



---

## TRABAJO FIN DE GRADO

Curso académico 2021-2022

---



### IDENTIFICACIÓN DE *Cryptosporidium* spp. Y *Giardia* spp. EN AGUAS NO POTABLES DE ALMERÍA, ESPAÑA

Grado en Biotecnología

Departamento de Biología y Geología

Área de Parasitología

*Autor:*

Francisco Montesinos Expósito

*Directora y Codirector:*

Concepción M<sup>a</sup> Mesa Valle  
José Cebrián Carmona



## RESÚMEN

El agua puede ser un vehículo de agentes patógenos, como virus, bacterias o parásitos. Según la OMS las enfermedades de transmisión hídrica provocan 2.2 millones de muertes al año.

La giardiasis es producida por el protozoo parásito *Giardia* spp y la criptosporidiosis por *Cryptosporidium* spp, ambas parasitosis son consideradas enfermedades de declaración obligatoria y pueden causar numerosos brotes diarréicos en la población de países industrializados tanto por aguas de bebida como recreacionales. Ambos parásitos son zoonóticos, parasitan diferentes hospedadores, pueden permanecer largos periodos de tiempo en el medio ambiente resistiendo condiciones adversas y son resistentes a los tratamientos de agua convencionales, tanto de bebida como residuales. Por todo ello, en la actualidad suponen una amenaza para la salud pública con la consiguiente preocupación de las autoridades sanitarias.

Los métodos recomendados para la identificación de ambos parásitos se basan en los establecidos por la USEPA (*Environmental Protection Agency of US*) pero son muy costosos y requieren de personal especializado.

En el presente trabajo se ha analizado, la presencia de las formas infectivas de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en 7 muestras de aguas no potables de la provincia de Almería, mediante técnicas sencillas de bajo coste.

## ABSTRACT

Water can be a vehicle for pathogens, such as viruses, bacteria, or parasites. According to the WHO, waterborne diseases cause 2.2 million deaths per year.

Giardiasis is caused by the protozoan parasite *Giardia* spp. and cryptosporidiosis by *Cryptosporidium* spp. both parasites are considered notifiable diseases and can cause numerous diarrhoeal outbreaks in the population of industrialised countries through drinking and recreational water. Both parasites are zoonotic, parasitise different hosts, can persist for long periods of time in the environment under adverse conditions and are resistant to conventional water treatments, both drinking and wastewater. Therefore, they currently pose a threat to public health and are of concern to health authorities.

The recommended methods for the identification of both parasites are based on those established by the USEPA (*Environmental Protection Agency of US*) but they are very expensive and require specialised personnel.

In the present study, the presence of infective forms of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in 7 non-drinking water samples from the province of Almería was analysed using simple low-cost techniques.



1.	INTRODUCCIÓN .....	7
1.1.	BACKGROUND .....	7
1.1.1.	Conceptos generales.....	7
1.1.2.	Taxonomía.....	9
	<i>Cryptosporidium</i> spp.....	9
	<i>Giardia</i> spp.....	10
1.2.	CICLO DE VIDA .....	12
1.2.1.	Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	12
1.2.2.	Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> . .....	14
2.	OBJETIVOS .....	15
2.1.	OBJETIVO PRINCIPAL .....	15
2.2.	OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	15
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1.	MATERIALES.....	16
5.1.1.	Muestras de agua.....	16
5.1.2.	Reactivos utilizados para procesos de floculación y sedimentación. ....	17
5.1.3.	Extracción de DNA.....	18
5.1.4.	Cebadores. ....	18
5.1.5.	Control del DNA genómico de los organismos de interés. ....	18
5.1.6.	Tinciones .....	19
5.2.	MÉTODOS. ....	20
5.2.1.	Protocolo de detección de <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Giardia</i> spp. en aguas. ....	20
5.2.1.1.	Concentración de formas infectivas. ....	20
	5.2.1.1.1. Técnicas de floculación, sedimentación y centrifugación. ....	21
5.2.1.2.	Tinción de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	23
5.2.1.3.	Tinción de <i>Giardia</i> spp. ....	24
5.2.1.4.	Extracción de DNA.....	24
5.2.1.5.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). ....	24
5.2.1.6.	Electroforesis. ....	25
5.2.1.7.	PCR a tiempo real o qPCR. ....	26
	5.2.1.7.1. Elaboración de la recta de calibrado. ....	28
5.2.1.8.	Secuenciación de DNA. ....	28
5.2.1.9.	Técnicas bioinformáticas.....	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR. ....	30
6.3.	IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE QUISTES DE <i>GIARDIA</i> SPP. Y OOQUISTES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. ....	32

6.4.	PCR CUANTITATIVA.....	33
6.4.1.	<i>Giardia</i> spp. ....	34
6.4.2.	<i>Cryptosporidium</i> spp. ....	36
7.	CONCLUSIONES .....	38
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	39

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. BACKGROUND

### 1.1.1. Conceptos generales

El agua es un elemento esencial en la naturaleza para sustentar la vida de todos los seres vivos. El ser humano, como ser desarrollado, consume no solo agua para mantener la homeostasis, sino también agua para otros fines, desde la higiene personal hasta el uso culinario, deportivo, agrícola, industrial, etc. En numerosas ocasiones el agua puede actuar como vehículo de agentes patógenos, ya sean virus, bacterias o parásitos. Así la Organización Mundial de la Salud estima más de 829.000 muertes anuales por enfermedades con cuadros diarreicos transmitidas por el agua contaminada (WHO, 2022), las vías de transmisión pueden ser la oral, nasal o incluso la cutánea (Rogelio López - Velez et al., 2008).

*Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. son dos protozoos parásitos responsables de enfermedades gastrointestinales, la giardiasis y la criptosporidiasis, respectivamente. Ambos tienen potencial zoonótico siendo capaces de infectar a numerosos hospedadores entre ellos el hombre (Thompson & Ash, 2019). Los recursos hídricos pueden contaminarse con las heces (humanas o de animales) que contengan las formas de transmisión de estos parásitos.

*Cryptosporidium* spp. fue descrito por primera vez en 1907 (E. E. Tyzzer, 1907), cuando se aisló en la mucosa gástrica de un ratón, no siendo hasta 1955 cuando fue reconocido como causa potencial de diarrea en pavos (SLAVIN, 1955). Posteriormente, este protozoo se identificó en otras especies de animales en las que se pensó que la infección era oportunista e inofensiva, o se demostró que estaba asociada a casos individuales poco frecuentes de enfermedad entérica en terneros, cobayas y humanos.

*Giardia* spp., se describió inicialmente por van Leeuwenhoek en 1681 mientras examinaba sus propias heces diarreicas al microscopio.

Las formas de transmisión de *Giardia* spp. (quistes) y de *Cryptosporidium* spp. (ooquistes) son muy resistentes a los tratamientos tradicionales de desinfección y potabilización de aguas y son capaces de permanecer en el medio ambiente soportando condiciones adversas durante largos periodos de tiempo. Por otra parte, el número de quistes u ooquistes necesarios para inducir la enfermedad es relativamente pequeño y aunque en la población inmunocompetente tanto la criptosporidiosis como la giardiasis suelen transcurrir sin complicaciones, los problemas graves pueden aparecer en las personas inmunodeprimidas (U. Ryan et al., 2021). A todo esto, se suma la escasez de tratamientos eficaces para ambas parasitosis (Dixon, 2020; Sponseller et al., 2014). En las últimas décadas ambos parásitos han provocado brotes diarreicos en la población de países industrializados como USA, UK, Canadá, España o Nueva Zelanda se han visto afectados por brotes diarreicos causados por ambos parásitos (Carter et al., 2020; Lal et al., 2013; Snel et al., 2009; Xiao & Feng, 2017). La causa han sido tanto aguas de bebida como recreacionales (Dong et al., 2020; U. Ryan et al., 2016; U. M. Ryan et al., 2021).

La prevalencia media de *Cryptosporidium* spp. es de aproximadamente un 4.3 % en países desarrollados y de 10.4 % en vías de desarrollo (Dong et al., 2020).

Por otro lado, *Giardia* spp., es uno de los parásitos entéricos con mayor prevalencia a nivel mundial llegando al 33 % en países en desarrollo (Dunn & Juergens, 2021).

En las últimas décadas el interés por estos dos protozoos ha ido en aumento lo que ha llevado a modificar las legislaciones vigentes en diferentes países, entre ellos España. En nuestro país, la antigua reglamentación técnico-sanitaria (RD 1.138/1990) no recogía la necesidad de detectar estos protozoos en las aguas de consumo. Posteriormente, el gobierno de España sacó el RD 140/2003, derogado por el RD 314/2016, de criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano que incluyó modificaciones en las medidas de control de los parámetros microbiológicos ya que los microorganismos que se utilizaban hasta entonces como indicadores de contaminación fecal no eran representativos de las nuevas formas infectantes de los géneros *Giardia* y *Cryptosporidium*. El indicador incluido en los parámetros microbiológicos es *Clostridium perfringens* (incluidas las esporas) ya que muchos investigadores lo consideran un buen indicador de parásitos. Si este indicador da positivo y la turbidez del agua es superior a 5 UNF la autoridad sanitaria determinará si es necesario detectar «*Cryptosporidium*» u otros microorganismos o parásitos. Sin embargo, es muy importante resaltar las dificultades que entraña la identificación de estos parásitos dado que la metodología para su determinación es muy costosa y requiere de personal altamente especializado. La Agencia de Protección Mediambiental Americana (EPA) desarrolló un método, el Método EPA 1623 (USEPA, 2005) para controlar los niveles de estos organismos en el agua potable. Este método requiere de grandes concentraciones de agua, al menos 10 litros. En una primera fase se concentran las muestras, después, se realiza una separación inmunomagnética de las formas infectivas de los parásitos, y finalmente, se realiza una tinción de inmunofluorescencia. La complejidad del método es lo que limita su utilización para la detección de ambos protozoos de forma estandarizada.

Tanto *Giardia* spp. como *Cryptosporidium* spp. son especies zoonóticas (Thompson & Ash, 2016). En *Cryptosporidium* spp. las especies encontradas en el hombre son *C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis* y *C. meleagridis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus* (fig 1). Los más prevalentes en el hombre son *C. hominis* de transmisión prácticamente exclusiva entre humanos, y *C. parvum* que también se transmite entre ganado (Navarro-I-Martinez et al., 2011).

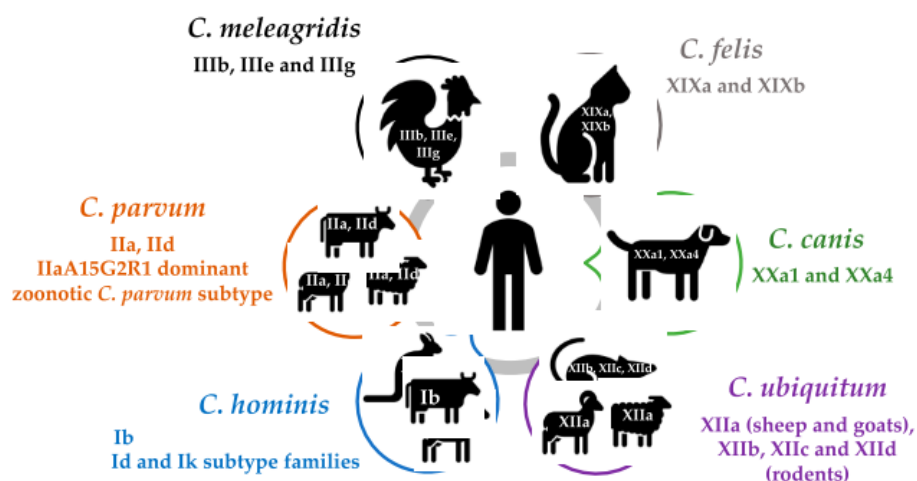


Figura 1. Transmisiones zoonóticas de las seis especies principales de *Cryptosporidium* en humanos. (U. Ryan et al., 2021)



Dentro del género *Giardia*, *G. duodenalis (lamblia)* es el grupo de este género más extendido por su desglose en diferentes “ensambles” o subespecies, entre las cuales destacan algunas que infectan principalmente a humanos. Además, hay dos especies más que se conocen que infectan a mamíferos, como son *G. microti* y *G. muris*. Ambas especies fueron encontradas en pequeños roedores (Helmy et al., 2018).

### 1.1.2. Taxonomía

#### *Cryptosporidium* spp.

El género *Cryptosporidium* es uno de los más de 300 géneros del filo Apicomplexa, clase Sporozoa, suborden Eimerozoa, y familia Cryptosporidiidae (LEVINE, 1984). Recientemente (2014), tras análisis transcriptómicos de un amplio rango de parásitos de este filo se incluyó en la subclase Gregarina en lugar de, como había estado hasta entonces, en los Coccidios (U. Ryan et al., 2016).

Antes de 1971, sólo había tres especies válidas dentro del género: *C. muris* (E. E. Tyzzer, 1907), *C. parvum* (E.E., 1912) y *C. meleagridis* (SLAVIN, 1955). Posteriormente, se identificó una nueva especie, *Cryptosporidium wrairi*, en cobayas, elevando a un total de cuatro especies válidas (J.M. et al., 1971). En los años 80, se pensaba que *C. homini* era una variante de *C. parvum*, y no fue hasta una década después, cuando con técnicas genómicas y proteómicas se observó que *C. hominis* no era una forma de *C. parvum* sino una especie en sí mismo (Xiao et al., 1999). A día de hoy, se conocen que hay al menos 44 especies validadas de *Cryptosporidium* spp. (U. M. Ryan et al., 2021).

La clasificación de *Cryptosporidium* spp. (fig. 2) cambia con frecuencia debido al aumento de los estudios moleculares. Anteriormente, la discriminación de especies en este género se basaba en el hospedador afectado porque se pensaba que el parásito era específico del huésped.

Además, para poder distinguir entre las diferentes especies se estableció un sistema de nomenclatura, este comienza con un número romano y una letra minúscula para cada subtipo del género *Cryptosporidium* (por ejemplo, *C. hominis*, Ia, Ib, etc., *C. parvum* IIa, IIb, etc.).

Hasta el momento, se han descrito un total de 36 especies de *Cryptosporidium* spp. (Khan et al., 2018). Las especies encontradas en el hombre son *C. hominis*, *C. parvum*, *C. felis* y *C. meleagridis*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus*. Los más prevalentes en el hombre son *C. hominis* de transmisión prácticamente exclusiva entre humanos, y *C. parvum* que también se transmite entre ganado (Navarro-I-Martinez et al., 2011).

Varios estudios han demostrado que las especies de este género son genéticamente heterogéneas. Existe heterogeneidad genética y fenotípica para tipos y genotipos morfológicamente similares. Hay evidencia de numerosas especies, géneros y genotipos de parásitos adaptados a huéspedes específicos. Los humanos son los reservorios primarios de *C. hominis* (U. M. Ryan et al., 2021), en los últimos años *C. hominis* se ha registrado además en animales (Krumkamp et al., 2021).

Otras especies que se han reportado en humanos, especialmente en inmunosuprimidos, son: *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis*, *C. canis*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, *C. saurophyllum*, *C. andersoni* y *C. serpentis*. *C. parvum* es la especie más ampliamente difundida y afecta 155 especies de mamíferos, siendo el ganado doméstico el principal reservorio.

Las nuevas técnicas moleculares han permitido evidenciar que la homología entre las secuencias de *C. parvum* y *C. hominis*, es similar a la observada entre los humanos y chimpancés. No sólo el número de cromosomas (8) sino que los dos genomas son aparentemente colineales y cada uno de los cromosomas de los dos parásitos son sinténicos. Se sugiere que las diferencias fenotípicas existentes entre ambos se deben a fuerzas selectivas ejercidas por la interacción parásito-huésped a lo largo de la evolución del parásito (Mazurie et al., 2013).

La aplicación continua de técnicas moleculares para la clasificación y epidemiología de *Cryptosporidium* spp. permitirá la identificación de nuevas especies así como de nuevas subespecies, facilitando la detección de fuentes de contaminación del agua que causan frecuentes brotes de criptosporidiosis (Clin, 2006).

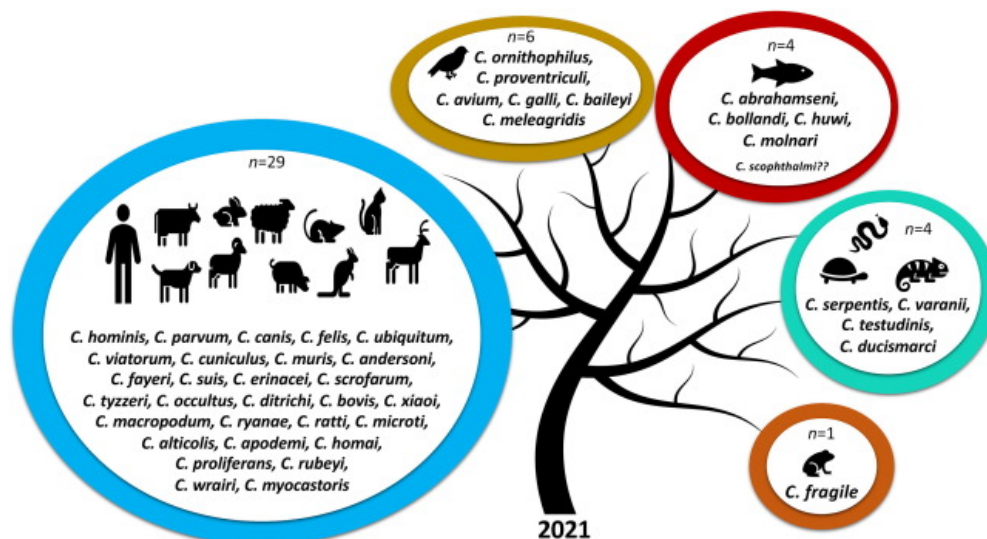


Figura 2 Especies de *Cryptosporidium* spp. reconocidas en 2021 (Ryan et al., 2021).

### *Giardia* spp.

*Giardia* spp. son diplomonádidos flagelados encontrados en una amplia variedad de vertebrados. Pertenecen al subfilo Mastigophora, clase Zoomastigophorea, orden Diplomonadida, familia Hexamitidae que incluye un único género: *Giardia*.

El organismo fue descrito con mayor detalle por Lambl en 1859, quien pensó que *Giardia* pertenecía al género *Cercomonas* y lo denominó *Cercomonas intestinalis*. En 1879, Grassi nombró a este parásito como un organismo que infecta roedores, y que ahora se conoce como una especie de *Giardia*, *Dimorphus muris*, aparentemente sin conocer la descripción anterior de Lambl (Lindsay et al., 1997). El nombre *Giardia* spp. fue establecido en 1882 por un flagelado encontrado en el intestino de renacuajos (Kunstler, 1882). Muchas especies fueron nombradas según su especificidad con el hospedador, incluyendo incluyendo *G. microti* en los topillos, *G. enterica* en los humanos, *G. equi* en los caballos, *G. bovis* en los bovinos, *G. canis* en los perros, *G. cati* y *G. felis* en los gatos, *G. ardeae* en las aves y *G. varani* en los lagartos (U. M. Ryan et al., 2021). Por otra parte, *G. duodenalis* es conocida también como *G. lamblia* y *G. intestinalis*, ya que los expertos no han sido capaces de llegar a un consenso para aceptar un nombre como representante.

La utilización de técnicas moleculares ha permitido establecer diferencias genotípicas entre giardias recogidas de diferentes hospedadores, aunque todas tengan la misma forma morfológica de *G. lamblia*. Los diferentes genotipos obtenidos han permitido establecer agrupaciones que recogen estas diferencias y actualmente se consideran “ensambles” o grupos, reflejando el hecho que esos grupos incluyan una colección con gran diversidad genética de aislamientos que no están restringidos a una localización geográfica particularizada, representan distintas formas de la misma especie (Fonte Galindo, 2010; Gasser, 1990; U. M. Ryan et al., 2021). Actualmente, hay nueve especies validadas del género *Giardia* spp. en varios vertebrados, y ocho genotipos establecidos de *G. lamblia* conocidos como “ensambles” de la A a la H. El ensamble A es comprendido por *G. duodenalis* en sentido estricto, el B, por *G. enterica*; estos dos “ensambles” pueden infectar tanto humanos como animales. Otros “ensambles”, como el C y D, aparecen en perros, por *G. canis*. Los “ensambles” E, F y G, aparecen en rumiantes y cerdos (*G. bovis*), en gatos (*G. cati*), y en ratas y ratones (*G. simondi*), respectivamente. Y por último, el “ensamble” H, en focas (Tabla 1; fig. 3) (U. M. Ryan et al., 2021).

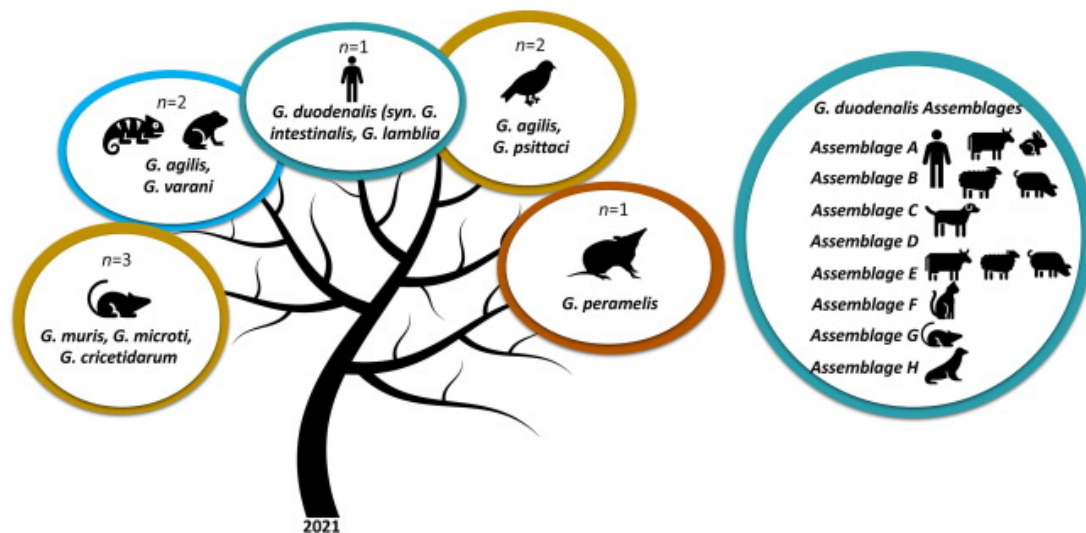


Figura 3. Representación de las especies del género *Giardia* spp. y los ensambles de *Giardia duodenalis* en 2021 (Ryan et al., 2021).

Tabla 1. Especies de *Giardia* spp. que han sido reportadas en humanos.

Nombre de la especie	Hospedador	
<i>G. duodenalis</i>	<b>Ensamble A</b>	<u>Humanos</u> , primates, rumiantes, cerdos, caballos, cánidos, felinos, roedores, marsupiales, otros mamíferos
	<b>Ensamble B</b>	<u>Humanos</u> , primates, rumiantes, cerdos, caballos, conejos, marsupiales, chinchillas y castores
	Ensamble C	Cánidos
	Ensamble D	Cánidos
	<b>Ensamble E</b>	Rumiantes, cerdos
	Ensamble F	Gatos
	Ensamble G	Ratas y ratones
	Ensamble H	Focas

## 1.2. CICLO DE VIDA

### 1.2.1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

Este parásito tiene un ciclo de vida monoxeno, es decir, en un único hospedador, y todas las etapas del desarrollo se dan sobre un único tipo celular, los enterocitos del intestino delgado (fig. 4). El ciclo vital del protozoo tiene lugar intracelularmente en una vacuola extracitoplasmática, situándose en el borde de las microvellosidades intestinales (Guérin & Striepen, 2020).

El ciclo comenzará con los ooquistes esporulados excretados por un hospedador infectado. Tras la ingestión por parte de otro hospedador se produce la exquistación, que consiste en la liberación de los esporozoítos del ooquiste. Este proceso se ve afectado por diversas variables directamente relacionadas con las condiciones del sistema digestivo, tales como la temperatura, las enzimas pancreáticas, las sales biliares, o el dióxido de carbono (Guérin & Striepen, 2020; Lagunas-Rangel et al., 2021).

El esporozoíto tiene un tamaño de 5 x 0.5  $\mu\text{m}$  y están caracterizados por poseer una superficie rugosa y una región apical punteada, así como una región posterior redondeada (Ghazy et al., 2015). Una vez que es liberado, se adhiere a las células epiteliales intestinales las cuales va a parasitar mediante la formación de una vacuola extracitoplasmática (Certad et al., 2017; Zhao et al., 2021) donde se transforma en trofozoíto, estructura con una superficie lisa y con forma de capucha (Ghazy et al., 2015). Los trofozoítos se dividen formando los merontes tipo I que contienen en su interior 6 u 8 merozoítos, caracterizados por ser la forma móvil, a diferencia del meronte. Tras un proceso de maduración, los merozoítos, que tienen forma de vara con una región apical punteada (Ghazy et al., 2015), tienen la capacidad de invadir nuevamente. Sin embargo, aquí pueden seguir dos rutas: o bien, invaden nuevos enterocitos y vuelven a empezar otro ciclo no sexual, o bien, sufren una segunda esquizogonia formándose los merontes tipo II que son los que van a dar lugar a una gametogonia o a la formación de gametos masculinos o microgametos, y gametos femeninos o macrogametos, comenzando así el ciclo sexual del parásito. Los microgametos tienen un único núcleo por lo que son caracterizados por una alta tasa transcripcional, expresando proteínas que son necesarias para la construcción del ooquiste.

Se produce la unión del micro y macrogameto, formando el cigoto que dará lugar a los ooquistes (Doménech, 2003; Guérin & Striepen, 2020; Pumipuntu & Piratae, 2018).

Los ooquistes formados, son estructuras con forma ovalada y una superficie lisa, y cuyo tamaño ronda los 5 x 7  $\mu\text{m}$  (Ghazy et al., 2015). Estos pueden ser de dos tipos: unos con pared delgada (una capa de una matriz lipoproteica asociada a carbohidratos), los cuales reinfectarán el tracto gastrointestinal, característica esencial para el desarrollo de la enfermedad. Y otros, con pared gruesa, que serán excretados al ambiente a través de las heces, y el grosor de este recubrimiento les protegerá ante diferentes agentes como el cloro, hasta que, en condiciones correctas, se produzca la infección de nuevo (Pumipuntu & Piratae, 2018).

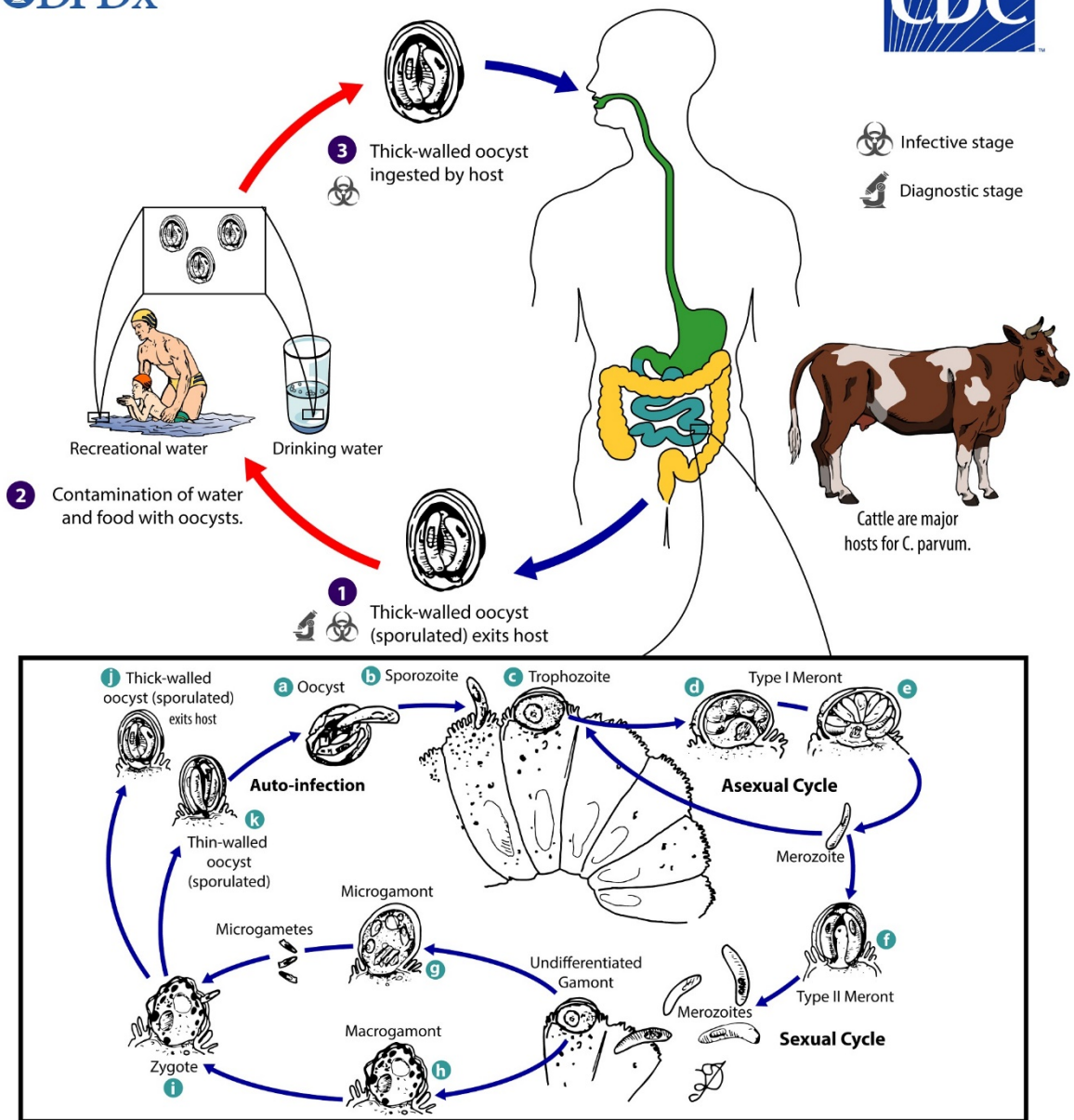


Figura 4. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. (Doménech, 2003)

### 1.2.2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.

*Giardia* spp. tiene un ciclo de vida simple con dos formas principales: la forma vegetativa y la de resistencia, infecciosa.

El ciclo de vida (fig. 5) comienza con la infección de este parásito comienza con la ingestión de los quistes infecciosos. La exquistación de estos se estimula por el medio ácido estomacal y por la presencia de bilis y tripsina en el duodeno (Einarsson et al., 2016; Horlock-Roberts et al., 2017), además se puede dar por otros factores como privación de colesterol, inanición o ajuste de pH (Midlej et al., 2019).

Tras esto, el parásito emergente o exozoíto sale del quiste y se transforma rápidamente en un trofozoíto; esta forma tiene dos núcleos posicionados anteriormente y son transcripcionalmente activos, además, el citoesqueleto implica el disco adhesivo, un cuerpo medio y cuatro pares de flagelos que se comportan de manera diferente durante la motilidad del organismo.

Este trofozoíto, empieza a dividirse en dos, que, a su vez, por fisión binaria longitudinal, son capaces de dividirse otra vez para producir 4 trofozoítos. Estos, colonizan las células del epitelio intestinal para establecer la infección; permanecerán en el lumen del intestino delgado proximal, pudiendo estar libres o adheridos a la mucosa por el disco de succión ventral (Einarsson et al., 2016; Rojas-López et al., 2022).

En el colon, debido a las condiciones químicas, se inicia la nueva enquistación para aumentar su resistencia y de tal modo, soportar estas arduas condiciones. Una vez formado el quiste, es excretado al ambiente por las heces, e incluso pueden sobrevivir durante varias semanas bajo condiciones adversas. De tal modo, se utilizará el quiste como estructura de resistencia para supervivencia, así como para una mayor transmisibilidad de la infección a un nuevo hospedador (Rojas-lópez, 2022).

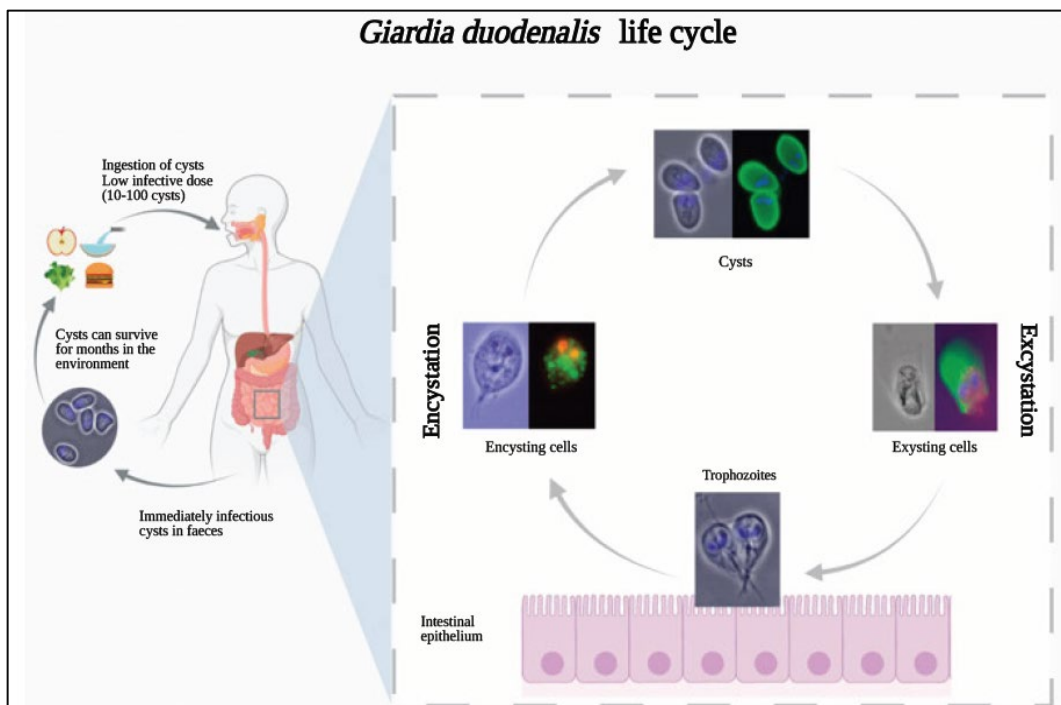


Figure 5. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (Rojas-López et al., 2022)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Poner de manifiesto la presencia de los protozoos intestinales *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en diferentes muestras de aguas no potables en la provincia de Almería.

### 2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Para conseguir este objetivo se han establecido 4 objetivos secundarios:

1. Conocer el ciclo de vida y la taxonomía de *Cryptosporidium* y *Giardia*
2. Identificar, mediante técnicas moleculares, la presencia de oosquistes de *Cryptosporidium* spp y quistes de *Giardia* spp en las muestras analizadas
3. Cuantificar, con una curva de calibrado estándar, la cantidad de DNA de los parásitos en las muestras analizadas.
4. Identificar, mediante microscopía óptica, oosquistes de *Cryptosporidium* spp y quistes de *Giardia* spp en las muestras analizadas



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. MATERIALES

#### 5.1.1. Muestras de agua

Para la elaboración del experimento se analizaron 7 muestras de agua de diferentes puntos (fig. 6, fig. 7):

1. Fuente de Almería (zona Lavadero de Padules).
2. Estanque de la entrada Sur al Campus de la UAL.
3. Estanque de la UAL, frente a la Escuela Superior de Ingeniería (ESI).
4. Bahía marítima portuaria (desembocadura de rambla).
5. Desembocadura del Río Andarax.
6. Desembocadura rambla de Costacabana, Almería. En este lugar se tomaron dos muestras con distintos fecha y tipos de lluvia, ya que la primera muestra fue tomada en febrero, 3 días después de un día de lluvia suave. Y la segunda, se realizó en abril y al día siguiente de haber ocurrido una lluvia torrencial.

El volumen recogido para cada una de las muestras fue de 20 litros de agua, en cubos de plástico limpios y esterilizados durante 30 minutos en cámara con UV. Las muestras se procesaron entre 24 y 48 horas después de ser recogidas.

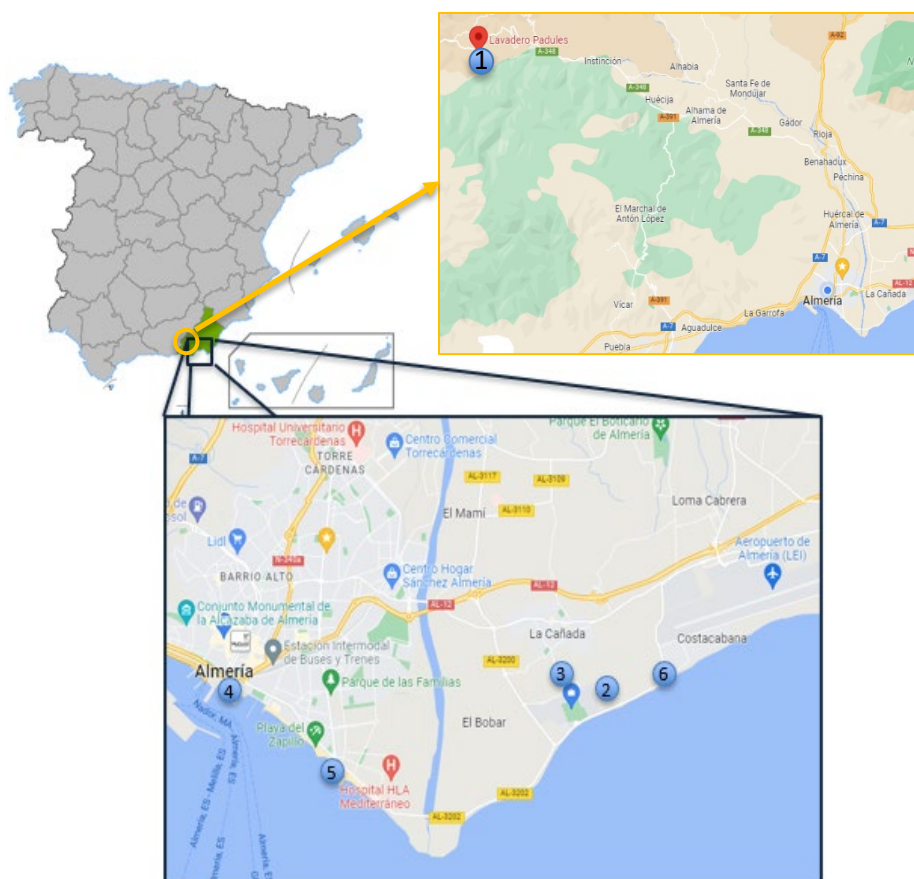


Figura 6. Mapa de las diferentes localizaciones de donde se tomaron las muestras analizadas.



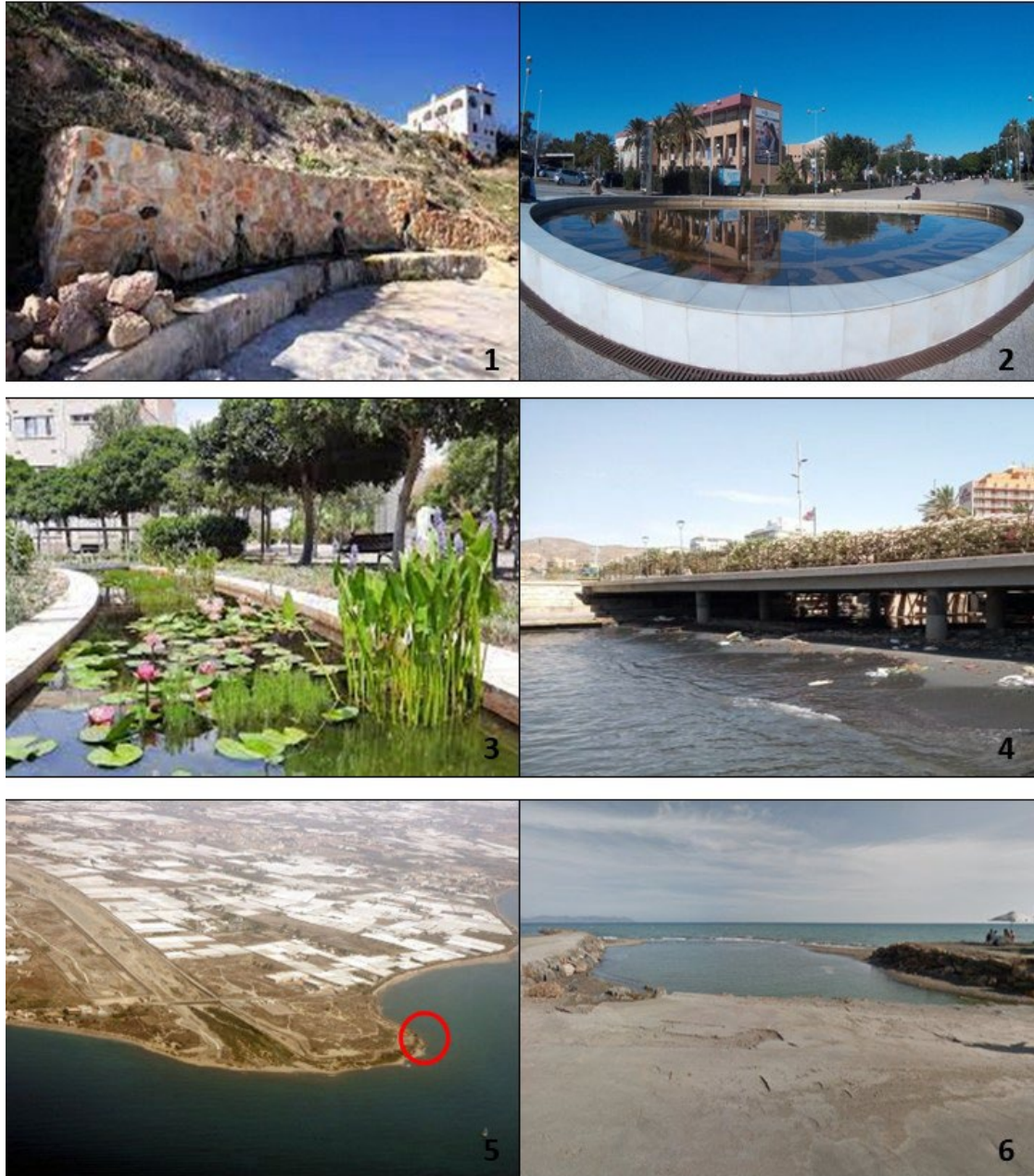


Figura 7. Composición de las diferentes localizaciones de donde se tomaron las muestras analizadas.

#### 5.1.2. Reactivos utilizados para procesos de floculación y sedimentación.

Para estos procesos fisicoquímicos se necesitaron:

- Cloruro de calcio 1M.
- Bicarbonato de sodio 1M.
- Hidróxido de sodio o sosa 2M.

### 5.1.3. Extracción de DNA.

Se utilizará un kit de extracción de DNA para purificación de RNA/DNA en aguas, de la marca NORGEN BIOTEK CORP.

Este es un kit en el cual se utilizan unos tubos con unas bolitas de vidrio para fragmentar el material de partida, para ayudar a la fragmentación se utiliza una solución buffer de lisis E, asimismo se incluyen tubos de recolección que fueron los que recogieron los compuestos que pasaron por las columnas para centrifuga, las cuales estaban compuestas por una red de carburo de silicio para permitir una mejor purificación. Este kit incluye también las soluciones de lavado de la membrana (o solución A), así como el buffer de elución H; y por último, se incluyeron los tubos de 1.5 ml, para conservar la dilución con el material genético final.

### 5.1.4. Cebadores.

La detección de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua se llevó a cabo con técnicas moleculares como la PCR, por lo tanto, se usaron los siguientes cebadores proporcionados por la empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*) aportados en la Tabla 2:

Tabla 2. Oligonucleótidos cebadores degenerados utilizados para la amplificación e identificación de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp.

Organismo	Gen amplificado	Cebador	Secuencia del cebador (5'→3')	Referencia
<i>Giardia</i>	Glutamato deshidrogenasa (432 pb)	GDHe-F	TCAACGYAAYCGYGGYTTCCGT	(Read et al., 2004)
		GDHi-F	CAGTACACCTCYGCTCTCGG	
		GDHi-R	GTTRTCCTTGACATCTCC	
	β-giardina (753 pb)	BG7-F	AAGCCCGACGACCTCACCCGAGT GC	(Cacciò et al., 2002)
BG759-R		GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGAC GAC		
<i>Cryptosporidium</i>	ARNr ssu (587 pb)	CR-P1	AGGGAGGTAGTGACAAGAA	(Tiangtip & Jongwutiwes, 2002)
		CR-P2	TCAGCCTTGCGACCATACTC	
		CR-P3	ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG	
		CPB-DIAGR	TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG	

“Y” representa el nucleótido T o C, y “R”, G o A. En “gen amplificado” se describe el tamaño de los amplicones de cada uno de los genes.

### 5.1.5. Control del DNA genómico de los organismos de interés.

Para establecer un control positivo en el experimento, se utilizó material genético purificado de los dos protozoos de estudio. Para ello se utilizaron los siguientes:

- Para *Cryptosporidium* spp., el Kit AMPLIRUN® CRYPTOSPODIDIUM PARVUM DNA CONTROL, el cual tiene un vial de DNA liofilizado que al reconstituir se obtiene una concentración de 700 a 2000 copias por microlitro.
- Para *Giardia* spp., el Kit AMPLIRUN® GIARDIA INTESTINALIS DNA CONTROL, el cual tiene 1 vial de DNA liofilizado con una concentración de 10.000 a 20.000 copias por microlitro.

La reconstitución de los liofilizados se llevó a cabo utilizando agua libre de DNAsas y RNAsas.

#### 5.1.6. Tinciones

Una vez identificado el DNA de ambos parásitos se puso de manifiesto la presencia de sus formas infectivas mediante microscopía óptica empleando las técnicas de tinción específicas para cada uno.

Para la visualización de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se empleó la tinción de Ziehl-Neelsen que emplea los colorantes azul de metileno y fucsina fenicada.

Para la observación de los quistes de *Giardia* spp. se utilizó la tinción con lugol.

## 5.2. MÉTODOS.

En primer lugar, las muestras de agua se sometieron a un proceso de floculación y sedimentación, seguido de centrifugación con objeto de concentrar los quistes y oocistos que puedan estar presentes. Esta metodología representa una alternativa efectiva a la recomendada por la Agencia Americana de Protección Ambiental (USEPA, 2005), con un equipamiento básico y de bajo coste (Efstratiou et al., 2017; Vesey et al., 1993).

Posteriormente mediante técnicas moleculares se analizó la presencia de las formas infectivas de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Para ello se realizó una extracción del DNA y, tras el diseño de los correspondientes cebadores, mediante PCR se puso de manifiesto la presencia de ambos parásitos en todas las muestras analizadas (fig. 8).

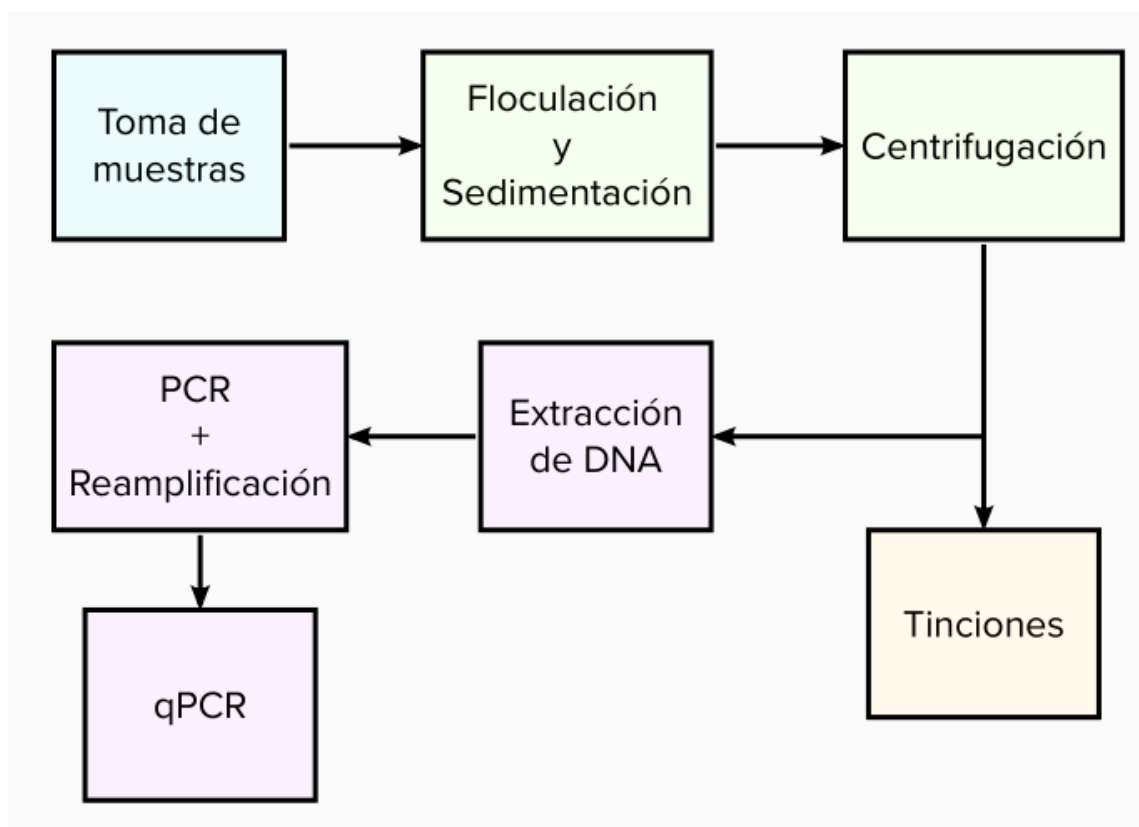


Figura 8. Diagrama de flujo de la metodología del experimento.

### 5.2.1. Protocolo de detección de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en aguas.

#### 5.2.1.1. Concentración de formas infectivas.

Vesey et al. (1993), propusieron una técnica de concentración de oocistos de *Cryptosporidium* spp., válida también para los quistes de *Giardia* spp., dicha técnica consiste en 3 pasos: floculación, sedimentación y centrifugación. Así se obtiene un pellet con el concentrado de quistes (*Giardia*) y oocistos (*Cryptosporidium*). Esta técnica se basa en la diferencia del peso relativo de las formas infectivas de los parásitos y el peso relativo de las impurezas presentes en el agua.

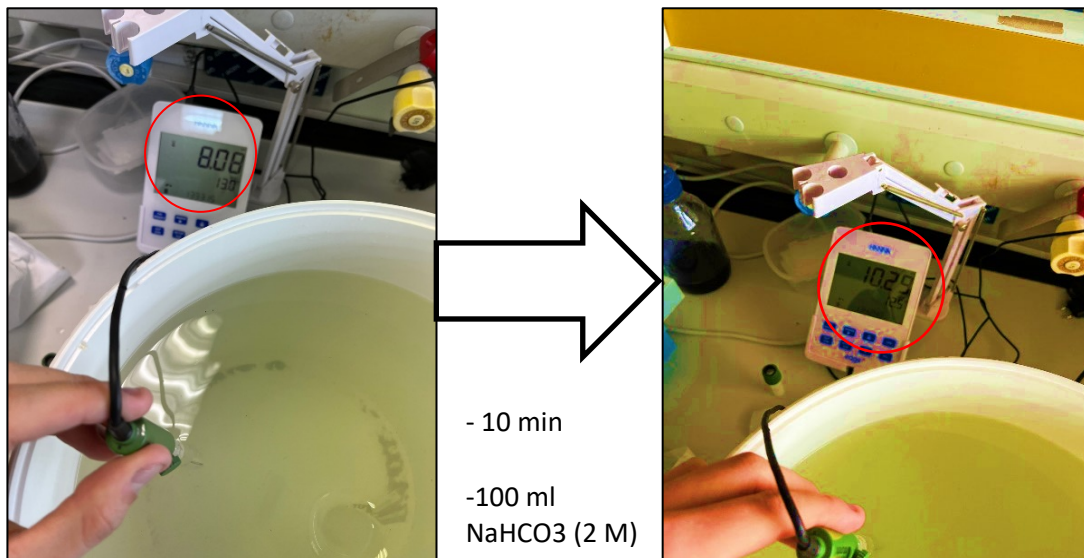
5.2.1.1.1. Técnicas de floculación, sedimentación y centrifugación.

- Floculación:

Se añaden 100 ml de cloruro de calcio 1 M y otros 100 de bicarbonato de sodio 1 M y se agita a alta velocidad con un agitador magnético durante 10 - 15 minutos (fig. 9).



*Figura 9. Floculación y sedimentación con cloruro cálcico y bicarbonato sódico.*



*Figura 10. Medición de pH antes y después de adicionar hidróxido de sodio 2 M.*



- Sedimentación:

Una vez se ha homogeneizado la muestra tras añadir los compuestos para el proceso de floculación se procede a medir el pH y lo ajustamos a 10 añadiendo hidróxido sódico 2 M (fig. 10). Finalmente se deja sedimentar durante 24 horas a temperatura ambiente. El tiempo de sedimentación no debe superar las 24 horas para evitar la resuspensión de los quistes y ooquistes (Alarcón et al. 2005).

- Centrifugado:

Transcurrido el tiempo de sedimentación se retiran unos 19 l de sobrenadante con ayuda de una bomba peristáltica. Es muy importante destacar que la bomba ha de ser puesta a 30-50 rpm para que no se formen turbulencias que haga que se desprenda el sedimento depositado en el fondo del (fig. 11)



*Figura 11. Extracción de sobrenadante para reducir el volumen a trabajar a 1L.*

El volumen de muestra restante (aproximadamente un litro) se reparte en tubos de centrifuga de 50 ml de fondo cónico y se centrifugan a 3000 g durante 10 minutos. En cada ciclo de centrifugación se elimina la mitad del volumen inicial y se ajusta el pH a 7,4 con PBS. Se repite el proceso de centrifugación hasta reducir a un volumen final de 50ml (fig. 12).

Es muy importante que el frenado de la centrifuga sea lento para evitar la resuspensión de los quistes y ooquistes.

Debido a que los (oo)quistes pueden quedar adheridos a las paredes del cubo en el que se realizó el proceso de sedimentación, se hace un lavado de estos utilizando 200 ml de Tween 80 al 1% y 200 ml de PBS. El producto obtenido en este paso se somete al mismo proceso de centrifugación y ajuste de pH descrito anteriormente.

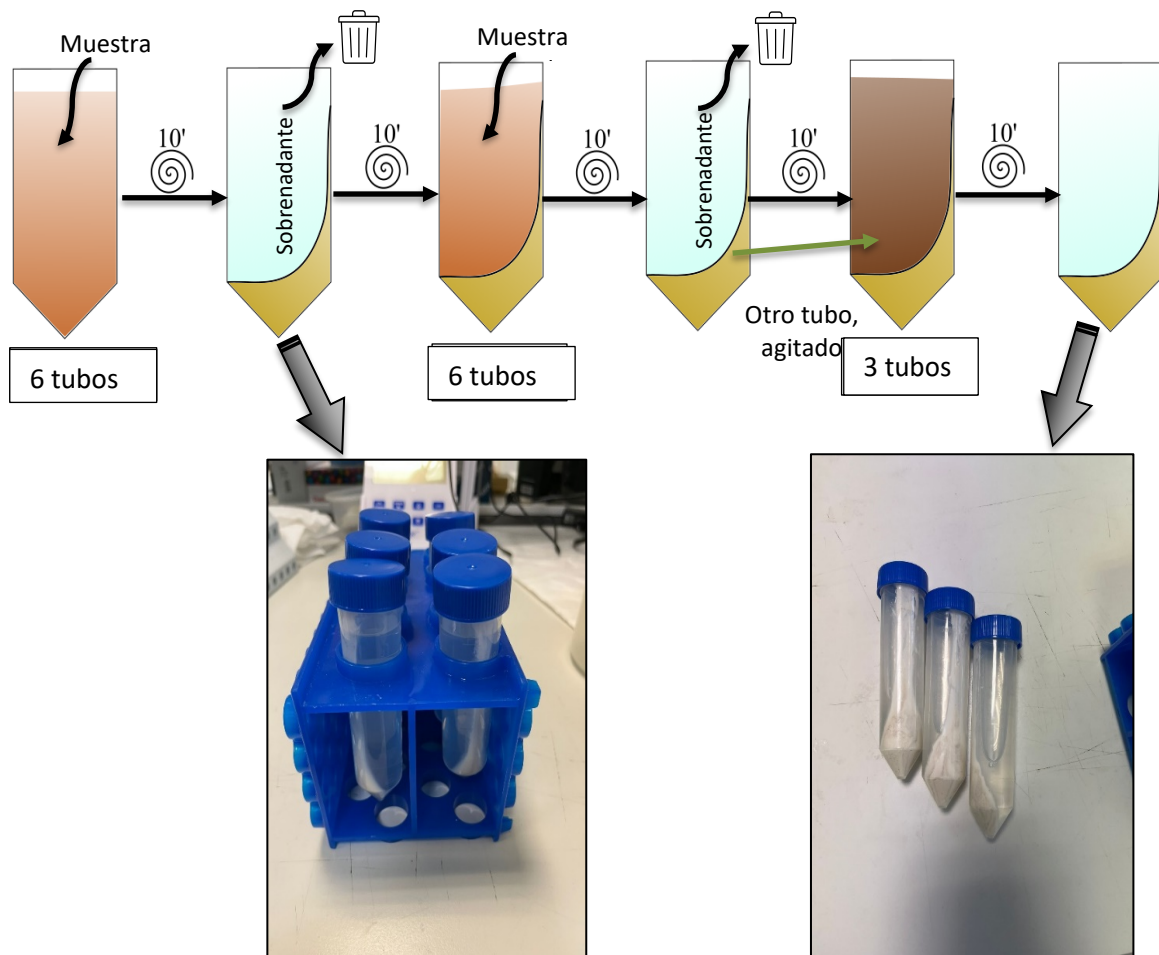


Figura 12. Diagrama del proceso de centrifugación para acumulación y concentración de los parásitos.

#### 5.2.1.2. Tinción de *Cryptosporidium* spp.

Para la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se utilizó una tinción Ziehl-Neelsen modificada (AECID, 2012). Este método de tinción es útil para la visualización de quistes de protozoos intestinales con capacidad ácido-alcohol resistencia (AAR).

Primeramente, se realizó un frotis o extensión de la muestra concentrada sobre un portaobjetos, creando una fina capa. Una vez se extendió la muestra y habiendo sido secada a temperatura ambiente, se pasó por la llama de un mechero 2-3 veces para fijar la muestra.

Posteriormente, se adiciona fucsina fenicada a la muestra, hasta cubrir todo el portaobjetos, y se deja 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se lava con agua para eliminar el sobrante. Para el siguiente paso, se necesita el compuesto alcohol-ácido, en este caso, Alcohol – Clorhídrico 8:2, para decolorar la muestra, esto se aplicó durante 20-30 segundos para no decolorar en exceso o afectar a la muestra; al ser los ooquistes AAR, no se decoloraron con este compuesto y permanecieron teñidos con la fucsina fenicada.

Se ha de repetir el lavado con agua para la eliminación del exceso del alcohol-ácido, para la posterior adición de azul de metileno durante 30 segundos. Se vuelve a lavar y se deja secar la preparación.

Una vez realizada la tinción se podrá observar en el microscopio con el objetivo de x40.

#### 5.2.1.3. Tinción de *Giardia* spp.

Para la detección de quistes de *Giardia* spp. se utilizó una tinción con lugol.

#### 5.2.1.4. Extracción de DNA.

La extracción del DNA se llevó a cabo con el Kit de la empresa NORGEN BIOTEK CORPORATION (#26480), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se llevaron a cabo 2 extracciones con el material centrifugado a los cuales se le adicionó 500 µl de buffer de lisis E, homogeneizando 30 segundos en el vórtex.

Se incubaron durante 10 minutos a 65 °C, durante este tiempo es necesario mezclar unas 3 veces los tubos volteándolos. Tras esto, se centrifugaron durante 1 minuto a 14000 RPM. Con este proceso, se habrán conseguido romper las formas de resistencia.

A continuación, el volumen de sobrenadante se pasó a un tubo de 1.5 ml, adicionando el mismo volumen de etanol al 70 % y se usa el vórtex para mezclar. A esto le siguió una fase en la que el DNA se une a las columnas que han de ser colocadas en tubos de recolección, y se a las cuales se les adicionó 600 µl del volumen del lisado con etanol a la columna; se centrifugó 1 minuto a 14000 RPM. Se desechó el líquido que había pasado al tubo de recolección y se lava la columna añadiendo solución de lavado A (500 µl) y centrifugando otro minuto; este paso fue repetido otra vez más. Y para secar la resina, se volvió a centrifugar, pero esta vez sin añadir nada. Se quitó el tubo de recolección y se situó la columna en un tubo de 1.5 ml, se añadieron 50 µl de buffer de elución para que los ácidos nucleicos que hayan sido adheridos a la membrana de la columna se desprendan.

Por lo tanto, tras centrifugar durante un minuto a 14.000 RPM, se conservó el tubo de 1.5 ml. El DNA extraído se puede conservar a -20 °C, si se va a utilizar en breve, o a -70 si se quiere conservar a medio o largo plazo.

#### 5.2.1.5. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Para realizar la reacción de amplificación del DNA, con objeto de la detección de los protozoos de interés se empleó el siguiente kit: Kit Terra™ PCR Direct FFPE. Asimismo, este kit se utilizó para la amplificación del DNA genómico control.

El volumen total de la reacción es 25 µl, divisibles en:

- 2 µl de DNA molde.
- 12.5 µl de x2 Termobuffer (+ dNTPs).
- 0.5 µl de Taq polimerasa Terra PCR Direct (1.25 U / µl).
- 3.75 µl de primer forward (concentración de 2 µM).
- 3.75 µl de primer reverse (concentración de 2 µM).
- 2.5 µl de agua.



La reacción de reamplificación o PCR anidada de las muestras consiste en utilizar 2 parejas de cebadores dirigidos contra la misma diana. En ella primero se amplifica con los cebadores más externos, y los productos de esta primera amplificación se utilizan para ser amplificados, con los cebadores más internos, en una reamplificación. Así se consigue aumentar la sensibilidad de la técnica.

Ambas PCRs, primera amplificación y reamplificación, se realizaron usando un termociclador 3 Prime TECHNE con el programa de amplificación que se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de PCR para Kit Terra™ PCR Direct FFPE.

Etapa	Nº ciclos	Temperatura, °C	Tiempo, s
Desnaturalización inicial	1	98	120
Desnaturalización	35	98	10
Hibridación		50	15
Extensión		68	60
Extensión final	1	68	300

Para *Cryptosporidium* spp., se utilizaron los cebadores cuya secuencia amplifica el gen *rRNA ssu* (CR-P1 – CR-P3, CPB-DIAGR), este gen codifica para la subunidad pequeña del ribosoma (de ahí el acrónimo *ssu*, *small subunit*). Se obtuvieron fragmentos o amplicones de 587 pb. Además, como control positivo de esta reacción se utilizó un DNA comercial, puro, que contiene el genoma completo de *Cryptosporidium parvum*.

Por otro lado, para *Giardia* spp. los cebadores utilizados fueron aquellos cuya secuencia amplifica los genes Glutamato deshidrogenasa (GDHe-F, GDHi-F, GDHi-R) y  $\beta$ -giardina (BG7-F, BG759-R), obteniendo amplicones con un tamaño de 432 pb y 753 pb, respectivamente. El control positivo utilizado fue DNA comercial, con el genoma de *Giardia intestinalis*.

La elección de los genes para ambos parásitos se debió a que se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero que contienen, además, variaciones que se concentran en zonas específicas.

#### 5.2.1.6. Electroforesis.

Para separar y visualizar los productos de amplificación de la PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X; el TAE es una disolución tampón que lleva Tris 40 mM (para regular el pH), acetato glaciar 19.8 mM (regula el pH y lo mantiene) y EDTA 1 mM (quelante de  $Mg^{2+}$ ).

Una vez obtenido el gel, se colocó en la cubeta, rebosante de TAE 1X. A continuación, se cargan en cada pocillo del gel 12  $\mu$ l: 5  $\mu$ l de buffer TE, 2  $\mu$ l del tampón de carga (TC). Este buffer contiene dos colorantes diferentes (azul de bromofenol) para el seguimiento visual de la migración del DNA durante la electroforesis. La presencia de glicerol garantiza que el DNA del estándar y de la muestra forme una capa en el fondo del pocillo. El EDTA incluido en la solución enlaza los iones metálicos divalentes e inhibe las nucleasas dependientes de metales; se encuentra a una concentración del 6X. En los 5  $\mu$ l restantes, se ha de adicionar la muestra de DNA. Aunque dependiendo de si se realiza la electroforesis de una amplificación o de un reamplificación, habrá que adicionar un volumen de DNA + TE de 2 + 8  $\mu$ l, o de 1 + 9  $\mu$ l, respectivamente.

A continuación, se utilizó el primer pocillo para poner 5  $\mu$ l del marcador Dye Plus de 500 pB que facilita la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados. El último pocillo fue usado como control positivo de la reacción, conteniendo el producto de amplificación del DNA genómico del organismo de interés. Una vez cargados todos los compuestos, se le aplica 100 voltios durante 20 minutos aproximadamente (lo suficiente para que haya migrado todo el DNA). Para visualizar los productos de la amplificación, el gel se sumergió en una disolución de bromuro de etidio, con una concentración de 10 mg / ml, protegido de la luz, durante 15 minutos (en oscuridad). Posteriormente, se observaron las diferentes bandas con un transiluminador combinado con un dispositivo de captación y procesado de imágenes (*G:Box Syngene*).

#### 5.2.1.7. PCR a tiempo real o qPCR.

Para la realización de una recta de calibrado que permitiera hacer un análisis semicuantitativo del material genético de los parásitos presente en las diferentes muestras se hizo una PCR a tiempo real (qPCR). A diferencia de la PCR convencional, donde los amplicones son detectados en un análisis en la etapa final de la reacción, en la qPCR la acumulación del producto de amplificación es medida a lo largo del progreso de la reacción, con una cuantificación del producto tras cada ciclo. Esta PCR se encarga de medir el valor Ct, que es el número de ciclo de PCR en el que la curva de reacción de su muestra se cruza con la línea de umbral (fig. 13).

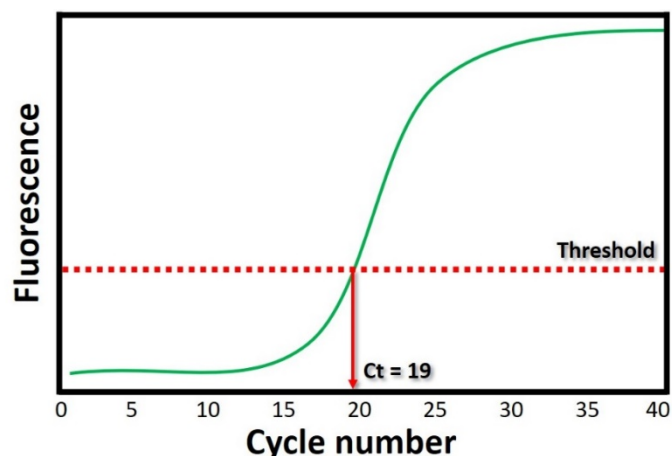


Figura 13. Gráfico explicativo de una qPCR en el que se representa la fluorescencia respecto al número de ciclos.

Los valores Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico presente en cada muestra, y se correlacionan con el número de copias resultantes (ThermoFisher, 2000).

Para la qPCR se usó el kit *SensyFastSYBRGreen*; y como cebadores se utilizaron los cebadores que amplifican la secuencia del gen *gdh*. El equipo en el que se realizó la reacción de qPCR se llama *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System*, de BioRad®.

Para realizar este método se utilizó el siguiente programa de PCR (Tabla 4):

Tabla 4. Programa de qPCR con el kit *SensyFastSYBRGreen*.

Etapa	Nº ciclos	Temperatura, °C	Tiempo, s
Desnaturalización inicial	1	94	300
Desnaturalización	35	95	30
Hibridación		55	60
Extensión		72	60
Extensión final	1	72	420
Mantenimiento	-	4	-

En la fase de mantenimiento, se conservará el DNA amplificado en el termociclador a corto plazo.

Para *Giardia* spp., se encontraron una pareja de cebadores, GDHe-F y GDHi-R, que tras secuenciar sus productos de amplificación tenían una homología total la región central del gen *gdh*.

Tabla 5. Programa de qPCR con el kit *SensyFastSYBRGreen* para *Cryptosporidium* spp.

Etapa	Nº ciclos	Temperatura, °C	Tiempo, s
Desnaturalización inicial	1	94	300
Desnaturalización	35	94	45
Hibridación		50	45
Extensión		72	60
Extensión final	1	72	600
Mantenimiento	-	4	-

Por otro lado, se intentaron encontrar una pareja de cebadores para el otro parásito, entonces, se hizo una qPCR para *Cryptosporidium* spp. utilizando los cebadores CR-P1, CR-P2, CR-P3 y CPB-DIAGR para el gen del *rRNA*; AL3531, AL3532, AL3533, AL3535 para el gen *gp60*. Utilizando el kit *SensyFastSYBRGreen*, con el siguiente programa (Tabla 5).

#### 5.2.1.7.1. Elaboración de la recta de calibrado.

Para realizar la recta patrón del protozoo ha de utilizarse el control del material genético de este (3.1.5), con el cual, se realizarán diluciones decimales.

Posteriormente, con las diluciones realizadas, se realizó el logaritmo en base 10 de los valores de las diluciones, y estos valores se representaron en el eje x de la posterior gráfica. Asimismo, en el eje y se pusieron los valores de Ct.

En la Tabla 6 se puede observar las diferentes diluciones, y de esta se obtuvo la representación de la recta patrón o de calibrado.

En la primera columna se anotaron el número de copias de DNA genómico del parásito; por ejemplo, un valor de 10.000 significa que hay 10.000 unidades del genoma. Por eso, cuanto menos DNA hay, mayor es la Ct.

Las medidas se hicieron por duplicado, y en la gráfica se anotó el valor medio de los Ct obtenidos por ambas réplicas.

#### - Recta patrón *Giardia lamblia*.

Tabla 6. Valores de Ct frente al número de copias de *Giardia lamblia* en la muestra.

Número de copias	LOG10	Media Ct
10.000	4	23,2595
1.000	3	25,2865
100	2	28,793
10	1	32,362

#### 5.2.1.8. Secuenciación de DNA.

Las muestras amplificadas por PCR fueron purificadas y secuenciadas. El método utilizado para dicha reacción corresponde al método de Sanger, también denominado método didesoxi o de terminación de cadena. Se utilizó un kit para establecer el procedimiento (kit comercial *Byg Dye® Terminator v3.1*

(*Applied Biosystems*), empleándose de 20 a 25 ng de los productos de PCR de las diferentes muestras para las reacciones de secuenciación.

#### 5.2.1.9. Técnicas bioinformáticas.

Tras realizar la secuenciación se observaron los resultados mediante la utilización de un programa de análisis de secuencias llamado *Chromas Lite version 2.6.6*. Se ensamblan todas las secuencias para obtener una sola, y, tras extraer la secuencia en formato FASTA, se utilizó la herramienta digital de alineamientos locales BLAST, la cual se encuentra dentro de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Con esta herramienta se consigue asegurar que la secuencia problema, corresponde con los protozoos parásitos o no, y cuánto porcentaje de similitud u homología hay con cada especie.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta el año 2000, las técnicas utilizadas para la detección de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. eran básicamente microscópicas, mediante tinción. Posteriormente, las técnicas moleculares han permitido poner de manifiesto su presencia tanto en muestras procedentes de animales y humanos como en muestras ambientales. Son numerosos los trabajos realizados en este sentido, y diferentes autores han demostrado la presencia de ambos parásitos en aguas de distinta procedencia (U. Ryan et al., 2021; Sánchez et al., 2018; Thompson & Ash, 2016).

En este trabajo, se han analizado 7 muestras de aguas no potables de diferentes puntos geográficos de la provincia de Almería, con objeto de demostrar la presencia de dos protozoos parásitos intestinales ampliamente extendidos a nivel mundial: *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Estos pueden suponer una amenaza para la salud pública y sería necesario tomar medidas debido a los numerosos brotes ocurridos tanto por ingestión de aguas potables como por aguas de recreo (Thompson & Ash, 2019)(Thompson & Ash, 2019).

### 6.1. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.

- 6.2. El primer paso fue concentrar las muestras, ya que para poder identificarlos es necesario que su concentración sea alta. Para ello se sometieron las muestras a un proceso de floculación, sedimentación y centrifugación.

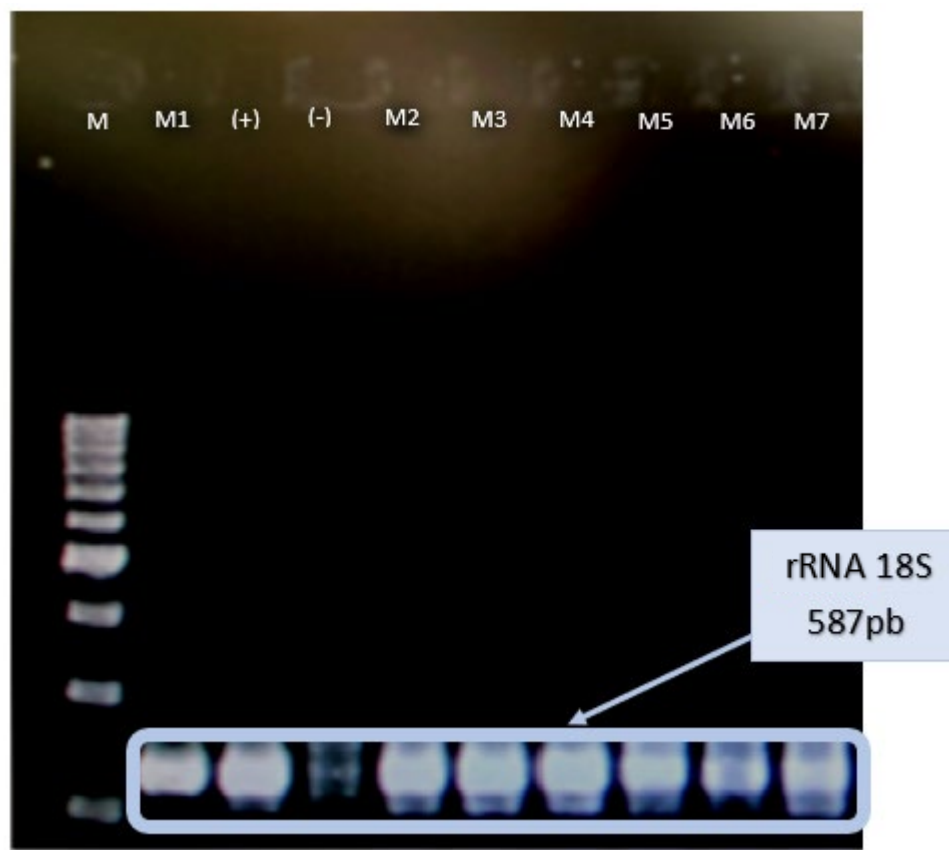


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Con un tamaño de banda de 587 pb, aparece la banda correspondiente al gen rRNA 18S de *Cryptosporidium* spp.

A los pellets obtenidos se les extrajo el DNA, y se realizó una amplificación mediante PCR anidada utilizando los cebadores diseñados previamente. Para *Cryptosporidium* spp. se utilizaron los cebadores CR-P1 – CR-P3 y CPB-DIAGR, que amplifican el gen *rRNA ssu* que codifica la subunidad pequeña del ribosoma (de ahí el acrónimo *ssu*, *small subunit*). Para *Giardia* spp. se utilizaron los cebadores que amplifican los genes Glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y  $\beta$ -giardina (*bg*). Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa.

En todos los casos se observó la banda del tamaño esperado. Se distingue una banda 587 pb correspondiente a *Cryptosporidium* spp (fig. 14). Y en el caso de *Giardia* spp. se pudo observar una banda de 432 pb, correspondiente a una región interna del gen *gdh* y otra banda de 753 correspondiente al gen *bg*.

Para confirmar nuestros resultados procedimos a secuenciar los 3 amplicones. Con las secuencias obtenidas reconstruimos la región central de cada uno de los genes, y la enfrentamos a las bases de datos de secuencias de DNA. La coincidencia fue del 100% en todos los casos.

Los resultados obtenidos han mostrado la presencia tanto de *Giardia* spp. como de *Cryptosporidium* spp. en todas las muestras analizadas. La presencia de las formas infectivas de ambos protozoos en el agua implica contaminación fecal de origen animal o humano dado el carácter zoonótico de ambos. Tanto animales domésticos como silvestres pueden actuar como reservorios pudiendo causar brotes y estableciéndose ciclos naturales entre animales silvestres y domésticos, y entre estos y humanos. Cabe destacar también la importancia de las mascotas en la epidemiología humana de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Por tanto, la presencia de material genético de ambos parásitos en nuestras muestras nos hace pensar en contaminación fecal probablemente de origen animal, aunque no se puede descartar el origen humano y dependerá según la muestra analizada.

En el caso de las fuentes de la UAL, donde tienen acceso animales merodeadores como jabalíes o gatos callejeros, pueden ser estos el origen y que se esté manteniendo un ciclo enzoótico de ambos parásitos. El resto de las muestras, a excepción de la muestra 1 procedente de la sierra de Padules, se trata de aguas que han discurrido al aire libre arrastrando materia orgánica de distinta naturaleza.

Sin embargo, a pesar de que estas aguas no son de consumo humano no podemos obviar que los quistes de *Giardia* spp. y los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. pueden suponer un riesgo para la fauna marina que es donde van a parar todas estas aguas. No debemos olvidar que la presencia de quistes u ooquistes en aguas de río o marina favorece su acumulación en los animales filtradores como mejillones, ostras u almejas, con el consiguiente riesgo de transmisión alimenticia ya que el riesgo no es únicamente tomarlos crudos, sino que al parecer no se inactivan con los habituales métodos de cocción al vapor (Navarro-I-Martinez et al., 2011).

La contaminación de mejillones con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se ha reportado en países europeos (Gomez-Bautista et al., 2000; Gómez-Couso et al., 2003, 2004; Li et al., 2006; Lowery et al., 2001; MacRae et al., 2005), Estados Unidos (T. K. Graczyk et al., 1999; Miller et al., 2005), y Canadá (Thaddeus K. Graczyk et al., 2001). Las zonas de captura de moluscos pueden contaminarse con los ooquistes y los seres humanos corren el riesgo de infectarse, ya sea por el consumo de mariscos, o por participar en actividades recreativas en estas zonas.

Otros estudios han mostrado la presencia de subtipos zoonóticos de *Cryptosporidium* spp. en muestras de pescado (Certad et al., 2015; Couso-Pérez et al., 2018; Koinari et al., 2013; Reid et al., 2010). La presencia de estos parásitos en el pescado comestible pueden ser el agente etiológico responsable de brotes de criptosporidiosis transmitida por el pescado.

Por otra parte, *Cryptosporidium* spp. no sólo representa una amenaza para la salud pública como responsable de brotes diarreicos en la población sino que también puede provocar pérdidas económicas importantes en la industria de la acuicultura debido al impacto de la criptosporidiosis en los peces en cultivo (Golomazou & Karanis, 2020). La presencia de *Cryptosporidium* spp. en el medio acuático va en aumento, se han detectado especies de este género en peces marinos, de agua dulce, de cultivo, cautivos y ornamentales en una amplia gama de regiones geográficas. El potencial zoonótico de estos parásitos y su impacto patológico en especies cultivadas se han notificado cada vez más (Golomazou et al., 2021).

En lo referente a *Giardia lamblia*, estudios realizados por Ghoneim et al. (2012) mostraron la presencia del ensamblaje zoonótico A de *G. duodenalis* en ciertas especies de peces examinadas en dos entornos acuáticos diferentes por lo que concluyeron que pueden desempeñar un papel importante en la epidemiología de la giardiasis humana.

Hasta ahora, no ha sido posible demostrar que los peces sean huéspedes naturales de estos protozoos; puede ser que sólo actúen como transportadores mecánicos. Sin embargo, aunque los peces sólo acumulen y transporten estos protozoos, podrían ser una "nueva" fuente de infección para las personas. Sin embargo, los trabajos realizados por Certad et al. (2015) sugieren que *C. parvum* está infectando a los peces, en lugar de ser transportado pasivamente. Dado el carácter zoonótico de *C. parvum*, los peces potencialmente contaminados por los mismos subtipos encontrados en los mamíferos terrestres serían una fuente adicional de infección para los seres humanos y los animales, y también podrían contribuir a la contaminación del medio ambiente con este parásito. Además, el riesgo de transmisión humana se ve reforzado por la observación de la contaminación de filetes comestibles

### 6.3. IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE QUISTES DE *GIARDIA* SPP. Y OOQUISTES DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

La utilización de la microscopía óptica también nos confirmó, según podemos apreciar en las figuras 15 y 16, la presencia de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se tiñeron mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. Dado el carácter ácido alcohol resistente de los ooquistes, estos se tiñen de violeta con el primer colorante, la fucsina fenicada, sin verse afectados por el segundo colorante, el azul de metileno (fig. 15).

En el caso de *Giardia* spp., se hizo tinción con lugol, que permitía observar los quistes (fig.16). Estos son ovalados, y el tamaño y la coloración es variable, de acuerdo con el estado de maduración. Es en quistes maduros cuando se puede observar claramente el axostilo, así como sus núcleos (de 2 a 4).



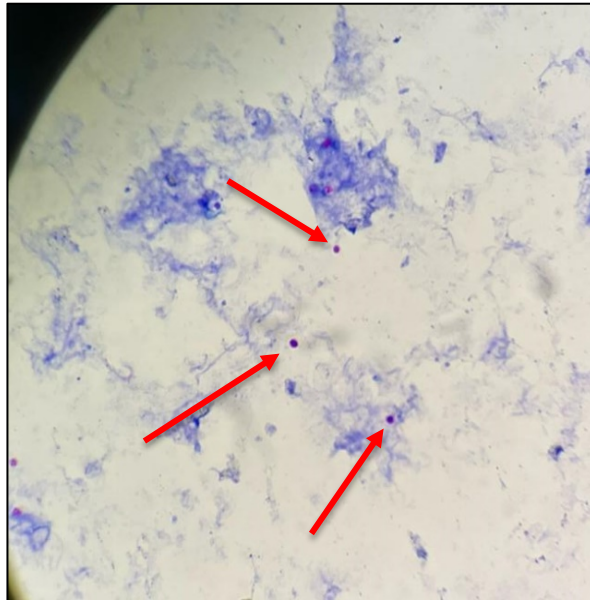


Figura 15. Fotografía al microscopio (x40) de las muestras de aguas con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada.

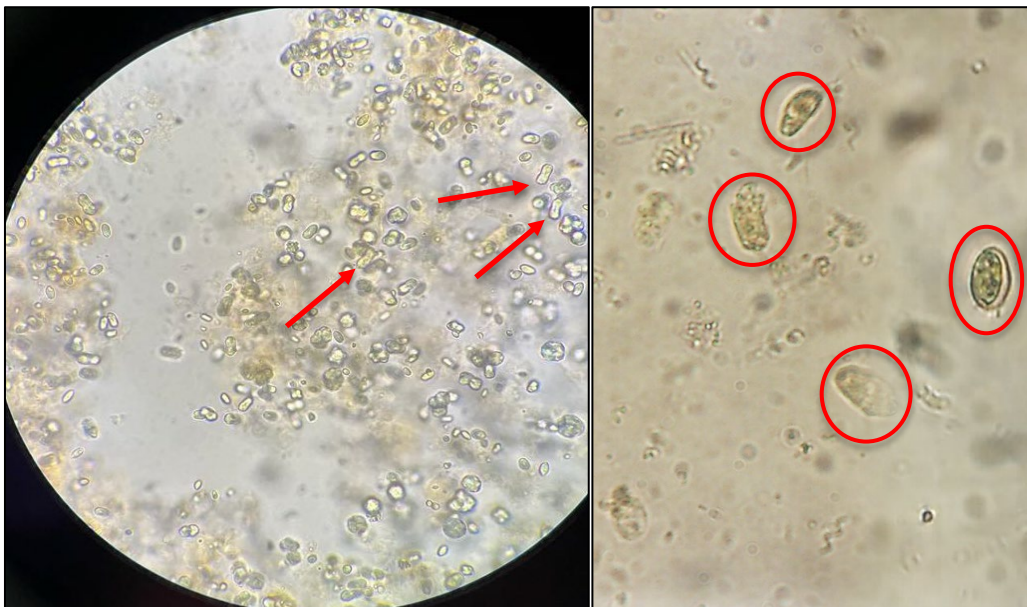


Figura 16. Fotografías al microscopio (x40) de las muestras de agua con la tinción de lugol.

#### 6.4. PCR CUANTITATIVA.

Para tener una aproximación de la cantidad de material genético presente en cada muestra intentamos encontrar una pareja de cebadores que diera un amplicón que nos permitiera cuantificar la cantidad de DNA de los parásitos presentes en cada una de las muestras.

#### 6.4.1. *Giardia* spp.

Para elaborar la recta de calibrado para *Giardia* spp. se seleccionaron una pareja de cebadores, GDHe-F y GDHi-R, que al ser utilizados en PCRs sobre DNA de las muestras analizadas nos permitieron confirmar que el producto de amplificación era específico del gen *gdh*.

La recta patrón, se elaboró enfrentando el logaritmo en base 10 de las diluciones del control a los Cts obtenidos en la qPCR (fig. 17) (Ruiz-Villalba et al., 2021; ThermoFisher, 2000).

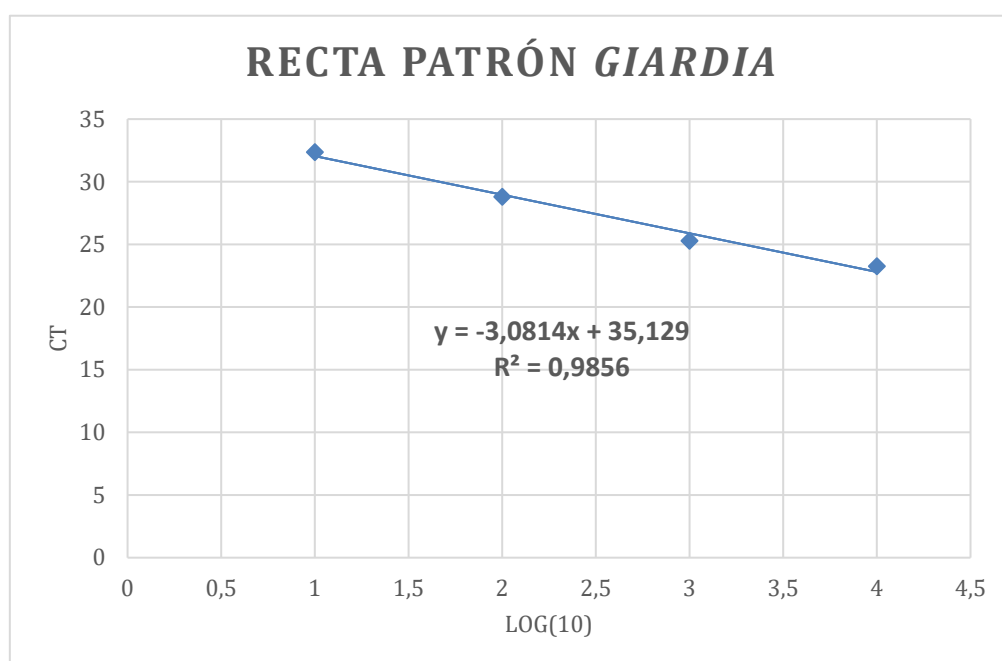


Figura 17. Gráfica de la recta patrón de *Giardia lamblia*.

La eficacia de la reacción se calcula a partir del valor de la pendiente de la recta obtenida, en este caso, -3.0814. Idóneamente se espera que la pendiente sea -3.3 y que la  $R^2$  sea mayor de 0.99, en cuyo caso, la eficacia es del 100 % (ThermoFisher, 2000). Dicha eficacia se calcula con la fórmula que se observa en la Tabla 7, y el rango de eficacia deseada para una amplificación va desde el 90% hasta el 110%. Sin embargo, como se observa en la Tabla 7, el valor es mayor, es de 111%. Las principales razones para que la eficacia supere esto se podría haberse dado por una inhibición de la polimerasa, o bien, porque la pureza del DNA no sea la óptima; asimismo, también pueden haber ocurrido errores en la manipulación pipeteado o por productos inespecíficos y cebadores dimerizados al usar agentes intercalantes para tinciones (Čepin, 2017; ThermoFisher, n.d., 2000).

Con esto se puede confirmar que se obtiene un valor de eficacia cercano al óptimo, al haberse analizado la pendiente de la recta patrón. Interpolando los valores de Ct obtenidos de cada una de las muestras se obtiene el número de copias de DNA existentes, y así tendremos una medida aproximada de la presencia de *Giardia* spp. en cada una de las muestras.

La interpretación de los resultados de este tipo de PCR es válida sólo en ese entorno, ya que la gráfica utilizada como recta de calibrado sirve únicamente como método de interpolación y no de extrapolación. Esto significa que, la eficacia calculada, el valor de  $R^2$ , así como la pendiente,

únicamente tienen sentido en el rango de concentración utilizado, fuera de este, no se podrá calcular el número de copias del parásito que hay en las muestras.

Tabla 7. Cálculo de la eficacia de la reacción de PCR a partir de la recta de calibrado.

<b>R<sup>2</sup></b>	0,9856
<b>Pendiente</b>	-3,0814
<b>Eficacia</b>	$10^{(-1/pendiente)-1}$
	1,111192391
	111%

Tabla 8. Valores de Ct de cada una de las muestras.

	<b>Muestra</b>	<b>Ct</b>	<b>Número de copias</b>
<b>gdh</b>	Control (N=100)	28,83	110,69
	Fuente Sierra (Padules)	32,01	10,28
	Estanque Entrada Sur UAL	30,56	30,50
	Estanque UAL (ESI)	29,99	46,59
	Desembocadura de Rambla	28,32	162,04
	Desembocadura del Río Andarax	30,14	41,59
	Costacabana (1)	32,13	9,39
	Costacabana (2)	31,98	10,52

Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se recogen en la tabla 8 y en la fig. 18. El control positivo nos permitió comprobar que se amplificó correctamente la secuencia de *Giardia* spp. y que daba un valor de Ct similar a la dilución 1:100 de la recta patrón, y, por lo tanto, un número de copias parecido (111 en el control con las muestras frente a 100 en la recta de calibrado). Se introdujo, además de las 7 muestras, un control positivo para comprobar que se amplificó correctamente la secuencia de *Giardia* y que daba un valor de Ct similar que en la dilución 1:100 de la recta patrón, y, por lo tanto, un número de copias parecido.

En la muestra 1, correspondiente a la fuente de la sierra se consiguen 10 copias de la secuencia, luego el nivel de *Giardia* spp. en esta muestra es muy inferior al resto de muestras analizadas. Y contrariamente, en el caso de la desembocadura de la rambla, se obtienen valores más altos en el número de copias de la secuencia, 162. Esto era lo esperado por la gran suciedad acumulada en este punto donde se acumulan tanto residuos orgánicos como no orgánicos, además de ser una zona al aire libre con mucha accesibilidad a diferentes animales, tales como gatos, que frecuentan la zona del puerto, donde se sitúa esta desembocadura.

Respecto a las muestras de Costacabana, se tomaron dos muestras de agua en tiempos diferentes, una después de una lluvia ligera y otra después de una fuerte lluvia, con objeto de comprobar si las fuertes lluvias arrastraban con el caudal una mayor cantidad de formas infectivas de los parásitos. Sin embargo, los valores obtenidos fueron parecidos y además el número de copias obtenido de la secuencia fue bajo. Estos resultados sugieren que el cauce por donde discurren las aguas no es frecuentado por animales domésticos o silvestres, lo cual es lógico si se piensa que una gran parte de su trayectoria transcurre entre invernaderos y durante gran parte del año no hay ningún caudal. Tampoco se eliminarán a esta rambla aguas residuales o excretas humanas que supongan una posible contaminación ambiental.

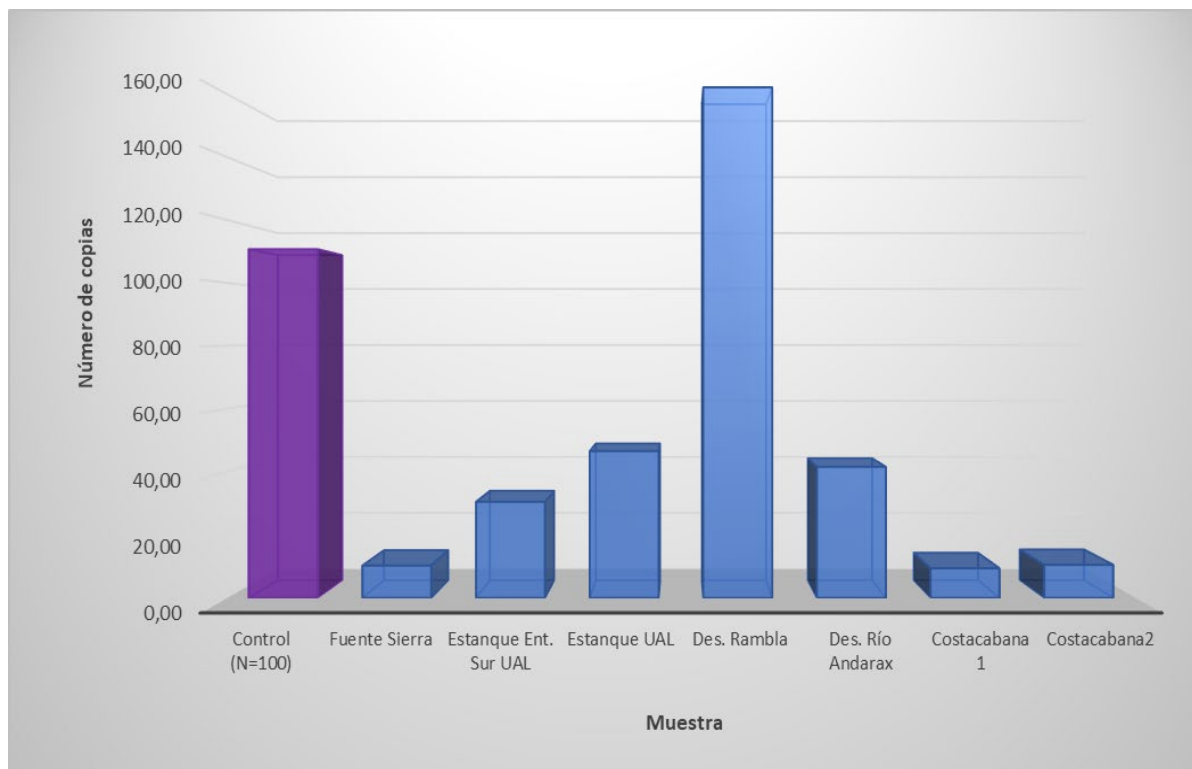


Figura 18. Histograma del número de copias de la secuencia que amplifica gdh por muestra.

#### 6.4.2. *Cryptosporidium* spp.

Una vez detectado *Cryptosporidium* en todas las muestras, el siguiente paso fue similar al realizado con *Giardia* spp., la búsqueda de una pareja de cebadores única que fuera capaz de amplificar el gen.

Con las parejas de cebadores utilizadas (CR-P1, CR-P2, CR-P3 y CPB-DIAGR para el gen del *rRNA*; AL3531, AL3532, AL3533, AL3535 para el gen *gp60*) para detectar la presencia *Cryptosporidium* spp. no se pudo obtener una amplificación única y específica. Se necesitaba de una reamplificación para poder detectarlo, por lo que no podía ser utilizada.

Para intentar resolver este problema, se buscó en bibliografía nuevas parejas de cebadores que fueran capaces de detectar la presencia de este parásito sin la necesidad de una reamplificación, lo que fue realmente complejo ya que aún no se ha conseguido una pareja que permita cuantificar el DNA de los parásitos.

El siguiente paso podría ser la secuenciación de uno de los genes que se han conseguido amplificar por PCR anidada y diseñar unos cebadores nuevos en regiones conservadas con una amplificación de no más de 1kb con la que quizás se pueda conseguir una amplificación única y específica del mismo por qPCR. De esta forma, se podría obtener una detección semicuantitativa del parásito *Cryptosporidium* spp.

## 7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas de este trabajo son:

1. Los cebadores que amplifican los genes de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y  $\beta$ -giardina (*bg*) en *Giardia* spp. son los adecuados para poner de manifiesto la presencia del parásito en las muestras analizadas.
2. De los cebadores anteriores, 2 fueron adecuados para realizar una PCR a tiempo real lo que permitió cuantificar la cantidad de DNA de *Giardia* spp. presente en las muestras analizadas.
3. Mediante microscopía óptica, con una tinción con lugol, se visualizaron quistes de *Giardia* spp. en las muestras analizadas.
4. Los cebadores CR-P1, CR-P3 y CPB-DIAGR, que amplifican el gen *rRNA ssu*, que codifica la subunidad pequeña del ribosoma de *Cryptosporidium* spp son los adecuados para poner de manifiesto la presencia del parásito en las muestras analizadas.
5. Ninguno de los cebadores anteriores permitió hacer una PCR a tiempo real para cuantificar la cantidad de DNA de *Cryptosporidium* spp. en las muestras analizadas.
6. Mediante microscopía óptica, con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, se pudo visualizar los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las muestras analizadas.
7. La presencia de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las muestras analizadas representan un riesgo para la fauna marina con consecuencias para la salud humana, por su transmisión a través del consumo de mariscos o pescado, y en la industria acuícola por el impacto en la salud de los peces cultivados.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- AECID. (2012). Procesamiento de muestras para diagnóstico de parásitos intestinales. *Ehas*, 1–15.
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardiaduodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023–1030. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00068-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00068-1)
- Carter, B. L., Chalmers, R. M., & Davies, A. P. (2020). Health sequelae of human cryptosporidiosis in industrialised countries: A systematic review. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04308-7>
- Čepin, U. (2017). *Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100%*. <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>
- Certad, G., Dupouy-Camet, J., Gantois, N., Hammouma-Ghelboun, O., Pottier, M., Guyot, K., Benamrouz, S., Osman, M., Delaire, B., Creusy, C., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., Aliouat-Denis, C. M., & Follet, J. (2015). Identification of cryptosporidium species in fish from Lake Geneva (Lac Léman) in France. *PLoS ONE*, 10(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133047>
- Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., & Cacciò, S. M. (2017). Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, 33(7), 561–576. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.006>
- Clin, I. (2006). *Cryptosporidium* : *Fi lo ge nia y ta xo no mía* . 47(ci), 1–4.
- Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E., & Gómez-Couso, H. (2018). Identification of a novel piscine *Cryptosporidium* genotype and *Cryptosporidium parvum* in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasitology Research*, 117(9), 2987–2996. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5995-3>
- Dixon, B. R. (2020). *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. *Research in Veterinary Science*, 135(June), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.034>
- Doménech, J. (2003). *Cryptosporidium y Giardia , problemas emergentes en el agua de consumo humano*. 22.
- Dong, S., Yang, Y., Wang, Y., Yang, D., Yang, Y., Shi, Y., Li, C., Li, L., Chen, Y., Jiang, Q., & Zhou, Y. (2020). Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitologica*, 65(4), 882–889. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00230-1>
- Dunn, N., & Juergens, A. L. (2021). Giardiasis. *StatPearls [Internet]*.
- E. E. Tyzzer. (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 5(261), 12–13.
- E.E., T. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.*, 26, 394 – 412. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0000063601&partnerID=40&md5=8c2b138d591c36a9314eeb0ad23cb2ab>
- Efstratiou, A., Ongerth, J., & Karanis, P. (2017). Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Research*, 123, 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>

- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on Giardia and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
- Fonte Galindo, L. (2010). Giardiasis A zoonosis? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 108–113.
- Gasser, R. B. (1990). Is giardiasis a zoonosis? *Australian Veterinary Journal*, 67(12), 456. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1990.tb03064.x>
- Ghazy, A. A., Abdel-Shafy, S., & Shaapan, R. M. (2015). Cryptosporidiosis in animals and man: 1. Taxonomic classification, life cycle, epidemiology and zoonotic importance. *Asian Journal of Epidemiology*, 8(3), 48–63. <https://doi.org/10.3923/aje.2015.48.63>
- Ghoneim, N. H., Abdel-Moein, K. A., & Saeed, H. (2012). Fish as a possible reservoir for zoonotic Giardia duodenalis assemblages. *Parasitology Research*, 110(6), 2193–2196. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2748-y>
- Golomazou, E., & Karanis, P. (2020). *Cryptosporidium Species in Fish: An Update*. 13. <https://doi.org/10.3390/environsciproc2020002013>
- Golomazou, E., Malandrakis, E. E., Panagiotaki, P., & Karanis, P. (2021). Cryptosporidium in fish: Implications for aquaculture and beyond. *Water Research*, 201, 117357. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117357>
- Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L. M., Tabares, E., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2000). Detection of infectious Cryptosporidium parvum oocysts in mussels (Mytilus galloprovincialis) and cockles (Cerastoderma edule). *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1866–1870. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1866-1870.2000>
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Amar, C. F. L., Grant, K. A., Williamson, K., Ares-Mazás, M. E., & McLauchlin, J. (2004). Detection of Cryptosporidium and Giardia in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.003>
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martínez-Urtaza, J., García-Martín, O., & Ares-Mazás, M. E. (2003). Contamination of bivalve molluscs by Cryptosporidium oocysts: The need for new quality control standards. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 97–105. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00057-6)
- Graczyk, T. K., Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M., & Farley, C. A. (1999). Cryptosporidium oocysts in Bent mussels (Ischadium recurvum) in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research*, 85(7), 518–521. <https://doi.org/10.1007/s004360050590>
- Graczyk, Thaddeus K., Marcogliese, D. J., De Lafontaine, Y., Da Silva, A. J., Mhangami-Ruwende, B., & Pieniazek, N. J. (2001). Cryptosporidium parvum oocysts in zebra mussels (Dreissena polymorpha): Evidence from the St. Lawrence River. *Parasitology Research*, 87(3), 231–234. <https://doi.org/10.1007/s004360000293>
- Guérin, A., & Striepen, B. (2020). The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite Cryptosporidium. *Cell Host and Microbe*, 28(4), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.007>
- Helmy, Y. A., Spierling, N. G., Schmidt, S., Rosenfeld, U. M., Reil, D., Imholt, C., Jacob, J., Ulrich, R. G., Aebischer, T., & Klotz, C. (2018). Occurrence and distribution of Giardia species in wild rodents in Germany. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2802-z>
- Horlock-Roberts, K., Reaume, C., Dayer, G., Ouellet, C., Cook, N., & Yee, J. (2017). Unusual Cell Cycle of Giardia intestinalis. *MSphere*, 2(5), 1–17.



- J.M., V., H.R., J., T.G., M., & H., S. (1971). *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea Pig *Cavia porcellus*, with an Emendation of the Genus. *The Journal of Protozoology*, 18(2), 243 – 247. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03315.x>
- Khan, A., Shaik, J. S., & Grigg, M. E. (2018). Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica*, 184(July 2017), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>
- Koinari, M., Karl, S., Ng-Hublin, J., Lymbery, A. J., & Ryan, U. M. (2013). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology*, 198(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.031>
- Krumkamp, R., Aldrich, C., Maiga-Ascofare, O., Mbwana, J., Rakotozandrindrainy, N., Borrmann, S., Caccio, S. M., Rakotozandrindrainy, R., Adegnika, A. A., Lusingu, J. P. A., Amuasi, J., May, J., Eibach, D., Stark, T., Dekker, D., Jaeger, A., Hogan, B., Lamshöft, M., Thye, T., ... Sannella, A. R. (2021). Transmission of *Cryptosporidium* Species among Human and Animal Local Contact Networks in Sub-Saharan Africa: A Multicountry Study. *Clinical Infectious Diseases*, 72(8), 1358–1366. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa223>
- Kunstler, J. (1882). Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. *CR Soc. Biol.(Paris)*, 95, 347–349.
- Lagunas-Rangel, F. A., Yee, J., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2021). An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. *Microbiological Research*, 250(2508), 126807. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126807>
- Lal, A., Baker, M. G., Hales, S., & French, N. P. (2013). Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. *Trends in Parasitology*, 29(2), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.10.005>
- LEVINE, N. D. (1984). Taxonomy and Review of the Coccidian Genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *The Journal of Protozoology*, 31(1), 94–98. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb04296.x>
- Li, X., Guyot, K., Dei-Cas, E., Mallard, J. P., Ballet, J. J., & Brasseur, P. (2006). *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.018>
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., & Blagburn, B. L. (1997). Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(1), 19–34. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.1.19>
- Lowery, C. J., Nugent, P., Moore, J. E., Millar, B. C., Xiru, X., & Dooley, J. S. G. (2001). PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiology and Infection*, 127(3), 545–553. <https://doi.org/10.1017/s0950268801006276>
- MacRae, M., Hamilton, C., Strachan, N. J. C., Wright, S., & Ogden, I. D. (2005). The detection of *Cryptosporidium parvum* and *Escherichia coli* O157 in UK bivalve shellfish. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.10.017>
- Mazurie, A. J., Alves, J. M., Ozaki, L. S., Zhou, S., Schwartz, D. C., & Buck, G. A. (2013). *Comparative Genomics of Cryptosporidium*. 2013.
- Midlej, V., de Souza, W., & Benchimol, M. (2019). The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle. *Journal of Structural Biology*, 207(3), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.07.002>

- Miller, W. A., Miller, M. A., Gardner, I. A., Atwill, E. R., Harris, M., Ames, J., Jessup, D., Melli, A., Paradies, D., Worcester, K., Olin, P., Barnes, N., & Conrad, P. A. (2005). New genotypes and factors associated with Cryptosporidium detection in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast. *International Journal for Parasitology*, *35*(10), 1103–1113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.04.002>
- Navarro-I-Martinez, L., Del Águila, C., & Bornay-Llinares, F. J. (2011). Cryptosporidium: A genus in revision. the Situation in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *29*(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.12.002>
- Pumpuntu, N., & Piratae, S. (2018). Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Veterinary World*, *11*(5), 681–686. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.681-686>
- Read, C. M., Monis, P. T., & Andrew Thompson, R. C. (2004). Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, *4*(2), 125–130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.001>
- Reid, A., Lymbery, A., Ng, J., Tweedle, S., & Ryan, U. (2010). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Veterinary Parasitology*, *168*(3–4), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.015>
- Rogelio López - Velez, Esteban Martín Echavarría, & Losé A. Pérez Molina. (2008). Guía de Enfermedades Infecciosas Importadas. *Ministerio de Sanidad y Consumo*, 11–209. [www.msc.es](http://www.msc.es)
- Rojas-lópez, L. (2022). *Regulation of differentiation during the Giardia life cycle An insight into the molecular control.*
- Rojas-López, L., Marques, R. C., & Svärd, S. G. (2022). *Giardia duodenalis.* *Trends in Parasitology*, *xx*(xx), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.01.001>
- Ruiz-Villalba, A., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Use and misuse of cq in qpcr data analysis and reporting. *Life*, *11*(6), 1–22. <https://doi.org/10.3390/life11060496>
- Ryan, U. M., Feng, Y., Fayer, R., & Xiao, L. (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* – a 50 year perspective (1971–2021). *International Journal for Parasitology*, *51*(13), 1099–1119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007>
- Ryan, U., Papparini, A., Monis, P., & Hijawi, N. (2016). It's official – *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*, *105*, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>
- Ryan, U., Zahedi, A., Feng, Y., & Xiao, L. (2021). An update on zoonotic cryptosporidium species and genotypes in humans. *Animals*, *11*(11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ani11113307>
- Sánchez, C., López, M. C., Galeano, L. A., Qvarnstrom, Y., Houghton, K., & Ramírez, J. D. (2018). Molecular detection and genotyping of pathogenic protozoan parasites in raw and treated water samples from southwest Colombia. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3147-3>
- SLAVIN, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, *65*(3), 262–266. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(55\)80025-2](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(55)80025-2)
- Snel, S. J., Baker, M. G., Kamalesh, V., French, N., & Learmonth, J. (2009). A tale of two parasites: The comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. *Epidemiology and Infection*, *137*(11), 1641–1650. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002465>
- Sponseller, J. K., Griffiths, J. K., & Tzipori, S. (2014). The evolution of respiratory cryptosporidiosis: Evidence for transmission by inhalation. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(3), 575–586.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00115-13>

- ThermoFisher. (n.d.). *Poor Efficiency of PCR*. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/poor-pcr-efficiency.html>
- ThermoFisher. (2000). Real-time PCR: understanding Ct. *Communication, C*, 1–6.
- Thompson, R. C. A., & Ash, A. (2016). Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections. *Infection, Genetics and Evolution*, *40*, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.028>
- Thompson, R. C. A., & Ash, A. (2019). Infection, Genetics and Evolution Molecular epidemiology of Giardia and Cryptosporidium infections – What 's new? *Infection, Genetics and Evolution*, *75*(May), 103951. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103951>
- Tiangtip, R., & Jongwutiwes, S. (2002). *Molecular analysis of Cryptosporidium species isolated from HIV-infected patients in Thailand*. *7*(4), 357–364.
- USEPA. (2005). Method 1623. *Control, December*.
- Vesey, G., Slade, J. S., Byrne, M., Shepherd, K., & Fricker, C. R. (1993). A new method for the concentration of Cryptosporidium oocysts from water. *Journal of Applied Bacteriology*, *75*(1), 82–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03412.x>
- WHO. (2022). *Drinking-water*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., Fayer, R., & Lal, A. A. (1999). Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small- subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(4), 1578–1583. <https://doi.org/10.1128/aem.65.4.1578-1583.1999>
- Xiao, L., & Feng, Y. (2017). Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens Cryptosporidium spp. and Giardia duodenalis. *Food and Waterborne Parasitology*, *8–9*(August), 14–32. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.002>
- Zhao, P., Cao, L., Wang, X., Dong, J., Zhang, N., Li, X., Li, J., Zhang, X., & Gong, P. (2021). Extracellular vesicles secreted by giardia duodenalis regulate host cell innate immunity via tlr2 and nlrp3 inflammasome signaling pathways. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009304>