratación y dolor abdominal. De las personas que presentaron la sintomatología, el 55,4 % (31/56) fueron positivos para *C. cayetanensis*, encontrando que hubo un mayor consumo de jugos y ensaladas entre los pacientes positivos para este agente patógeno que en los negativos (25). Este brote ocurrió durante meses lluviosos, con una precipitación total de 42 mm, mientras que el promedio anual fue de 15 mm, lo cual está de acuerdo con la marcada estacionalidad en la presentación de los episodios de ciclosporiasis, que se caracteriza por presentar tasas de infección más altas durante la temporada de lluvia, que va disminuyendo a niveles indetectables durante la temporada seca (95). No obstante, también hay estudios que indican que en algunos países el mayor número de casos se presentan durante épocas secas. Es posible que la estacionalidad de este microorganismo pueda ser explicada por los rangos de temperatura, humedad y otros factores medioambientales que permiten la esporulación y sobrevivencia de los ooquistes (25).

Es importante tener en cuenta que en el estudio de *C. cayetanensis*, particularmente en muestras ambientales, sería valioso contar con herramientas sensibles y específicas para

---

detectar y cuantificar la presencia del parásito, lo cual permitiría una mejor evaluación de la epidemiología y los riesgos reales presentados por este microorganismo (113). Actualmente, el diagnóstico de la ciclosporiasis en heces se basa en la búsqueda directa de ooquistes por medio de examen directo, concentración con formol éter, coloración de Ziellh Neelsen modificada y autofluorescencia empleando filtros dicromáticos de 365 nm y 450 a 490 nm, para observar la fluorescencia azul o verde, respectivamente (25). Sin embargo, en muestras ambientales, no hay un protocolo de detección estandarizado en muestras ambientales, como el método USEPA 1623 para *Giardia* y *Cryptosporidium* en agua (32), y aunque las técnicas microscópicas y moleculares disponibles hasta ahora están mejorando sustancialmente, pueden aún no ser lo suficientemente sensibles como para detectar *C. cayetanensis* de manera confiable cuando los niveles de contaminación son bajos (115). En el caso de las técnicas de microscopia, la principal desventaja en muestras ambientales es la adecuada separación de la muestra de todos los desechos y detritos, además se requiere de un observador lo suficientemente entrenado para distinguir morfológicamente los ooquistes de *Cyclospora* de otros artefactos que puedan ser similares o presentar autofluorescencia. Con respecto a las técnicas moleculares, uno de los principales desafíos es garantizar la adecuada detección de *C. cayetanensis* para que no hayan detecciones inespecíficas de otras especies de *Cyclospora* o *Eimeria*, ya que en las secuencias de ADN disponibles se ha observado gran homología. Cabe destacar que tanto *Eimería* como las otras especies de *Cyclospora* son prevalentes en animales y por lo tanto pueden encontrarse más fácilmente en el ambiente, lo que podría conducir a identificaciones falsas positivas de *C. cayetanensis* (56,115). En este sentido, se han descrito algunas técnicas moleculares basadas en la PCR que permiten la diferenciación entre *Cyclospora* y *Eimeria*; también se ha descrito el uso de marcadores como las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS), que podría usarse para identificar diferentes genotipos de *C. cayetanensis*, lo cual sería de gran valor epidemiológico (90).

Aun hacen falta mucha información que permita comprender la biología y epidemiología de *C. cayetanensis*, como por ejemplo estudios con respecto a la presencia y supervivencia de *C. cayetanensis* en el medio ambiente, origen, fuentes y reservorios, estacionalidad, entre otros (56,114,116).

### 1.3 Remoción de parásitos protozoarios en las plantas de producción de agua potable

En el año 1900 las enfermedades transmitidas por el agua eran responsables del 25 % de las muertes por enfermedades infecciosas. El cloro fue el primer desinfectante utilizado en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano, reduciendo drásticamente las enfermedades transmitidas por el agua (119). Hoy en día, de acuerdo con las directrices de la OMS para mejorar la calidad de agua para consumo se recomiendan sistemas de tratamiento multi-barrera, que incluyen procesos como sedimentación, pre-filtración, filtración lenta en arena, coagulación, floculación, sedimentación, filtración rápida en arena, aireación y desinfección a través de ebullición, la radiación UV, cloro y el ozono (15).

De acuerdo con la literatura, pasos eficientes de coagulación/floculación, sedimentación, filtración y desinfección pueden remover los protozoos parásitos que normalmente se encuentran en las aguas superficiales. Los trofozoitos son susceptibles a la mayoría de desinfectantes usados, pero las formas quísticas son más resistentes a la cloración y ozonización que la mayoría de bacterias entéricas y virus. Por ejemplo, está bien documentado que los quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* son altamente resistentes a condiciones medioambientales adversas y a las concentraciones de los desinfectantes comúnmente usadas en las plantas de tratamiento de agua. Se ha observado que los quistes de *Giardia* sobreviven en el agua por aproximadamente 2 meses a temperaturas tan bajas como 8 °C y los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden sobrevivir hasta 1 año a 4 °C en agua de mar artificial (9).

Por esta razón, en la eliminación de los agentes patógenos de éste tipo, juega un papel fundamental la remoción física mediante múltiples barreras. Los quistes/ooquistes son naturalmente electronegativos, una propiedad utilizada durante la filtración y coagulación. En la etapa de coagulación, la precipitación usando hidróxidos metálicos puede reducir la concentración de los quistes/ooquistes hasta un 99 %. Así mismo, la etapa de filtración a través de diatomeas de tierra puede ser muy eficaz, y el uso de recubrimientos electropositivos como el óxido de aluminio de hierro hidratado puede mejorar la efectividad de la filtración aún más. La filtración a presión a través de filtros de microfiltración o ultrafiltración también puede producir una reducción de hasta 6 log de formas quísticas (66).

---

También se ha reportado que algunos quistes son particularmente susceptibles a la irradiación UV, abriendo la posibilidad del aprovechamiento de la luz solar natural para su desinfección. Los estudios realizados *in bach* mediante desinfección solar, proceso conocido como método SODIS, han mostrado que después de 10 horas de exposición a 48 °C los quistes de *Giardia muris*, *E. histolytica* y *Cryptosporidium parvum* dejan de ser infectivos, e incluso que después de 1 hora de exposición a luz solar intensa, se podría inactivar hasta un 90 % de los quistes de *Giardia* (66). No obstante, estudios más recientes reportan que muchas formas quísticas de protozoarios tienen una capa protectora que impide que la radiación UV tenga contacto con el tejido, y que en caso de causar daño e inactivarlos, si no se mantienen en exposición constante a la luz UV, pueden recuperar su infectividad (120,121).

Actualmente, teniendo en cuenta la importancia de los microorganismos resistentes a los métodos de desinfección empleados con más frecuencia en la producción de agua para consumo humano como los protozoos parásitos, existe la necesidad de desarrollar, optimizar e implementar métodos de tratamiento alternativos, que puedan hacer frente de forma más eficiente y económica a los retos que implican este tipo de microorganismos, así como los altos niveles de contaminación hídrica, los problemas de salud pública causados por enfermedades relacionadas con el uso de agua contaminada y las normativas cada vez más exigentes con respecto a la calidad del agua potable (121–124).

En las últimas décadas, se ha incrementado notablemente el interés por nuevos métodos de desinfección como los procesos de oxidación avanzada (POAs), ya que constituyen alternativas potenciales para mejorar los sistemas de tratamiento de fuentes superficiales de agua para la producción de agua potable (125–127). Los POAs son un conjunto de métodos que utilizan el poder oxidante de los radicales OH• y difieren entre sí por su forma de generarlos (128). Entre los métodos utilizados para la producción de los radicales hidroxilo se encuentran: O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/UV, peroxidación catalítica con sistemas de reacción Fenton, fotocátalisis con semiconductores (como TiO<sub>2</sub> y ZnO) así como sólidos activos, sonólisis, sono-foto-catálisis, peroxidación catalítica en fase húmeda (PCFH) y las diferentes combinaciones entre éstos métodos (129,130).

Los radicales hidroxilo, que son la base de la eficiencia demostrada por los POAs, son capaces de mineralizar diferentes compuestos hasta  $\text{CO}_2$ , agua e iones inorgánicos, sin limitaciones importantes de concentración o cambio de fase, y simultáneamente inactivar una alta proporción de microorganismos patógenos presentes en el agua (122,123,131). Los radicales  $\text{OH}\cdot$  que hacen parte de las denominadas especies de oxígeno reactivas, permiten procesos termodinámicamente más favorables y velocidades de oxidación superiores en comparación con otros métodos de oxidación; por ejemplo, tienen la capacidad de reaccionar 100 – 1000 veces más rápido que agentes oxidantes alternativos como el ozono (132). Los POAs no generan subproductos de desinfección tóxicos, generalmente no inducen la formación de lodos que requieran tratamiento y/o eliminación adicional, mejoran las características organolépticas de las aguas tratadas y son poco selectivos en la degradación de un amplio espectro de compuestos orgánicos (124). Todas estas características y los promisorios resultados reportados mediante la aplicación de POAs han orientado las investigaciones hacia la optimización de los parámetros de operación involucrados en la degradación de contaminantes orgánicos, así como el estudio de su potencial en la inactivación de microorganismos patógenos. Este último sería un factor determinante para viabilizar la aplicación de los POAs en la producción de agua potable a gran escala en el corto plazo.

## **1.4 Detección de parásitos protozoarios en agua**

Contar con metodologías sensibles, eficientes y confiables para la detección de parásitos protozoarios en ambientes acuáticos, continua siendo un objetivo clave para su estudio y monitoreo, que permitan una mejor evaluación del riesgo que representan, entender mejor su ecología en las fuentes de agua, así como para elucidar las fuentes de contaminación y las vías de transmisión (55,57). Por ésta razón, estos métodos son frecuentemente revisados en diversas instituciones a nivel mundial, con el fin de optimizar su sensibilidad y especificidad (28,133,134).

Los métodos para detectar parásitos protozoarios en agua, al igual que los métodos desarrollados para el estudio de este tipo de microorganismos en otras matrices, como muestras clínicas y alimentos, presentan sus propios desafíos, lo cual debe ser considerado al adaptar metodologías que no se hayan utilizado en muestras de agua, siendo necesario llevar a cabo su adecuada optimización antes de su uso (56). Entre los principales desafíos del

---

estudio de parásitos protozoarios en ambientes acuáticos encontramos, la presencia de restos de plantas y animales, sólidos suspendidos, arcillas, ácidos húmicos y fúlvicos, diversos productos químicos orgánicos e inorgánicos, otros microorganismos e incluso otros protozoos genéticamente similares, los cuales limitan la eficiencia de recuperación y detección de los microorganismos blanco (18,31,56). Así mismo, es importante tener en cuenta que en muestras ambientales las formas quísticas de los parásitos protozoarios pueden encontrarse en pequeñas cantidades, por lo tanto los métodos utilizados para su recuperación deben ser capaces de concentrarlos efectivamente y los métodos utilizados para su detección deben ser altamente sensibles y específicos (6,55,94).

Hasta ahora la mayoría de métodos diseñados y aprobados se han desarrollado para el monitoreo de *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas superficiales y en agua destinada al consumo humano; pero aún no hay métodos validados para la detección de otros parásitos protozoarios como *T. gondii* y *C. cayetanensis* en este tipo de matriz, y aunque hay un mejoramiento sustancial en esta área, aun hacen falta más estudios que evalúen los métodos propuestos (33,36,115,135). Cabe resaltar que generalmente los mismos métodos utilizados para el estudio de *Giardia* y *Cryptosporidium* han sido adaptados para los otros parásitos protozoarios (28,57,136,137).

En los métodos aprobados para el monitoreo de parásitos protozoarios en fuentes de agua los pasos claves corresponden principalmente a: toma de muestras, concentración, purificación y detección (57,84).

Con respecto a la toma de muestras de agua, si bien no hay un único procedimiento aceptado, se debe tener en cuenta que las estrategias de muestreo utilizadas son de gran relevancia en la eficiencia de recuperación de los parásitos protozoarios. Entre los factores que se deben tener en cuenta están: el volumen de muestra (volumen pequeño: 10 – 50 L; volumen grande: > 50 L), la concentración total de partículas que se puede procesar, la recolección de muestras puntuales o compuestas, el número de muestras que se puede procesar en laboratorio, la frecuencia de muestreo y la temporada de muestreo (6,138). Para definir estos aspectos es importante tener en cuenta el tipo de agua a muestrear, los datos previos de caracterización

fisicoquímica y microbiológica de las fuentes de agua de interés, así como las características y capacidad de la metodología a utilizar (84,138). El número de muestras a analizar puede estar limitado por los costos de muestreo y costos de procesamiento de las muestras.

En cuanto a la etapa de concentración de las muestras de agua para la recuperación de los parásitos protozoarios, tiene como objetivo coleccionar todas las partículas con un tamaño y una velocidad de sedimentación asociadas con los microorganismos blanco. Para ello se han desarrollado diferentes metodologías, entre las cuales se encuentran: filtración y recuperación de partículas del filtro, precipitación química seguida de la disolución del precipitante, centrifugación continua y centrifugación-decantación (18,56,138). Cabe resaltar, que por lo general los porcentajes de recuperación de parásitos protozoarios en muestras de agua mediante los métodos mencionados son bajos y pueden variar dependiendo del método y de la calidad del agua (60,84). La filtración es el método más comúnmente utilizado, y puede variar en función del tipo de filtro utilizado, el material del filtro y tamaño de poro (138). De acuerdo con Efstratiou et al., (2017), en los últimos 35 años la filtración representa aproximadamente el 72 % de los métodos de concentración utilizados (filtros tipo cartucho 45 %; filtros tipo membrana 27 %; otros 5 %), seguido por floculación con un 10 %, centrifugación 7 % y ultrafiltración 6 % (138).

En relación con la purificación, el objetivo es la separación selectiva de las formas quísticas de los parásitos protozoarios de los materiales inespecíficos en suspensión (139). Entre las metodologías utilizadas para este fin se encuentran técnicas de separación por gradiente de densidad como flotación y centrifugación en gradiente discontinuo y la técnica de separación inmunomagnética, siendo esta última la que proporciona suspensiones de quistes/ooquistes más limpias, pero que también corresponden al método más costoso (84,138). Algunas limitaciones de estas metodologías están relacionadas, en el caso de la centrifugación con la ineficiente remoción de materiales biológicos como levaduras y algas que podrían afectar la posterior detección de los parásitos protozoarios y, en el caso de la separación inmunomagnética su dependencia del pH, debido a que cuando se eliminan los materiales magnéticos, esto provoca que el pH varíe del óptimo, lo que puede disminuir la afinidad de las interacciones anticuerpo-antígeno y por tanto afectar la eficiencia de recuperación de los quistes/ooquistes (31).

---

En la etapa de detección de los parásitos protozoarios, hay varias metodologías desarrolladas, de las cuales las de mayor interés son las técnicas basadas en microscopía y las técnicas de biología molecular (78,113). Entre las técnicas de microscopía se encuentran: microscopía de contraste de fases y microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC), las cuales permiten observar la morfología interna de los parásitos y proporcionan una mejor visualización e identificación en comparación con la microscopía óptica, así mismo la microscopía de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (ITFC), lo que permite incrementar la capacidad de visualizar los quistes/ooquistes y diferenciarlos de materiales inespecíficos, a esta metodología generalmente se integran tinciones con colorantes fluorescentes nucleofílicos como por ejemplo DAPI y yoduro de propidio, los cuales pueden revelar detalles estructurales de los quistes/ooquistes, facilitando su identificación morfológica (84,138,139). Sin embargo, las técnicas de microscopía pueden ser laboriosas, en particular cuando la muestra tiene muchos detritos y se requiere de personal bien entrenado que pueda distinguir las características microscópicas de los parásitos protozoarios de interés de artefactos u otras estructuras similares, que incluso puedan presentar autofluorescencia (115).

Por otro lado, con respecto a las técnicas de biología molecular, se han descrito varios métodos basados principalmente en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la utilización de iniciadores específicos que presentan una alta sensibilidad y especificidad en la detección de parásitos protozoarios en muestras ambientales (57,80). Entre las técnicas que más ampliamente se han utilizado se encuentran: PCR convencional, PCR anidada, qPCR, RT-PCR, PCR-RFLP y más recientemente LAMP (138). Las principales ventajas de éstas técnicas son: capacidad de analizar un gran número de muestras en un corto tiempo, bajo costo económico, potencial para eliminar resultados falsos positivos encontrados mediante las técnicas de microscopía, diferenciación entre especies y genotipos, así como también pueden proporcionar información respecto a la viabilidad de los quistes/ooquistes (5,31,57,66).

De las técnicas mencionadas, la qPCR constituye un método altamente eficiente, con sensibilidad, especificidad, rapidez y reproducibilidad mejoradas, lo que favorece la detección de las formas quísticas en muestras ambientales, en las cuales es común que se encuentren en

bajas cantidades (31,65). Diferentes estudios han indicado la detección exitosa de parásitos protozoarios como *Giardia* y *Cryptosporidium* en diferentes tipos de muestras de agua mediante la qPCR (34). Una de las ventajas de ésta técnica es que no se requiere la manipulación de las muestras posterior al proceso de amplificación en pasos como la electroforesis, generalmente utilizada para la verificación de los amplicones obtenidos en otros métodos basados en la PCR (98). La qPCR se basa en la detección en tiempo real de las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. La química fluorescente puede estar basada en métodos específicos y no específicos; los no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena que al ser oxidados generan una señal fluorescente, la fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. Entre los reporteros más usados para este fin se encuentran el SYBR Green y EVA Green (140). Los métodos específicos se basan en pruebas de hidrolisis o pruebas por hibridación. Las primeras se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos marcadas con un reportero fluorescente y un *quencher*. En el proceso de amplificación, a medida que la sonda se une a la secuencia blanco, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el *quencher*, que permiten que la actividad exonucleasa 5' → 3' de la Taq Polimerasa libere el reportero y este a su vez emita fluorescencia a una longitud de onda específica que será detectada en tiempo real, para lo cual se utilizan termocicladores especializados equipados con módulos de detección para monitorizar la fluorescencia a medida que se produce la amplificación, un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan (141,142). En cuanto a las pruebas por hibridación, consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que se encuentra muy próximo a un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibriden a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia, un ejemplo de este método son las sondas *molecular Beacons* (140).

Entre las otras técnicas mencionadas, la RT-PCR ha sido empleada principalmente en estudios de viabilidad y la PCR anidada y la PCR-RFLP se aplican ampliamente para la discriminación entre los principales genotipos de los parásitos protozoarios, seguido de la secuenciación del producto amplificado (43,138). En cuanto a la LAMP, éste es un nuevo método para la

amplificación de ADN bajo condiciones isotérmicas, entre las ventajas de esta metodología se encuentran su costo-efectividad comparado con otros ensayos moleculares, su velocidad y alta sensibilidad y especificidad, no requiere el uso de termociclador y no es afectada por la presencia de inhibidores, entre las desventajas se encuentran el difícil diseño de los iniciadores a utilizar (33,84,94,138). En la tabla 1-5 se presentan algunos estudios en los cuales se llevó a cabo la detección de parásitos protozoarios mediante técnicas de biología molecular, principalmente en muestras de agua:

**Tabla 1-5:** Detección de parásitos protozoarios mediante técnicas moleculares.

Técnica	Parásito protozoario detectado	Referencia
PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(5,9,53,143,82,95,135)
	<i>C. cayetanensis</i>	(144)
	<i>E. histolytica</i>	(99,112)
	<i>Giardia</i> spp.	(5,9,83,42,49,53,143,82,135,145)
	<i>T. gondii</i>	(36,53,146)
RFLP	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(83,45,95)
	<i>G. duodenalis</i>	(41)
qPCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(34,55,59,78,147)
	<i>C. cayetanensis</i>	(113,135,147)
	<i>Giardia</i> spp.	(34,78)
	<i>T. gondii</i>	(36,98,147)
RT-PCR	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(5)
	<i>Giardia</i> spp.	(5)
LAMP	<i>Cryptosporidium</i> spp.	(94)
	<i>Giardia</i> spp.	(94)
	<i>T. gondii</i>	(33,146)

Una de las grandes ventajas de las técnicas de biología molecular es que permiten discriminar a nivel de especies y genotipos, información que puede ser relevante para la evaluación de las fuentes de infección en humanos y en el estudio del potencial riesgo que representan los parásitos protozoarios que se encuentran en los animales y en el medio ambiente para la salud pública (57,93). Entre los métodos más ampliamente usados para este fin se destacan: técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de secuenciación y análisis de curva *melting*. En el caso de *Cryptosporidium*, los marcadores moleculares más ampliamente utilizados corresponden a la subunidad pequeña del ARN ribosomal, la glucoproteína *gp60*, la proteína de choque térmico *hsp70* y la proteína de la pared de los

ooquites COWP; en el caso de *Giardia*, los marcadores utilizados con mayor frecuencia corresponden a genes polimórficos como  $\beta$ -giardina (*bg*), factor de elongación 1-alfa (*ef1 $\alpha$* ), glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y triosa fosfato isomerasa (*tpi*) (10,87,93).

Sin embargo, las técnicas de biología molecular basadas en la PCR también presentan algunas desventajas, entre las cuales se encuentra la dependencia de la calidad del ADN extraído, debido a que los parásitos protozoarios se caracterizan por presentar paredes quísticas resistentes que dificultan los pasos de lisis empleados en los protocolos de extracción de ADN, además la presencia de inhibidores de la PCR, comúnmente encontrados en ambientes acuáticos, también pueden afectar los resultados obtenidos.

Actualmente, también se están diseñando otras metodologías para la detección de parásitos protozoarios en muestras de agua, por ejemplo se han desarrollado una gran variedad de tipos de biosensores: óptico, electroquímico, mecánico, piezoeléctrico, que ofrecen la posibilidad de combinar en un chip una variedad de moléculas con especificidad para una gran gama de patógenos, que permitirían monitorear agua en tiempo real (148–150). Hasta ahora se han evaluado algunos biosensores para la detección de *Cryptosporidium*, pero ninguno de ellos presenta un alto nivel de sensibilidad (149). Así mismo, se han desarrollado microarreglos de ADN, los cuales son biosensores especializados que utilizan oligonucleótidos inmovilizados y específicos para escanear mezclas de nucleótidos purificados. Las muestras ambientales representan un considerable reto para el uso de microarreglos, debido a la abundancia de diferentes tipos de patógenos, que pueden ocasionar mucho ruido en las señales detectadas mediante esta técnica. Para mejorar estas señales se puede emplear un paso intermedio de PCR, no obstante este paso puede implicar sesgos en la detección, lo cual es un problema, ya que el objetivo de ésta metodología es la detección de múltiples patógenos a partir de una sola muestra. Wang et al., (2004) describieron un microarreglo de ADN capaz de detectar el genotipo de los principales protozoos parásitos transmitidos por el agua: *E. histolytica*, *E. dispar*, ensamblajes A, B, y C de *G. duodenalis*, *C. parvum* y *C. hominis*. A pesar de la utilidad que pueden representar los microarreglos aún no se utilizan de manera rutinaria, pero se sigue profundizando en su estudio y potencial en este campo (66).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que una de metodologías más ampliamente aceptada en el monitoreo conjunto de *Giardia* y *Cryptosporidium* en agua es la USEPA 1623,

---

desarrollada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, la cual es considerada como el método de referencia en el estudio de éstos parásitos protozoarios en ambientes acuáticos; en Europa el procedimiento análogo corresponde al método ISO 15553 (84,94). La USEPA 1623 sigue los siguientes pasos: concentración de la muestra por filtración, purificación mediante separación inmunomagnética y detección mediante microscopía de inmunofluorescencia (31,57,134).

Sin embargo, esta metodología presenta algunas desventajas, entre las cuales se encuentran: alta dependencia de la calidad del agua y su turbiedad, debido a que durante el proceso de filtración se pueden acumular partículas que pueden limitar la eficiencia de la recuperación del método, el porcentaje de recuperación también puede ser afectado por las variaciones del pH durante la etapa de purificación de los microorganismos blanco mediante separación inmunomagnética, durante la detección mediante microscopía de inmunofluorescencia puede presentarse reacción cruzada con otros organismos de tamaño y forma similar a los de interés, por tanto se quiere de personal con alta experiencia en la discriminación microscópica de los quistes/ooquistes, no diferencia entre especies y genotipos, información relevante para determinar la importancia en salud de los resultados del monitoreo de parásitos protozoarios, así como las posibles fuentes de contaminación, presenta un alto costo, debido a los requerimientos en equipos e infraestructura durante el proceso de implementación de la técnica, así como reactivos y consumibles de uso constante que en su mayoría son muy costosos, lo cual restringe su uso principalmente en países en vía de desarrollo (18,28,34,59,138). Teniendo en cuenta esto, en América Latina, muchos investigadores aplican solo algunos pasos de la USEPA 1623 y modifican otros, con el fin de minimizar los costos de sus investigaciones de acuerdo con los objetivos de cada estudio (28). Teniendo en cuenta lo anterior, las técnicas de biología molecular cada vez ganan mayor importancia, por las ventajas enumeradas previamente (39,78).

Finalmente, cabe resaltar que la información disponible con respecto a los métodos de detección de parásitos protozoarios en agua, sugiere la necesidad de metodologías rentables, altamente sensibles y específicas, en las que se puedan resolver las limitaciones de los métodos

disponibles actualmente, que faciliten el monitoreo de parásitos protozoarios en agua y que permitan la obtención de información estandarizada(138).



## **2. Capítulo 2: Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Detectar *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Entamoeba histolytica*, y caracterizar las subpoblaciones de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., en agua cruda y tratada de cuatro plantas potabilizadoras del Departamento de Nariño (Colombia).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Detectar el ADN de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* y *Toxoplasma gondii* en muestras de agua cruda y tratada de las plantas potabilizadoras en estudio, mediante PCR en tiempo real
- Caracterizar las sub-poblaciones de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., en muestras de agua cruda y tratada de las plantas potabilizadoras en estudio, mediante secuenciación.



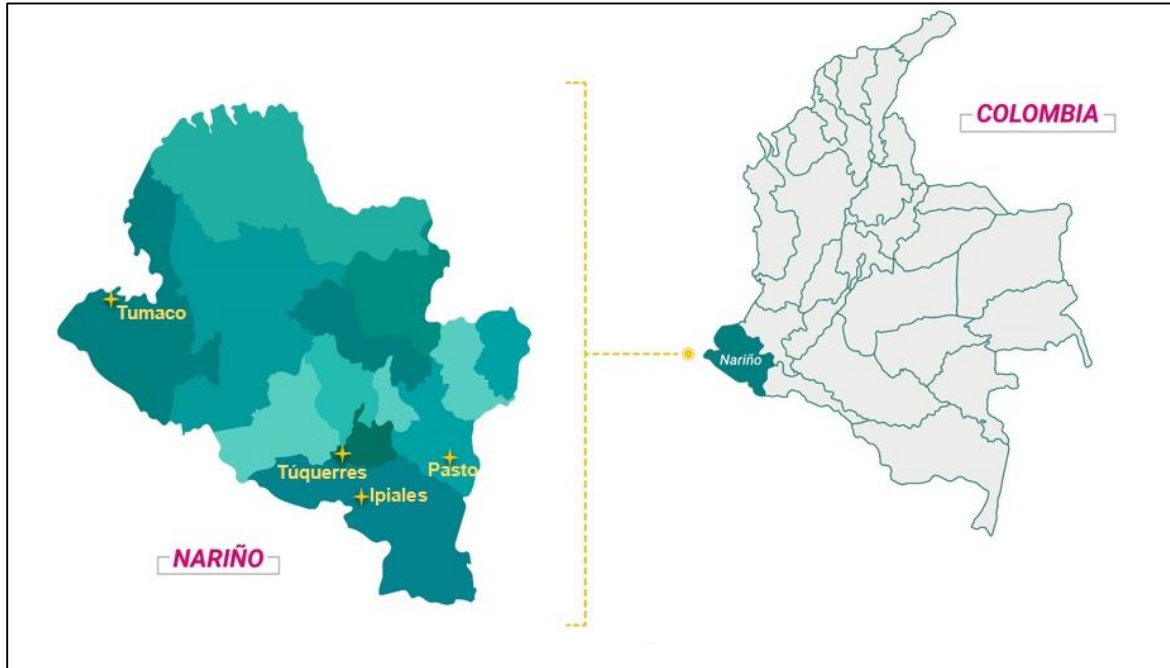
## **3. Capítulo 3: Metodología**

El presente estudio es de tipo descriptivo y exploratorio, y hace parte del macro-proyecto titulado “Desarrollo y aplicación de la Tecnología de Oxidación Avanzada PCFH para mejorar la calidad del agua potable en el Departamento de Nariño”, financiado por el Fondo de CTeI del Sistema General de Regalías al Departamento de Nariño, liderado por el Grupo de Investigación en Materiales Funcionales y Catálisis - GIMFC de la Universidad de Nariño, BPIN 2014000100020.

### **3.1 Área de estudio**

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en plantas encargadas de la distribución de agua para consumo humano, pertenecientes a los municipios de Pasto (Latitud 1° 12' 52" N; Longitud 77° 16' 41" O; altitud: 2.527 msnm; temperatura media: 12 °C), Ipiales (Latitud 0° 49' 44" N; Longitud 77° 38' 26" O; altitud: 2.900 msnm; temperatura media: 12 °C), Túquerres (Latitud 1° 05' 14" N; Longitud 77° 37' 08" O; altitud: 3.104 msnm; temperatura media: 11 °C) y Tumaco (Latitud 1° 48' 24" N; Longitud 78° 45' 53" O; altitud: 1 msnm; temperatura media: 26 °C), ubicados en el Departamento de Nariño. En la figura 3-1 se presentan los municipios de muestreo.

**Figura 3-1:** Mapa del Departamento de Nariño, señalando los municipios en los cuales se llevó a cabo el estudio.



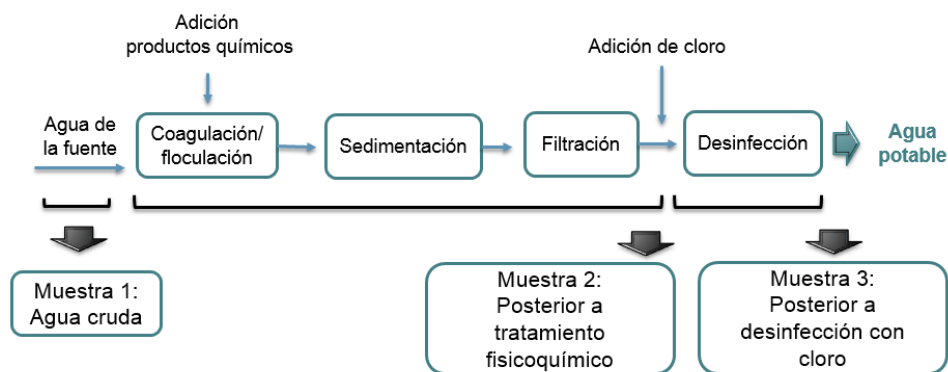
### 3.2 Toma de muestras

En este estudio se llevaron a cabo dos muestreos, uno en el mes de marzo y otro entre los meses de agosto y septiembre del 2016. Los meses de muestreo fueron seleccionados a conveniencia, de acuerdo con la información de la precipitación mensual promedio del Departamento de Nariño, proporcionada por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia - IDEAM. Lo anterior con el fin de tomar muestras en dos temporadas con niveles de precipitación diferentes, siendo el mes de marzo considerado como lluvioso y los meses de agosto y septiembre como secos.

En los municipios de Pasto, Ipiales y Túquerres se tomaron muestras en una de las plantas que abastece agua a la zona urbana, además en Ipiales se tomaron muestras en 5 plantas veredales (A, B, C, D y E) y en Tumaco se tomaron muestras en 6 plantas veredales (A, B, C, D, E y F). Para efectos de este estudio, las plantas de tratamiento que abastecen agua a zonas urbanas serán abreviadas como PTACH y las plantas veredales que abastecen agua a zonas rurales, también conocidas como acueductos veredales serán abreviadas como AV.

En las plantas que abastecen agua a zonas urbanas, se tomaron tres tipos de muestras de agua, que fueron colectadas en tres puntos diferentes de las plantas de tratamiento: (i) a la entrada, cuando aún no han recibido ningún tipo de tratamiento, las cuales se denominaron muestras de agua cruda, (ii) posterior al tratamiento fisicoquímico y (iii) posterior al tratamiento de desinfección con cloro, ver figura 3-2.

**Figura 3-2:** Puntos de muestreo en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano que abastecen agua a zonas urbanas. Fuente: esta investigación.



En las plantas que abastecen agua a zonas rurales o acueductos veredales, se tomaron únicamente muestras de agua cruda, debido a que en el momento del muestreo no se estaba aplicando ningún tipo de tratamiento en los acueductos en estudio, con excepción del acueducto F de Tumaco, en el cual se tomaron muestras de agua cruda y post-tratamiento.

En cada punto de muestreo, se tomaron muestras de agua puntuales de 10 L cada una, a 50 – 100 cm de la orilla, a una profundidad de 15 – 30 cm. Adicionalmente, se tomaron datos *in situ* de oxígeno disuelto, pH, temperatura y conductividad eléctrica del agua, y se recolectaron muestras para llevar a cabo el análisis de COT y turbiedad, el cual fue realizado por los investigadores del componente químico del macroproyecto. Una vez tomadas las muestras, éstas fueron transportadas inmediatamente a los laboratorios de la Universidad de Nariño, bajo adecuadas condiciones de refrigeración y transporte.

El número de muestras a tomar fue determinado teniendo en cuenta el número de muestras y frecuencia de muestreo establecido como control de la calidad microbiológica del agua para

consumo humano en la Resolución 2115 de 2007 y la frecuencia de detección de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *E. histolytica* y *T. gondii*, reportada en la literatura a nivel mundial. En la tabla 3-1 se presenta el plan de muestreo.

**Tabla 3-1:** Plan de muestreo llevado a cabo en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano y en los acueductos veredales en estudio. Fuente: esta investigación.

	Municipio	Sitio de muestreo	No. plantas/ acueductos veredales	Días de muestreo	Total muestras
<b>Muestreo I:</b> marzo 2016	<b>Pasto</b>	Planta zona urbana	1	2	12
	<b>Túquerres</b>	Planta zona urbana	1	2	12
		Planta zona urbana	1	2	12
	<b>Ipiales</b>	Ac. veredales	5	1	10
	<b>Tumaco</b>	Ac. veredales	6	1	13
<b>Muestras tomadas</b>					<b>59</b>
<b>Muestreo II:</b> agosto – septiembre 2016	<b>Pasto</b>	Planta zona urbana	1	2	12
	<b>Túquerres</b>	Planta zona urbana	1	2	12
		Planta zona urbana	1	2	12
	<b>Ipiales</b>	Ac. veredales	5	1	10
	<b>Tumaco</b>	Ac. veredales	6	1	12
<b>Muestras tomadas</b>					<b>58</b>
<b>Total muestras</b>					<b>117</b>

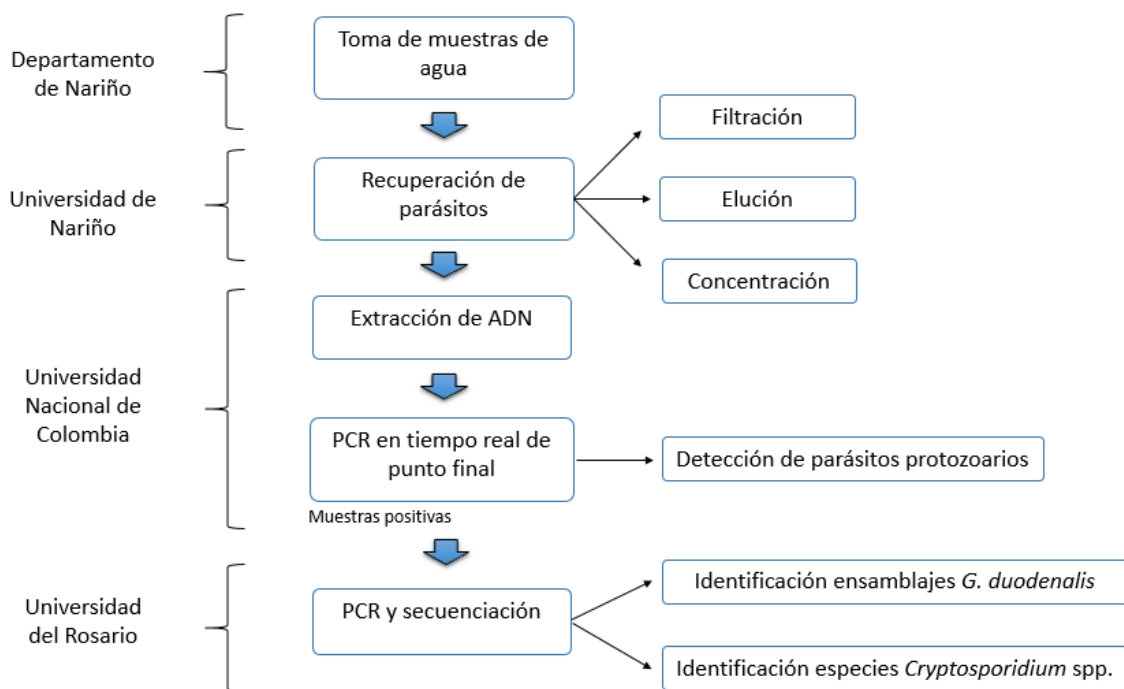
### 3.3 Procesamiento de las muestras

Previo al procesamiento de las muestras de agua, se realizaron ensayos control para evaluar la metodología propuesta con el parásito protozoario *G. duodenalis*. Para ello se realizó un ensayo adicionando concentraciones conocidas de los quistes de éste microorganismo a 10 L de agua tipo I. El ensayo se realizó con *G. duodenalis*, debido a que se contó con los quistes para llevar a cabo todas las pruebas requeridas. El número de quistes adicionado en cada ensayo fue: 5, 10, 25, 50, 75 y 100. Posteriormente, se realizó la filtración de los 10 L de agua, la extracción de ADN y la detección de los parásitos mediante qPCR, obteniendo que incluso cuando se adicionaban 5 quistes en los 10 L de agua se detectaban mediante la metodología planteada.

Igualmente, antes de llevar a cabo los ensayos de qPCR con las muestras de agua, se realizaron ensayos con los controles de ADN de cada microorganismo, obteniendo la detección de *G. duodenalis* hasta en 0,00392 ng de ADN, la detección de *Cryptosporidium* spp hasta en 0,7948 ng de ADN, la detección de *T. gondii* hasta en 0,12 ng de ADN y la detección de *E. histolytica* hasta en 0,00379 ng de ADN.

Con respecto a las muestras de agua, una vez tomadas se transportaron a los laboratorios de la Universidad de Nariño, donde se procedió a su respectiva filtración, elución y concentración. Posteriormente, las muestras concentradas fueron llevadas a la Universidad Nacional de Colombia, bajo adecuadas condiciones de transporte y refrigeración, donde se llevó a cabo la extracción de ADN y detección de los parásitos en estudio mediante qPCR de punto final; la identificación de los ensamblajes de *G. duodenalis* y especies de *Cryptosporidium* spp., se llevó a cabo en la Universidad del Rosario. En la figura 3-3, se presenta un diagrama de flujo con los pasos metodológicos desarrollados.

**Figura 3-3:** Diagrama de flujo con los pasos metodológicos desarrollados. Fuente: esta investigación.



### **3.3.1 Filtración, elución y concentración de parásitos**

La recuperación de los parásitos protozoarios se realizó siguiendo la metodología descrita por Ortíz, (2017) y Franco et al., (2012) (18,151). Para ello, las muestras de agua cruda fueron filtradas utilizando membranas de nitrocelulosa de 3 µm de porosidad, 47 mm de diámetro, y las muestras de agua tomadas posterior al tratamiento fisicoquímico y posterior al proceso de desinfección, fueron filtradas utilizando membranas de nitrocelulosa de 1,2 µm de porosidad, 47 mm de diámetro. Las membranas obtenidas en el proceso de filtración fueron lavadas 2 veces con 5 mL de solución de elución (Tween 80 al 0.01 % y antiespumante). Posteriormente, para la concentración de la muestra, el volumen recuperado de los lavados fue transferido a tubos de poliestireno estériles y centrifugado a 1500 x g durante 15 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se dejó 1 mL de este sobre el pellet, el cual fue transferido a un tubo nuevo estéril.

### **3.3.2 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de la suspensión obtenida previamente, usando el kit comercial *FastDNA® SPIN for soil*, el cual ya ha sido reportado previamente en la extracción de ADN de los parásitos protozoarios en estudio con buenos resultados (61,143). Este kit contiene una mezcla de partículas de cerámica y sílice diseñadas para lisar eficazmente diferentes tipos de microorganismos de suelo y de diferentes muestras ambientales, esto en presencia de los buffer MT y fosfato sódico, que protegen y solubilizan los ácidos nucleicos tras la lisis celular. Estos reactivos trabajan en conjunto para permitir la extracción de ADN genómico con una contaminación mínima de ARN. Después de la lisis, las muestras se centrifugan para sedimentar los desechos celulares y la matriz de lisis. Finalmente, el ADN se purifica del sobrenadante con un procedimiento *GENECLEAN®* a base de sílice utilizando filtros SPIN.

Al protocolo recomendado por el fabricante del kit, se le realizaron algunas modificaciones con el fin de optimizar la lisis de la pared de las formas quísticas, considerado como el principal reto en la extracción de ácidos nucleicos de parásitos protozoarios (37). Las modificaciones realizadas fueron las siguientes: incubación de las muestras a 90 °C en placa de calentamiento durante 10 minutos, 2 ciclos en el disruptor celular Mini BeatBeater durante 3 minutos e

incubación en hielo durante 2 minutos, elución del ADN en 50  $\mu\text{L}$  de buffer DES e incubación de las muestras durante 5 minutos a 55 °C posterior a la adición del buffer de elución.

Durante el proceso de extracción de ADN, además de la muestra se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  del control interno (CI) (100 pg/ $\mu\text{L}$ ), que corresponde al plásmido recombinante pZErO-2, el cual contiene clonada la secuencia que codifica para la proteína Tip5:1 de *Arabidopsis thaliana*, una acuporina específica del polen que no contiene semejanza con proteínas de los parásitos en estudio. Este plásmido se utilizó como un control del proceso de extracción de ADN y su posterior amplificación, con el fin de descartar resultados falsos-negativos debidos a sustancias inhibitorias de la PCR o pérdida de ADN durante el procesamiento de las muestras (152–154).

En las muestras que presentaron resultado negativo y no se observó la amplificación del control interno, se realizó la siguiente estrategia metodológica para descartar resultados falsos negativos: (i) dilución de las muestras con el fin de descartar que la cantidad de ADN estuviera saturando la reacción de PCR (ii) repetición de la extracción de ADN para descartar errores de manipulación o pérdidas de ADN durante el procesamiento de las muestras y (iii) repetición de la extracción de ADN con el kit de extracción *ZR Soil Microbe DNA MiniPrep*, caracterizado por eliminar ácidos húmicos/polifenoles que puedan inhibir la reacción de amplificación.

### ***3.3.3 Detección de los parásitos mediante PCR en tiempo real de punto final***

Posterior a la extracción del ADN, se procedió a la detección de los parásitos en estudio: *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *T. gondii*, *E. histolytica* y *C. cayetanensis*, mediante PCR en tiempo real de punto final, con iniciadores y sondas TaqMan específicos para cada uno de los 5 patógenos en estudio, los cuales fueron confirmados bioinformáticamente antes de su uso. En la tabla 3-2 se presentan los iniciadores y las sondas en mención.

**Tabla 3-2:** Información de las secuencias de los iniciadores y sondas usados en los ensayos de qPCR. Fuente: adaptada de (55,65,98,154,155).

Parásito	Secuencia iniciador <i>forward</i> (5' → 3')	Región blanco	Referencia
	Secuencia iniciador <i>reverse</i> (5' → 3')		
	Secuencia sonda (5' → 3')		
<i>Cryptosporidium</i> spp.	GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG GAGTAAGGAACAACCTCCAATCTCTAG 6FAM/TCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCC/TAMRA	18S ARNr	(55)
<i>Giardia duodenalis</i>	CATGCATGCCCGCTCA AGCGGTGTCCGGCTAGC 6FAM/AGGACAACGGTTGCAC/MGB	18S ARNr	(65)
<i>Entamoeba histolytica</i>	GTTTGTATTAGTACAAAATGGCCAATTC TCGTGGCATCCTAACTCACTTAGA 6FAM/CAATGAATTGAGAAAATGACA/MGB	18S ARNr	(65)
<i>Toxoplasma gondii</i>	TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT AGCGTTCGTGGTCAACTATCGATTG 6FAM/TCTGTGCAACTTTGGTGTATTTCGCAG/TAMRA	B1 gene	(98)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	TAGTAACCGAACGGATCGCATT AAT GCC ACG GTA GGC CAA TA HEX/CCGGCGATAGATCATTCAAGTTTCTGACC/DABCYL	18S ARNr	(155)
Control interno (CI)	ACCGTCATGGAACAGCACGTA CTCCCGCAACAAACCCTATAAA VIC/AGCATCTGTTCTTGAAGGT/NFQ-MGB		(154)

Los ensayos de qPCR para la detección de *G. duodenalis*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium* spp. y *T. gondii* se llevaron a cabo en el equipo *Applied Biosystem 7500*, siguiendo la metodología descrita por Mejia *et al.*, (2013) (65), Burnet *et al.*, (2013) (55) y Lin *et al.*, (2000) (98), estudios que se utilizaron como base para obtener las secuencias de los iniciadores y sondas utilizados para la detección de cada uno de los parásitos en estudio, como se presenta en la tabla 3-2.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 9 µL y en el caso de *Cryptosporidium* spp., en un volumen final de reacción de 10 µL. La concentración y el volumen de los componentes de la reacción de amplificación se describen en la tabla 3-3.

**Tabla 3-3:** Componentes de reacción de la qPCR para la detección de los parásitos protozoarios en estudio. Fuente: esta investigación.

Componente	Concentración (µM)	Volumen por reacción (µL)
Agua		0,3
Master mix	--	3,5
Iniciador <i>Fw</i>	10	1,0
Iniciador <i>Rv</i>	10	1,0
Iniciador <i>Fw</i> CI	10	0,4
Iniciador <i>Rv</i> CI	10	0,4
Sonda <i>Crypto</i>	5	0,2
Sonda CI	5	0,2
Muestras ADN ( <i>G. duodenalis</i> , <i>E. histolytica</i> , <i>T. gondii</i> )	--	2,0
Muestra ADN ( <i>Cryptosporidium</i> )	--	3,0

El perfil térmico utilizado para la amplificación mediante qPCR de cada uno de los parásitos en estudio se describe en la tabla 3-4.

**Tabla 3-4:** Perfil térmico utilizado para la detección de cada uno de los parásitos en estudio. Fuente: esta investigación.

<i>G. duodenalis, E. histolytica</i>			
	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Paso 1	1	50 °C	2 min
Paso 2	1	95 °C	10 min
Paso 3	40	95 °C	15 seg
		58 °C	1 min
		60 °C	1 min
<i>Cryptosporidium</i> spp.			
	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Paso 1	1	50 °C	2 min
Paso 2	1	95 °C	10 min
Paso 3	50	95 °C	15 seg
		60 °C	1 min
<i>T. gondii</i>			
	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Paso 1	1	50 °C	2 min
Paso 2	1	95 °C	10 min
Paso 3	40	95 °C	15 seg
		60 °C	1 min

Controles: como control negativo de la qPCR se utilizó ADN extraído a partir de una muestra de agua tipo I y como control positivo se utilizó ADN de cada uno de los parásitos en estudio:

Control positivo *G. duodenalis*: ADN obtenido a partir de un cultivo axénico en medio TYS-33 London School of Hygiene and Tropical Medicine, cepa de referencia WB, banco de muestras del Laboratorio de Parasitología del Departamento de Salud Pública de la Universidad Nacional de Colombia.

Control positivo *E. histolytica*: ADN obtenido a partir de un cultivo axénico en medio TYS-33 London School of Hygiene and Tropical Medicine, cepa de referencia HM1, banco de muestras del Laboratorio de Parasitología del Departamento de Salud Pública de la Universidad Nacional de Colombia.

Control positivo *Cryptosporidium*: ADN de referencia, banco de muestras del Laboratorio de Parasitología del Departamento de Salud Pública de la Universidad Nacional de Colombia.

Control positivo *T. gondii*: ADN de referencia donado por el grupo de investigación GEPAMOL de la Universidad del Quindío.

Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

Interpretación de resultados: una muestra fue considerada positiva cuando se observó fluorescencia detectable, cuando la curva de fluorescencia cruzo el umbral dando lugar a un Ct menor o igual a 38 y fue considerada negativa cuando no se observó fluorescencia detectable, cuando la curva de fluorescencia no cruzo el umbral dando lugar a la ausencia de Ct o a un Ct mayor a 38. En cada ensayo se tuvo en cuenta la adecuada amplificación de los controles positivos, la ausencia de amplificación de los controles negativos y se analizó muestra a muestra la amplificación del control interno.

En el caso de *Cyclospora cayetanensis*, la detección se realizó con la colaboración de la División de Enfermedades Parasitarias y Malaria de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades CDC, Atlanta, Estados Unidos, con los iniciadores y sondas descritos en la tabla 3-2, siguiendo la metodología descrita por Qvarnstrom *et al.*, 2017 (155).

### **3.3.4 Identificación de los ensamblajes de *Giardia duodenalis* y especies de *Cryptosporidium* spp**

Para la identificación de las sub-poblaciones de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano y acueductos veredales en estudio,

todas las muestras con resultado positivo para estos dos parásitos protozoarios mediante qPCR, fueron analizadas mediante PCR y secuenciación.

Para la detección de los ensamblajes de *G. duodenalis*, las muestras positivas para este microorganismo mediante qPCR con el marcador 18S ARNr, fueron analizadas mediante PCR semi-nested con el marcador *gdh* (glutamato deshidrogenasa) y mediante PCR nested con el marcador *tpi* (triosa fosfato isomerasa). La selección de estos marcadores se realizó teniendo en cuenta que son loci conservados en *Giardia*, pero que al mismo tiempo presentan una alta heterogeneidad genética que permite la genotipificación de éste parásito protozoario (41,42,81,86). Así mismo, para la detección de las especies de *Cryptosporidium* spp., las muestras positivas para este microorganismo mediante qPCR, fueron analizadas mediante PCR convencional con el marcador SSU ARNr (subunidad menor del ARN ribosomal). En la tabla 3-5 se presentan los Iniciadores utilizados en cada una de las PCRs. Este marcador fue seleccionado teniendo en cuenta su naturaleza multicopia (20 copias por ooquiste), lo cual incrementa la probabilidad de detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras ambientales, en las que generalmente se encuentra en pequeñas cantidades (6,55,59). Además, este gen tiene regiones con secuencias de nucleótidos semiconservadas e hipervariables que favorecen la identificación de las especies de *Cryptosporidium* (46,48,59,156).

**Tabla 3-5:** Información de las secuencias de los iniciadores que serán usados en las PCRs. Fuente: adaptada de (41,42,45).

Parásito	Secuencia iniciador <i>forward</i> (5' → 3')	Región blanco	Referencia
	Secuencia iniciador <i>reverse</i> (5' → 3')		
<i>Giardia duodenalis</i>	GDHeF/TCAACGYAAYCGYGGYTTCCGT GDHiF/CAGTACAACCTCYGCTCTCGG GDHiR/GTTRTCCTTGACATCTCC	<i>gdh</i>	(41)
	AL3543/AAATIATGCCTGCTCGTCG AL3546/CAAACCTTITCCGCAAACC AL3544/CCCTTCATCGGIGGTAACCTT AL3545/GTGGCCACCACICCCGTGCC	<i>tpi</i>	(42)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	SSUrRNAF/AGTGACAAGAAATAACAATACAGG SSUrRNAR/CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC	SSU ARNr	(45)

Todos los ensayos de PCR se llevaron a cabo en el Termociclador *MultiGene OptiMax, Labnet*, en un volumen final de reacción de 25 µL. La concentración y el volumen de los componentes de amplificación se describen en la tabla 3-6.

**Tabla 3-6:** Componentes de reacción de la PCR para la detección de las sub-poblaciones de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. Fuente: esta investigación.

Componente	Concentración (µM)	Volumen por reacción (µL)
Agua	--	6,5
Master mix	2 X	12,5
Iniciador Fw	10 µM	2,0
Iniciador Rv	10 µM	2,0
Muestra ADN	--	2,0

El perfil térmico utilizado para la amplificación de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp con cada uno de los marcadores mencionados anteriormente, se describen en las tablas 3-7, 3-8 y 3-9:

**Tabla 3-7:** Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen *gdh* para la detección de *G. duodenalis*. Fuente: esta investigación.

Pasos	Ciclos	PCR 1		PCR 2 <sup>1</sup>	
		T °C	Tiempo	T °C	Tiempo
Denaturación inicial	1	95	10 min	95	10 min
Denaturación		95	1 min	95	1 min
Anillamiento	35	50	1 min	54	1 min
Extensión		72	1 min	72	1 min
Extensión final	1	72	10 min	72	10 min

<sup>1</sup> Para realizar la segunda PCR se partió de una dilución 1/10 de los productos de amplificación de la primera PCR.

**Tabla 3-8:** Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen *tpi* para la detección de *G. duodenalis*. Fuente: esta investigación.

Pasos	Ciclos	PCR 1		PCR 2 <sup>1</sup>	
		T °C	Tiempo	T °C	Tiempo
Denaturación inicial	1	95	10 min	95	10 min
Denaturación		95	1 min	94	45 seg
Anillamiento	35	50	1 min	55	45 seg
Extensión		72	1 min	72	1 min
Extensión final	1	72	10 min	72	10 min

<sup>1</sup> Para realizar la segunda PCR se partió de una dilución 1/10 de los productos de amplificación de la primera PCR.

**Tabla 3-9:** Perfil térmico utilizado en la amplificación del gen SSU ARNr para la detección de *Cryptosporidium* spp. Fuente: esta investigación.

Pasos	Ciclos	T °C	Tiempo
Denaturación inicial	1	95	10 min
Denaturación		95	1 min
Anillamiento	40	58	1 min
Extensión		72	1 min
Extensión final	1	72	10 min

**Verificación de los productos de PCR:** los productos de amplificación obtenidos fueron verificados en geles de agarosa al 2 % teñidos con el colorante *Syber safe*. La corrida electroforética se llevó a cabo con el buffer TBE 1X, durante 30 minutos a 100V. La visualización del gel se realizó en un fotodigitalizador de geles *E-Gel Imager* de *Life Technologies*.

**Análisis de secuenciación:** los productos de amplificación de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp, en las cuales se observó la presencia de la banda de interés con una buena calidad y del tamaño esperado, se enviaron a Macrogen (Corea del Sur), en donde fueron purificados y secuenciados por ambos sentidos *forward* y *reverse* (Standard-seq Single) mediante el método dideoxy-terminal en un secuenciador capilar automatizado (*Applied Biosystems*).

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó la verificación de la calidad de los electroferogramas resultantes y su edición manual usando el programa MEGA 6.0. Posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con las base de datos del GenBank usando la herramienta BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y con secuencias de referencia en el programa ClustalW 1.8. La reconstrucción filogenética se realizó mediante un análisis de máxima verosimilitud, usando el método de Tamura 3 parámetros, con 1000 réplicas de bootstrap, en el programa MEGA 6.0.

Los códigos del acceso en el GenBank de las secuencias de referencias utilizadas en el análisis de secuenciación corresponden a los siguientes:

**Secuencias de referencia *G. duodenalis*:**

**Marcador *gdh*:** ensamblaje AI (M84604.1); ensamblaje AII (AY178737.1); ensamblaje BIII (AF069059.1); ensamblaje BIV (AY178739.1); ensamblaje C (U60982.2); ensamblaje D (U60986.2); ensamblaje E (AY178741.1); ensamblaje F (AB569384.1); ensamblaje G (AF069058.2); ensamblaje H (GU176089.1); outgroup *Giardia ardeae* (AF069060.2).

**Marcador *tpi*:** ensamblaje AI (AF069556.1); ensamblaje AII (AF069557.1); ensamblaje BIII (AF069561.1); ensamblaje BIV (AF069560.1); ensamblaje C (AF069563.1); ensamblaje E (AY228645.1), ensamblaje F (AF069558.1); outgroup *Giardia microti* (AY228649.1).

**Secuencias de referencia *Cryptosporidium* spp:** marcador SSU ARNr 18S: *C. andersoni* (AF093496.1); *C. baileyi* (L19068.1), *C. bovis* (AY741305.1); *C. canis* (AF112576.1); *C. fayeri* (AF159112.1); *C. felis* (AF108862.1); *C. fragile* (EU162751.1); *C. galli* (AF316624.1); *C. hominis* (AF108865.1); *C. macropodum* (AF513227.2); *C. meleagridis* (AF112574.1); *C. cf. molnari* (AY524773.1); *C. muris* (AB089284.1); *C. parvum* (AF112571.1); *C. ryanae* (AY587166.1); *C. cf. scophthalmi* (KR340588.1); *C. serpentis* (AF151376.2); *C. suis* (AF115377.1); *C. varanii* (AF112573.1); *C. wrairi* (AF115378.1).

### 3.4 Análisis de datos

Se construyó una base de datos en el programa Microsoft Excel®, en la cual se registraron los resultados obtenidos a partir de cada una de las muestras tomadas en las cuatro plantas de tratamiento de agua potable en estudio. Para fines de esta investigación la base de datos se llamó “Registro de la detección de parásitos”, discriminando los datos entre los diferentes periodos y sitios de muestreo.

Para los principales eventos de interés se utilizaron estadísticas descriptivas, reportando los resultados en términos de porcentajes y frecuencias. Además, se evaluó si había una correlación estadísticamente significativa entre los resultados de la detección molecular de los parásitos en estudio y variables como: lugar de muestreo, tipo de agua, época de muestreo y algunas características fisicoquímicas como: pH, temperatura del agua, conductividad

eléctrica, oxígeno disuelto, COT y turbiedad, mediante análisis de regresión logística, utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I. Las diferencias fueron consideradas como significativas cuando el *p-valor* estuvo por debajo de 0,05.



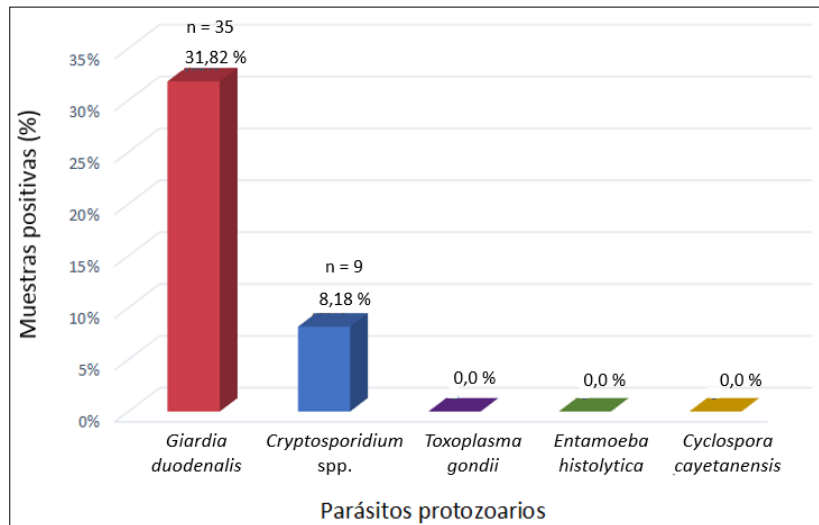
## **4. Capítulo 4: Resultados**

### **4.1 Detección de parásitos protozoarios en muestras de agua mediante PCR en tiempo real de punto final**

En el estudio se incluyeron un total de 117 muestras de agua, 72 colectadas en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano que abastecen zonas urbanas de los municipios de Pasto, Ipiales y Túquerres y 45 que fueron colectadas en acueductos veredales de los municipios de Ipiales y Tumaco. De estas 117 muestras, 7 fueron excluidas del estudio debido a que no presentaron amplificación del control interno en ninguno de los ensayos de qPCR llevados a cabo para la detección de los parásitos en estudio. Las 7 muestras excluidas corresponden a 3 muestras de agua colectadas en la PTACH del Municipio de Pasto, 1 muestra colectada en la PTACH del Municipio de Ipiales y a 3 muestras tomadas en acueductos veredales del Municipio de Ipiales.

De las 110 muestras analizadas, el 31,82 % (35/110) fueron positivas para la presencia de *G. duodenalis* y 8,18 % (9/110) fueron positivas para la presencia de *Cryptosporidium* spp. En ninguna de las muestras procesadas se encontraron resultados positivos para *T. gondii* (0/110), *E. histolytica* (0/110) y *C. cayetanensis* (0/110), ver grafica 4-1.

**Grafica 4-1:** Detección de los parásitos en estudio mediante PCR en tiempo real. Fuente: Esta investigación.



## 4.2 Correlación de los resultados de la detección de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* mediante qPCR con algunas variables consideradas en el estudio

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del análisis de correlación entre los resultados de la detección molecular de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., que corresponden a los dos parásitos protozoarios en los cuales se obtuvieron muestras positivas en los ensayos de qPCR, y variables como: sitio de muestreo, tipo de agua, temporada de muestreo y características fisicoquímicas del agua como pH, temperatura, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, turbiedad, COT y nitrógeno total.

### 4.2.1 Análisis entre los resultados de la detección molecular de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., y el lugar de muestreo y el tipo de agua

Con respecto al lugar de muestreo, *G. duodenalis* se detectó en las tres plantas de tratamiento de agua para consumo humano en estudio: Pasto, Ipiales y Túquerres, en tres de los cinco acueductos veredales de Ipiales y en dos de los seis acueductos veredales de Tumaco. *Cryptosporidium* se detectó en dos de las tres plantas de tratamiento de agua para consumo

humano en estudio: Pasto e Ipiales, en uno de los cinco acueductos veredales de Ipiales y en tres de los seis acueductos veredales de Tumaco. No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre el lugar de muestreo y los resultados de la detección molecular de *G. duodenalis* (*p*-valor PTACH: 0,0524; *p*-valor AV: 0,3198) y *Cryptosporidium* spp (*p*-valor PTACH: 1,0000; *p*-valor AV: 0,4780). Ver tabla 4-1.

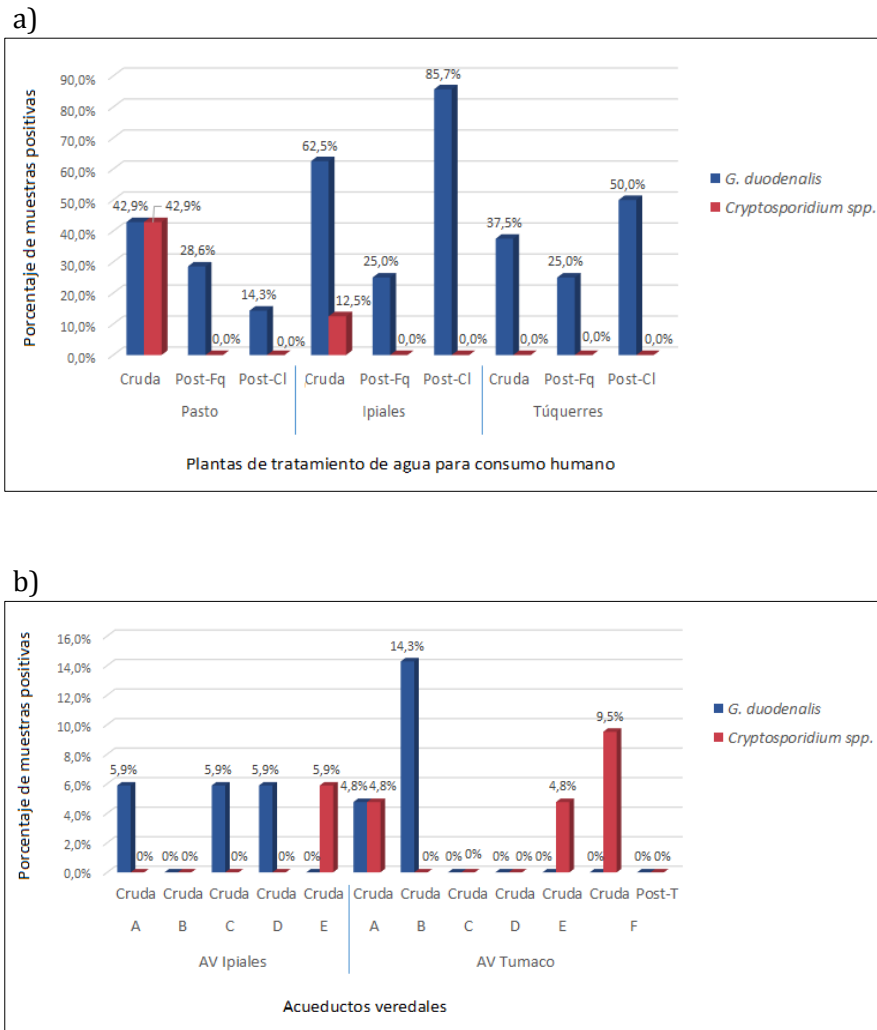
**Tabla 4-1:** Número y porcentaje de muestras positivas por cada parásito protozoario y por sitio de muestreo. Fuente: esta investigación.

Sitio de muestreo	<i>G. duodenalis</i>		<i>Cryptosporidium</i> spp.	
Pasto (n = 21)	6	28,57 %	3	14,29 %
Ipiales (n = 23)	13	56,52 %	1	4,35 %
Túquerres (n = 24)	9	37,50 %	-	-
AV Ipiales (n = 17)	3	17,65 %	1	5,88 %
AV Tumaco (n = 25)	4	16,00 %	4	16,00 %

De los dos parásitos detectados en este estudio, *G. duodenalis* se encontró en los tres tipos de agua evaluados en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano (agua cruda: 11/23, 47,83 %; post-tratamiento fisicoquímico: 6/23, 26,09 %; y post-cloración: 11/22, 50 %) y en muestras de agua cruda de los acueductos veredales (7/38, 18,42 %). No se obtuvo ninguna relación estadísticamente significativa entre el tipo de agua y éste microorganismo (P-valor PTACH: 0,6835; P-valor AV: 0,9066). En cuanto a la detección de *G. duodenalis* por sitio de muestreo y tipo de agua, se encontró lo siguiente: PTACH del Municipio de Pasto: agua cruda: 3/7 (42,9 %); post-tratamiento fisicoquímico: 2/7 (28,6 %); y post-cloración: 1/7 (14,3 %). PTACH del Municipio de Ipiales: agua cruda: 5/8 (62,5 %); post-tratamiento fisicoquímico: 2/8 (25 %); y post-cloración: 6/7 (85,7 %). PTACH del Municipio de Túquerres: agua cruda: 3/8 (37,5 %); post-tratamiento fisicoquímico: 2/8 (25 %); y post-cloración: 4/8 (50 %). AV Ipiales: agua cruda: 3/17 (17,65 %). AV Tumaco: agua cruda: 4/25 (16,0 %). Ver grafica 4.2

*Cryptosporidium* spp se encontró únicamente en muestras de agua cruda tanto en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano (agua cruda: 4/23, 17,39 %) como en los acueductos veredales (5/38, 13,16 %), presentando una relación estadísticamente significativa entre el tipo de agua evaluado en las PTACH y éste microorganismo (P-valor PTACH: 0,0097; P-valor AV: 0,3198). Ver grafica 4-2.

**Grafica 4-2:** Detección molecular de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., en: a) las plantas de tratamiento de agua para consumo humano y, b) los acueductos veredales. Fuente: Esta investigación.

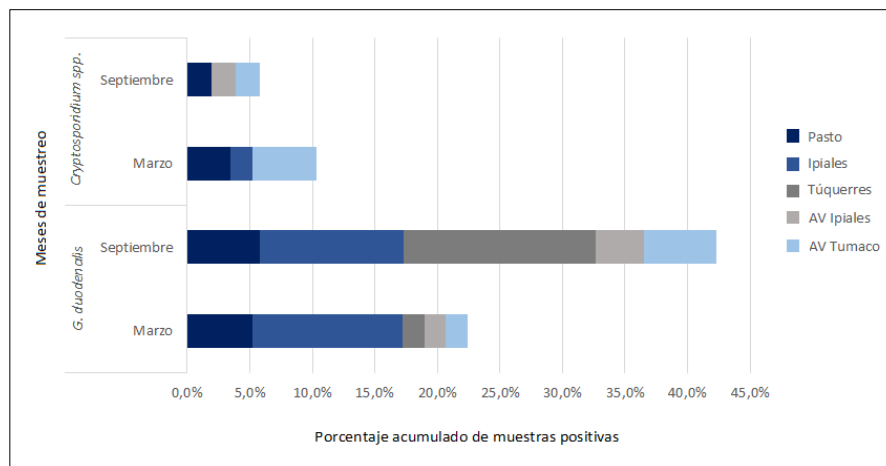


#### 4.2.2 Análisis entre los resultados de la detección molecular de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., y la temporada de muestreo

Algunos estudios han reportado que la detección de parásitos protozoarios en agua puede variar con la estacionalidad, la cual para países tropicales está limitada a seco o lluvioso. En este estudio, se tomaron muestras de agua en el mes de marzo considerado como lluvioso y entre los meses de agosto y septiembre, considerados como secos, obteniendo a partir del análisis de regresión logística, que la detección de *G. duodenalis* presenta una relación

estadísticamente significativa con la temporada de muestreo, con un mayor número de muestras positivas durante el mes de septiembre (marzo: 13/58, 22,41 %; agosto-septiembre: 22/52, 42,31 %) (P-valor = 0,0078). En contraste, no se encontró esta misma relación para los resultados de detección molecular de *Cryptosporidium* spp (marzo: 6/58, 10,34 %; agosto-septiembre: 3/52, 5,77 %) (P-valor = 0,3768). Ver grafica 4-3.

**Grafica 4-3:** Porcentaje de muestras positivas para *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en las 2 temporadas de muestreo. Fuente: Esta investigación.



#### 4.2.3 Análisis entre los resultados de detección molecular de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., y características fisicoquímicas.

A partir del análisis de regresión logística realizado con la información de las características fisicoquímicas incluidas en el estudio y los resultados de la detección molecular obtenidos mediante qPCR, se determinó que no hay interacciones estadísticamente significativas entre la presencia de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en las muestras de agua colectadas y los datos de pH, temperatura del agua, oxígeno disuelto, conductividad eléctrica del agua, turbiedad y COT ( $p$ -valor > 0.05), ver tabla 4-2. Estos resultados sugieren que ninguna de las características fisicoquímicas consideradas en este estudio puede explicar o predecir la presencia de *G. duodenalis* y/o *Cryptosporidium* spp en las muestras de agua colectadas.

**Tabla 4-2:** Correlación entre los resultados de la detección molecular de *Giardia* y *Cryptosporidium* y características fisicoquímicas del agua. Fuente: esta investigación.

Características fisicoquímica	<i>G. duodenalis</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp
pH promedio en muestras negativas frente a positivas	7,1 versus 7,1 ( $p = 0,1473$ )	7,1 versus 7,2 ( $p = 0,4171$ )
Temperatura del agua promedio (°C) en muestras negativas frente a positivas	17,7 versus 15,7 ( $p = 0,4346$ )	16,9 versus 21,1 ( $p = 0,6154$ )
Temperatura ambiente promedio (°C) en muestras negativas frente a positivas	22,6 versus 18,4 ( $p = 0,4457$ )	20,7 versus 25,25 ( $p = 0,4622$ )
Conductividad eléctrica promedio ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) en muestras negativas frente a positivas	185,4 versus 234,7 ( $p = 0,5511$ )	207,4 versus 154 ( $p = 0,7983$ )
Oxígeno disuelto promedio (mg/L) en muestras negativas frente a positivas	11,5 versus 10,2 ( $p = 0,4916$ )	10,8 versus 12,9 ( $p = 0,7597$ )
COT promedio (mg/L) en muestras negativas frente a positivas	5,6 versus 3,5 ( $p = 0,2210$ )	4,9 versus 5,8 ( $p = 0,3683$ )
Turbiedad promedio (UNT) en muestras negativas frente a positivas	8,8 versus 3,7 ( $p = 0,5412$ )	5,2 versus 20,4 ( $p = 0,6695$ ) 0,1258

De acuerdo con la resolución 2115 de 2007, en la cual se indican los valores máximos aceptables (vma) de características fisicoquímicas en el agua de consumo, como pH (vma = 6,5 - 9), turbiedad (vma = 2 UNT), conductividad eléctrica del agua (vma = hasta 1000 microsiemens/cm) y COT (vma = 5,0 mg/L), se obtuvo que las muestras de agua tomadas en las plantas de tratamiento de agua para consumo humano de Pasto y Túquerres, se encuentran dentro de los valores establecidos. De las muestras de agua colectadas posterior al proceso de desinfección con cloro en la planta de tratamiento de agua para consumo humano de Ipiales, dos no cumplen con el valor máximo aceptable de pH, dos con los valores de COT, y una supera el valor de turbiedad indicado en la norma.

En relación con los acueductos veredales, debido a que en estos no se realiza ningún tipo de tratamiento al agua cruda que mejore sus características, varias de las muestras colectadas en Ipiales y Tumaco se encuentran por encima de los valores máximo aceptables de pH, turbiedad y COT. Las muestras post-tratamiento tomadas en el acueducto veredal F de Tumaco, cumplen con los valores máximos aceptables de pH y conductividad eléctrica del agua, pero se encuentran por encima de los valores establecidos para turbiedad y COT.

### 4.3 Identificación de las sub-poblaciones de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos posterior al análisis de secuenciación llevado a cabo para la determinación de los ensamblajes de *G. duodenalis* y las especies de *Cryptosporidium* spp.

#### 4.3.1 Identificación de los ensamblajes de *Giardia duodenalis*

De las 35 muestras de agua positivas para *G. duodenalis* mediante qPCR, se encontró que 17 de las muestras procesadas presentaron una banda definida y de buena calidad mediante la PCR con el marcador molecular *gdh* y 28 mediante la PCR con el marcador *tpi*. Estas muestras fueron enviadas a secuenciación. El resto de muestras presentaron bandas muy tenues, dobles bandas o ausencia de amplificación y por tanto no se consideraron en el análisis de secuenciación. De las muestras que se enviaron a secuenciación, algunas presentaron electroferogramas con picos múltiples, que no pudieron ser analizadas adecuadamente. Estas muestras fueron procesadas nuevamente por PCR y enviadas a secuenciación. Sin embargo, se obtuvo nuevamente el mismo resultado. En cuanto a las muestras en las cuales la calidad de los electroferogramas fue buena, se obtuvieron las secuencias consenso y se realizó el respectivo análisis de secuenciación, obteniendo la presencia de los ensamblajes AI, AII y H mediante el marcador *gdh* y los ensamblajes AI y AII mediante el marcador *tpi*, ver tabla 4-3.

**Tabla 4-3:** Ensamblajes de *G. duodenalis* identificados con los marcadores *gdh* y *tpi* en cada sitio de muestreo. Fuente: esta investigación.

Marcador	Ensamblaje	Planta Pasto	Planta Ipiales	Planta Túquerres	AV Tumaco
<i>gdh</i>	AI	-	1	-	-
	AII	-	1	-	-
	H	1	-	-	-
	No identificado	-	1	1	-
<i>tpi</i>	AI	-	1	-	-
	AII	2	2	-	-
	No identificado	-	1	1	1

### 4.3.2 Identificación de las especies de *Cryptosporidium* spp.

De las 9 muestras positivas para *Cryptosporidium* spp mediante qPCR, 9 presentaron una banda definida y de buena calidad mediante la PCR convencional y fueron enviadas a secuenciación. No obstante, al igual que en el caso de *Giardia*, se requirió de un análisis minucioso de las secuencias para la identificación de las especies de *Cryptosporidium*, debido a la baja calidad de los electroferogramas obtenidos. En la tabla 4-4 se presentan las especies identificadas de este microorganismo posterior al análisis de secuenciación:

**Tabla 4-4:** Especies de *Cryptosporidium* spp., identificadas en cada sitio de muestreo. Fuente: esta investigación.

Espece	Planta Pasto	Planta Ipiales	AV Ipiales	AV Tumaco
<i>Cryptosporidium molnari</i>	-	1	-	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1	-	-	-
<i>Cryptosporidium galli</i>	1	-	-	-
<i>Cryptosporidium</i> sp. genotipo II de murciélagos	1	-	-	-
<i>Cryptosporidium</i> sp. genotipo VIII de aves	-	-	-	3
<i>Cryptosporidium</i> sp.	-	-	1	1

## 5. Capítulo 5: Discusión de resultados

Con la relación a las 7 muestras de agua que fueron excluidas del estudio, la ausencia de amplificación del control interno en los ensayos de qPCR, pudo deberse a la pérdida de ADN durante el procesamiento de las muestras o a la presencia de inhibidores de la PCR, que no pudieron ser eliminados con los métodos de extracción de ADN utilizados (28,82,90). La posible presencia de inhibidores en las muestras de agua, se debe a que las fuentes naturales de agua pueden contener diferentes sustancias capaces de afectar negativamente la amplificación del ADN y, en consecuencia, la sensibilidad de la PCR (56,78,94,156). Entre estas sustancias se encuentran principalmente ácidos húmicos, compuestos fenólicos, metales pesados, constituyentes de células bacterianas, ADN no diana, biopelículas y cianobacterias, que pueden contribuir a la obtención de ADN de baja calidad e interferir con las interacciones entre el ADN blanco y la ADN polimerasa, impidiendo la amplificación específica de los ácidos nucleicos de interés (31,84).

En cuanto a los resultados obtenidos en la detección molecular, están acordes con lo reportado en la literatura, en la cual se indica que los parásitos protozoarios más comúnmente transmitidos y reportados en agua corresponden a *Giardia* y *Cryptosporidium* (30,32,34,58,69,53,80,94). La mayor frecuencia de éstos dos parásitos puede deberse a que se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y afectan al humano y a un amplio rango de animales domésticos y silvestres, siendo fácilmente transmitidos a fuentes de agua que se encuentran expuestas a la contaminación por heces, vertimientos de aguas residuales domésticas e industriales, descargas de residuos sólidos, zonas agrícolas, granjas, lixiviados, escorrentía urbana y agrícola (7,9,14,15,83,78). Además, su ocurrencia en el agua es multiplicada por la alta persistencia de las formas quísticas de estos microorganismos en el ambiente, así como su resistencia a los desinfectantes comúnmente utilizados en el tratamiento del agua (1,11,12,21,22,32,79).

En Latinoamérica también se ha observado esta tendencia, siendo *Giardia* y *Cryptosporidium* los más frecuentemente reportados, seguidos por amebas de vida libre, *T. gondii* y *C. cayetanensis*. Sin embargo, cabe destacar, que en esta región son pocos los estudios reportados acerca de la presencia de este tipo de microorganismos en ecosistemas acuáticos (28). Según lo reportado por Rosado et al., (2017), Brasil es el país que lidera los informes de protozoos parásitos transmitidos por el agua en Suramérica con 30.3% (20/66), seguido por Argentina con 15.1% (10/66), Colombia 10.6% (7/66), Venezuela 7.6% (5 / 66), Perú 4.5% (3/66), Ecuador y Chile 1.5% (1/66) (28).

En Colombia, estudios como el de Lora et al., (2016); Triviño et al., (2016) y Alarcón et al., (2005) también han reportado la presencia de parásitos protozoarios en muestras de agua. Al contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo (*G. duodenalis* 31,82 %; *Cryptosporidium* spp 8,18 %) con los descritos en estos estudios, se observa que el porcentaje de detección reportado para *Giardia* y *Cryptosporidium*, es menor que el obtenido en el estudio de Lora et al., (2016) (52) (*Giardia*: 40 %; *Cryptosporidium*: 36 %); es menor para el caso de *Cryptosporidium* (*C. parvum*: 21 %; *C. hominis*: 10,5 %) y mayor para el caso de *Giardia* (ensamblaje A: 5,2 %; ensamblaje B: 13,1 %) con respecto al estudio de Triviño et al., (2016) (53) y, similar en el caso de *Cryptosporidium*, pero mayor en el caso de *Giardia* en relación con el estudio de Alarcón et al., (2005) (54) (*Giardia*: 16,7 %; *Cryptosporidium*: 8,3 %). Adicionalmente, en el estudio de Triviño et al., (2016) reportan la presencia de *T. gondii* en un alto porcentaje (58,6 %), en contraste, en este estudio no se encontró ninguna muestra positiva para este microorganismo patógeno. La variabilidad de los resultados obtenidos en los estudios reportados hasta ahora en el país, pueden deberse a las diferencias que existen entre los lugares donde se llevó a cabo cada estudio, dependiendo de la exposición de los puntos de muestreo de agua seleccionados a diferentes focos de contaminación propios de cada zona. Así mismo, las diferencias pueden estar relacionadas con la temporada de muestreo, el número de muestras analizadas y a las técnicas de recuperación y detección de los parásitos protozoarios empleadas (1,18,91).

En el Departamento de Nariño, hasta el momento no se ha reportado el estudio de parásitos protozoarios en muestras de agua mediante metodologías moleculares, siendo este el primer estudio realizado en la región.

El mayor porcentaje de detección de *G. duodenalis* (31,82 %) con respecto a *Cryptosporidium* spp (8,18 %) encontrado en este estudio, también ha sido reportado previamente en otras investigaciones (34,78). Este resultado puede deberse a que *Giardia* tiene una distribución global, siendo considerado como el parásito protozoario entérico más comúnmente aislado en todo el mundo y que presenta altas tasas de infección en niños, adultos, animales domésticos (perros, gatos, aves, caballos, cabras, ovejas y vacas entre otros) y en un amplio rango de mamíferos silvestres y aves, principalmente en países en vía de desarrollo, lo cual incrementa las probabilidades de la transmisión de éste microorganismo a través del agua y las probabilidades de ser detectado (5,10,42,49,77,82,84). En Colombia, de acuerdo con la última Encuesta Nacional de Parasitismo Intestinal en población escolar para los años 2012 - 2014, la prevalencia de *G. duodenalis* corresponde a 15,4 % y la de *Cryptosporidium* spp a 0,5 %, lo cual también indica la mayor presencia de *Giardia* en el país. (157) Otra razón para explicar este resultado puede estar relacionada con el tamaño de los quistes de *Giardia* (10 - 15  $\mu\text{m}$  de longitud; 7 - 10  $\mu\text{m}$  de ancho) y su espesor (0,3 - 0,5  $\mu\text{m}$ ), en comparación con *Cryptosporidium* (4 - 6  $\mu\text{m}$ ), lo que pudo favorecer su retención en las membranas de nitrocelulosa utilizadas en el proceso de filtración y recuperación de los parásitos protozoarios (34).

Por otro lado, con respecto a la ausencia de muestras positivas como resultado de la detección molecular de los parásitos protozoarios *T. gondii*, *E. histolytica* y *C. cayetanensis*, se puede inferir que si bien estos microorganismos también han sido reportados en muestras de agua y se ha documentado su resistencia a desinfectantes convencionales utilizados en la producción de agua potable (16,23,28,33,97,99), su frecuencia de detección en agua ha sido baja y su comportamiento en esta matriz poco estudiado, por tanto se desconoce si la presencia de estos microorganismos este afectada por algunas condiciones particulares (22,36). Por ello, considerando el bajo número de muestras incluido en este estudio, no se puede descartar la presencia de éstos parásitos protozoarios en las fuentes de agua de la región, siendo de gran relevancia continuar la detección de *T. gondii*, *E. histolytica* *C. cayetanensis* en estudios futuros, que incluyan un mayor número de puntos de muestreo y mayor número de muestras, diferentes temporadas del año, así como también otras metodologías de recuperación y detección.

En relación con los sitios de muestreo, en la PTACH de Pasto, se observó la disminución de los quistes de *G. duodenalis* y de los ooquistes de *Cryptosporidium* a medida que avanzó el

tratamiento para la obtención de agua potable. Sin embargo, esta misma tendencia no se observó en las PTACH de Ipiales y Túquerres, en las cuales las formas quísticas de *G. duodenalis* también se detectaron en muestras de agua tomadas posterior al tratamiento fisicoquímico y a la desinfección con cloro, en frecuencias considerables con respecto al agua sin tratamiento, indicando la necesidad de revisar los procedimientos aplicados en éstas plantas. Cabe destacar, que de acuerdo con la información proporcionada por el comité técnico de muestreo del macroproyecto, la planta ubicada en el Municipio de Pasto se encuentra en mejores condiciones de infraestructura, cuenta con metodologías automatizadas y constante inversión para el mejoramiento de los procesos llevados a cabo para la potabilización del agua. En el caso de los Municipios de Ipiales y Túquerres, las plantas incluidas en el estudio llevan varios años de funcionamiento sin inversiones considerables y con infraestructuras deterioradas. Esto también puede ser reflejado en los IRCAs de las zonas urbanas de los municipios en estudio, que de acuerdo con el Informe Nacional de Calidad de Agua para Consumo Humano INCA 2015 corresponden a: Pasto 8,08 (riesgo bajo), Túquerres 12,47 (riesgo bajo) e Ipiales 22,92 (riesgo medio) (8).

La presencia de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp en agua cruda, así como en diferentes pasos del tratamiento del agua para consumo humano y en agua potable, ha sido ampliamente reportada, siendo por ello, el agua considerada como una de las principales fuentes de transmisión de las formas quísticas de éstos microorganismos (6,12,15,24,31,35,46,53,158). La detección de *G. duodenalis* en el agua post-tratamiento de las PTACH en estudio (post-tratamiento fisicoquímico: 26,09 %; post-cloración: 50 %) puede estar relacionada con la resistencia que presentan las formas quísticas de este microorganismo al tratamiento fisicoquímico (coagulación, floculación, sedimentación, filtración), así como a los desinfectantes oxidativos, como el cloro, que corresponde al método aplicado en las plantas en estudio (9,11,13,14,30,39,80,82). Otros estudios realizados en el país como el de Alarcón et al., (2005) (54), Lora et al., (2016) (52) y Triviño et al., (2016) (53) también reportan la presencia de *Giardia* en agua tratada en el 16,7 % de las muestras (2/12), en 36 % de las muestras (22/61) y en 15 % de las muestras (3/20), respectivamente (53,52,54).

En este sentido, uno de los puntos clave que debe ser revisado en las tres PTACH en estudio, corresponde al tratamiento fisicoquímico (coagulación, floculación, sedimentación, filtración),

debido a que la eliminación de las formas quísticas de los parásitos protozoarios se ha correlacionado fuertemente con el adecuado funcionamiento de cada una de las etapas de este proceso (11,31,79), con especial atención en los pasos de coagulación-floculación, ya que se ha reportado que la eficiencia de todas las demás etapas del tratamiento fisicoquímico pueden ser afectadas en gran medida por su efectividad (39,159). En este sentido, una de las desventajas que presentan las PTACH de Túquerres e Ipiales es que no adicionan coagulante de forma rutinaria, sino que su adición está condicionada a la presencia de altos niveles de turbiedad de sus fuentes de abastecimiento, principalmente cuando hay lluvias. Por esta razón, tampoco cuentan con dosificadores eficientes para la adición del coagulante al agua. La adición del coagulante en función de la turbiedad, se debe a que tanto en la planta de Ipiales como en la de Túquerres adicionan para este fin sulfato de aluminio granulado, el cual se caracteriza por ser económico y fácil de obtener, pero que si no se adiciona de forma controlada y en cantidades adecuadas puede generar concentraciones residuales de aluminio, el cual también representa riesgo para la salud humana (14). Una alternativa en estas plantas puede ser el uso de coagulantes naturales en lugar de los químicos, ya que al ser biodegradables y no tóxicos podrían adicionarse de forma regular, favoreciendo también la remoción de parásitos protozoarios (14).

Por otro lado, la detección de *G. duodenalis* en el agua tratada también podría deberse a la contaminación post-tratamiento por quistes de este microorganismo durante el proceso de producción de agua potable en las plantas en estudio, causada por infiltraciones en el sistema de tratamiento a través de fugas, conexiones abiertas o cruzadas, manipulación de elementos del sistema, reparación de tuberías, o a la formación de biopelículas de este microorganismo en las tuberías, representando una posible fuente de contaminación secundaria del agua, debido a la acumulación y concentración de quistes que puede ocurrir durante periodos de flujo bajo (84). La formación de biopelículas en tuberías ha sido previamente documentada para otros parásitos protozoarios como *Cryptosporidium*, lo que explica su detección en fuentes de agua aparentemente clasificadas como libre de ooquistes y apta para el consumo humano (35). Sin embargo, es importante resaltar que en este estudio no se cuenta con información sobre la viabilidad o infectividad de los parásitos protozoarios detectados y por lo tanto no se podría hacer conjeturas sobre el riesgo de la detección de *G. duodenalis* en el agua post-tratamiento.

En este estudio, la detección de *G. duodenalis* en los tres tipos de agua analizados (agua cruda, post-tratamiento fisicoquímico y post-cloración) en contraste con la detección de *Cryptosporidium* únicamente en muestras de agua cruda, puede deberse a que posiblemente la concentración de los quistes de *Giardia* sea mucho más alta que la concentración de los ooquistes de *Cryptosporidium* en los sitios de muestreo en estudio, siendo por tanto más persistentes incluso posterior al tratamiento aplicado en cada una de las PTACH (84), lo cual ha sido reportado previamente, indicando que la resistencia de las formas quísticas a los procesos convencionales de tratamiento y desinfección con cloro está relacionada, entre otros factores, con la concentración de los quistes/ooquistes en el agua (14). En el caso de *Cryptosporidium*, si bien ha sido caracterizado por su alta resistencia a los tratamientos convencionales para la potabilización de agua, incluso más que *Giardia* (9,35,39), también se ha caracterizado por encontrarse en bajas concentraciones en ambientes acuáticos (6,31,160), lo que puede contribuir a su remoción durante el tratamiento fisicoquímico aplicado. Sin embargo, en este estudio no se cuenta con información acerca de la concentración de *Giardia* y *Cryptosporidium* en las muestras de agua colectadas, que permitan corroborar este planteamiento. Estudios como el de Helmi et al., (2011) (78) y Kumar et al., (2016) (34), al igual que en este estudio, también reportaron la presencia de *Cryptosporidium* únicamente en muestras de agua cruda y su ausencia en muestras de agua post-tratamiento, asociando su remoción principalmente con el tratamiento fisicoquímico.

En los acueductos veredales de los Municipio de Ipiales y Tumaco, en los cuales durante los meses de muestreo no se encontraban aplicando ningún tipo de tratamiento al agua, la detección de las formas quísticas de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., evidencia la contaminación de las fuentes de agua natural captadas para el consumo humano. En el caso de los acueductos veredales de Ipiales, las fuentes de agua utilizadas para el abastecimiento de los acueductos pudieron estar expuestas a diversos focos de contaminación, principalmente vertimientos de origen doméstico y residuos procedentes de cultivos y del cuidado o crianza de animales, debido a que en la zona se desarrollan diferentes actividades antropogénicas de manera muy próxima a las fuentes de agua. Con respecto a los acueductos veredales A y B de Tumaco, la contaminación de los pozos de agua subterránea pudo ocurrir debido a que se encuentran expuestos directamente al ambiente y no cuentan con el mantenimiento adecuado; en el acueducto E, en el cual toman el agua del Río Mira, su contaminación pudo estar asociada

con las diferentes actividades llevadas a cabo de manera frecuente en el Río, como recreación, aseo personal, lavado de ropa y en general vertimientos residuales de origen doméstico; en el acueducto F, la contaminación del pozo subterráneo del cual toman el agua podría deberse a filtraciones de los quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* que se ven favorecidas por el tamaño que presentan, lo cual ya ha sido previamente reportado como una amenaza para aguas subterráneas (22,161). Este acueducto veredal fue el único en el cual al momento del muestreo, estaban aplicando algún tipo de tratamiento, el cual incluyó: desarenadores, carbono activado y cloración; en las muestras de agua tomadas post-tratamiento de este acueducto no se encontraron muestras positivas para ninguno de los dos parásitos protozoarios detectados en los demás sitios de muestreo.

En general, en el estudio de los acueductos veredales, una de las principales reflexiones fue la importancia del cuidado de las fuentes naturales de agua, con una mayor tendencia al manejo preventivo de la transmisión de microorganismos patógenos, así como el desarrollo de tecnologías de tratamiento de fácil implementación y la capacitación del personal encargado del mantenimiento de los acueductos, debido a que la construcción de plantas de tratamiento convencional robustas en zonas rurales puede estar condicionada por diferentes factores relacionados con la adecuada gestión para el desarrollo de proyectos de acueducto y alcantarillado, designación de recursos, difícil acceso a zonas veredales y aspectos culturales propios de cada zona.

Con respecto a la relación existente entre los niveles de precipitación y la presencia de parásitos protozoarios en fuentes de agua, en este estudio se encontró que *G. duodenalis* presenta una relación estadísticamente significativa con la temporada de muestreo (P-valor = 0,0078), con un mayor número de muestras positivas durante el mes de septiembre, que corresponde a un mes seco. Algunos estudios indican que las infecciones causadas por parásitos protozoarios son más altas durante los meses más cálidos, debido a que durante esta temporada se incrementan actividades al aire libre que pueden inducir mayores índices de contaminación de los ecosistemas acuáticos (47,78). En contraste, otros estudios indican que las frecuencias más altas de las formas quísticas de este tipo de microorganismos en los cuerpos de agua, se presentan durante las temporadas de mayor precipitación, debido a los procesos de escorrentía inducidos por la lluvia que pueden favorecer la contaminación del agua. Además, las bajas temperaturas pueden beneficiar la persistencia de los

quistes/ooquistes, así como su viabilidad y diseminación a través del agua (1,9,17,28,78). Sin embargo, en el caso específico de los quistes de *G. duodenalis*, en la literatura se ha reportado que éstos se encuentran de manera continua durante todo el año y que los picos de detección, como el observado en este estudio durante la temporada de menor precipitación, pueden estar asociados con eventos puntuales de contaminación de las fuentes de agua, así como a procesos ambientales de cada sitio de muestreo (1,32,44,56,78,80). No obstante, para realizar un análisis concluyente con respecto a la relación entre la detección de parásitos protozoarios y los niveles de precipitación a nivel regional, se recomienda que en estudios futuros se realice el seguimiento de este tipo de microorganismos durante un periodo de tiempo más amplio, teniendo en cuenta el efecto de fenómenos como el del niño y la niña que provocan cambios en los patrones climáticos considerados típicos o normales en una región.

Por otro lado, de las características fisicoquímicas en análisis, la turbiedad y la temperatura del agua son las que más ampliamente se han correlacionado con la detección de parásitos protozoarios (3,31,44,60). En cuanto a la turbiedad, aunque en este estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre éste parámetro y los resultados de la detección molecular de *G. duodenalis* ( $p$ -valor = 0,5412) y *Cryptosporidium* spp ( $p$ -valor = 0,6695), es importante tener en cuenta que esta característica fisicoquímica es un factor relevante durante el tratamiento convencional aplicado a las plantas para la potabilización del agua, ya que como se mencionó previamente en algunas de las plantas en estudio (PTACH de Ipiales y Túquerres), la adición de coagulante depende de los niveles de turbiedad del agua cruda que ingresa a la planta, lo que puede afectar el desarrollo de las etapas de coagulación-floculación, que son claves en la remoción de parásitos protozoarios (3,60,78). Además, altos niveles de turbiedad pueden favorecer que los parásitos protozoarios se camuflen en partículas que pueden funcionar como sustancias protectoras de la acción del desinfectante, disminuyendo aún más la eficiencia del cloro adicionado (11,31,39). Por otro lado, los niveles de turbiedad también pueden afectar el proceso de recuperación de los parásitos protozoarios (160). En este estudio, las muestras de agua cruda con alta turbiedad fueron pre-filtradas con un tamiz estándar número 60 (250  $\mu$ m de tamaño de poro) y filtradas mediante membranas de nitrocelulosa de 3  $\mu$ m de tamaño de poro. En éstas muestras fue necesario utilizar un mayor número de membranas, con el fin de evitar su obstrucción y que no se afectara la captura y retención de los microorganismos blanco.

Con relación a la temperatura del agua, si bien las formas quísticas de agentes patógenos como *Giardia* y *Cryptosporidium* se caracterizan por presentar paredes quísticas robustas que les confieren una alta capacidad de resistencia a las condiciones ambientales (21,34,43,135) su sobrevivencia, viabilidad e infectividad en ambientes naturales pueden ser afectadas bajo condiciones de temperaturas extremas o cambios rápidos de la temperatura, de manera que temperaturas muy altas pueden acelerar la degradación de los quistes/ooquistes debido a las alteraciones en la integridad de la pared causadas por la desnaturalización de las proteínas, y temperaturas de congelación pueden inactivar estas formas quísticas (31,37,44). Se ha reportado que el rango de temperatura en el cual los quistes/ooquistes pueden sobrevivir por periodos prolongados de tiempo en el agua oscilan entre 4°C y 22 °C (31,80,92), que corresponde al rango dentro del cual se encontró la temperatura del agua de la mayoría de sitios de muestreo incluidos en este estudio (temperatura promedio del agua de Pasto: 14,7 °C; Ipiales: 14,4 °C; Túquerres: 11,8 °C; AV Ipiales: 14,6 °C), con excepción de las muestras tomadas Tumaco que presentaron una temperatura promedio del agua por encima de este rango (28,1 °C).

En la identificación de los ensamblajes de *G. duodenalis*, el menor número de muestras positivas por la PCR anidada con respecto a la qPCR puede deberse a que los marcadores moleculares *gdh* y *tpi* utilizados en la PCR presentan un menor número de copias que el marcador 18S ARNr utilizado en la PCR en tiempo real. Además, la qPCR se ha caracterizado por presentar una alta sensibilidad que favorece la detección de parásitos protozoarios en muestras ambientales, en las cuales este tipo de microorganismos pueden encontrarse en bajas concentraciones (10,31,34,59,98).

En cuanto a la presencia de picos mixtos obtenida en algunos electroferogramas en el análisis de secuenciación, puede estar asociada con la presencia de varios ensamblajes de *G. duodenalis* en una misma muestra, lo cual ha sido reportado para muestras clínicas y es altamente probable en muestras de agua donde las fuentes de contaminación pueden ser diversas, resultando en una limitante de la técnica de secuenciación en el estudio de éste parásito protozoario (6,10,53,87). Algunos estudios reportan picos dobles en electroferogramas cuando los aislados corresponden a los ensamblajes B, C, D y E, pero no se han observado en aislados de los ensamblajes A, F y G (10). La presencia de varios ensamblajes en una misma

muestra, puede causar que los productos de PCR se mezclen, pero se observen como una sola banda durante la verificación de los amplicones en el gel de agarosa, debido a que presentan un tamaño similar. La baja calidad de los electroferogramas también puede deberse a la baja concentración del ADN blanco en las muestras o a la presencia de estructuras secundarias. Al igual que en el caso de *Giardia*, el uso de la secuenciación en la identificación de las especies de *Cryptosporidium* a partir de muestras ambientales, parece estar también limitado, debido a que este tipo de muestras pueden presentar una mezcla de especies, genotipos y subgenotipos de este parásito protozoario, que dificulta su adecuada discriminación (6,55). Esto se evidenció en la calidad de los electroferogramas obtenidos, que requirió de un análisis minucioso de las secuencias para la identificación de las especies de *Cryptosporidium*.

De los ensamblajes de *G. duodenalis* encontrados, el ensamblaje A, ha sido reportado tanto en humanos como en ganado (bovinos, búfalos, ovejas, cabras, alpacas y cerdos), animales de compañía (perros, gatos y caballos), algunas especies de animales marinos (delfines, marsopas, focas, tiburones) y mamíferos silvestres, siendo por tanto de gran relevancia considerar su potencial zoonótico (10,41,44). Este ensamblaje se ha subdividido en los subensamblajes AI, AII y más recientemente AIII y AIV (87), de los cuales en este estudio encontramos AI y AII. De éstos, el subensamblaje AI ha sido reportado predominantemente en ganado y mascotas y el AII en humanos (87). Por lo tanto, las fuentes de contaminación probablemente estén asociadas con estos hospederos. Además, en este estudio se encontró una muestra con el ensamblaje H, el cual ha sido recientemente incluido y se ha reportado hasta ahora en focas y gaviotas(10,44). Este resultado corresponde a la primera descripción del ensamblaje H en Colombia o Sur América. En este sentido, uno de los interrogantes de mayor interés por resolver es cuáles son los verdaderos reservorios de este ensamblaje y la relevancia de estudios futuros que permitan describir los hospederos y su frecuencia en el país y en la región. Así mismo, es importante tener en cuenta que la descripción del ensamblaje H ha sido soportada únicamente por el análisis de secuenciación con el marcador *gdh*, pero no con *tpi*, siendo necesario un mayor número de estudios que permitan contribuir a su caracterización (10,44).

A pesar de que la transmisión de *G. duodenalis* a través del agua ha sido bien documentada, es poco lo que se conoce sobre la presencia de los ensamblajes de este microorganismo en agua.

Estudios realizados en aguas residuales, han encontrado los ensamblajes A, B y E (10). En Colombia, Triviño et al., (2016) reportaron la presencia de los ensamblajes A y B en muestras de agua cruda y tratada (53). Otras investigaciones llevadas a cabo en el país en población infantil, han reportado los ensamblajes A y B (162,163) y los subensamblajes AI, AII, BIII y BIV (49,81).

Por otro lado, la presencia de los ensamblajes AI y AII en la planta de tratamiento de agua para consumo humano de Ipiales, podría indicar que la fuente de abastecimiento de esta planta posiblemente tiene focos de contaminación asociados con heces fecales de humanos, así como de mascotas y ganado y, la presencia del ensamblaje AII en la planta de tratamiento de agua para consumo humano de Pasto, podría indicar que posiblemente hay focos de contaminación asociados con heces fecales de humanos. Lo anterior puede deberse a que las fuentes de agua superficial que sirven para el abastecimiento de éstas dos PTACH corresponden a ríos que antes de la captación de agua por parte de las plantas están expuestos a vertimientos de tipo doméstico y desechos del cuidado o crianza de animales.

Con respecto a la detección de las especies de *Cryptosporidium*, este resultado demuestra la presencia del género en la zona y la posibilidad de circulación de otras especies. De las especies detectadas, *C. parvum* es uno de las más ampliamente distribuida, reportada en más de 150 huéspedes mamíferos, incluidos el humano, ratones, vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos y ciervos, siendo considerada una especie de transmisión zoonótica y uno de los principales agentes causales de brotes de criptosporidiosis transmitidos a través del agua (24,45,47,66,86). En cuanto a las otras especies de *Cryptosporidium* detectadas, son consideradas hospedero específicas: *C. molnari* se ha descrito principalmente en pescados y *C. galli* en aves como pollos, gallinas y pinzones (6,46,92). Se encontraron 6 secuencias que no correspondieron a ninguna de las especies de *Cryptosporidium* hasta ahora aceptadas, pero de las cuales una presentó un alto porcentaje de identidad con una secuencia de un aislamiento obtenido a partir de murciélagos (*Cryptosporidium sp.* genotipo II de murciélagos), y 3 alinearon con una secuencia aislada a partir de pavos y pollos (*Cryptosporidium sp.* genotipo VIII de aves). Es importante tener en cuenta que dentro del género *Cryptosporidium* hay varias especies y genotipos pendientes de clasificación definitiva, lo que indica que se encuentra en continua revisión (46). Esto representa una desventaja al realizar alineamientos con la base de datos del genbank, debido a que no siempre hay actualizaciones de los cambios taxonómicos (55).

Las especies de *Cryptosporidium* más ampliamente reportadas en agua corresponden a *C. hominis*, *C. parvum* y *C. andersoni* (47,55,53,82), además se han detectado especies como *C. meleagridis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*, genotype III de ratones (W1), genotipo I de la rata almizclera (W7), and genotipo del zorrillo (W13) (59,82). De estas especies en este estudio se encontró únicamente a *C. parvum*.

Con relación a los posibles fuentes de contaminación, la detección de *C. parvum*, *C. galli* y *Cryptosporidium* sp. bat genotype II en la planta de tratamiento de agua para consumo humano de Pasto podría estar asociada con la contaminación del agua por heces de origen humano, de mamíferos rumiantes, aves y murciélagos. En la planta de Ipiales la presencia de *C. molnari* podría estar relacionada con la contaminación del agua por ooquistes proveniente de peces; y en los acueductos veredales de Tumaco la detección de *Cryptosporidium* sp. avian genotype VIII podría indicar la contaminación del agua por aves.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

La detección molecular de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp mediante PCR en tiempo real en las muestras de agua colectadas, indican la presencia de estos dos parásitos protozoarios circulando en fuentes de agua, utilizadas para el abastecimiento de las plantas de tratamiento de agua para consumo humano de los municipios de Pasto, Ipiales y Túquerres y de los acueductos veredales de Ipiales y Tumaco, del Departamento de Nariño.

No se encontró la presencia de los parásitos protozoarios *T. gondii* y *E. histolytica* en agua utilizada para el abastecimiento de las plantas de tratamiento para la producción de agua potable y acueductos veredales de los sitios de muestreo en estudio.

Entre los parásitos en estudio *G. duodenalis* fue el parásito protozoario detectado con mayor frecuencia en todos los sitios de muestreo y se encontró tanto en agua cruda como en agua colectada posterior al tratamiento fisicoquímico y posterior al proceso de desinfección con cloro.

El parásito protozoario *Cryptosporidium* se detectó únicamente en agua cruda de las plantas de tratamiento de agua para consumo humano de Pasto e Ipiales y en los acueductos veredales de Ipiales y Tumaco, presentando una relación estadísticamente significativa con el tipo de agua colectado.

La detección de *G. duodenalis* presentó una asociación estadísticamente significativa con la temporada de muestreo, encontrando un mayor número de muestras positivas entre los meses de agosto y septiembre, caracterizados por presentar niveles de precipitación bajos para el Departamento de Nariño.

El pH, la temperatura del agua, el oxígeno disuelto, la conductividad eléctrica, la turbiedad y el COT no presentaron ninguna relación estadísticamente significativa con la detección molecular de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp en las muestras de agua colectadas y por tanto no permitieron explicar la presencia de estos parásitos protozoarios en los sitios de muestreo en estudio.

La técnica de qPCR utilizada en este estudio permitió la detección de los parásitos protozoarios *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* a partir de muestras de agua y podría considerarse a futuro como una metodología alternativa o complementaria a las utilizadas actualmente para el monitoreo de este tipo de microorganismos en agua.

Mediante el análisis de secuenciación se encontró la presencia de *G. duodenalis*, ensamblaje H con el marcador *gdh* y ensamblaje AII con el marcador *tpi* en la planta de tratamiento de agua para consumo humano del Municipio de Pasto; la presencia de *G. duodenalis* ensamblajes AI y AII con ambos marcadores *gdh* y *tpi* en la planta de tratamiento de agua para consumo humano del Municipio de Ipiales; y la presencia de *G. duodenalis*, ensamblaje no identificado en la planta de tratamiento de agua para consumo humano de Túquerres y acueductos veredales de Tumaco, confirmando la presencia de éste parásito protozoario en fuentes de agua del Departamento de Nariño.

Mediante el análisis de secuenciación se encontró la presencia de *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium galli* y *Cryptosporidium* sp. genotipo II de murciélagos en la planta de tratamiento de agua para consumo humano del Municipio de Pasto, la presencia de *Cryptosporidium molnari* en la planta de tratamiento de agua para consumo humano del Municipio de Ipiales, la presencia de *Cryptosporidium* sp. genotipo VIII de aves en los acueductos veredales de Tumaco y la presencia de *Cryptosporidium* sp. en los acueductos veredales de Ipiales y Tumaco, confirmando la presencia de éste parásito protozoario en fuentes de agua del Departamento de Nariño.

La técnica de secuenciación utilizada en este estudio presentó algunas limitaciones en la genotipificación de *G. duodenalis* y *Cryptosporidium* spp, en muestras de agua, que se asociaron con la presencia de varios ensamblajes de *Giardia* y varias especies de *Cryptosporidium* en una

misma muestra, debido a que se obtuvieron electroferogramas con picos mixtos que no permitieron el adecuado análisis de algunas secuencias.

## 6.2 Recomendaciones

Continuar trabajando en la qPCR y en otras técnicas de biología molecular para el seguimiento de parásitos protozoarios en muestras de agua, que a futuro puedan considerarse alternativas metodológicas para su monitoreo.

Realizar el seguimiento de los parásitos protozoarios en fuentes de agua de la región durante periodos más prolongados de tiempo, que permitan un mejor conocimiento de su comportamiento y de las variables que puedan afectar su presencia.

En estudios futuros además de la detección de los parásitos protozoarios en muestras de agua, se recomienda considerar la concentración de las formas quísticas, su viabilidad e infectividad.

Realizar estudios que contrasten y correlacionen la detección de parásitos protozoarios mediante qPCR con otras metodologías como la USEPA 1623 que corresponde al método validado para la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en el país.

Desarrollar estrategias metodológicas para mejorar la genotipificación de parásitos protozoarios en muestras de agua, considerando la presencia de varios ensamblajes de *G. duodenalis* y la presencia de varias especies de *Cryptosporidium* spp en una misma muestra.

Considerar los resultados obtenidos en esta investigación para tomar medidas y precauciones que permitan mitigar las posibles fuentes de contaminación del agua de abastecimientos de las plantas encargadas de la producción de agua potable y de los acueductos veredales de la región.

## A. Anexo: Divulgación

**Figura A-1:** Certificado de participación en XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología, en modalidad de poster de investigación



Se deja constancia que

*C Sánchez, M Guerrero, C López, A Sánchez, J Ramírez*

participó en calidad de

Presentador/es de Poster

*Detección por PCR en tiempo real de Giardia duodenalis en muestras de agua cruda y tratada en Nariño (Colombia)*

**Rosario, Santa Fe, Argentina. 26 al 30 de Septiembre de 2016**

Marcelo Galas  
Presidente ALAM-CAM

Hector Morbidoni  
Presidente SLAMTB

Graciela Torno  
Presidente CLAMME

Gustavo Giusiano  
Presidente AAM

Manuel Gómez Carrillo  
Presidente ALAM

**Figura A-2:** Certificado de participación en la VI Conferencia Internacional de *Giardia* y *Cryptosporidium*, en modalidad de presentación oral, con el trabajo titulado: “Molecular detection of *Giardia duodenalis* in raw and drinking water samples from Nariño (Colombia) in 2016”



## Certificate of Attendance

This is to certify that

**Claudia Andrea Sánchez Ortega**

attended the

6<sup>TH</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference

26-28 April, 2017

At the Havana International Conference Center  
Havana, Cuba

  
Dr. Angel A. Escobedo  
Organizer IGCC

  
Dr. M. Guadalupe Ortega-Pierres  
Co-Organizer IGCC

  
Dr. María G. Escarot  
President of the CSMP



## Bibliografía

1. Burnet J-B, Penny C, Ogorzaly L, Cauchie H-M. Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: Implications for monitoring and risk assessment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2014 Feb [cited 2015 Oct 6];472:1023–35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713012278>
2. WHO (World Health Organization). WHO guidelines for drinking-water quality. Volume 1 - Recommendations. WHO chronicle. 2006. 515 p.
3. Fewtrell L, Macgill SM, Kay D, Casemore D. Uncertainties in risk assessment for the determination of drinking water pollutant concentrations: *Cryptosporidium* case study. *Wat Res* [Internet]. 2001;35(2):441–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00281-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00281-5)
4. Briñez A KJ, Guarnizo G JC, Arias V. S a. Calidad del agua para consumo humano en el departamento del Tolima. *Rev Fac Nac Salud PÉblica* [Internet]. 2012;30 (2):175–82. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&\npid=S0120-386X2012000200006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&\npid=S0120-386X2012000200006)
5. Ali MA, Al-Herrawy AZ, El-Hawaary SE. Detection of enteric viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* in two different types of drinking water treatment facilities. *Water Res* [Internet]. 2004 Nov [cited 2015 Nov 16];38(18):3931–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135404003409>
6. Smith H V., Nichols RAB. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Exp Parasitol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;124(1):61–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.014>
7. Pérez Vidal A, Lozada Torres P, Cruz Velez C. Planes de seguridad del agua . Fundamentos y perspectivas de implementación en Colombia. *Ing E Investig.* 2009;29(3):79–85.
8. Ministerio de Salud y Protección Social. Informe Nacional de la calidad del agua para consumo humano con base en el IRCA. Bogotá D.C.; 2016.
9. Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Sci Total Environ* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2015 Nov 11];405(1-3):45–53. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896970800692X>

10. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):110–40.
11. Schoenen D. Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens with drinking water: Possibilities and limitations. *Water Res.* 2002;36(15):3874–88.
12. Davies JM, Mazumder A. Health and environmental policy issues in Canada: The role of watershed management in sustaining clean drinking water quality at surface sources. *J Environ Manage.* 2003;68(3):273–86.
13. Menocal L, Caraballo Y. Importance of health surveillance of parasites in water quality according to use. *Rev Cuba Hig y Epidemiol* [Internet]. 2014;52(2):1–13. Available from: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol52\\_2\\_14/hie06214.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol52_2_14/hie06214.htm)
14. Nishi L, Vieira AMS, Vieira MF, Silva GF, Bergamasco R. Application of hybrid process of coagulation/flocculation and membrane filtration for the removal of protozoan parasites from water. *Procedia Eng.* 2012;42(August):148–60.
15. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2015 Nov 16];45(20):6603–14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411006117>
16. Organización Mundial de la Salud. Guías para la calidad del agua potable. *Environ Prot* [Internet]. 2006;1:408. Available from: <http://www.mendeley.com/research/guas-para-la-calidad-del-agua-potable/>
17. Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* [Internet]. 2004 May 20 [cited 2015 Sep 22];198(1-3):229–38. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X04000952>
18. Franco RMB, Hachich EM, Sato MIZS, Naveira RML, Silva EDC, Campos MMDC, et al. Avaliação da performance de metodologias de detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água destinada ao consumo humano, para o atendimento às demandas da Vigilância em Saúde Ambiental no Brasil. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2012;21(2):233–42. Available from: [http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742012000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742012000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
19. Chacín-Bonilla L. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Trop.* 2010;115(3):181–93.
20. Blans MC, Ridwan BU, Verweij JJ, Rozenberg-Arska M, Verhoef J. Cyclosporiasis outbreak, Indonesia. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2005;11(9):1453–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229780>
21. Hofstra N, Bouwman AF, Beusen AHW, Medema GJ. Exploring global *Cryptosporidium*

- emissions to surface water. *Sci Total Environ*. 2013;442:10–9.
22. Slifko TR, Smith H V, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* [Internet]. 2000 Nov [cited 2015 Sep 28];30(12-13):1379–93. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751900001284>
  23. Pino LE, Salinas JE, López MC. Descripción de un brote epidémico de toxoplasmosis aguda en pacientes inmunocompetentes miembros de las fuerzas militares de Colombia durante operaciones de selva. *Infectio* [Internet]. 2009;13(2):83–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123939209707295>
  24. Tufenkji N, Dixon DR, Considine R, Drummond CJ. Multi-scale *Cryptosporidium*/sand interactions in water treatment. *Water Res*. 2006;40(18):3315–31.
  25. Botero-garces J, Montoya-palacio MN. Brote epidémico por *Cyclospora cayetanensis* en Medellín, Colombia. 2006;8(3):258–68.
  26. Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Research*. 2017. p. 14–22.
  27. Plutzer J, Karanis P. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res*. 2016;101:318–32.
  28. Rosado-García FM, Guerrero-Flórez M, Karanis G, Hinojosa MDC, Karanis P. Waterborne protozoa parasites: The Latin American perspective. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2017;220(5):783–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.03.008>
  29. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health*. 2007. p. 1–38.
  30. Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: The need for safe drinking water. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(1):132–8.
  31. Carey C., Lee H, Trevors J. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*. 2004;38(4):818–62.
  32. Kitajima M, Haramoto E, Iker BC, Gerba CP. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Sci Total Environ*. 2014;484:129–36.
  33. Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Mahmoodi MR, Karanis P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Trop* [Internet]. 2013 Feb [cited 2015 Nov 16];125(2):231–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X12003439>
  34. Kumar T, Majid MAA, Onichandran S, Jaturas N, Andiappan H, Salibay CC, et al. Presence

- of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. Infect Dis Poverty [Internet]. Infectious Diseases of Poverty; 2016;5(1):3. Available from: <http://www.idpjournals.com/content/5/1/3>
35. Ryan U, Papparini A, Monis P, Hijawi N. It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? Water Res [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;105:305–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>
  36. Shapiro K, Mazet JAK, Schriewer A, Wuertz S, Fritz H, Miller WA, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres in water using ultrafiltration and capsule filtration. Water Res [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;44(3):893–903. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.061>
  37. Jenkins MB, Eaglesham BS, Anthony LC, Kachlany SC, Bowman DD, Ghiorse WC. Significance of wall structure, macromolecular composition, and surface polymers to the survival and transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Environ Microbiol. 2010;76(6):1926–34.
  38. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd S. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol. 2010;8(6):413–22.
  39. Betancourt WQ, Rose JB. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Vet Parasitol [Internet]. 2004 Dec 9 [cited 2015 Oct 30];126(1-2):219–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704004042>
  40. Keegan A, Daminato D, Saint CP, Monis PT. Effect of water treatment processes on *Cryptosporidium* infectivity. Water Res [Internet]. 2008 Mar [cited 2015 Nov 16];42(6-7):1805–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135407007014>
  41. Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol [Internet]. 2004 Jun [cited 2015 Nov 24];4(2):125–30. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134804000139>
  42. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg Infect Dis. 2003;9(11):1444–52.
  43. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health [Internet]. 2010 Sep [cited 2015 Nov 18];213(5):321–33. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463910000829>
  44. Monis P, Caccio S, Thompson A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of

- the genus. *Trends Parasitol.* 2009;25(2):93–100.
45. Hunter PR, Hadfield SJ, Wilkinson D, Lake IR, Harrison FCD, Chalmers RM. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(1):82–8.
  46. Navarro-I-Martinez L, Del Águila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(2):135–43.
  47. Waldron LS, Ferrari BC, Cheung-Kwok-Sang C, Beggs PJ, Stephens N, Power ML. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011;77(21):7766–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3209151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  48. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Dec 3];124(1):80–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489409000927>
  49. Sánchez A, Muñoz 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.
  50. Ministerio De La Protección Social. Resolución 2115: Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. 2007;1–23.
  51. Ministerio De La Protección Social. Decreto 1575 de 2007: Por el cual se establece el Sistema para la Protección y Control de la Calidad del Agua para Consumo Humano. D Of [Internet]. 2007;2007(Mayo 9):1–14. Available from: <file:///C:/Users/Estacion6/Downloads/n16Dmps1575.htm>
  52. 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.
  53. 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.
  54. Alarcón M, Beltrán M, Cárdenas M, Campos M. Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. *Biomédica* [Internet]. 2005;353–65. Available from: <http://69.163.168.50/index.php/biomedica/article/view/1360>
  55. Burnet JB, Ogorzaly L, Tissier A, Penny C, Cauchie HM. Novel quantitative TaqMan real-time PCR assays for detection of *Cryptosporidium* at the genus level and genotyping of major human and cattle-infecting species. *J Appl Microbiol.* 2013;114(4):1211–22.
  56. Shields JM, Olson BH. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic

- coccidian. Int J Parasitol [Internet]. 2003 Apr [cited 2015 Nov 20];33(4):371–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751902002680>
57. Quintero-Betancourt W, Peele ER, Rose JB. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. J Microbiol Methods. 2002;49(3):209–24.
  58. Sato MIZ, Galvani AT, Padula JA, Nardocci AC, Lauretto M de S, Razzolini MTP, et al. Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao Paulo State, Brazil. Sci Total Environ. 2013;442:389–96.
  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.
  60. Ongerth JE. A Membrane Filter Method for *Giardia* and *Cryptosporidium* Concentrations in Small Volume Water Samples. University of Washington; 1994.
  61. Alonso JL, Amorós I, Cañigral I. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89(4):1203–11.
  62. Alum A, Sbai B, Asaad H, Rubino JR, Khalid Ijaz M. ECC-RT-PCR: a new method to determine the viability and infectivity of *Giardia* cysts. Int J Infect Dis [Internet]. 2012 May [cited 2015 Nov 16];16(5):e350–3. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971212000379>
  63. Garcés-Sánchez G, Wilderer PA, Munch JC, Horn H, Leubhn M. Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. Water Res [Internet]. 2009 Jun [cited 2015 Nov 16];43(10):2669–78. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135409001766>
  64. Schmidt PJ, Emelko MB, Thompson ME. Analytical recovery of protozoan enumeration methods: Have drinking water QMRA models corrected or created bias? Water Res [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;47(7):2399–408. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.001>
  65. Mejia R, Vicuña Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, et al. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(6):1041–7.
  66. Bouzid M, Steverding D, Tyler KM. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2008 Jun [cited 2015 Nov 16];19(3):302–6.

- Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166908000554>
67. Who. Quantifying selected major risks to health. *World Heal Rep* 2002. 2002;47-97.
68. Abu Amr SS, Yassin MM. Microbial contamination of the drinking water distribution system and its impact on human health in Khan Yunis Governorate, Gaza Strip: seven years of monitoring (2000-2006). *Public Health [Internet]*. 2008 Nov [cited 2015 Nov 16];122(11):1275-83. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033350608000565>
69. Basualdo J, Pezzani B, Luca M De, Córdoba A, Apezteguía M. Screening of the municipal water system of La Plata, Argentina, for human intestinal parasites. *Int J Hyg Environ Health [Internet]*. 2000 Jan [cited 2015 Nov 16];203(2):177-82. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463904700255>
70. Juárez MM, Rajal VB. Parasitosis intestinales en Argentina: Principales agentes causales encontrados en la población y en el ambiente. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45(3):191-204.
71. Castro-Hermida JA, García-Preledo I, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Res [Internet]*. 2010 Dec [cited 2015 Nov 1];44(20):5887-96. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410004781>
72. Barbee SL, Weber DJ, Sobsey MD, Rutala WA. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointest Endosc [Internet]*. 1999 May [cited 2015 Nov 16];49(5):605-11. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016510799703895>
73. Kistemann T, Classen T, Koch C, Dangendorf F, Fischeder R, Gebel J, et al. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Appl Environ Microbiol [Internet]*. 2002;68(5):2188-97. Available from:  
<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/68/5/2188>
74. Signor RS, Roser DJ, Ashbolt NJ, Ball JE. Quantifying the impact of runoff events on microbiological contaminant concentrations entering surface drinking source waters. *J water Heal*. 2005;3(4):453-68.
75. Lanata CF. Studies of food hygiene and diarrhoeal disease. *Int J Environ Health Res*. 2003;13:S1:S175-83.
76. Mak JW. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. *Trop Biomed*. 2004;21(2):39-50.
77. Hernández N, Cortés JA. Prevalencia y factores de riesgo de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en terneros de ganado lechero de la zona noroccidental de la Sabana de Bogotá. *Rev salud pública [Internet]*. 2012;14(1):169-81. Available from:  
<http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v14n1/v14n1a14.pdf>

78. Helmi K, Skraber S, Burnet JB, Leblanc L, Hoffmann L, Cauchie HM. Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. *Environ Monit Assess.* 2011;179(1-4):163-75.
79. Hsu BM, Yeh HH. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water treatment: A pilot-scale study. *Water Res.* 2003;37(5):1111-7.
80. Hernandez Gallo N. Prevalencia y factores de riesgo de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en terneros de ganado lechero de la zona noroccidental de la Sabana de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia; 2010.
81. Ramírez JD, Heredia RD, Hernández C, León CM, Moncada LI, Reyes P, et al. Molecular diagnosis and genotype analysis of *Giardia duodenalis* in asymptomatic children from a rural area in central Colombia. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015;32:208-13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134815001008>
82. Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökne A, Márialigeti K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2008 Oct [cited 2015 Nov 16];211(5-6):524-33. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463908000278>
83. Castro-Hermida JA, García-Presedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: A health risk for humans and animals. *Water Res.* 2009;43(17):4133-42.
84. Monis P, Caccio S, Thompson A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2015 Dec 3];25(2):93-100. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492208002894>
85. Stuart JM, Orr HJ, Warburton FG, Jeyakanth S, Pugh C, Morris I, et al. Risk factors for sporadic giardiasis: A case-control study in Southwestern England. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(2):229-33.
86. Abeywardena H, Jex AR, Nolan MJ, Haydon SR, Stevens MA, McAnulty RW, et al. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: Discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;12(8):1984-93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.004>
87. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int J Parasitol* [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2013;43(12-13):943-56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>
88. Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia*

- duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: The need for safe drinking water. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2015;218(1):132–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.09.001>
89. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Diseases, Division of Parasitic Diseases [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/>
  90. Quintero-Betancourt W, Peele ER, Rose JB. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2002 May [cited 2015 Aug 20];49(3):209–24. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701202000076>
  91. Amer S, Honma H, Ikarashi M, Tada C, Fukuda Y, Suyama Y, et al. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Vet Parasitol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;169(3-4):382–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.017>
  92. Fayer R. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*. 2004;126(1-2 SPEC.ISS.):37–56.
  93. Xiao L, Feng Y. Food and Waterborne Parasitology Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food Waterborne Parasitol* [Internet]. Elsevier; 2017;(August):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.002>
  94. Plutzer J, Törökné A, Karanis P. Combination of ARAD microfibre filtration and LAMP methodology for simple, rapid and cost-effective detection of human pathogenic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in drinking water. *Lett Appl Microbiol*. 2010;50(1):82–8.
  95. 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.
  96. Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, Metzner S, James ER, Torun N, et al. *Toxoplasma* serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2013;208(9):1520–8.
  97. Aksoy U, Marangi M, Papini R, Ozkoc S, Bayram Delibas S, Giangaspero A. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiol*. 2014;44:128–35.
  98. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000;38(11):4121–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351543>
  99. Rivero Z, Bracho Á, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, et al. Detección y

- diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del Estado Zulia, Venezuela. *Cad Saude Publica*. 2009;25(1):151-9.
100. Leung PO, Chen KH, Chen KL, Tsai YT, Liu SY, Chen KT. Epidemiological features of intestinal infection with *Entamoeba histolytica* in Taiwan, 2002-2010. *Travel Med Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;12(6):673-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.04.010>
  101. Chacín-Bonilla L. Amebiasis: aspectos clínicos, terapéuticos y de diagnóstico de la infección. *Rev Med Chil*. 2013;141:609-15.
  102. Pinilla AE, López MC, Viasus DF. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Rev Med Chil*. 2008;136(1):118-24.
  103. Gómez JC, Cortés JA, Cuervo SI, López MC. Amebiasis intestinal. *Asoc Colomb Infectología*. 2007;11:36-45.
  104. Al Saqur IM, Al-Warid HS, Albahadely HS. The prevalence of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica/dispar* among Iraqi provinces. *Karbala Int J Mod Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;3(2):93-6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405609X17300738>
  105. Benetton MLFN, Gonçalves A V., Meneghini MEF, Silva EF, Carneiro M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica/E. dispar* complex: An epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005;99(7):532-40.
  106. Aguilar-Rojas A, Olivo-Marin JC, Guillen N. The motility of *Entamoeba histolytica*: finding ways to understand intestinal amoebiasis. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;34:24-30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.016>
  107. Welter BH, Sehorn MG, Temesvari LA. Flow cytometric characterization of encystation in *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. Elsevier; 2017;218(October):23-7. Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0166685117301226>
  108. Pires-Santos GM, Santana-Anjos KG, Vannier-Santos MA. Optimization of *Entamoeba histolytica* culturing in vitro. *Exp Parasitol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;132(4):561-5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489412002901>
  109. Neves Santos FL, De Souza Gonçalves M, Matos Soares N. Validation and utilization of PCR for differential diagnosis and prevalence determination of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in Salvador City, Brazil. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. Elsevier; 2011;15(2):119-25. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-)

86702011000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=en

110. Heredia RD, Fonseca JA, López MC. *Entamoeba moshkovskii* perspectives of a new agent to be considered in the diagnosis of amebiasis. *Acta Trop* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;123(3):139–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.012>
111. Anuar TS, Al-Mekhlafi HM, Abdul Ghani MK, Abu Bakar E, Azreen SN, Salleh FM, et al. Molecular epidemiology of amoebiasis in Malaysia: Highlighting the different risk factors of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections among Orang Asli communities. *Int J Parasitol* [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2012;42(13-14):1165–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.003>
112. López OY, López MC, Corredor V, Clara Echeverri M, Pinilla Roa AE. Diferenciación del complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* mediante Gal/GalNAc-lectina y PCR en aislamientos colombianos. *Rev Med Chil*. 2012;140(4):476–83.
113. Varma M, Hester JD, Schaefer FW, Ware MW, Lindquist HDA. Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2003 Apr [cited 2015 Nov 16];53(1):27–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701202002099>
114. Eberhard ML, Da Silva AJ, Lilley BG, Pieniazek NJ. Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian monkeys: *C. cercopithecii* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(5):651–8.
115. Herwaldt BL. SPECIAL SECTION : EMERGING INFECTIONS *Cyclospora cayetanensis* : A Review , Focusing on the Outbreaks of Cyclosporiasis in the 1990s. *Clin Infect Dis*. 2000;31:1040–57.
116. Chacín-Bonilla L. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Trop* [Internet]. 2010 Sep [cited 2015 Nov 3];115(3):181–93. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X10000860>
117. Ramírez-Olivencia G, Dolores Herrero M, Subirats M, Rivas González P, Puente S. Brote de *Cyclospora cayetanensis* en viajeros a Cuba. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2008;26(9):558–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X08752613>
118. Cam PD, Sorel N, Dan LC, Larher E, Tassin S, Barbier JP, et al. A new contribution to the epidemiological survey of *Cyclospora cayetanensis* in Hanoi water supplies (Viet-Nam); a 12-month longitudinal study. *Médecine Mal Infect* [Internet]. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS; 2001;31(10):597–600. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399077X01002773>
119. Cutler D, Miller G. The Role of Public Health Improvements in Health Advances: The Twentieth Century United States. *Mortality*. 2005;42(1):1–22.

120. McGuigan KG, Conroy RM, Mosler H-J, du Preez M, Ubomba-Jaswa E, Fernandez-Ibañez P. Solar water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top. *J Hazard Mater* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2015 Sep 7];235-236:29-46. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389412007960>
121. Spuhler D, Andrés Rengifo-Herrera J, Pulgarin C. The effect of Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. *Appl Catal B Environ* [Internet]. 2010 Apr [cited 2015 Nov 16];96(1-2):126-41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337310000664>
122. Lanao M, Ormad MP, Mosteo R, Ovelleiro JL. Inactivation of *Enterococcus* sp. by photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in natural water. *Sol Energy* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Nov 16];86(1):619-25. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038092X11004178>
123. López-Gálvez F, Posada-Izquierdo GD, Selma M V, Pérez-Rodríguez F, Gobet J, Gil MI, et al. Electrochemical disinfection: an efficient treatment to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in process wash water containing organic matter. *Food Microbiol* [Internet]. 2012 May [cited 2015 Oct 22];30(1):146-56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002011002309>
124. Galeano LA. Peroxidación catalítica de contaminantes orgánicos en medio acuoso utilizando una bentonita modificada con Al y Fe, Cu o Mn. Universidad de Salamanca - España; 2011.
125. Mohajerani M, Mehrvar M, Ein-Mozaffari F. An overview of the integration of advanced oxidation technologies and other processes for water and wastewater treatment. *Int J Eng*. 2009;3(2):120-46.
126. Sökmen M, Değerli S, Aslan A. Photocatalytic disinfection of *Giardia intestinalis* and *Acanthamoeba castellanii* cysts in water. *Exp Parasitol* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Nov 16];119(1):44-8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489407003347>
127. Rincón A-G, Pulgarin C. Comparative evaluation of Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water. *Appl Catal B Environ* [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Nov 16];63(3-4):222-31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337305003772>
128. García-Fernández I, Polo-López MI, Oller I, Fernández-Ibañez P. Bacteria and fungi inactivation using Fe<sup>3+</sup>/sunlight, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study. *Appl Catal B Environ* [Internet]. 2012 Jun [cited 2015 Nov 16];121-122:20-9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337312001154>
129. Joseph CG, Li Puma G, Bono A, Krishnaiah D. Sonophotocatalysis in advanced oxidation process: a short review. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2009 Jun [cited 2015 Sep

- 7];16(5):583-9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135041770900011X>
130. Malato S, Blanco J, Alarcón DC, Maldonado MI, Fernández-Ibáñez P, Gernjak W. Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catal Today* [Internet]. 2007 Apr [cited 2015 Nov 16];122(1-2):137-49. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586107000478>
131. Galeano LA, Bravo PF, Luna CD, Vicente MÁ, Gil A. Removal of natural organic matter for drinking water production by Al/Fe-PILC-catalyzed wet peroxide oxidation: Effect of the catalyst preparation from concentrated precursors. *Appl Catal B Environ* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Apr 9];111-112:527-35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337311005133>
132. Li B, Xu X, Zhu L, Ding W, Mahmood Q. Catalytic ozonation of industrial wastewater containing chloro and nitro aromatics using modified diatomaceous porous filling. *Desalination* [Internet]. 2010 May [cited 2015 Nov 16];254(1-3):90-8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916409013423>
133. Environmental Protection Agency USEP. EPA Wastewater Technology Fact Sheet: Chlorine Disinfection. EPA 832-F-99-062. 1999;
134. Epa. Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. United States Prot Agency [Internet]. 2012;83. Available from: <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/upload/epa816r12001.pdf>
135. Kitajima M, Haramoto E, Iker BC, Gerba CP. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Sci Total Environ*. 2014;484(1).
136. Dumètre A, Dardé M-L. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2005 May [cited 2015 Nov 16];61(2):209-17. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701204003501>
137. Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Pisano E, Pinon J, et al. Evaluation of a Strategy for *Toxoplasma gondii* Oocyst Detection in Water. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(7):4035-9.
138. Efstratiou A, Ongerth J, Karanis P. Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;123:96-112. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>
139. Betancourt WQ, Querales LJ. Parásitos protozoarios entéricos en ambientes acuáticos: métodos de concentración y detección. *Interciencia*. 2008;33(6):418-23.
140. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2013;2(5):70-8. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

141. Espy M. J, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):165–256.
142. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.* 1995;4(6):357–62.
143. Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: the need for safe drinking water. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Oct 11];218(1):132–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463914000820>
144. Lalonde LF, Gajadhar AA. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(14):4354–8.
145. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.* 1999;16(9):1135–44.
146. Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2008;62(4):357–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.009>
147. Lalonde LF, Gajadhar AA. Detection and Differentiation of coccidian oocysts by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis. *J Parasitol* [Internet]. 2011;97(4):725–30. Available from: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-2706.1>
148. Campbell GA, Mutharasan R. Near real-time detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst by IgM-functionalized piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever biosensor. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2008 Feb 28 [cited 2015 Nov 16];23(7):1039–45. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566307004538>
149. Kramer MF, Vesey G, Look NL, Herbert BR, Simpson-Stroot JM, Lim D V. Development of a *Cryptosporidium* oocyst assay using an automated fiber optic-based biosensor. *J Biol Eng* [Internet]. 2007;1:3. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18271980](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18271980)
150. Baeumner AJ, Pretz J, Fang S. A universal nucleic acid sequence biosensor with nanomolar detection limits. *Anal Chem* [Internet]. 2004;76(4):888–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961717>
151. Ortíz Pineda C. Parasitos em amostras de água de piscinas e em hortaliças: Desafios de

- detecção por métodos parasitológicos ou moleculares. Universidade Estadual de Campinas; 2017.
152. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4).
  153. Ramirez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-silva E, Juiz N, Pavia P, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*. 2015;17(5):605–15.
  154. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1).
  155. Qvarnstrom Y, Benedict T, Marcet PL, Wiegand RE, Herwaldt BL, da Silva AJ. Molecular detection of *Cyclospora cayetanensis* in human stool specimens using UNEX-based DNA extraction and real-time PCR. *Parasitology*. 2017;1–6.
  156. Silva SOS, Richtzenhain LJ, Barros IN, Gomes AMMC, Silva A V, Kozerski ND, et al. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. *Exp Parasitol* [Internet]. 2013 Nov [cited 2015 Nov 24];135(3):551–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489413002415>
  157. Ministerio de Salud y Protección Social. Encuesta nacional de parasitismo intestinal en población escolar 2012 – 2014. Facultad Nacional Salud Pública Universidad de Antioquía, editor. Medellín: El Ministerio; 2015. 1-174 p.
  158. Egorov A, Paulauskis J, Petrova L, Tereschenko A, Drizhd N, Ford T. Contamination of water supplies with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* and diarrheal illness in selected Russian cities. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2002;205(4):281–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12068747>
  159. Dugan BYNR, Fox KIMR, Owens JH, Miltner RJ. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional filtration. *Am Water Work Assoc*. 2001;93:64–77.
  160. Shields JM, Olson BH. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int J Parasitol*. 2003;33(4):371–91.
  161. Elfadaly HA, Hassanain NA, Hassanain MA, Barakat AM, Shaapan RM. Evaluation of primitive ground water supplies as a risk factor for the development of major waterborne zoonosis in Egyptian children living in rural areas. *J Infect Public Health* [Internet]. King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences; 2017;In press. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2017.07.025>
  162. Arroyo-Salgado B, Buelvas-Montes Y, Villalba-Vizcaíno V, Salomón-Arzuza O. Caracterización genética por reacción en cadena de la polimerasa de *Giardia intestinalis*

en muestras de humanos y perros del Caribe colombiano. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(7):424–7.

163. Rodríguez V, Espinosa O, Carranza JC, Duque S, Arevalo A, Clavijo JA, et al. *Giardia duodenalis* genotypes found in the Instituto Colombiano de Bienestar Familiar day care centers and dogs in Ibagué, Colombia. *Biomedica.* 2014;34(2):271–81.