

**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LA SELECCIÓN OPERANTE DE LA
ADHESINA GP60 DE *Cryptosporidium parvum* CON LA PRESENTACIÓN DE
DIARREA, EDAD DEL TERNERO Y REGIÓN GEOGRÁFICA PROCEDENCIA DE
LA MUESTRA.**

NATALIA SIERRA DURÁN

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:

MÉDICO VETERINARIO

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

MEDICINA VETERINARIA

BOGOTÁ D.C

OCTUBRE 2018

**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LA SELECCIÓN OPERANTE DE LA
ADHESINA GP60 DE *Cryptosporidium parvum* CON LA PRESENTACIÓN DE
DIARREA, EDAD DEL TERNERO Y REGIÓN GEOGRÁFICA PROCEDENCIA DE
LA MUESTRA.**

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:

MÉDICO VETERINARIO

**NATALIA SIERRA DÚRAN.
AUTOR TRABAJO DE GRADO**

**CATALINA ESTER AVENDAÑO.
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO**

**ALEJANDRO AMAYA.
DIRECTOR TRABAJO DE GRADO**

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES – U.D.C.A.
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIONES
BOGOTA, COLOMBIA**

2018

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	6
2	OBJETIVO GENERAL	9
2.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	9
3	MARCO TEÓRICO	10
3.1	TAXONOMÍA	10
3.2	CICLO DE VIDA	11
3.3	GENÉTICA	14
3.4	FISIOPATOLOGÍA	15
3.5	DIAGNÓSTICO	17
3.6	EPIDEMIOLOGIA	19
3.6.1	FACTORES DE RIESGO	19
3.6.2	PREVALENCIA	20
3.7	TRATAMIENTO	22
3.8	PREVENCIÓN Y CONTROL	24
4	METODOLOGÍA	25
4.1	MUESTRAS	25
4.2	PROCESAMIENTO MUESTRAS	25
4.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSIÓN	34
7	CONCLUSIONES	38
8	BIBLIOGRAFÍA	40

LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diferencias entre <i>Cryptosporidium</i> y los coccidios intestinales.	10
Tabla 2. Comparación entre <i>Cyptosporidium</i> y las gregarinas.	11
Tabla 3. Subtipos encontrados en muestras de terneros positivos a <i>Cryptosporidium parvum</i> , pertenecientes a la región de Cundinamarca.	27
Tabla 4. Relación subtipos con presencia de diarrea.	28
Tabla 5. Edades de los terneros.	28
Tabla 6. Resultado del test de tajisma´s y chi- cuadrado.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organelo de alimentación o epimerita.	13
Figura 2. Ciclo de <i>Cryptosporidium</i> dentro del hospedador.	14
Figura 3. Ooquiste de <i>Cryptosporidium</i> en tinción de Heine en aumento 1000x con aceite de inmersión.	18
Figura 4. Técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de ooquistes de <i>Cryptosporidium parvum</i> .	18
Figura 5. Rutas de transmisión de la criptosporidiosis.	20
Figura 6. Prevalencia de diarrea en subtipos.	28
Figura 7. Edades terneros, grafico de barras	29
Figura 8. Mapa de la región de Cundiboyasence donde se puede observar una distribución homogénea de los subtipos.	30
Figura 9. Reconstrucción filogénica.	31
Figura 10. Ventana deslizable del Tajima´s test.	33

1 INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad causada por *Cryptosporidium spp* que afecta humanos (niños y pacientes inmunocomprometidos) y una gran variedad de animales vertebrados (Cacció et al., 2015; Trotz et al., 2007); siendo una de las causas más importante de diarrea y muerte en niños y terneros. Este protozoo ataca el intestino, en donde los esporozoítos invaden el epitelio y por medio de la acción de ácidos gástricos, ácidos biliares, tripsina y una temperatura intestinal ideal se produce la exquistación del ooquiste, el cual va a causar un acortamiento y destrucción de las vellosidades. Estas lesiones provocan diarrea debido a una mala digestión / mala absorción (Wayatt et al., 2010; Fayer., 2010), consecuentemente, los signo observables pueden ser desde diarrea acuosa, depresión, anorexia y dolor abdominal, produciendo la muerte por la deshidratación y la falla cardiovascular de animales en estado crítico (Tomazic et al., 2013; Almeida et al., 2009).

Los casos clínicos aparecen entre la segunda y tercera semana de vida de los terneros, sin embargo, Kvac et al. (2006) Almeida reportaron una carga parasitaria significativa en terneros de un día de nacidos, pero sin manifestación de signos clínicos debido a que el parásito está en periodo de incubación; así mismo, estos autores mencionan que la cantidad de infectados disminuyó al día 20, reportando que las vacas son la principal fuente de infección de terneros.

Una de las herramientas para conocer el potencial de distribución zoonótico de *Cryptosporidium* circulante es su caracterización molecular. El genoma de *Cryptosporidium parvum* tiene un tamaño de aproximadamente 9 millones pb y 8 cromosomas (Puiu et al., 2004; Rider; Zhu., 2010). Para la identificación de las diversas especies de *Cryptosporidium* se requiere el uso de herramientas moleculares, el método más utilizado es el de análisis de ADN de la glicoproteína de (gp60) (Del Coco et al., 2014).

En su mayoría, el ganado se infecta con *Cryptosporidium parvum* subtipo IIa, es importante tener presente que los subtipos IIa e IIId han sido los más descritos como los responsables de la mayoría de las infecciones zoonóticas (Córdoba et al., 2011), reportándolos como altamente virulentos. Hay dos opciones por las cuales se generan estos subgrupos entre los cuales se encuentra; primero que el subtipo representa una población homogénea de parásito y segundo se da una recombinación genética la cual da origen a nuevos subtipos demostrando una amplia heterogeneidad de *C. parvum*. Esta recombinación genética parece estar asociada con la alta frecuencia de polimorfismo en el gen de la gp60 (Feng et al., 2013). Esta recombinación entre cepas genéticamente diferentes se da por que *Cryptosporidium* posee una fase sexual (Li et al., 2013).

La caracterización molecular de *Cryptosporidium* circulante puede permitir la evaluación del potencial de distribución zoonótico identificando si *Cryptosporidium* posee una relación estadísticamente significativa entre las variables. Asimismo, determinar si el área geográfica y sus condiciones ambientales específicas pueden

influir en la composición genética del parásito, actuando como un agente inductor de mutaciones y diferenciando los subtipos alrededor del mundo. Estudios filogenéticos permiten conocer, el potencial zoonótico y la variación genética de especies y subtipos (Avendaño & Amaya 2017).

Este trabajo pretendió evaluar la asociación entre la gp60 de *Cryptosporidium parvum* con la presentación de diarrea, edad del ternero y región geográfica procedencia de la muestra.

2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la asociación entre la selección operante de la adhesina gp60 de *Cryptosporidium parvum* con la presentación de diarrea, edad del ternero y región geográfica procedencia de la muestra.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar la relación entre la selección operante de la adhesina gp60 de *Cryptosporidium parvum* y la presencia de diarrea en terneros de la región Cundiboyacense.
2. Estimar la fuerza de asociación entre la selección operante de la adhesina gp60 de *Cryptosporidium parvum* y la edad de los terneros.
3. Determinar la asociación existente entre la selección operante de la adhesina gp60 de *Cryptosporidium parvum* y la región geográfica en la que se tomó la muestra.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 TAXONOMÍA

Taxonómicamente, este género estaba incluido en la clase Coccidea, dentro del phylum Apicomplexa. Sin embargo, recientes descubrimientos han reabierto el debate sobre su filiación. Siendo este clasificado como un parásito extracitoplasmático, en contraposición al resto de coccideos que son intracelulares, situándolos en la clase Gregarinasina (Tabla 1) (Chacin., 2007; Uribarren., 2018).

Estudios moleculares sugieren que *Cryptosporidium* está estrechamente relacionado con el primitivo apicomplexa gregarinas compartiendo estadios (Tabla 2) donde crecen y se desarrollan fuera del hospedador (Hijawi., 2010).

Tabla 1. Diferencias entre *Cryptosporidium* y los coccidios intestinales

Características	<i>Cryptosporidium</i>	Otros coccidios
Ubicación dentro de la célula hospedadora	Intracelular pero extra citoplasmática	Intracelular
Orgánulo de alimentación	Presente	Ausente
Tipos de ooquistes	Dos: de pared delgada y de pared gruesa	Uno: de pared gruesa
Tamaño de los ooquistes	Pequeños: (5–7,4 x 4,5–5,6 µm)	Grandes: (9–38 x 7–39 µm)
Esporoquistes, micropili y gránulos polares en el ooquiste	Ausente	Presente
Desarrollo extracelular	Si	No

Especificidad de hospedador	Baja	Alta
Apicoplasto	Ausente	Presente

Tomado de: Galván (2014)

Tabla 2. Comparación entre *Cryptosporidium* y las Gregarinas.

Características	<i>Cryptosporidium</i>	Gregarinas
Apicoplasto	Ausente	Algunas gregarinas no poseen apicoplasto
Sitio y modo de inserción	Epitelial y extracelular, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes: Los parásitos epiteliales (es decir, la membrana plasmática de trofozoíto se fusiona con la del huésped); La membrana de la vacuola en el lado del citosol del trofozoíto se pliega extensivamente para construir un organelo del alimentador que extienda en la célula de anfitrión	Transmembrana y extracelular, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes: Transmembrana, a través de la unión a la superficie de la célula huésped. Epitelial: La micocitosis (es decir, la gregarina perfora la membrana celular de la célula huésped con un tubo de alimentación, aspira el contenido celular y los digiere)
Tamaños	En el hospedador: 0.1-5µm Sin hospedador: 0.1-50µm	1–50mm o más
Morfología	Pleomórfica depende en gran medida de la cantidad de nutrientes y el entorno	Pleomórfica depende en gran medida de la cantidad de nutrientes y el entorno
Orgánulo de alimentación	Vía epimerita (orgánulo de alimentación expuesto en la superficie)	Vía epimerita (orgánulo de alimentación expuesto en la superficie)

Tomado de: Clode et al. (2015)

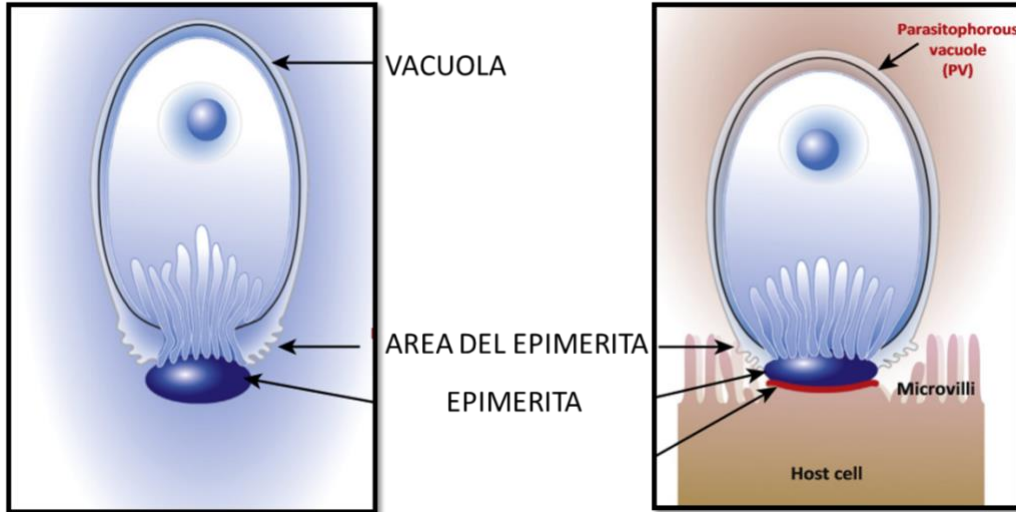
3.2 CICLO DE VIDA

La transmisión se da por contacto directo entre hospedador-hospedador, a través de alimentos o agua contaminados con ooquistes infectantes al momento de ser

eliminados a través de la materia fecal del hospedero. Los ooquistes de *Cryptosporidium*, poseen una pared doble y 4 esporozoítos desnudos en su interior, son capaces de sobrevivir en el ambiente por largos periodos de tiempo a una temperatura entre 20 - 30 °C, durante semanas o meses (figura 1). Una vez en tracto digestivo, principalmente a nivel de intestino delgado, los esporozoítos (forma invasiva) son liberados a través de una ranura en los ooquistes (Uribarren., 2018). El periodo de incubación de los ooquistes va de 1 a 15 días con un promedio de 7, las manifestaciones clínicas suelen aparecer de 2 a 20 días post infección (Higuita., 2016).

Los esporozoítos se unen a los enterocitos por medio del complejo apical a la membrana celular del hospedador, dando lugar a una vacuola parasitófora, la cual se denomina organelo de alimentación o epimerita (Figura 1).

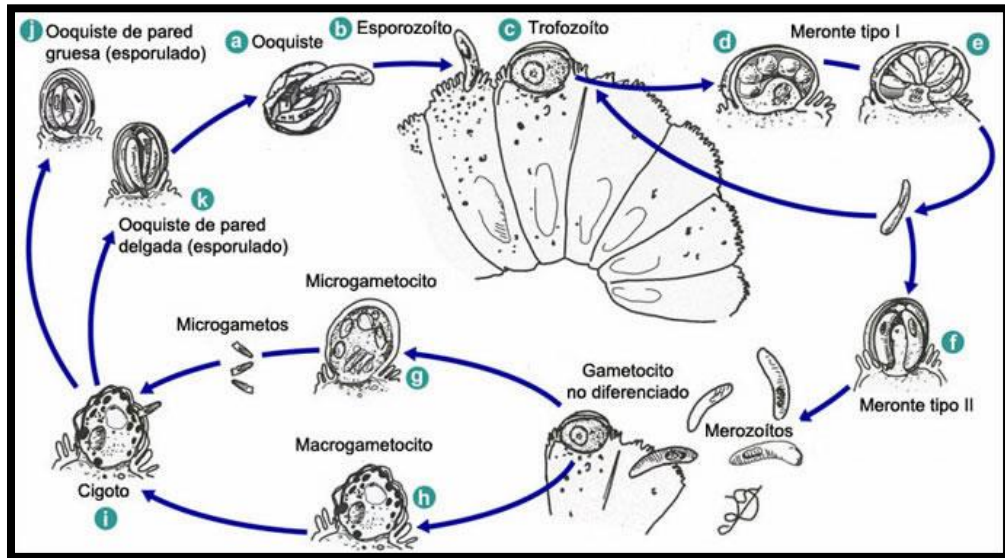
Figura 1. Organelo de alimentación o epimerita.



Adaptado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/criptosporidiasis.html>

El desarrollo posterior comprende la transformación del esporozoíto en trofozoíto y la reproducción de manera asexual, por merogonia, que da lugar a merontes de dos tipos: merontes I con 8 merozoítos, que invaden otras células, con repetición del ciclo y formación de otros merontes I, o merontes II, con 4 merozoítos; estos últimos dan origen a estadios sexuales y la reproducción sexual ocurre por gametogonia, con micro y macrogametos. Los cigotos resultantes pasan por una última fase de desarrollo (esporogonia), que culmina con la producción de ooquistes (Figura 2) (Garcés., 2014).

Figura 2. ciclo de *Cryptosporidium* dentro del hospedador.



Tomado de: (Marroquín et al., 2018)

3.3 GENÉTICA

Cryptosporidium pertenece al grupo de los Gregarinos, en el phylum Apicomplexa. posee un genoma de 8 cromosomas y aproximadamente 9 millones pares de bases nitrogenadas (Chalmers & Robinson 2009), este tiene un gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (gp60) de *C. parvum* que posee dentro un segmento polimórfico hipervariable de codones que codifican para el aminoácido serina, este protozoo posee una fase sexual y una asexual lo que facilita la recombinación genética (Xiao et al., 1999; Peña., 2016), facilitando el proceso de evolución, aparición de nuevos subtipos y adaptación de los ya existentes. las cuales se pueden presentar como: adición, deleción o sustitución génica, dentro de esta última categoría podemos distinguir las transiciones (cambio de una pirimidina a otra (C a

U o U a C) o cambios de una purina a otra (A a G o G a A)) y las transversiones cambio de una purina (A-G) a una pirimidina (C-U) y viceversa (Briones et al., 2015). Para la identificación de estas mutaciones se realiza el conteo de cada triplete que codifica para serina de la región microsatélite.

3.4 FISIOPATOLOGÍA

Cryptosporidium es un protozoo que se multiplica en el intestino de cientos de especies de vertebrados incluyendo a los bovinos. Este parásito es capaz de producir diarrea por si solo pero además su presencia también agrava las infecciones producidas por otros agentes oportunistas como virus y bacterias. Una vez se produce la ingestión del ooquiste hay ciertos factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad, como lo son la exposición previa al microorganismo y el estado inmunológico (Rodriguez et al., 2001).

Se ha observado atrofia leve o moderada de las vellosidades, aumento de tamaño de las criptas para remplazar el epitelio dañado, se produce infiltrado inflamatorio de la lámina propia, con polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas. Finalmente, la diarrea se produce por la mala absorción a causa de la atrofia de las vellosidades intestinales con la consiguiente disminución del área de absorción (Pérez et al., 2005), estimulada por la polimerización y acumulación de actina en la interfase parásito-citoplasma de la célula hospedadora, para que protruya la membrana plasmática y se forme la vacuola parasitófora. Este hecho desencadena

la hiperplasia de las células de la cripta y lleva el balance intestinal de absorción-secreción hacia el extremo secretor (Del coco et al., 2009).

Además, el sistema inmunitario del hospedador, en respuesta mediada por citoquinas estimuladas por el parásito invasor, ejerce efecto amplificador sobre la respuesta secretora. Ya que los macrófagos que infiltran la lámina propia secretan factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual estimula los fibroblastos y otras células de la lámina propia para producir prostaglandina E₂ (PGE₂) la cual potencia la secreción de cloro (Cl⁻) e inhibe la absorción de cloruro de sodio (NaCl). En el caso de que la respuesta del hospedador fuese a predominio de infiltrado de linfocitos polimorfonucleares, se produce una estimulación de la síntesis de prostaglandinas y otros productos derivados de los neutrófilos como radicales libres de oxígeno, los cuales estimulan la secreción intestinal. Se han detectado anticuerpos específicos de tipo IgG, IgM, IgA e incluso IgE entre los 8 y 15 días luego de la exposición (Perez et al., 2005).

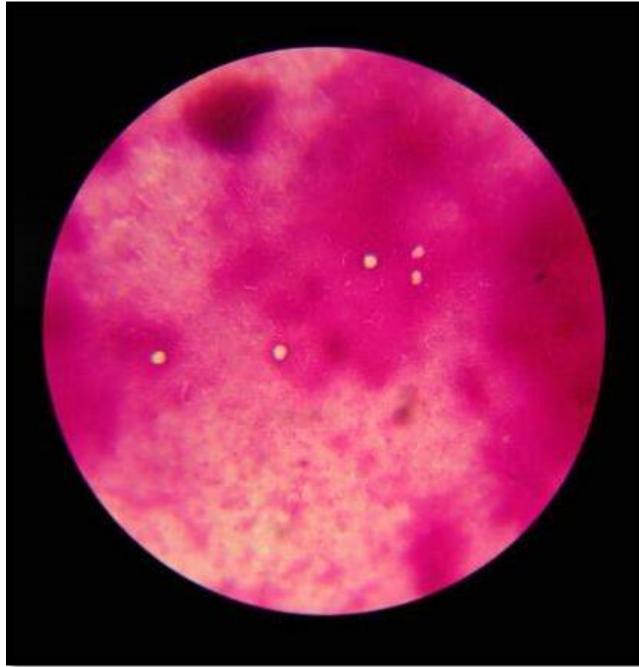
Tras un periodo de incubación que oscila entre 5 y 28 días, el síntoma más frecuente es la diarrea, acompañado de dolor abdominal, náuseas y fiebre. Hay que tener en cuenta que estas manifestaciones se relacionan con el estado inmunológico del paciente, en los casos de inmunosupresión grave, el microorganismo invade el conducto biliar y produce fiebre, ictericia y vómito (OIE., 2008).

3.5 DIAGNÓSTICO

La detección de ooquistes se realiza en las heces del paciente y su excreción coincide con los síntomas clínicos, para esto los métodos más utilizados son Kinyoun modificado y el Ziehl - Neelsen. Con estas tinciones, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp se observan ácido resistente (de color rojo) ooquistes son lisos, con pared celular gruesa, sin color, con formas esféricas o ligeramente ovoides que cuando están desarrollados (esporulados) contienen cuatro esporozoitos alargados libres (Figura 3) (OIE., 2008). Existen métodos de detección de antígenos en heces por inmunofluorescencia, hemaglutinación y ELISA que muestran buenos resultados y la PCR, con la utilización de cebadores específicos para *Cryptosporidium*, se logra una alta sensibilidad y especificidad en la detección de este parásito (Rojas., 2013), siendo esta útil para diferenciar las especies y los genotipos de *Cryptosporidium* (Del coco et al., 2009).

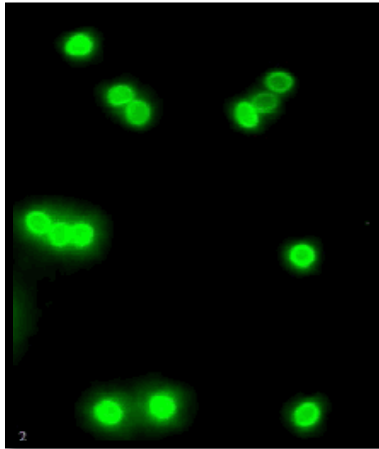
Para el diagnóstico de una infección subclínica se aconseja usar técnicas como la inmunofluorescencia directa que emplea un anticuerpo monoclonal específico frente a un epítipo o determinante antigénico de la pared del ooquiste marcado con isotiocianato de fluoresceína (Figura 4), siendo este el método más empleado para la detección del parásito en las heces de animales asintomáticos (Castro et al., 2015).

Figura 3. Ooquiste de *Cryptosporidium* en tinción de Heine en aumento 1000x con aceite de inmersión.



Adaptado de: Catalina Avendaño, María Fernanda Ballesteros y Alejandra Páramo (2016)

Figura 4. Técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium parvum*.



Tomado de: (Castro et al., 2015)

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE *gp60*: el método de identificación de esta glicoproteína se realiza mediante una PCR anidada aumentando la sensibilidad de

reacción, donde, se amplifica un segmento del gen *gp60*, ampliamente usado en la subtipificación de *Cryptosporidium* debido a la heterogeneidad. En este gen se encontró que esta presenta una secuencia similar a la de un microsatélite, ya que tiene repeticiones del codón serina (TCA, TCG o TCT) en el extremo 5' terminal del gen (Xiao.,2010; Peña., 2016).

La implementación de la sutipificación con el gen de la GP60, ha permitido la identificación de diferencias geográficas y temporales en la transmisión de *Cryptosporidium* spp., y una mejor apreciación de la implicación del parásito en la salud pública (Avendaño & Amaya., 2017).

3.6 EPIDEMIOLOGIA

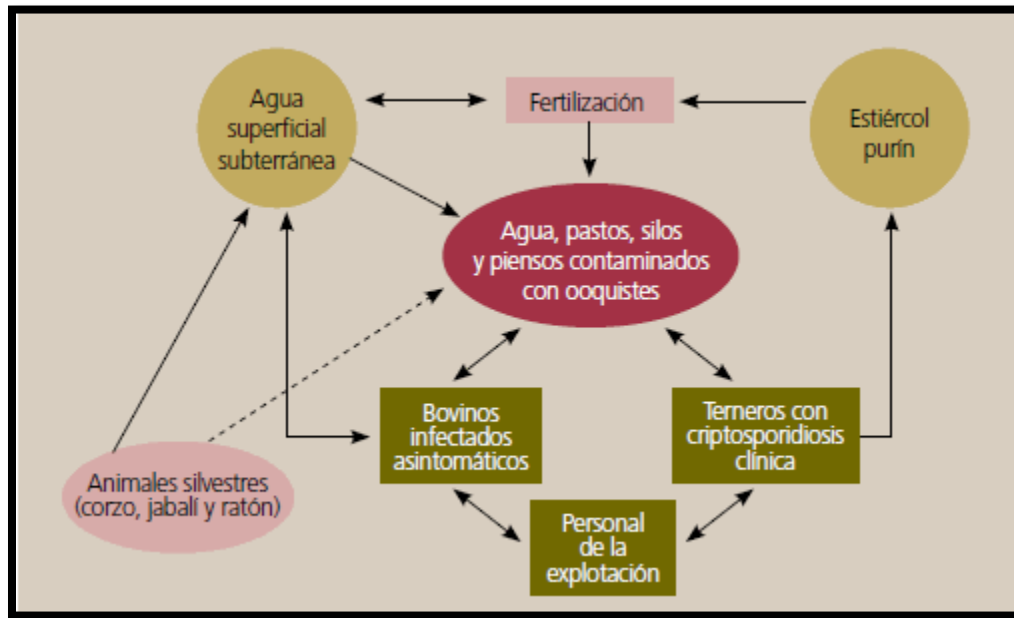
Los resultados de multitud de estudios epidemiológicos demuestran una distribución cosmopolita del parásito, existiendo un gran número de especies hospedadoras, incluido el hombre (Barco et al., 1991). La Cryptosporidiosis es una enfermedad mundial con mayor influencia en zonas tropicales o de clima templado (Uribarren, 2017).

3.6.1 Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo encontramos que la contaminación ambiental con heces de animales parasitados (Figura 5) ; así como, los bovinos adultos con infección subclínica, animales domésticos y silvestres infectados, portadores mecánicos como insectos pájaros e incluso el hombre, los alimento, el agua y diversos

utensilios empleados habitualmente en las explotaciones que hayan sido accidentalmente expuestas a contaminación fecal, desempeñan un papel importante en la transmisión de la enfermedad. Los ooquistes de *Cryptosporidium* son muy resistentes a factores ambientales, resistiendo temperaturas 20-30 grados durante 2 a 6 meses y posee dosis infectantes bajas (10-100 ooquistes) (Castro et al., 2015; Pulido et al., 2014; Avendaño et al., 2010).

Figura 5. Rutas de transmisión de la criptosporidiosis.



Tomado de: (Hermida et al., 2015).

3.6.2 Prevalencia

La prevalencia de este microorganismo es variable, en función de las características socioeconómicas de la población, ya que es más frecuente en los lugares con

problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable, en las piscinas, en la eliminación de aguas residuales o con estrecho contacto con animales (Hernandez., 2010).

Aunque se ha demostrado que la criptosporidiosis puede afectar animales, desde, dos días de nacidos, la mayor prevalencia se presenta en terneros de 15 a 21 días de nacidos los cuales en la mayoría de los casos presentan cuadros diarreicos. Los animales adultos desarrollan infección activa del parásito la cual es asintomática. La prevalencia estimada de *Cryptosporidium* spp. en personas con diarrea es de 1% a 3% en países desarrollados, y de alrededor del 10% en países en vías de desarrollo (Del Cocco et al., 2009). La prevalencia en bovinos positivos a *Cryptosporidium* spp es variable dependiendo del país y las condiciones particulares de cada región, estimar la prevalencia de esta enfermedad es difícil, puesto a que esta no es de notificación obligatoria (Pulido et al., 2014).

En Colombia existen pocos estudios, entre ellos uno realizado en el departamento de Cundinamarca, donde se estudiaron 135 muestras provenientes de 7 explotaciones ganaderas para determinar la seroprevalencia a *Cryptosporidium* spp, encontrándose el 53.3 % de reactores positivos (Vergara et al., 2001).

Un estudio más reciente de la prevalencia de *Cryptosporidium* spp, fue realizado en el valle de Ubaté- Chiquinquirá donde se recolectaron 170 muestras de materia fecal de terneros lactantes entre cinco y 35 días de edad, pertenecientes a 41 explotaciones, encontrando 37 animales positivos en 18 previos (Avendaño et al.,

2010). Estos estudios demuestran que la criptosporidiosis es endémica en el país y representa un riesgo en cuanto a la salud pública.

En un estudio en 1103 explotaciones lecheras en Estados Unidos, donde se reportó que 225 de los terneros excretaron ooquistes de *C. parvum*, en Canadá el 63% estaban infectados con *C. parvum* y en México y Brasil se observaron prevalencias de 25% y del 27,8%, respectivamente, en explotaciones lecheras (Fitz et al., 2013), donde predominan los subtipos de *C. parvum* de la familia Ila como IlaA14G2R1, IlaA18G1R1, IlaA19G2R2, IlaA20G1R1, IlaA20G2R2, IlaA22G1R1 (Tomazic et al., 2013; Del Coco et al., 2014).

Aunque la mayoría de los estudios se han realizado en países desarrollados, los resultados indican que los terneros son frecuentemente infectados por la familia de subtipo de *C. parvum* Ila y un subtipo en especial (IlaA15G2R1) es el que mayormente afecta a estos animales (Peña., 2016). Otros subtipos, sin embargo, predominan más regionalmente, por ejemplo el IlaA16G1R1 en Hungría, Slovenia, Belgrado, Serbia, Montenegro y el IlaA18G3R1 en el Reino Unido y Australia (Xiao, 2010).

3.7 TRATAMIENTO

A pesar de décadas de estudios de este parásito aún no se cuenta con un tratamiento efectivo contra este, Se han llevado a cabo numerosos estudios para

encontrar una quimioterapia específica contra *Cryptosporidium*. Si bien se han probado más de 200 drogas, tanto *in vivo* como *in vitro*, ninguna resultó totalmente efectiva en el tratamiento de la infección (Del coco et al., 2009), se le atribuye a que la localización intracelular del parásito y la naturaleza dual de la separación del lumen intestinal y del citoplasma celular fueran la causa de la resistencia a diferentes medicamentos (Luján & Garbossa., 2008).

En pacientes inmunocompetentes se requiere un tratamiento de soporte y sintomático el cual consiste en hidratación oral o intravenosa, sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos es necesario realizar una combinación de un agente antimicrobiano y uno antidiarreico (Rodríguez & Royo., 2000).

Entre los fármacos que han mostrado alguna eficacia frente a *C. parvum* se encuentran la paromomicina (Parofo[®]) que es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos, activo frente a protozoos, cestodos y bacterias, la azitromicina (Azitromizin[®]) que es otro antibiótico perteneciente a los macrólidos cuyo mecanismo de acción consiste en detener el crecimiento bacteriano y la nitazoxanida que es un agente antiprotozoario que funciona deteniendo el crecimiento de estos, disminuye la eliminación de ooquistes (De la parte et al., 2005).

3.8 PREVENCIÓN Y CONTROL

La criptosporidiosis se contrae principalmente por la ingesta de los ooquistes, por lo tanto, las medidas preventivas recaen en la implementación de procesos necesarios para la eliminación de las vías de transmisión de *Cryptosporidium spp* (Zanaro & Garbossa., 2008). Según Sánchez et al., 2013 se pueden mencionar 3 pilares fundamentales para la prevención de la enfermedad: 1. Buenas prácticas de manejo, 2. Nutrición adecuada, 3 higiene.

Los ooquistes son resistentes a la cloración, y la filtración es el sistema más útil para eliminar este microorganismo. Son sensibles a la actividad desinfectante del óxido de etileno, pero mantienen la infectividad después de un proceso de congelación, sin embargo, no resisten los procesos de pasteurización (Rodríguez& Royo., 2000). Los animales enfermos deberían ser aislados de los sanos para evitar la diseminación de la enfermedad y la contaminación del ambiente donde son criados los animales (Margueritte., et al 2007).

4 METODOLOGÍA

4.1 MUESTRAS

Se analizaron 51 secuencias de la glicoproteína gp60 de *C. parvum* amplificada a partir de aislados de materia fecal, que provinieron de terneros entre 1 y 30 días de nacidos, procedentes de 51 fincas de la región Cundiboyacense de los municipios Tocancipá, Suesca, Ubaté, Chía, Guachetá, Chiquinquirá, Simijaca, Susa, San Miguel, Nemocón y Sopó.

4.2 PROCESAMIENTO MUESTRAS

Se extrajeron las secuencias haciendo uso del programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999). Para establecer la especie y familia de subtipo, se utilizó la herramienta bioinformática en línea, BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), la cual mediante el alineamiento múltiple de cada una de las secuencias generadas encontró similitudes entre las secuencias previamente reportadas en la base de datos Genbank, el subtipo fue determinado por medio de la región microsatélites. Para la reconstrucción filogenética se usó el software Mega 5.1 (Tamura et al., 2013), para lo cual se ajustaron las secuencias a un múltiplo de tres asociados al análisis evolutivo por codones, luego de lo cual las secuencias fueron alineadas

utilizando Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>); las secuencias alineadas fueron analizadas mediante el método Neighbor- Joining, con 1000 repeticiones Bootstrap. Para el análisis de selección positiva los alineamientos fueron analizados usando la prueba Tajima's D que compara dos estimadores θ ($\theta = 4N_e\mu$) (Divergencia poblacional, flujo de genes) el cual puede ayudar a determinar si los patrones de diversidad dentro de una población son consistentes con la expectativa neutral o no; específicamente se observa la heterogeneidad de los nucleótidos (Kent E. & Holsinger., 2010).

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones, se desarrollaron usando una distribución χ^2 . Todos los sitios con valores $\omega > 1$ se consideraron bajo selección positiva. Para medir la fuerza de asociación entre la mutación y la presencia o ausencia de diarrea, la edad del ternero y la región en la cual fue tomada la muestra se realizó la prueba χ^2 . Para el presente trabajo la presencia de diarrea se determinó con base a la consistencia de las heces.

5 RESULTADOS

Los resultados encontrados tienen como base inicial la identificación de 8 familias pertenecientes a *C. parvum*, de las cuales 4 fueron ya descritas por el GenBank (Tabla 3). Los 4 subtipos ya descritos fueron: IlaA15G2R1, IlaA16G2R1, IlaA20G5R1 y IlaA18G5R1, los otros 4 subtipos restantes no se habían descrito y cada uno de ellos coincidió con una mutación por polimorfismo de sustitución sinónima, donde se reemplaza una adenina por una guanina o hay presencia de una adición o deleción génica. Los polimorfismos de sustitución, donde, variaban los codones TCA por TCG o viceversa, correspondieron a mutaciones que codifican para el mismo aminoácido, siendo este el mismo serina (Ramírez et al., 2013).

El número de animales con diarrea y sin diarrea fue de 34 y 17, respectivamente (Tabla 4, Figura 6).

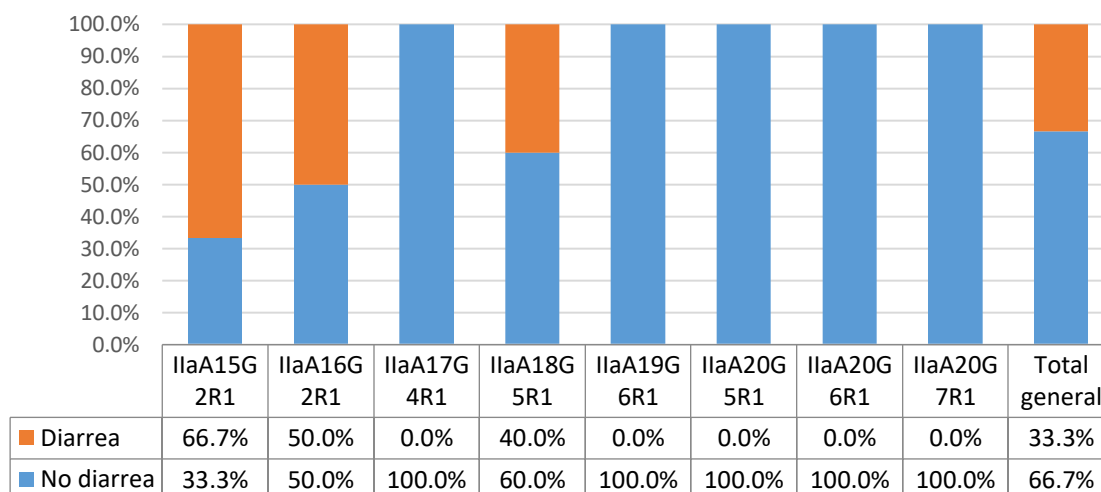
Tabla 3. Subtipos encontrados en muestras de terneros positivos a *Cryptosporidium parvum*, pertenecientes a la región e Cundinamarca.

Subtipos	Número de individuos	Porcentaje %
IlaA15G2R1	3	5.8%
IlaA16G2R1	2	3.9%
IlaA17G4R1	1	1.9%
IlaA18G5R1	35	68.6%
IlaA19G6R1	2	3.9%
IlaA20G5R1	3	5.8%
IlaA20G6R1	4	7.8%
IlaA20G7R1	1	1.9%

Tabla 4. Relación subtipos con presencia de diarrea.

Subtipo	No diarrea	Diarrea	Total, general	Subtipo	No diarrea	Diarrea	Total, general
IlaA15G2R1	1	2	3	IlaA15G2R1	33,3%	66,7%	100,0%
IlaA16G2R1	1	1	2	IlaA16G2R1	50,0%	50,0%	100,0%
IlaA17G4R1	1	0	1	IlaA17G4R1	100,0%	0,0%	100,0%
IlaA18G5R1	21	14	35	IlaA18G5R1	60,0%	40,0%	100,0%
IlaA19G6R1	2	0	2	IlaA19G6R1	100,0%	0,0%	100,0%
IlaA20G5R1	3	0	3	IlaA20G5R1	100,0%	0,0%	100,0%
IlaA20G6R1	4	0	4	IlaA20G6R1	100,0%	0,0%	100,0%
IlaA20G7R1	1	0	1	IlaA20G7R1	100,0%	0,0%	100,0%
Total general	34	17	51	Total general	66,7%	33,3%	100,0%

Figura 6. Prevalencia de diarrea en subtipos.



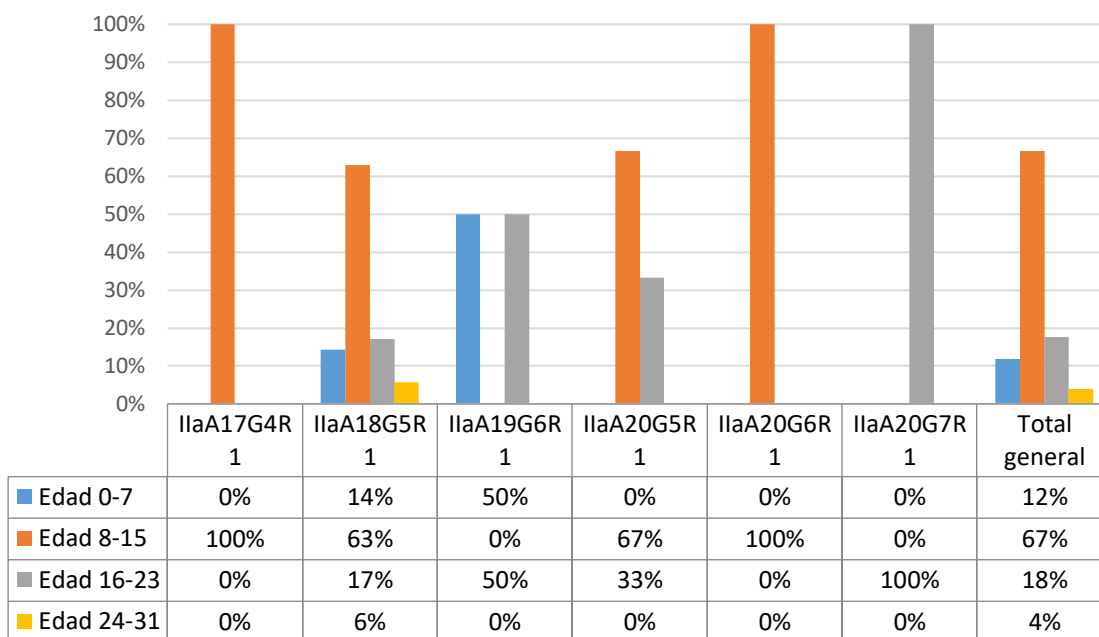
Al evaluar la procedencia de las muestras, se identificó que el grupo más grande de individuos infectados estaba entre los 8 y 15 días de edad (Tabla 5 y figura 7).

Tabla 5. Edades de los terneros.

Subtipo	Edad 0-7	Edad 8-15	Edad 16-23	Edad >24	Total, general
IlaA15G2R1	0	3	0	0	3
IlaA16G2R1	0	2	0	0	2

IlaA17G4R1	0	1	0	0	1
IlaA18G5R1	5	22	6	2	35
IlaA19G6R1	1	0	1	0	2
IlaA20G5R1	0	2	1	0	3
IlaA20G6R1	0	4	0	0	4
IlaA20G7R1	0	0	1	0	1
Total, general	6	34	9	2	51

Figura 7. Edades terneros, grafico de barras.



La distribución de las secuencias se halló homogénea alrededor de la región cundiboyacense, en donde el subtipo IlaA18G5R1 fue el más encontrado, abarcando un 68.6% de la población analizada (Figura 8), los únicos municipios donde no se encontró la familia IlaA18G5R1 fue en Tabio donde estaba presente IlaA20G7R1 que presentaban una adición génica y Tocancipá IlaA15G2R1 cepa ya descrita anteriormente en el Genbank.

Figura 8. Mapa de la región de Cundiboyasense donde se puede observar una distribución homogénea de los subtipos.



Durante la reconstrucción filogenética de la adhesina GP60, se tomó como outgroup el subtipo IlaA5G3a de *Cryptosporidium parvum* AY738191, el resultado fue la obtención de 2 clados derivados de un ancestro en común (Figura 9). En el árbol filogenético se observa una relación entre especies.

Figura 9. Reconstrucción filogenética.



0.20

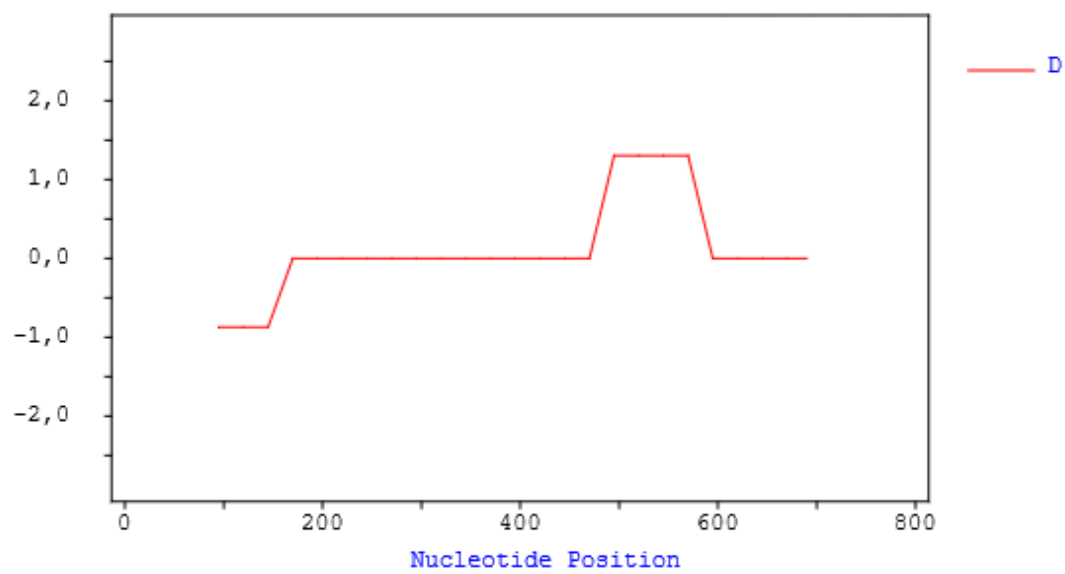
Al someter las 51 secuencias de procedencia de la región central de Colombia a la prueba del Tajima's test, se obtuvo un resultado $D=0.285812$ (Tabla 6). Aunque el resultado final del Tajima's indica que no hay selección positiva, en el momento de analizar la ventana deslizante del Tajima's se puede observar que hubo una zona donde hay presencia de selección positiva valores >1 , esta zona se encuentra entre los aminoácidos 445 y 620 (Figura 10), sin embargo, en esta región no se encontraba en la zona microsatélite.

Al realizar el análisis estadístico se encontró que no hay relación estadísticamente significativa entre los clados del árbol, con un valor de $P<0.001$ (tabla 6) y las variables consistencia de las heces, edad y región geográfica rechazando las hipótesis planteadas.

Tabla 6. Resultado del Tajima's y chi-cuadrado.

Tajima's	Sitios polimórficos	Mutaciones	Numero de nucleótidos diferentes	Diversidad nucleotica	Theta por secuencias	Theta por sitio	chi-cuadrado
$D=0.285812$	2	2	K: 0,51608	0,00075	0,44452	0,00064	$P<0.10$

Figura 10. Ventana deslizante del Tajima's test.



6 DISCUSIÓN

Feng et al. (2013) describieron que el subtipo IlaA15G2R1 presentaría una alta tasa de transmisibilidad como una característica adaptativa, En el 2015 Kaupke & Rzezutka encontraron en Polonia el subtipo IlaA15G2R1 en 9/25 terneros menores de 1 mes y correspondió a 1 de los 11 subtipos detectados en terneros no diarreicos. En los terneros que presentaban cuadros diarreicos, este subtipo fue aislado en 1 de 28 animales estudiados y fue 1 de los 7 subtipos aislados en ellos. Esto sugiere que en Polonia el subtipo IlaA15G2R1 se aislaría con mayor frecuencia en terneros no diarreicos, En el 2016 Peña realiza un estudio en Chile donde obtiene 36 muestras de terneros de las cuales 15 fueron positivas a *Cryptosporidium*, de estas 15 muestras 10 corresponden a el subtipo IlaA15G2R1 observado en animales diarreicos. En el presente estudio, se encontró que de las 51 muestras recolectadas en la región Cundiboyacense solo 3 presentaron este subtipo y de 34 animales que no presentaban diarrea solo 1 posee el subtipo IlaA15G2R1 encontrando una dominancia de la familia IlaA18G5R1 en animales con presencia de diarrea y sin esta. Este hecho coincide con lo encontrado en Argentina por del Coco et al. (2009) quienes encontraron a subtipo como uno de los menos prevalentes en la región.

Mazurie et al. en el año 2013, describieron que el genoma de los parásitos puede someterse a un cis-reordenamiento genómico donde se produce inserción, delección

y reordenamiento de genes dentro del cromosoma y a un trans-reordenamiento en el cual se produce un intercambio de fragmentos genómicos o cromosomas, estas tasas de sustitución genómica se usan para la identificación de la selección positiva o negativa. La mutación que cambia una secuencia de aminoácidos tiende a tener más probabilidades de alterar las funciones de las proteínas y, por lo tanto, se espera que se eliminen rápidamente de los genes funcionales esenciales de estos parásitos, *Cryptosporidium parvum* se encuentra sometido a una selección negativa, lo que confirma que hay presencia de cambios evolutivos a nivel molecular que son causados selectivamente por deriva al azar de mutaciones neutrales.

De acuerdo con afirmaciones de Striepen et al. (2002); Abal et al., 2013 y Widmer & Sullivan., 2012, la cadena de *C. parvum* posee un alto polimorfismo, asociado a una recombinación genética, siendo esta la consecuencia de la aparición de nuevos subtipos, situación que favorece la adaptación al medio. No obstante, con ocasión del presente estudio, se comprobó que en la región cundiboyacense se encuentran 8 diferentes subtipos, los cuales presentaron mutaciones, sometidas a una selección negativa, sustituciones que se presentaron van a codifican para el mismo aminoácido la serina.

La deriva genética es la base de todo cambio evolutivo. Es el proceso a través del cual, los organismos mejor adaptados desplazan a los menos adaptados mediante la acumulación lenta de cambios genéticos favorables en la población a lo largo de las generaciones (Pabón., 2015). Durante la selección negativa la diversidad

genética decae y los nuevos mutantes poseen adecuaciones menores que el promedio de la población. Aunque en este estudio los valores indicaron selección negativa hubo una región del nucleótido 445 hasta el 620 sometida a selección positiva. La selección positiva adaptativa es el mecanismo evolutivo mediante el cual los nuevos mutantes poseen mayor capacidad de adaptación que el promedio de la población, y las frecuencias de dichos mutantes se incrementan en la siguiente generación (Castillo, 2007), esta selección va a promover la diversidad genética y se reporta que esta puede favorecer la aparición de nuevas familias durante la fase sexual de *Cryptosporidium parvum* (Puiu et al 2004.; Striepen et al., 2002.; Li et al., 2013) asociándola a una diversidad genética; sin embargo, esta no necesariamente va a determinar la virulencia de *Cryptosporidium parvum*.

Según Plutzer & Karanis, (2009) los subgenotipos permiten la ubicación por zonas geográficas, sin embargo, al evaluar la distribución de las muestras se identificó que la procedencia geográfica de las muestras; se encontraba distribuida de tal manera que un solo un subtipo (IIaA18G5R1) estaba presente en casi todos los municipios, aunque este presentó una distribución homogénea, el resto de los subtipos que se presentaron estaban presentes en una sola zona geográfica.

Aunque se rechaza la hipótesis de que hay una relación estadísticamente significativa entre la variable heces y la gp60, se encontraron animales positivos a *C. parvum* que no manifestaban diarrea, es importante tener en cuenta que estos

continúan eliminando grandes cantidades de ooquistes, lo que poseerá un impacto frente a la salud pública, ya que no se manipulan estos animales con las mismas medidas preventivas, convirtiéndose en fuente de infección tanto para humanos como para gran variedad de vertebrados. Otro impacto que se genera está relacionado con los sistemas de producción, puesto que este protozoo, aunque no se manifieste con sintomatología, está produciendo un acortamiento de las vellosidades intestinales, lo que va a disminuir la capacidad de absorción e influir directamente con la ganancia de peso (Klein., 2008).

7 CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos rechazan la hipótesis planteada demostrando que no hay una relación estadísticamente significativa entre las variables consistencia de las heces, edad de los terneros y región geográfica de procedencia de la muestra asociándolas a la glicoproteína 60. La presencia de 8 subtipos de los cuales 3 no se han descrito aun por el GenBank, estos 3 nuevos subtipos pueden ser el resultado de cambios evolutivos a nivel molecular que son causados selectivamente por deriva al azar de mutaciones neutrales donde se cambia una base nitrogenada por otra, sin embargo, esta codificaba para el mismo aminoácido, las zonas donde se encontró selección positiva no estaban relacionadas con la sección microsatélite que va a determinar la virulencia del parasito, si estas mutaciones cambiaran la secuencia de los aminoácidos se alterarían las funciones de las proteínas comprometiendo genes fundamentales de *Cryptosporidium*.

No se presentó una relación estadísticamente significativa entre la gp 60 y las variables heces, edad de los terneros y procedencia de las muestras, aunque, se rechaza la hipótesis, se pudo observar que hay bovinos positivos a *C. parvum* que no manifiesta sintomatología, pero que continúan eliminando ooquistes siendo estos un foco de infección, un riesgo para la salud pública, debido a el tipo de manejo sin las debidas medidas preventivas.

En cuanto a el tratamiento de esta enfermedad no existe ninguno lo que motiva día a día a realizar nuevos estudios y a la implementación de nuevas medidas preventivas.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. ALMEIDA CASTRO, A. P., BILBAO, G., ECHEVARRÍA, H., MORÁN, P., CATENA, M., CACCIATTO, C., & MONTEAVARO, C. 2009. Cryptosporidiosis: caracterización de la infección en terneros de rodeos lecheros.
2. AVENDAÑO, C. V., & Martínez, A. A. (2017). Caracterización molecular de los subtipos de la GP60 de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* alrededor del mundo. *Revista MVZ Córdoba*, 22(3), 6339-6354.
3. AVENDAÑO, C., Quílez, J., & Sánchez-Acedo, C. (2010). Prevalence of *Cryptosporidium* in calves in the Ubaté-Chiquinquirá Valley (Colombia). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 41-47.
4. BARCO, MD Compañ; GONZÁLEZ, A. Llopis; SUÁREZ-VARELA, MM Morales. Consideraciones epidemiológicas sobre criptosporidiosis. *Revista de sanidad e higiene pública*, 1991, vol. 65, no 4, p. 363-370.
5. BARRETO, Guillermo. The Introduction of Darwinism in Venezuela. *INTERCIENCIA-CARACAS*, 1994, vol. 19, p. 59-59
6. BENHOUDA, D., Hakem, A., Sannella, A. R., Benhouda, A., & Cacciò, S. M. (2017). First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria. *Parasite*, 24.
7. CACCIÒ, S. M., DE WAELE, V., & WIDMER, G. 2015. Geographical segregation of *Cryptosporidium parvum* multilocus genotypes in Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 31, 245-249.
8. CALL, M. L. T. (2001). *Análisis de polimorfismos de ADN microsatélite de cromosoma Y: estudio de la población de Galicia y aplicaciones forenses* (Doctoral dissertation, Universidade de Santiago de Compostela).
9. CAÑADAS, G., et al. Comprensión Del Test Chi-Cuadrado Por Estudiantes De Psicología. *Investigación en Educación Matemática*, 2012, vol. 16, p. 153-160.
10. CAPONI, Gustavo. Teleología Naturalizada (Naturalized Teleology): Los conceptos de función, aptitud y adaptación en la Teoría de la Selección Natural (The concepts of function, fitness and adaptation in Natural

Selection Theory). *THEORIA. Revista de Teoría, Historia y Fundamentos de la Ciencia*, 2013, vol. 28, no 1, p. 97-114.

11. CASTILLO, C. A. 2007. La selección natural a nivel molecular. *Ecología molecular*, LE Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (eds.). Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, México, DF, 11-48.
12. CHACÍN-Bonilla, L., Barrios, F., & Sanchez, Y. (2007). Epidemiology of *Cyclospora cayentanensis* infection in San Carlos Island, Venezuela: strong association between socio-economic status and infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(10), 1018-1024.
13. CERDA, J., & VILLARROEL DEL, L. 2007. Interpretación del test de Chi-cuadrado (X^2) en investigación pediátrica. *Revista chilena de pediatría*, 78(4), 414-417.
14. CÓRDOBA, A., BASUALDO FARJAT, J. Á., DRUT, R., SANTÍN, M., SIDOTI, A., & DEL COCO, V. 2011. Caracterización clínica e histopatológica de la infección por el subtipo zoonótico Ila A21G1R1 de *Cryptosporidium parvum* en modelo murino. *Tercera Época*, 2.
15. CHALMERS, R. M., Robinson, G., Elwin, K., Hadfield, S. J., Xiao, L., Ryan, U., ... & Mallaghan, C. (2009). *Cryptosporidium* rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerging infectious diseases*, 15(5), 829.
16. CLODE, P. L., Koh, W. H., & Thompson, R. A. (2015). Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*?. *Trends in parasitology*, 31(12), 614-624.
17. DE LA PARTE-PEREZ, Maria Antonia, et al. *Cryptosporidium* spp. y criptosporidiosis. *Revista de la sociedad Venezolana de microbiología*, 2005, vol. 25, no 1, p. 06-14
18. DEL COCO, V. F., CÓRDOBA, M. A., & BASUALDO, J. A. 2009. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista argentina de microbiología*, 41(3), 185-196.
19. DEL COCO, V. F., CÓRDOBA, M. A., BILBAO, G., DE ALMEIDA CASTRO, A. P., BASUALDO, J. A., FAYER, R., & SANTÍN, M. 2014. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Research in veterinary science*, 96(2), 311-314.
20. FAYER R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2010;124(1):90–7.

21. FENG, Y., TORRES, E., LI, N., WANG, L., BOWMAN, D., & XIAO, L. 2013. Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. *International journal for parasitology*, 43(14), 1141-1147.
22. GALVÁN, A. L., Magnet, A., Izquierdo, F., Vadillo, C. F., Peralta, R. H., Angulo, S., ... & Del Aguila, C. (2014). A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. *Science of the Total Environment*, 468, 368-375.
23. HALL, T. A. 1999, January. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95-98).
24. HERMIDA, J. A. C., Warleta, M. G., & Mezo, M. (2015). La criptosporidiosis en el ganado bovino. *Albéitar: publicación veterinaria independiente*, (187), 14-16.
25. HERNÁNDEZ-Gallo, N., & Cortés-Vecino, J. A. (2010). 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. *Revista de Salud Pública*, 14, 169-181.
26. HIJJAWI, N., Ng, J., Yang, R., Atoum, M. F., & Ryan, U. (2010). Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Experimental parasitology*, 125(2), 161-164.
27. HOLSINGER, K. E. 2013. Tajima's D, Fu's FS, Fay and Wu's H, and Zeng et al.'s E.
28. KHALIL, Shehla, et al. *Cryptosporidium* species subtypes and associated clinical manifestations in Indian patients. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 2017, vol. 10, no 4, p. 311.
29. KLEIN, P., KLEINOVÁ, T., VOLEK, Z., & ŠIMŮNEK, J. 2008. Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. *Veterinary parasitology*, 152(1), 53-59.
30. KORNELIUSSEN, T. S., Moltke, I., Albrechtsen, A., & Nielsen, R. (2013). Calculation of Tajima's D and other neutrality test statistics from low depth next-generation sequencing data. *BMC bioinformatics*, 14(1), 289.
31. KVÁČ, M., KOUBA, M., & VÍTOVEC, J. 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary parasitology*, 137(3), 202-209.

32. LI, N., XIAO, L., CAMA, V. A., ORTEGA, Y., GILMAN, R. H., GUO, M., & FENG, Y. 2013. Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerg Infect Dis*, 19(10), 1573-82.
33. MADDOX-HYTTEL, C., LANGKJÆR, R. B., ENEMARK, H. L., & VIGRE, H. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs—occurrence and management associated risk factors. *Veterinary parasitology*, 141(1), 48-59.
34. MARGUERITTE, J., Mattion, N., Blackhall, J., Fernández, F., Parreño, V., Vagnozzi, A., ... & Combessies, G. (2005). Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y tratamiento. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1, 11-13.
35. MARROQUÍN, M. M. E., Janeth, B. P. D., Carolina, G. M., & YeisonAndres, R. C. (2018). Encephalitozoon cuniculi en conejo doméstico. reporte de un caso.
36. MAZURIE, A. J., Alves, J. M., Ozaki, L. S., Zhou, S., Schwartz, D. C., & Buck, G. A. (2013). Comparative genomics of *Cryptosporidium*. *International journal of genomics*, 2013.
37. MOLINA, M., López, U., González, Z., Gómez, P., & Pezo, C. (2009). *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo en la diarrea neonatal en alpacas de Puno. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(2), 263-269.
38. PEÑA, S. F. NEONATAL EN DOS REGIONES DE CHILE USANDO EL GEN gp60 (2016).
39. PLUTZER, J., & KARANIS, P. 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary parasitology*, 165(3), 187-199.
40. PUIU, D., ENOMOTO, S., BUCK, G. A., ABRAHAMSEN, M. S., & KISSINGER, J. C. 2004. CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic acids research*, 32(suppl 1), D329-D331.
41. PULIDO-Medellín, M. O., Andrade-Becerra, R. J., Rodríguez-Vivas, R. I., & García-Corredor, D. J. (2014). Prevalencia y posibles factores de riesgo en la excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp en bovinos de Boyacá, Colombia. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 5(3), 357-364.
42. RAMÍREZ-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., & Fragoso, J. M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta medica de Mexico*, 149(2), 220-228.
43. RIDER, S. D., & ZHU, G. 2010. *Cryptosporidium*: genomic and biochemical features. *Experimental parasitology*, 124(1), 2-9.

44. SÁNCHEZ, R., Romero, J., & Rossanigo, C. (2013). EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE COCCIDIOS Y CRYPTOSPORIDIUM.
45. SULLIVAN, & Widmer, G., (2012). Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite immunology*, 34(2-3), 61-71.
46. STERN, A., DORON-FAIGENBOIM, A., EREZ, E., MARTZ, E., BACHARACH, E., PUPKO, T. SELECTON 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Research*. 35: W506-W511.
47. STRIEPEN, B., WHITE, M. W., LI, C., GUERINI, M. N., MALIK, S. B., LOGSDON, J. M., ... & ABRAHAMSEN, M. S. 2002. Genetic complementation in apicomplexan parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6304-6309.
48. STENSVOLD, C. R., Beser, J., Axén, C., & Lebbad, M. (2014). High applicability of a novel method for gp60 subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of clinical microbiology*, JCM-00598.
49. STENSVOLD, Christen Rune, et al. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of clinical microbiology*, 2014, vol. 52, no 7, p. 2311-2319.
50. TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
51. TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., & KUMAR, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.
52. TEAM, R. C. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012). URL: [http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org).
53. TOMAZIC, M. L., MAIDANA, J., DOMINGUEZ, M., URIARTE, E. L., GALARZA, R., GARRO, C., ... & SCHNITTGER, L. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Veterinary parasitology*, 198(3), 382-386.
54. TROTZ-WILLIAMS, L. A., MARTIN, S. W., LESLIE, K. E., DUFFIELD, T., NYDAM, D. V., & PEREGRINE, A. S. 2007. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive veterinary medicine*, 82(1), 12-28.
55. URIBARREN, T. B. CRYPTOSPORIDIOSIS o CRYPTOSPORIDIASIS o CRIPTOSPORIDIOSIS 2018;

56. WYATT, CAROL, RIGGS, MICHAEL W, et al Cryptosporidiosis in Neonatal Calves, *Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice* 2010; 89-103-6.
57. VERGARA-Castiblanco, C., Sánchez-Acedo, C., Del Cacho, E., & López-Bernad, F. (2001). Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en ganado caprino en la provincia de Zaragoza. Estudio preliminar. *Acta Parasitol Port*, 8, 167.
58. XIAO, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental parasitology*, 124(1), 80-89.
59. XIAO, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A. A., Montali, R. J., ... & 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.
60. ZANARO, N. L., & Garbossa, G. (2008). *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 195-201.