



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
TESIS DE LICENCIATURA

“DETECCIÓN MOLECULAR DE PROTOZOOS PARÁSITOS (*Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*) EN MUESTRAS DE AGUA Y AIRE, PROVENIENTES DE LA BAHÍA DE PANAMÁ DURANTE LA ESTACIÓN SECA Y LLUVIOSA”

PRESENTADO POR:

CARRASCO, JACOB 4-791-2018

ROJAS, NELSON 8-938-1342

DIRIGIDO POR:

RÍOS, NIVIA

MARTÍNEZ TORRES, ALEX

QUEROL-AUDI, JORDI

SÁNCHEZ, MAGALY

Trabajo de graduación para optar por el título de licenciatura en Biología, con orientación en Microbiología y Parasitología. Título de licenciatura en Biología, con orientación en Genética y Biología Molecular.

Panamá, República de Panamá 2024.

DEDICATORIA

Este esfuerzo se lo dedicamos a Dios, primeramente, por permitirnos llegar hasta acá, a nuestros asesores por la confianza que nos brindaron, por el tiempo invertido en nosotros y sus conocimientos compartidos. A nuestros padres por su sacrificio diario en permitirnos alcanzar nuestras metas, por sus apoyos en esta carrera y esas palabras de aliento y ánimo diario en este largo camino.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios por permitirnos lograr otra meta más en este largo camino, por darnos esa fuerza diaria y ánimo que nos permitió dedicarnos a lograr cada prueba y objetivo en esta hermosa carrera.

A nuestros asesores, Magister Nivia Ríos por su tiempo invertido en toda la información necesaria en este proyecto, por sus conocimientos compartidos con nosotros y consejos para obtener los mejores resultados, al Doctor Alex Omar Martínez Torres por ser nuestro guía en el laboratorio, por facilitarnos todo lo que necesitábamos para nuestro trabajo experimental, por brindarnos cada minuto de su tiempo para saber nuestra evolución diaria en lo que hacíamos, por su apoyo moral cuando los resultados no eran los esperados y darnos una solución, al Doctor Jordi Querol-Audi por ser quien nos orientaba en cada actividad dentro del laboratorio, por compartirnos su valioso conocimiento en cada paso, por darnos también las mejores soluciones a cada contratiempo y por hacer que cada uno de nuestros resultados fuesen lo mejor posible.

A los laboratorios de Microbiología de aguas (LAMA) y Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) por acogernos y el apoyo brindado durante la realización de nuestra investigación.

Al Ministerio de Ambiente por la financiación del proyecto mediante el convenio N° 0-26-45-2019 de detección molecular y análisis filogenético de virus, bacteriófagos, bacterias, hongos filamentosos y parásitos patógenos en aire y agua provenientes de la bahía de Panamá del fondo de agua, áreas protegidas y vida silvestre, donde el investigador principal es e Dr. Alex O. Martínez Torres. Al financiamiento por parte de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado (VIP) con el concurso CUF1-2022-CNET-EG-011 para la realización de este proyecto y su culminación posible.

A nuestros padres por darnos su confianza en haber elegido esta carrera, por apoyarnos día a día en lo que hacíamos, por darnos ánimo para lograr cada meta que nos proponemos y por acompañarnos en los momentos frustrantes de este camino y aquellos de alegría como en la culminación de este trabajo de graduación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	5
INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Protozoos intestinales:	9
2.2 Generalidades	9
2.3 Sintomatología asociada a protozoos patógenos	12
2.4 Técnicas moleculares para la detección de los diferentes parásitos infecciosos	12
2.5 Genes de Referencia	13
CAPÍTULO II	17
MARCO METODOLÓGICO	17
3.1 Sitios de Muestreo:	18
3.2 Extracción del material genético y Purificación	19
3.3 Secuenciación y Diagnóstico	23
CAPÍTULO IV	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4. Resultados	28
4.1 Discusión	32
CAPÍTULO IV	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5. Conclusiones	39
Referencias Bibliográficas	41
ANEXOS	49

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Descripción morfológica de Giardia: Trofozoito y quiste. Modificado de Ankarklev, 2010.-----	10
Figura 2. Imagen de microscopía de Cryptosporidium spp. Cortesía de MedlinePlus.gov.-----	11
Figura 3. Fotografía de microscopía de un ovoquiste inmaduro con citoplasma indiferenciado (izq.) y (der.) ovoquiste diferenciando en 2 esporoquistes de Cyclospora sp. Cortesía del CDC/DPDM.-----	11
Figura 4. Mapa de los sitios de muestreo, extraído de Google Earth.-----	19
Tabla 1. Información de los cebadores para la PCR – nPCR.-----	23
Tabla 2. Condiciones de PCR y nPCR en tiempo final para Giardia sp., Cryptosporidium sp. y Cyclospora sp.-----	26
Figura 5. Electroforesis de resultados de Giardia sp. en temporada lluviosa, meses de octubre, noviembre y diciembre (ambas matrices).-----	28
Figura 6. Electroforesis de resultados Cyclospora sp. en temporada lluviosa (octubre y noviembre).-----	28
Figura 7. Resultados de Cryptosporidium sp. En temporada lluviosa, meses de octubre, noviembre, diciembre. Todas las muestras salieron negativas para las dos matrices, aire y agua.-----	29
Figura 8. Diagrama de Venn, resultados de temporada lluviosa (72 muestras en total).-----	29
Figura 9. Electroforesis de resultados Giardia sp. en temporada seca, matriz aire.-----	29
Figura 10. Resultados de Cyclospora sp. en temporada seca, meses de marzo, abril y mayo.-----	30
Figura 11. Resultados de Cryptosporidium sp. en temporada lluviosa, meses de marzo, abril y mayo.-----	30
Figura 12. Diagrama de Venn, resultados de temporada seca (72 muestras en total).-----	31
Tabla 3. Comparación de resultados entre las temporadas y matrices.-----	31
Tabla 4. Resultados de detección de parásitos en ambas matrices (agua y aire) por sitio de muestreo.-----	31
Figura 13. GenElute™ Stool DNA Isolation Kit de Sigma-Aldrich.-----	50
Figura 14. QIAamp Fast DNA Stool mini kit de Qiagen.-----	50
Figura 15. Nucleospin Soil de Macherey-Nagel Kit de Extracción-----	50
Figura 16. Crio cajas con las 144 muestras correspondientes a temporada seca y lluviosa.-----	51
Figura 17. Proceso de extracción ADN para las 144 muestras-----	51

Figura 18. Cuantificación de ADN total.-----	51
Figura 19. Preparación de la corrida electroforesis en gel de agarosa.-----	51
Figura 20. Electroforesis para detección de Giardia sp. en temporada seca marzo (matriz agua).-----	52
Figura 21. Electroforesis detección de Giardia sp. Temporada seca abril (matriz agua). -----	52
Figura 22. Electroforesis detección de Giardia sp. Temporada seca mayo (matriz agua).-----	52
Figura 23. Electroforesis para detección de Giardia sp. en temporada seca marzo (matriz aire).-----	52
Figura 24. Electroforesis detección de Giardia sp. en temporada seca abril (matriz aire).-----	52
Figura 25. Electroforesis para detección de Giardia sp. Temporada seca mayo (matriz aire).-----	52
Figura 26. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. Temporada seca marzo (matriz agua).-----	53
Figura 27. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. Temporada seca abril (matriz agua).-----	53
Figura 28. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. Temporada seca mayo (matriz agua).-----	53
Figura 29. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. Temporada seca marzo (matriz aire).-----	53
Figura 30. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. Temporada seca abril (matriz aire).-----	53
Figura 31. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. Temporada seca mayo (matriz aire).-----	53
Figura 32. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada seca marzo (matriz agua).-----	54
Figura 33. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada seca abril (matriz agua).-----	54
Figura 34. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada seca mayo (matriz agua).-----	54
Figura 35. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada seca marzo (matriz aire).-----	54
Figura 36. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada seca abril (matriz aire).-----	54
Figura 37. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada seca mayo (matriz aire).-----	54
Figura 38. Electroforesis detección de Giardia sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz agua).-----	55

Figura 39. Electroforesis detección de Giardia sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz agua).-----	55
Fig. 40. Electroforesis detección de Giardia sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz agua).-----	55
Fig.41. Electroforesis detección de Giardia sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz aire).-----	55
Figura 42. Electroforesis detección de Giardia sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz aire). -----	55
Fig 43. Electroforesis detección de Giardia sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz aire). -----	55
Figura 44. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz agua).-----	56
Fig. 45. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz agua).-----	56
Fig. 46. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz agua).-----	56
Fig. 47. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz aire). -----	56
Fig. 48. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. Temporada lluviosa noviembre (matriz aire). -----	56
Fig. 49. Electroforesis detección Cryptosporidium sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz aire).-----	56
Figura 50. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada lluviosa octubre (matriz agua).-----	57
Fig. 51. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz agua).-----	57
Fig. 52. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada lluviosa diciembre (matriz agua).-----	57
Fig. 53. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz aire). -----	57
Fig. 54. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz aire). -----	57
Fig. 55. Electroforesis detección Cyclospora sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz aire). -----	57
Tabla 5. Resumen general de la detección de parásitos. -----	58
Tabla 6. Resultados específicos para las muestras analizadas. -----	58
Tabla 7. Tablas comparativas detección clásica y molecular (ambas matrices). -	59
Figura 56. Resultados agrupados detección de parásitos por sitio de muestreo. -	60
Figura 57. Comparación de positivos entre las temporadas. -----	60

RESUMEN

Según el MINSA, uno de los graves problemas ambientales en Panamá es la contaminación de las aguas superficiales, donde los niveles de contaminación en la bahía de Panamá son muy altos, lo cual ha provocado una proliferación de enfermedades de la piel, gastrointestinales e infecciosas a la población. Los protozoos intestinales representan una gran problemática de salud humana, ya que protozoos patógenos como *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., entre otros, son responsables de un gran número de problemas principalmente gastrointestinales, siendo los niños y personas inmunosuprimidas, los más susceptibles a estas infecciones. Mediante el agua se genera un conjunto de unidades biológicas suspendidas en el aire como microgotas llamadas bioaerosoles, que van de 0.5 a 30 µm de diámetro y el viento sirve como medio de transporte para su dispersión. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue la detección molecular de protozoarios patógenos en el aire y agua de la Bahía de Panamá. Para esto, se analizaron 144 muestras ambientales (72 de aire y 72 de agua) correspondientes a 12 sitios a lo largo de la zona de la bahía de Panamá. Se realizó la detección molecular de 3 parásitos protozoarios de interés siguiendo la metodología de extracción de ADN, amplificación por PCR anidada-tiempo final y la visualización posterior mediante electroforesis en gel de agarosa. En todos los puntos de muestreo se detectó al menos un parásito de interés. El microorganismo más prevalente fue *Cyclospora* sp., encontrándose en un 58% de las muestras, seguido de *Giardia* sp. con un 20%, sin embargo, no se detectó la presencia de *Cryptosporidium* sp. La temporada seca mostró mayor prevalencia que la temporada lluviosa, reportando un 94% y 36%, respectivamente. En conclusión, los protozoos de interés se detectaron mediante PCR anidada (nPCR), excepto *Cryptosporidium* sp.

Palabras claves: *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, PCR anidada, ambiente.

ABSTRACT

According to MINSA, one of the serious environmental problems in Panama is the contamination of surface waters, where pollution levels in the Bay of Panama are very high, which has led to a proliferation of skin, gastrointestinal, and infectious diseases among the population. Intestinal protozoa represent a major human health problem, since pathogenic protozoa such as *Giardia sp.*, *Cryptosporidium sp.* and *Cyclospora sp.*, among others, are responsible for a large number of mainly gastrointestinal problems, with children and immunosuppressed people being the most susceptible to these infections. Water generates a set of biological units suspended in the air as microdroplets called bioaerosols, ranging from 0.5 to 30 μm in diameter, and the wind serves as a means of transport for their dispersion. For this reason, the objective of this work was the molecular detection of pathogenic protozoa in the air and water of Panama Bay. For this purpose, 144 environmental samples (72 air and 72 water samples) corresponding to 12 sites along the Panama Bay area were analyzed. Molecular detection of 3 protozoan parasites of interest was performed following the methodology of DNA extraction, amplification by end-point nested PCR and subsequent visualization by agarose gel electrophoresis. At least one parasite of interest was detected at all sampling points. The most prevalent microorganism was *Cyclospora sp.*, found in 58% of the samples, followed by *Giardia sp.* with 20%, however, the presence of *Cryptosporidium sp.* was not detected. The dry season showed higher prevalence than the rainy season, reporting 94% and 36%, respectively. In conclusion, the protozoa of interest were detected by nested PCR (nPCR), except for *Cryptosporidium sp.*

Keywords: *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, PCR, environment.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y

MARCO TEÓRICO

1. INTRODUCCIÓN

Según el MINSA (2014), uno de los graves problemas ambientales en Panamá es la contaminación de las aguas superficiales, donde los niveles de contaminación en la bahía de Panamá son muy altos, lo cual ha provocado una proliferación de enfermedades de la piel, gastrointestinales e infecciosas a la población.

Estudios realizados en la bahía de Panamá demuestran los altos niveles de contaminación orgánica e inorgánica por encima de los niveles aceptables para el sostenimiento de la vida acuática y de las actividades comerciales y recreacionales (Grey *et al.*, 2014).

Los protozoos intestinales representan una gran problemática de salud humana, ya que protozoos patógenos como *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp., entre otros, son responsables de un gran número de problemas, principalmente gastrointestinales, siendo los niños y personas inmunosuprimidas, los más susceptibles a estas infecciones (Solarte, 2006).

La transmisión de enfermedades de origen hídrico está relacionada con la contaminación de origen fecal en aguas residuales y potables. Estas enfermedades son causadas por la presencia de parásitos, los cuales tienen una alta incidencia en la población infantil (Castillo y Rovira, 2020). *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* spp. se han seleccionado como organismos indicadores de contaminación de origen parasitario y su análisis es útil para evaluar la calidad del agua y determinar el riesgo sanitario (Manjarrez *et al.*, 2019).

Mediante el agua se genera un conjunto de unidades biológicas suspendidas en el aire como microgotas llamadas bioaerosoles, que van de 0.5 a 30 μm de diámetro y el viento sirve como medio de transporte para su dispersión. La inhalación, ingestión y contacto superficial son las vías de exposición a los organismos en aire. El asma, la neumonía por hipersensibilidad y otras enfermedades respiratorias

están asociadas con la exposición a los bioaerosoles (NIOSH, 2010). Su alta resistencia, el hecho de que se encuentran diseminados por todo el mundo, de que infecten individuos debilitados o inmunodeprimidos y el difícil manejo de su infección y profilaxis, hace que estas infecciones sean de suma importancia a nivel mundial (Serra, 2017).

Nuestro clima tropical hace que Panamá sea un área endémica e ideal para que se den infecciones por protozoos tales como: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Cyclospora cayetanensis*. Estas infecciones son muy fáciles de adquirir, porque estos organismos se encuentran en gran porcentaje en el ambiente y son difíciles de erradicar, debido a que tienen formas de resistencia conocidas como quistes y ooquistes, que les permiten sobrevivir a situaciones adversas y vivir en el ambiente en condiciones adecuadas de temperaturas y humedad, por más de un año (Guillén, 2016).

La criptosporidiosis (infección producida por *Cryptosporidium* sp.) es la cuarta causa principal de muerte entre niños menores de 5 años, con 1.3 millones de muertes en todo el mundo en 2015, lo que representa el 12.1% de las muertes en todo el mundo en niños menores de 5 años (Zahedi y Ryan, 2020).

Tanto *Cryptosporidium* como *Giardia*, son patógenos para los humanos y son de distribución mundial y su presencia es significativa en aguas superficiales ambientales. Es por ello, que son de particular interés para las cuencas hidrográficas que sirven de suministro a las plantas de tratamiento de agua para consumo humano (Efstratiou, 2017).

En *Cyclospora* sp., los ooquistes son robustos y pueden sobrevivir durante largos períodos en el ambiente, y su transmisión puede ocurrir a través de alimentos y aguas contaminadas por heces humanas o aguas residuales. Una alta resistencia al cloro hace que la desinfección primaria del agua potable sea ineficaz contra este grupo particular de parásitos. Las evaluaciones de riesgo de la ciclosporiasis

transmitida por el agua se ven obstaculizadas por la falta de datos sobre la esporulación, la supervivencia, el destino y el transporte de los ooquistes, la infectividad humana y la susceptibilidad (Shields y Olson, 2003).

Los porcentajes de especies genéticamente parecidas es alto y, por ende, se requiere de la utilización de mecanismos más precisos y sensibles que puedan diferenciar entre las especies, especialmente cuando se trata de organismos como *Cyclospora* sp., por su alto porcentaje genético de similitud (98%) con *Eimeria* sp. (Jinneman *et al.*, 1999).

Para ello, es indispensable la utilización de técnicas específicas que permitan la precisa identificación de estos microorganismos, como, por ejemplo, técnicas moleculares tipo PCR, que utilizan genes específicos del parásito (García *et al.*, 2017), de manera que se eviten confusiones de parásitos por sus similitudes morfológicas al identificarlos por otros métodos tradicionales (Almeria *et al.*, 2019).

En Panamá, se conoce poco sobre la presencia y concentración de protozoos en el agua y aire de la bahía, por lo que es importante determinar cuáles son los riesgos sanitarios. Existe la necesidad de identificar qué áreas a lo largo de la bahía están más contaminadas para poder establecer valores de referencia y posteriormente, se den monitoreos y puedan tomarse medidas en beneficio de la población. El propósito de este proyecto es evaluar la presencia de protozoos en agua y aire de 12 sitios de muestreo a lo largo de la bahía de Panamá y determinar cuáles son los sitios con más contaminación durante la temporada seca y lluviosa. También, mediante este estudio, se puede demostrar la eficiencia que ha tenido el proyecto de saneamiento de la bahía desde su creación hasta la actualidad. Los resultados generados en este estudio, servirán para futuros proyectos de investigación y además, tiene impacto en el ámbito social, económico y principalmente, en la salud de la población panameña.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Protozoos intestinales:

Las infecciones humanas por protozoos intestinales tienen una alta prevalencia y distribución a nivel mundial. Aunque hay muchos casos de pacientes asintomáticos, algunos de los síntomas más comunes de una infección por protozoos son los cuadros diarreicos, náuseas, pérdida de peso, entre otros. Los protozoos intestinales de mayor prevalencia son *Giardia sp.*, *Entamoeba sp.* y *Cryptosporidium sp.* Estos tipos de microorganismos se caracterizan por poseer dentro de su ciclo biológico, etapas de quistes u ooquistes que son altamente resistente al ambiente. La transmisión de este tipo de organismos suele ser por contacto fecal-oral o por consumo de agua o alimentos contaminados (Rojo-Marcos y González, 2016).

Los protozoos, al ser organismos unicelulares, se clasifican de manera simple por su morfología, distinguiendo así formas ameboides, flagelados o ciliados o tipo coccidios, y suelen alimentarse mediante procesos de pinocitosis o fagocitosis (Tenesaca y Maldonado, 2019).

2.2 Generalidades

2.2.1 *Giardia sp.*: es un protozoo flagelado que, de acuerdo con la clasificación taxonómica de los protozoos de Levine, pertenecería al Phylum Sarcomastigophora y al Orden Diplomonadida. De acuerdo con su morfología y disposición de estructuras microtubulares, desde 1990 se admiten 3 grupos de especies: *Giardia agilis*, *Giardia muris* y *Giardia intestinalis (duodenalis o lamblia)* (Soriano, s.f.).

Posee un ciclo de vida simple y directa, con 2 fases: la primera de quiste, que es infectiva y altamente resistente al ambiente, y la segunda que comprende al trofozoito que coloniza el duodeno y yeyuno del intestino delgado, principalmente. Presenta reproducción únicamente asexual por fisión binaria (Baker y Muller, 1993). La *Giardia* posee quistes de morfología elíptica de 8 a 12 μm de longitud por 5 a 8 μm de ancho. En el citoplasma, se pueden observar 8 axonemas (6 centrales y 2 periféricos) y los quistes inmaduros poseen 2 núcleos, mientras que los quistes maduros son tetranucleados (Soriano, s.f.). Su etapa de trofozoíto, tiene forma de

pera alargada con un largo de 12 a 15 μm y 5 a 9 μm ancho, y posee 2 núcleos sin nucleolo, dispuestos de manera simétrica y sus característicos 8 flagelos (Fig. 1) (Rodney, 2001).

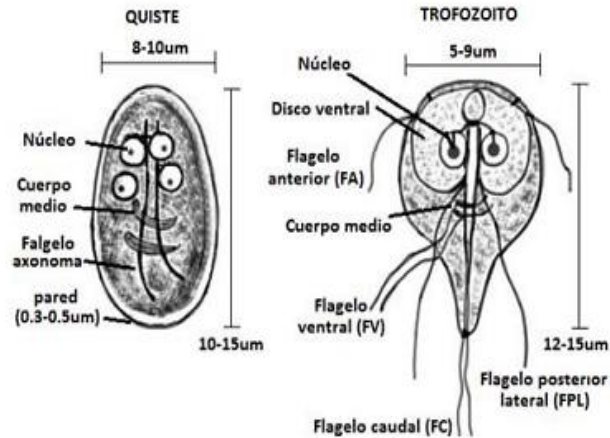


Figura 1. Descripción morfológica de Giardia: Trofozoito y quiste. Modificado de Ankarklev, 2010.

2.2.2 *Cryptosporidium* sp.: microorganismo patógeno que pertenece al Filo Apicomplexa con 14 especies reconocidas. Este es un género de protozoo parásito, que afecta a una gran cantidad de animales incluido el hombre, siendo *Cryptosporidium parvum* y *C. hominis*, los que poseen mayor distribución. Cabe destacar que, aunque para efectos de diagnóstico clínico se les agrupa junto a los coccidios, estudios moleculares han determinado que pertenecen a grupos diferentes, aunque presenten similitudes (Chacín-Bonilla, 2006).

Posee un ciclo biológico del tipo monoxeno incluyendo la fase de ooquiste (el cual es altamente resistente, pudiendo permanecer en el ambiente hasta 6 meses siendo infeccioso) y la fase de esporozoito, del cual puede continuar todo el ciclo de vida dentro de su hospedero (Huang y White, 2006). Posee una morfología particular, diferenciándose de otros miembros del Filo Apicomplexa. Presenta ooquistes que miden de 4 a 6 μm de diámetro con 4 esporozoitos en su interior, los cuales son liberados en el hospedero infectado (Fig. 2) (Dávila y Fernández, 2017).

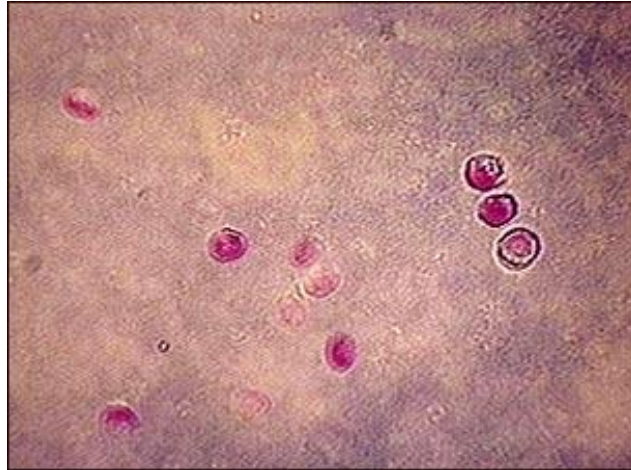


Figura 2. Imagen de microscopía de *Cryptosporidium* spp. Cortesía de MedlinePlus.gov.

2.2.3 Cyclospora sp.: Este protozoo pertenece al Filo Apicomplexa, Familia Eimeriidae y se distinguen 13 especies. Posee una morfología típica redonda para el ooquiste con un aproximado de entre 7.5 a 10 μm de diámetro con una doble pared gruesa (Fig. 3). A su vez, el ooquiste maduro infectante contiene 2 esporoquistes ovoides con 2 esporozoitos en su interior (Ortega y Sánchez, 2010). Este protozoo posee un ciclo de vida monoxeno, ya que una vez el hospedero se infecta con ooquistes provenientes del medio externo, éste viaja por el tracto gastrointestinal hasta llegar al intestino delgado, donde colonizará los enterocitos (Almeria, *et al.*, 2019).



Figura 3. Fotografía de microscopía de un ovoquiste inmaduro con citoplasma indiferenciado (izq.) y (der.) ovoquiste diferenciando en 2 esporoquistes de *Ciclospora* sp. Cortesía del CDC/DPDM.

2.3 Sintomatología asociada a protozoos patógenos

2.3.1 Giardiasis: Es causante de diarreas crónicas o grasosas (esteatorrea), pérdida de peso, náuseas y vómitos, aumento de gases, cólicos e hinchazón abdominal, y la mala absorción de lactosa, así como de vitaminas. Sin embargo, se ha descrito que muchos infectados pueden ser asintomáticos (alrededor del 50%) (Soriano, s.f).

2.3.2 Criptosporidiosis: es causante de diarrea profusa, dolores abdominales, náuseas y vómitos, fiebre, falta de apetito y pérdida de peso, y también, de inflamación del páncreas o colon, en algunos casos. Sin embargo, se ha descrito que algunos pacientes pueden ser asintomáticos (Cama y Mathison, 2015).

2.3.3 Cyclosporiasis: es causante de diarrea crónica y hasta explosiva, pérdida de peso y apetito, dolores abdominales y cólicos, aumento de gases y fatiga. También, se ha descrito la alta resistencia que presentan los ooquistes de este protozoo, por ejemplo: son capaces de resistir bajas temperaturas de hasta 4°C por 2 meses y hasta 37°C por 1 semana. De igual manera, son muy resistentes al tratamiento del agua, como el uso de desinfectantes y cloración, aunque se ha visto que tienen una alta sensibilidad a la desecación, ya que sus paredes se empiezan a romper aproximadamente a los 15 min (Chacín-Bonilla y Barrios, 2011).

2.4 Técnicas moleculares para la detección de los diferentes parásitos infecciosos

Los métodos basados en ácidos nucleicos para la detección de los diferentes parásitos infecciosos ofrecen muchas ventajas sobre la microscopía y los métodos inmunológicos. Además de ser altamente sensibles y específicos, permiten identificar la especie hospedera, el genotipo y el subgenotipo y, además, permiten identificar la fuente y la gravedad de la infección en caso de una situación de brote (Hassan y Örmeci, 2021).

2.4.1 PCR anidada o nested: utiliza dos pares de cebadores, donde el primer par de cebadores se une a secuencias fuera del ADN objetivo y el producto sirve como

plantilla para el segundo par de cebadores. Además, la PCR anidada aumenta la sensibilidad y la especificidad al disminuir la unión no específica resultante del primer conjunto de cebadores. La PCR anidada se ha utilizado con éxito en la detección de ooquistes en aguas superficiales, aguas residuales y en muestras fecales humanas y animales (Monis y San, 2001; Hassan y Örmeci, 2021).

2.4.2 PCR Múltiple: las PCR múltiples son aquellas, en general, que en el proceso de amplificación participan más de dos iniciadores amplificando en un único tubo varias secuencias dianas, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth, 2004). Una prueba de PCR múltiple permitiría la especiación rápida de un subconjunto de especies de protozoos como *Cryptosporidium* que se encuentran con mayor frecuencia en el ganado (Santin y Zarlenga, 2009).

2.4.3 Técnica de secuenciación: el método más popular de identificación de especies en muestras positivas es la secuenciación. Este método es muy sensible y puede detectar una gran variedad de especies y genotipos como se comprobó con la secuenciación del gen 18S ARN ribosomal (ARNr) de *Cryptosporidium* (Silverlas *et al.*, 2010). Con la secuenciación del gen completo, se identifican todas las secuencias de las regiones hipervariables, por lo que se ha logrado clasificar hasta nivel taxonómico de especie. La secuenciación de próxima generación, también llamada secuenciación masiva o de alto rendimiento, ha ayudado a describir metagenomas complejos como los de muestras ambientales, con importancia ecológica, así como metagenomas que crecen en ambientes extremos (Cortés-López *et al.*, 2020).

2.5 Genes de Referencia

Los genes de referencia son secuencias de genes conservados que se utilizan como controles positivos. Para que un gen se considere una referencia fiable, debe cumplir varios criterios, siendo uno de los más importantes su nivel de expresión no afectado por factores experimentales. Además, debe mostrar una mínima variabilidad en su expresión entre tejidos y estados fisiológicos del organismo. El

gen de referencia debe, a su vez, demostrar la variabilidad resultante de las imperfecciones de la tecnología utilizada y los procedimientos preparatorios, lo que asegura que cualquier variación en la cantidad de material genético se relacionará en la misma medida que el objeto de investigación y control (Kozera y Rapacz, 2013).

Los genes diana que se utilizan habitualmente para la identificación de *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp. son: gen de la β -giardin, gen COWP-proteína de pared celular del ooquiste y gen de la subunidad pequeña ARNr 18S, respectivamente (Lalle *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2009; Resendiz-Nava *et al.*, 2020).

2.5.1 Gen de la β -giardin

Las giardinas se definen como una familia de proteínas estructurales que tienen un tamaño aproximado de 29 a 38 kDa y una estructura de hélice alfa enrollada (Holberton *et al.*, 1988). Las proteínas se encuentran en los bordes de las microcintas (o cintas dorsales), las cuales son parte integral del disco ventral del trofozoíto (Adam, 2001). La ventaja de utilizar genes giardin como objetivos para la detección molecular de los quistes de *Giardia*, es que se consideran exclusivos de este parásito (Faubert, 2000).

2.5.2 Gen COWP-proteína de pared celular del ooquiste

La microscopía inmunoelectrónica demostró que la COWP está presente en la pared interna del ooquiste y en el interior de los cuerpos formadores de pared de los macrogametos maduros. La COWP1, tiene una sorprendente periodicidad de cisteína, con residuos de cisteína espaciados aproximadamente cada 10 a 12 aminoácidos debido a conjuntos en tándem de dos dominios ricos en cisteína. Se ha propuesto que una estructura globular extensa con enlaces disulfuro o enlaces disulfuro intermoleculares proporcionan rigidez a la pared del ooquiste (Spano *et al.* 1997).

En la investigación de sensibilidad comparativa de los juegos de cebadores de PCR para la detección de *Cryptosporidium parvum* (Ran Yu *et al.*, 2009), el gen-1 de

COWP fue el producto de PCR amplificado más sensible por los cebadores Cry-15 y Cry-19 (Ran Yu *et al.*, 2009).

2.5.3 Gen ARNr 18S de la subunidad ribosomal pequeña de eucariotas.

Los métodos de detección molecular a menudo se dirigen a regiones conservadas del genoma, por ejemplo, 18s rRNA, que se encuentran en múltiples copias. Por un lado, las características de copias múltiples de estos loci son beneficiosas para la sensibilidad del ensayo (Temesgen, *et al.* 2019). El protocolo de PCR anidado basado en el gen 18S rRNA proporciona un marcador genético útil para la detección del parásito *C. cayetanensis* y lo confirma como una especie genéticamente distinta del género *Cyclospora* (Sulaiman, *et al.* 2014).

Hipótesis

H₁: Las muestras ambientales de agua y aire de la bahía de Panamá poseen protozoos parásitos como *Cryptosporidium sp*; *Giardia sp.* y *Cyclospora sp.*

H₀: Las muestras ambientales de agua y aire de la bahía de Panamá no poseen protozoos parásitos como *Cryptosporidium sp*; *Giardia sp.* y *Cyclospora sp.*

OBJETIVOS

Objetivo General

- Detectar molecularmente la presencia de protozoos intestinales patógenos en muestras ambientales de agua y aire provenientes de 12 puntos de la Bahía de Panamá de época lluviosa de 2019 y seca de 2021.

Objetivos Específicos

- Optimizar la metodología molecular para la detección de parásitos (*Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp.) en muestras ambientales.
- Identificar por PCR anidada protozoos patógenos como *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp., y *Cyclospora* sp. de muestras ambientales (agua y aire) provenientes de la bahía de Panamá.
- Comparar los resultados de la detección en ambas temporadas, estación lluviosa y seca.

CAPÍTULO II

MARCO

METODOLÓGICO

3 METODOLOGÍA

3.1 Sitios de Muestreo:

Las muestras fueron previamente colectadas entre la temporada lluviosa del 2019 y la temporada seca del 2021 (Stapf, 2022; García y Domínguez, 2023). Estas muestras se obtuvieron de 12 zonas a lo largo de la zona costera de la bahía de Panamá, 1 muestra por sitio por mes de muestreo, siendo los meses de muestreo octubre, noviembre y diciembre de 2019 de la época lluviosa y marzo, abril y mayo de 2021 en la época seca, dando un total de 36 muestra de aire y 36 de agua por época, y un gran total de 144 muestras (72 de aguas y 72 de aire, entre ambas estaciones). Estos sitios comprenden el tramo desde Costa del Este hasta Isla Flamenco (Fig. 4).

A continuación, se enumeran los sitios de colecta:

Sitio 1: Costa del Este: Coordenadas: 9° 0'34.00"N 79°28'10.00"W

Sitio 2: Panamá La Vieja: Coordenadas: 9° 0'10.30"N 79°29'37.20"W

Sitio 3: Coco del Mar: Coordenadas: 8°59'41.00"N 79°29'48.00"W

Sitio 4: Boca la Caja: Coordenadas: 8°59'0.40"N 79°30'16.50"W

Sitio 5: Club Unión: Coordenadas: 8°58'30.00"N 79°30'41.00"W

Sitio 6: Salida del río Matasnillo: Coordenadas: 8°58'26.00"N 79°31'5.30"W

Sitio 7: Hospital Santo Tomás: Coordenadas: 8°58'4.00"N 79°31'52.00"W

Sitio 8: Mercado del marisco: Coordenadas: 8°57'35.4"N 79°32'10.3"W

Sitio 9: Las Bóvedas: Coordenadas: 8°57'2.00"N 79°31'57.00"W

Sitio 10: Muro de los poetas: Coordenadas: 8°56'49"N 79°32'41"W

Sitio 11: Antigua ARI: Coordenadas: 8°56'10.00"N 79°32'42.00"W

Sitio 12: Isla Flamenco: Coordenadas: 8°54'28.2"N 79°31'09.0"W

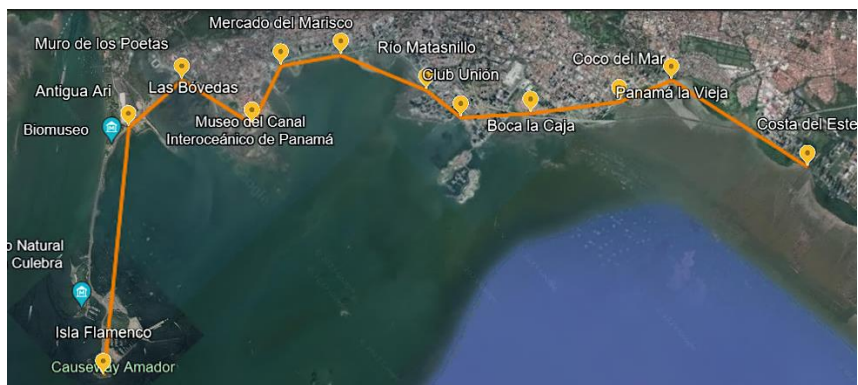


Figura 4. Mapa de los sitios de muestreo, extraído de Google Earth.

3.2 Extracción del material genético y Purificación

A Las muestras obtenidas para cada punto de muestreo en la Bahía, se le practicaron varios procesos de filtración y eliminación de material orgánico. Estos procesos fueron realizados por las Licenciadas Alice, Betzaida y Guadalupe, partícipes del Proyecto Bahía (Stapf, 2022; García y Domínguez, 2023). Dichas muestras ya filtradas se nos compartieron para su subsiguiente procesamiento para la extracción de ADN. Para ello se utilizaron y optimizaron varios kits de extracción:

- A.** GenElute™ Stool DNA Isolation Kit de Sigma-Aldrich.
- B.** QIAamp Fast DNA Stool mini kit de Qiagen.
- C.** Nucleospin Soil de Macherey-Nagel.

A. Protocolo GenElute™ Stool DNA Isolation Kit modificado:

Preparación de lisado: se agregó 250 µL de la muestra a un tubo que contenía 200 µL de buffer de lisis y 5 µL de proteinasa K. Seguidamente, se incubó la muestra a 65°C durante 15 min. A continuación, se dejó en reposo y se transfirió a un tubo de microesferas y se agregaron 800 µL de tampón de lisis (Lisis Buffer L). Después, se llevó al vórtex por 30 s a máxima velocidad para mezclar y romper las células. Luego, se añadió 100 µL de Lisis Aditivo A y se llevó al vórtex por 30 s a máxima velocidad. A continuación, se mantuvo la muestra en agitación en el vórtex durante 3 min para que el movimiento de las perlas rompiera cualquier material y se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente (TA). Después, se transfirió 800 µL del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 2 mL libre de

ADNasa estéril y se añadió 133 μL de Binding Buffer I, se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se incubó durante 10 min en hielo. Luego, se retiró el tubo del hielo y se procedió a calentar rotándolo en la palma de las manos para descongelar con el calor del movimiento. Seguido, se agregó un volumen igual de etanol al 70% al lisado recogido. Finalmente, se llevó el tubo al vortex para mezclar por 30 s a máxima velocidad. Enlace a la columna: se ensambló la columna al tubo de recolección proporcionado. Se aplicaron 600 μL del lisado clarificado con etanol en la columna y se centrifugó a 6000 rpm durante 1 min. Luego, se descartó el fluido del tubo de colecta y se volvió a montar la columna de centrifugación con el mismo tubo de recolección. Después, se repitió este paso con el volumen restante del lisado. A continuación, se aplicaron 500 μL de tampón de lavado SK a la columna y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. Después, se desechó el filtrado y se volvió a montar la columna de centrifugación con su tubo de recolecta. Luego, se aplicó 500 μL de solución de lavado A a la columna y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. Seguido, se desechó el filtrado y se volvió a montar la columna de centrifugación con su tubo de recolecta. Después, se colocó la columna en un tubo de elución nuevo de 1.7 mL y se añadieron 50 μL de tampón de elución B a la columna. Finalmente, se realizó un último centrifugado a 14000 rpm durante 1 min y el ADN genómico purificado se almacenó a -80°C .

B. Protocolo de QIAamp Fast DNA Stool mini kit modificado:

Se pipeteó 250 μL en el tubo de microcentrífuga y se colocó sobre hielo. Se le agregó 250 mL de tampón InhibitEX a cada muestra y se agitó continuamente durante 1 min. Se calentó durante 5 min a 75°C y se colocó en un vórtex durante 15 s. Este paso de calentamiento se hizo con el fin de ayudar a lisar bacterias y otros parásitos. Después, se centrifugaron las muestras a máxima velocidad durante 1 min para sedimentar las partículas de material. Luego, se pipetearon 600 μL del sobrenadante del paso anterior al tubo de microcentrífuga de 2 mL, cuidando de no arrastrar material del tubo. Seguidamente, se pipetearon 15 μL de proteinasa K al tubo de microcentrífuga de 2 mL que contenía los 600 μL de muestra, se mezcló en un vórtex brevemente y después, se añadieron 200 μL del tampón AL a la mezcla, y se mezcló bien en un vórtex por 15 s. Se incubó entre 70° a 80°C durante 2 h y

luego, se centrifugó brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo. Después, se añadieron 400 μ L de etanol (96 – 100%) al lisado y agitó en un vórtex durante 1 min. Se Aplicó con cuidado 600 μ L del lisado del paso anterior a la columna de centrifugación. Luego, se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Se descartó el filtrado del tubo de recogida y se repitió el paso anterior las veces necesarias con el resto del lisado. Con cuidado se añadió 500 μ L de tampón AW1 a los tubos con columnas. Se Centrifugó a máxima velocidad durante 2 min y se desechó el filtrado del tubo de recogida. Con cuidado se añadió 500 μ L de tampón AW2 y se centrifugó a máxima velocidad durante 3 min. Se desechó el tubo de recolección que contenía el filtrado. Se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 3 min (con un tubo de recolección nuevo, incluido). Para finalizar, se transfirió la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga nuevo y etiquetado de 1.5 mL, y se pipetearon 50 μ L de tampón ATE directamente sobre la membrana. Se incubó durante 1 min a TA y luego, se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min para eluir el ADN. Se almacenó entre -30°C y -20°C .

C. Protocolo de Nucleospin Soil kit modificado.

Primero, se transfirieron 250 μ L de muestra a tubos tipo eppendorf y se les agregó 15 μ L de proteinasa k, seguidamente se incubaron a 75°C por 15min. Después, se transfirieron 250 μ L del material al tubo perlado (MN bead tube type A) y se le añadieron 250 μ L del Buffer SL2. Luego, se añadió 15 μ L del Enhancer SX, se fijaron los tubos horizontalmente y se agitaron en un vórtex por 5 min a máxima velocidad. Seguido, se centrifugó por 2 min a máxima velocidad para eliminar la espuma formada. Luego, se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y se agregaron 150 μ L del Buffer SL3. Se agitó en un vórtex por 15 s y seguidamente, se llevó a incubación por 5 min a 4°C , después se centrifugó por 1 min a máxima velocidad. Después, se colocaron los tubos con columnas para remoción de inhibidores en tubos colectores con tapa de 2 mL y se añadieron 700 μ L del sobrenadante del paso anterior. Luego, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min y se repitió las veces necesarias. Después, se descartaron solo las columnas. Se añadió 250 μ L del Buffer SB a los tubos colectores de 2 mL con tapa y se agitó en vortex por 5 s. Luego

se colocaron los tubos con columnas de suelo en los tubos colectores de 2 mL sin tapa. Después, se le añadieron 550 μ L del filtrado anterior y se centrifugó por 1 min a máxima velocidad. Se descartó el filtrado y se repitió el proceso con el resto del filtrado anterior. Se agregó 500 μ L a la columna del Buffer SW1 y se centrifugó por 1 min a máxima velocidad. Se descartó el filtrado y después se agregó 600 μ L del Buffer SW2 a la columna y se agitó en vórtex por 2 s para homogenizar y luego se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad. Se descartó el filtrado y se repitió una segunda vez. Luego, se centrifugó por 2 min a máxima velocidad con el fin de secar la membrana y eliminar residuos del Buffer anterior. Para finalizar, se colocaron los tubos con columnas en tubos eppendorf nuevos y se añadió 50 μ L del Buffer SE directamente a la membrana. Se dejó los tubos en incubación durante 1 min a temperatura ambiente con la tapa abierta y luego de eso se centrifugó por 2 min a máxima velocidad y se almacenaron.

3.3 Secuenciación y Diagnóstico

3.3.1 Cebadores

Tabla 1. Información de los cebadores para la PCR – nPCR.

Organismo	Gen	Target	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	No. Acceso GenBank
<i>Giardia intestinalis</i>	β-giardin Externo:	G376A F	(5'CCATCCATAACGACGCC ATCGCGGCTCTC3')	415	NC_051859.1
		GGR789-809B R	(5'GGCGCTTAGTGCTTTGT GACC3')		
	β-giardin Interno:	G376B F	(5'CGACGCCATCGCGGCT CTCAGGAAGGAGG3')	374	
		G759A R	(5'CGCCCTGGATCTTCGA GACGACGTCT3')		
<i>Cryptosporidium parvum</i>	COWP Externo:	Cry-15	(5'-GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G-3')	550	AB089292
		Cry-9	(5'-GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G-3')		
	COWP Interno:	Cowpnest F	(5'-TGT GTT CAA TCA GAC ACA GC-3')	311	
		Cowpnest R	(5'-TCT GTA TAT CCT GGT GGG C-3')		
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	18 rRNA Externo:	CYCF1E	(5'TACCCAATGAAAACAGT TT3')	630	EU861001.1 KY770759.1 GU557063.1
		CYCR2B	(5'CAGGAGAAGCCAAGGT AGG3')		
	18 rRNA Interno:	CC719	(5'GTAGCCTTCGCGCTT CG3')	298	
		CRP999	(5'CGTCTTCAAACCCCT ACTGTCG3')		

3.3.2 Controles para diagnóstico:

Control *Giardia intestinalis*: Giardia DNA control de AMPLIRUN®, contiene ADN purificado de *Giardia intestinalis* para ser usado como control en técnicas de diagnóstico *in vitro* basadas en amplificación de ácidos nucleicos. Este control tiene como propiedades:

- Genoma microbiano completo cuantificado
- Permite realizar la amplificación de cualquier fragmento del genoma
- Rango de concentración: 10000-20000 copias/μL determinado en Tiempo Real o qPCR
- Válido para cualquier plataforma (PCR Tiempo Real y PCR convencional)
- No contiene material infeccioso
- Presentación liofilizada
- Incluye un vial de resuspensión con agua de grado molecular

Control *Cryptosporidium parvum*: Cryptosporidium DNA control de AMPLIRUN®, contiene ADN purificado de *Cryptosporidium parvum* para ser usado como control en técnicas de diagnóstico *in vitro* basadas en amplificación de ácidos nucleicos.

- Genoma microbiano completo cuantificado
- Permite realizar la amplificación de cualquier fragmento del genoma
- Rango de concentración: 700-2.000 copias/μL determinado por PCR en Tiempo Real o qPCR
- Válido para cualquier plataforma (PCR Real-Time y PCR convencional)
- No contiene material infeccioso
- Presentación liofilizada
- Incluye un vial de resuspensión con agua de grado molecular

Control *Cyclospora cayetanensis*: código Genbank: AF111183.1 gen 18s rARN *Cyclospora cayetanensis*. Utilización de la secuencia con el código de GenBank y enviado a sintetizar con TWIST BIOSCIENCE. Secuencia con 636 pb, tamaño suficiente para su amplificación.

3.3.3 Protocolos de Detección Molecular

***Cryptosporidium* sp.:** La primera ronda consistió en la amplificación de un fragmento de 550 pb para *Cryptosporidium parvum* empleando una concentración de 25 µM de los cebadores para la PCR, en una mezcla de 25 µL. Para el proceso de amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador. Precaentamiento 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C 50 s, 52°C por 30 s, 72°C por 50 s y una extensión final de 72°C por 10 min. Para la segunda ronda, se añadieron 2.0 µL del producto de ADN obtenido en la primera ronda. La mezcla consistió en 10 µL GoTaq colorless Master Mix 2X Promed, 0.5 µL Primer Forward, 0.5 µL Primer Reverse y 7 µL H₂O. **Programa de PCR:** precaentamiento 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C 50 s, 60°C por 30 s, 72°C por 50 s y una extensión final de 72°C por 10 min. Se obtuvo como producto de esta 2da amplificación, un fragmento de ADN de 311 pb del gen esperado (Yu, 2009).

***Giardia* sp:** La primera ronda consistió en la amplificación de un fragmento de 415 pb para *Giardia intestinalis* empleando una concentración de 25 µM de los cebadores para la PCR, en una mezcla de 25 µL. Para el proceso de amplificación de ADN se colocaron las muestras en el termociclador: 12.5 µL GoTaq colorless Master Mix 2X Promed, 0.5 µL Primer Forward, 6 µL de la muestra de ADN, 0.5 µL Primer Reverse y 5.5 µL H₂O. **Programa de PCR:** precaentamiento 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C 30s, 52°C por 30s, 72°C por 30s y una extensión final de 72°C por 10 min. Para la segunda ronda, se añadió 2.0 µL del producto de ADN obtenido en la primera ronda. La mezcla consistió en 10.0 µL GoTaq colorless Master Mix 2X Promed, 0.5 µL Primer Forward, 0.5 µL Primer Reverse y 7 µL H₂O. **Programa de PCR anidada:** precaentamiento 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final de 72°C por 10 min, para obtener como producto, un fragmento de ADN de 374 pb del gen esperado (Cheun, *et al.* 2013).

***Cyclospora* sp.:** La primera reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía cada cebador (25 µM) 0.5 µL Forward, 0.5 µL reverse, 12.5 µL de GoTaq colorless Master Mix 2X Promed y 5 µL de ADN extraído y 6.5 µL H₂O.

Seguido, se utilizaron 2 µL del producto sin diluir del primer paso para realizar la segunda PCR. Los parámetros modificados de ciclado fueron 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 s, 57°C por 15 s, y 72°C por 1 min para el primer paso; y 35 ciclos de 95°C por 15 s, 65°C por 15 s y 72°C por 1 min para el paso anidado (Resendiz-Nava *et al* 2020).

Tabla 2. Condiciones de PCR y nPCR en tiempo final para *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp. y *Cyclospora* sp.

<i>Giardia</i> <i>sp.</i>	Gia externo Vol. 25 µl	1. 95° C, 7:00	35 ciclo	<i>Cryptosporidium</i> <i>sp.</i>	Cry externo Vol. 25 µl	1. 94° C, 5:00	30 ciclo	<i>Cyclospora</i> <i>sp.</i>	Cyc externo Vol. 25 µl	1. 95° C, 5:00	35 ciclo
		2. 95° C, 1:00				2. 94° C, 0:50				2. 95° C, 0:30	
		3. 52° C, 0:40				3. 52° C, 0:30				3. 56° C, 0:30	
		4. 72° C, 0:30				4. 72° C, 0:50				4. 72° C, 1:00	
		5. 72° C, 10:00				5. 72° C, 10:00				5. 72° C, 5:00	
		6. 4° C, ∞				6. 4° C, ∞				6. 4° C, ∞	
	Gia interno Vol. 22.5 µl	1. 95° C, 2:30	35 ciclo		Cry interno Vol. 22.5 µl	1. 94° C, 2:30	30 ciclo		Cyc interno Vol. 22.5 µl	1. 95° C, 2:30	
		2. 95° C, 1:00				2. 94° C, 0:50				2. 95° C, 0:30	
		3. 60° C, 0:40				3. 60° C, 0:30				3. 66.5° C, 0:30	
		4. 72° C, 0:30				4. 72° C, 0:50				4. 72° C, 0:30	
		5. 72° C, 10:00				5. 72° C, 10:00				5. 72° C, 2:00	
		6. 4° C, ∞				6. 4° C, ∞				6. 4° C, ∞	

3.3.4 Preparación y visualización del gel de agarosa para la Detección:

Para su preparación se empleó una concentración de agarosa (AGAROSE ULTRAPURE INVITROGEN 500G) al 1.5% en buffer TBE 0.5X (TBE Buffer 10x RPI), seguido de su calentamiento y homogenización. Se le añadió GelGreen® Nucleic Acid Gel Stain Biotium 10,000x y se dejó solidificar en la bandeja de electroforesis. Se mezcló 2 µL de Sample Loading Dye 6x BIO-RAD con 8 µL de muestra y se cargó en el gel, con su control positivo y negativo correspondiente. Como marcador de peso molecular se utilizó Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD. El gel se visualizó bajo cámara de luz UV dentro del foto documentador Bio Doc-It 220 de UVP.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados

De las 144 muestras analizadas, para la temporada lluviosa se detectaron 26 muestras positivas para al menos uno de los parásitos de interés (26/72) y en la temporada seca se detectaron 68 muestras positivas para al menos uno de los parásitos de interés (68/72).

Resumen de los resultados obtenidos en las corridas de electroforesis en gel de agarosa:

- **Resultados temporada lluviosa:**

- **Giardia:**

Para *Giardia* sp. en temporada lluviosa, se obtuvo resultados positivos en los 3 meses analizados (octubre, noviembre y diciembre) (Fig. 5).

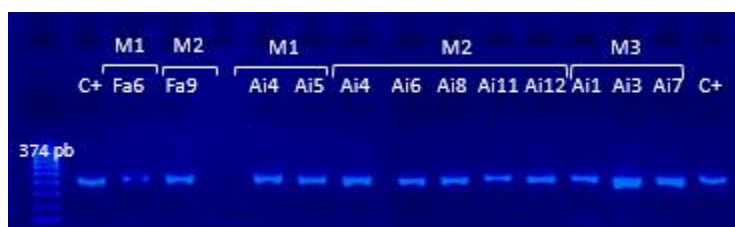


Figura 5. Electroforesis de resultados de *Giardia* sp. en temporada lluviosa, meses de octubre, noviembre y diciembre (ambas matrices). Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD

- **Cyclospora:**

Para *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa, se obtuvo resultados positivos en los meses de octubre y noviembre (Fig. 6).



Figura 6. Electroforesis de resultados *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa (octubre y noviembre). Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD

- **Cryptosporidium:**

Para *cryptosporidium* sp. en temporada lluviosa, no obtuvimos resultados positivos (Fig. 7).

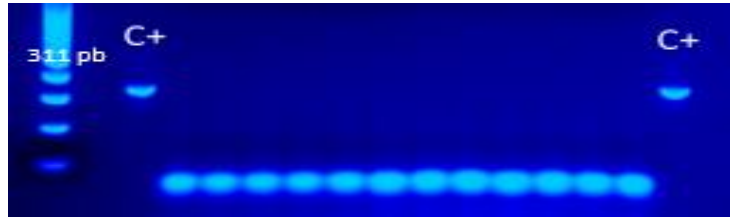


Figura 7. Resultados de *Cryptosporidium* sp. En temporada lluviosa, meses de octubre, noviembre, diciembre. Todas las muestras salieron negativas para las dos matrices, aire y agua. Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD

En total se detectaron 12 muestras positivas para *Giardia* sp. en temporada lluviosa, distribuidos entre los 3 meses y las 2 matrices (agua y aire) analizadas. En cambio, para *Cyclospora* sp., se detectaron 17 muestras positivas en temporada lluviosa distribuidas entre ambas matrices (Fig. 8).

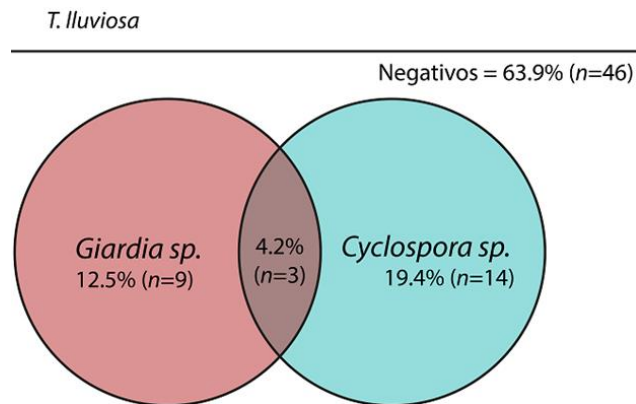


Figura 8. Diagrama de Venn, resultados de temporada lluviosa (72 muestras en total).

- **Resultados temporada seca:**

- **Giardia:**

Para *Giardia* sp. en temporada seca obtuvimos resultados positivos los 3 meses analizados (marzo, abril y mayo) (Fig. 9).

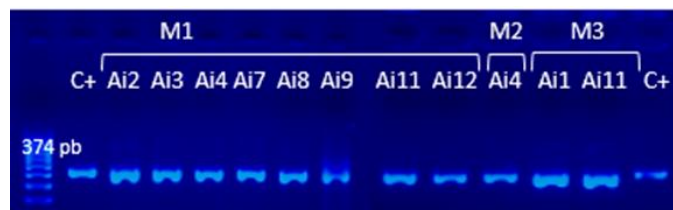


Figura 9. Electroforesis de resultados *Giardia* sp. en temporada seca, matriz aire. Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD

- **Cyclospora:**

Para *Cyclospora* sp. en temporada seca, se obtuvo resultados positivos en los 3 meses analizados (marzo, abril y mayo) (Fig. 10).

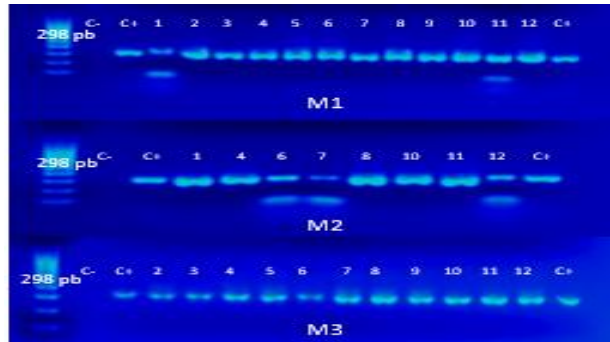


Figura 10. Resultados de *Cyclospora* sp. en temporada seca, meses de marzo, abril y mayo. Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD

- **Cryptosporidium:**

Para *Cryptosporidium* sp. en temporada seca, no se obtuvo resultados positivos (Fig. 11).

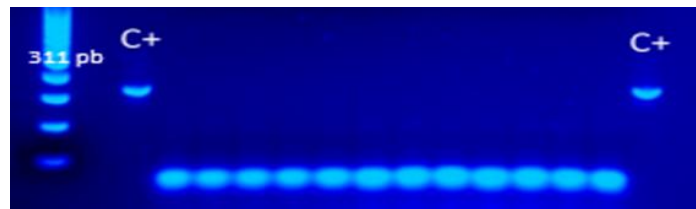


Figura 8. Resultados de *Cryptosporidium* sp. en temporada lluviosa, meses de marzo, abril y mayo. Ez Load 100 pb Molecular Rule BIO-RAD

En total se detectaron 17 muestras positivas para *Giardia* sp. en temporada seca, distribuido entre las matrices (agua y aire). En cambio, para *Cyclospora* sp. se detectaron 67 muestras positivas, distribuido entre las matrices (agua y aire) (Fig.12).

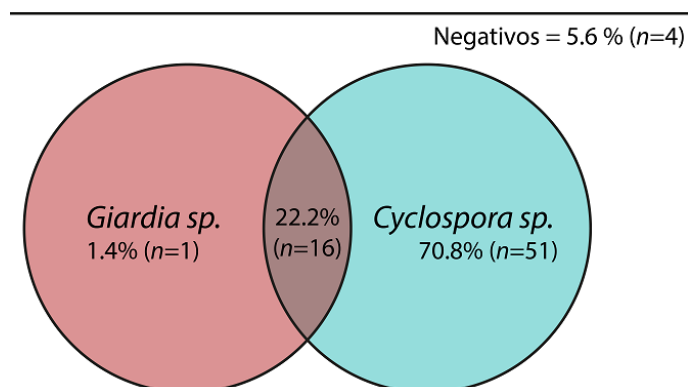


Figura 11. Diagrama de Venn, resultados de temporada seca (72 muestras en total).

Para *Cyclospora sp.*, se obtuvo un total de 94% (68/72) de muestras positivas para la temporada seca y un 36% (26/72) de muestras positivas para la temporada lluviosa (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de resultados entre las temporadas y matrices.

Temporada	Agua	Aire	Total
Seca	32	36	68
Lluviosa	12	14	26

En cuanto a los parásitos de interés en este estudio, se detectó un 20% (29/144) de *Giardia sp.* y un 58% (84/144) de *Cyclospora sp.*, en el total de muestras analizadas. En diferencia con *Cryptosporidium sp.*, donde no se detectó ninguna muestra positiva en este estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de detección de parásitos en ambas matrices (agua y aire) por sitio de muestreo.

Sitio de Muestreo	<i>Giardia sp.</i>	<i>Cryptosporidium sp.</i>	<i>Cyclospora sp.</i>
Costa del Este	4	0	7
Panamá la Vieja	1	0	6
Coco del mar	3	0	7
Boca la caja	4	0	7
Club unión	1	0	6

Río Matasnillo	3	0	9
Hospital Santo Tomás	2	0	7
Mercado del marisco	2	0	7
Las Bóvedas	4	0	7
Muro de los poetas	0	0	7
Antigua ARI	3	0	6
Isla Flamenco	2	0	8
Total	29	0	84

4.1 Discusión

Este estudio abarcó la temporada lluviosa (octubre, noviembre y diciembre) de 2019 y la temporada seca (marzo, abril y mayo) de 2021. Se analizaron 144 muestras en total, provenientes de 12 puntos de muestreo de la Bahía de Panamá (Fig. 4), divididas en 72 muestras para la temporada seca y 72 para la temporada lluviosa, que se subdividen a su vez en 36 muestras por matriz (agua y aire). En los resultados obtenidos, se pudo confirmar molecularmente la presencia de *Giardia* sp. y *Cyclospora* sp. en los 12 sitios de muestreos de la Bahía de Panamá, tanto en aire como en agua. No obstante, no fue detectado la presencia de *Cryptosporidium* sp.

***Giardia* sp.:**

En esta investigación se obtuvo un 20.1% de muestras positivas, utilizando la β -giardina como gen objetivo e incluyendo tratamiento enzimático (proteínasa k) y mecánico (perlas) previas a la extracción de ADN. A partir de esto, se obtuvo 12 muestras positivas para los 3 meses analizados del 2019 (octubre, noviembre y diciembre) y 17 muestras positivas para los 3 meses analizados del 2021 (marzo, abril y mayo), de los cuales 8 corresponden a matriz de aire. Ahora bien, Tarqui-Terrones *et al.* (2019), comparando metodologías de extracción de ADN, encontró que la adición de pre tratamientos como el choque térmico (100° a -20°), mecánico (uso de perlas) e incubación enzimática incrementan la eficiencia de la PCR anidada para identificar el gen β -giardina presente en *Giardia* sp., lo que coincide por lo

realizado por nosotros en este estudio. Por otra parte, Balderrama (2014) en México, logró identificar por primera vez, mediante tinción en muestras de aire, la presencia de quistes de *Giardia* en cantidades lo suficientemente altas para determinar riesgo latente de infección, por otra parte lo obtenido en este estudio confirma por métodos moleculares la presencia de *Giardia* sp. en muestras de aire y agua de la Bahía de Panamá, que podría también tener riesgo latente de infección.

***Cyclospora* sp.:** obtuvimos un 58.35% de muestras positivas, siendo la subunidad ribosomal pequeña de eucariotas ARNr 18s el gen objetivo.

A partir de esto, obtuvimos 17 muestras positivas para los 3 meses analizados del 2019 (octubre, noviembre y diciembre) y 67 muestras positivas para los 3 meses analizados del 2021 (marzo, abril y mayo), de los cuales 42 corresponden a la matriz agua y 42 a matriz de aire en total.

Ahora bien, estudios moleculares realizados por Resendiz-Nava *et. al.* (2020) en granjas de bayas en México, encontraron ooquistes de *Cyclospora* sp. (22/48 total) y estandarizaron una metodología de nested PCR utilizando el gen 18s ARNr (mismo gen de este estudio) para identificar hasta un ooquiste por gramo de muestra. Una revisión sistemática y meta-análisis por Naganathan *et. al.* (2022) desde 1979 hasta 2019 determinó la presencia de ooquistes del protozoo en aguas ambientales, recreacionales, entre otras, con una prevalencia media de 6.9%, sin embargo se estima que el porcentaje debiera ser mayor sobre todo en países endémicos, esto debido a la poca información que se tenía de este parasito hasta hace poco y también debido a la baja utilización de técnicas más sensibles y específicas en regiones endémicas. Por otra parte, Kitajima *et. al.* (2014) detectaron quistes y ooquistes tanto en influentes como efluentes de plantas de tratamiento de aguas en Arizona concluyendo que los ooquistes de los coccidios son capaces de resistir tratamientos físicos y demostrando por primera vez en Estados Unidos la presencia de *Cyclospora cayetanensis* en aguas residuales. En cuanto a la matriz aire, si bien hay pocos estudios al respecto, Pepper y Gerba (2015) señalan que si bien el aire es un ambiente inhóspito lo que impide muchos microorganismos se

mantengan activos biológicamente, la formación de quistes y ooquistes en los protozoos, son un mecanismo específico que les permite sobrevivir la aerolización y mantener su capacidad infectiva.

***Cryptosporidium* sp.:**

En cuanto a la no detección de *Cryptosporidium* sp. por técnicas moleculares, varios factores pudieron haber afectado los resultados obtenidos en este estudio. Por ejemplo, una mala distribución o pipeteo de las muestras ya que estas fueron divididas entre varias réplicas y para distintos procesos. Esto pudo causar una disminución en la presencia de quistes en las muestras analizadas. Nikaeen (2005), intentó satisfactoriamente identificar *Cryptosporidium* sp. a partir del mínimo de ooquiste posibles llegando a 1 ooquiste. Sin embargo, esto lo lograron bajo ciertas condiciones previas a la PCR anidada, como, por ejemplo, realizar un filtrado de una gran cantidad de agua con filtros de 1.2 micras. También, purificaron el ADN utilizando nitrógeno líquido para la ruptura de los ooquistes y realizando numerosos ciclos de congelación y descongelación. Además, diseñaron cebadores para amplificar una región específica del gen *hsp70*, lo cual difiere de nuestro protocolo de trabajo.

Otro estudio de Diaz-Lee (2014), determinó las cantidades mínimas de ooquistes en muestras de aguas inoculadas artificialmente y llegaron a la conclusión de que, si bien con un solo ooquiste es posible identificar a *Cryptosporidium* sp., en la práctica el mínimo real es de 6 ooquiste por mililitro para la técnica de nPCR y 200 ooquistes por mililitro para PCR convencional, usando las condiciones propuestas por ellos, las cuales difieren de las usadas en este estudio.

En el estudio de sensibilidad comparativa de los juegos de cebadores de PCR para la detección de *Cryptosporidium parvum* de Yu *et al.* (2009), el cual utilizó como guía principal para la detección de *Cryptosporidium* en este proyecto, donde la metodología varía en muchas condiciones, como la preparación de los ooquistes: los ooquistes purificados se esterilizaron en la superficie colocándolos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min y se mantuvieron durante <

2 semanas a 4°C en agua destilada filtrada (0.22 µm) para el experimento. La amplificación por PCR se realizó en un volumen de 50 µL que contenía el ADN molde (5 µL de ADN genómico) a una concentración equivalente al número de 10 ooquistes diluidos. Además, en ese estudio, el número de ooquistes utilizados para producir el ADN molde en la PCR se calculó indirectamente utilizando ADN diluido extraído de ooquistes purificados. Por lo tanto, el límite de sensibilidad puede ser diferente cuando este método de PCR se aplica a muestras ambientales o clínicas. En un estudio anterior, demostraron una alta sensibilidad del enfoque de PCR, detectando un solo ooquiste usando los cebadores SB012F y SB012R. Sin embargo, replicaron ese experimento y la sensibilidad de detección de ese conjunto de cebadores fue 1000 veces menor que en el informe anterior. La razón de esta discrepancia no está clara (Yu *et al.*, 2009). En este estudio, no se contó con ninguna de estas condiciones, lo cual pudo haber sido determinante en que las condiciones de PCR no logran amplificar *Cryptosporidium* sp., a pesar de que este protozoo ha sido ampliamente detectado en el ambiente, incluyendo este estudio, por métodos tradicionales (Stapf, 2022; García y Domínguez, 2023).

Temporalidad:

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que existe una temporalidad en la prevalencia de los protozoos analizados. Esto se correlaciona con la teoría ya que, los protozoarios a diferencia de otros organismos, no se reproducen en el ambiente. Por ende, se esperaría que, en meses de la temporada lluviosa, haya menos presencia de protozoos en el ambiente, debido al exceso de escorrentías. Un estudio realizado en México, determinó cierta temporalidad del protozoo *Giardia* durante la temporada seca e intentaron establecer correlaciones de circanualidad con las estaciones de otros países (Hermida, 1990).

Un meta análisis llevado a cabo entre 1979 y el 2020 encontró una mayor cantidad de reportes positivos para *Cyclospora* sp. en países desarrollados como Italia, España y Estados Unidos, a pesar de no ser regiones endémicas como América Central o el África, esto probablemente sea debido a que han invertido en estudios y metodologías más eficaces para la detección de este microorganismo. También

concluyen que si bien existe una marcada temporalidad asociada a este parásito, no puede ser delimitado a ciertos meses en específico, ya que es multifactorial y varían, de acuerdo al país del estudio (Naganathan, 2022. USDA, 2023).

Este estudio encontró para Panamá una marcada temporalidad sobre la temporada seca, no obstante revisiones sistemáticas de Almería (2023) señalan que la temporalidad varía según la región y otros factores como, la actividad humana, la contaminación ambiental y las condiciones necesarias para la esporulación. Además las tendencias en temporalidades han sido reportadas inconsistentemente, variando entre altas prevalencias en periodos de mucha lluvia y altas temperaturas y viceversa. Por lo menos en el caso de *Cyclospora sp.* en zonas endémicas se ha visto cierta prevalencia en meses cálidos con mucha humedad y lluvias periódicas.

Estudios anteriores de detección por microscopia y tinción:

En un estudio del 2014, se reportó no haber detectado parásitos en las muestras de aire lo cual difiere de lo encontrado en esta investigación. Esto probablemente se debió a que las técnicas moleculares son mucho más sensibles y específicas, y también, por el volumen de muestras utilizado por Guillén (2016), a diferencia del volumen de muestra utilizado por Staph (2022) y García y Domínguez (2023) en sus estudios.

Temporada lluviosa

En los estudios de la temporada lluviosa de 2019 realizado por Staph (2022), se detectó como resultado predominante *Cryptosporidium sp.*, seguido de *Giardia sp.* y por último, se detectó *Cyclospora sp.* mediante técnicas de tinción clásica como Ziehl-Neelsen. A parte, que el mes en el que se detectaron más parásitos fue octubre (Staph, 2022). En nuestro caso, para la temporada lluviosa por detección molecular mediante PCR anidada, fue noviembre el mes en que más positivos se detectaron.

También, cabe destacar, que se detectó *Giardia sp.* en 16.7% (12/72) de las muestras analizadas y 23.6% (17/72) de *Cyclospora sp.* de las muestras analizadas de la temporada lluviosa del 2019. Lo que deja un total de 36.1% de muestras positivas por detección molecular para la temporada lluviosa.

Temporada seca

Los estudio de la temporada seca de 2021 realizados por García y Domínguez, (2022), permitieron determinar una mayor presencia de *Cyclospora* sp. con 53% de las muestras analizadas, seguido de *Cryptosporidium* sp. con 34% y por último, *Giardia* sp. con 13%, utilizando métodos tradicionales de flotación, filtración y tinciones, además que abril, fue el mes con mayor recuento de parásitos.

En nuestro caso, marzo fue el mes en el que más muestras positivas fueron detectadas, seguido de abril. En cuanto a los parásitos de interés, para la temporada seca, se detectó *Giardia* sp. en un 23.6% (17/72) y un 93% (67/72) para *Cyclospora* sp., lo que muestra cierta similitud de resultados entre la detección tradicional y la detección molecular.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. Conclusiones

- Se logró detectar molecularmente la presencia de protozoos patógenos en muestras ambientales provenientes de la bahía de Panamá, tanto para la temporada lluviosa como la seca.
- Se optimizaron las condiciones de los protocolos de extracción de ADN utilizados, así como también las condiciones de los protocolos de PCR para PCR tiempo final utilizados.
- Se logró identificar por primera vez parásitos protozoos patógenos en muestras ambientales de agua y aire proveniente de la Bahía de Panamá, mediante técnicas moleculares.
- También se detectó molecularmente por primera vez para Panamá, el parásito *Cyclospora cayetanensis*.
- Se pudo determinar que es necesario la utilización de la técnica de PCR anidada sobre la PCR convencional, para detectar protozoos en muestras ambientales con baja concentración de quistes/ooquistes.
- Se obtuvo 94 muestras positivas de 144 (65.3%) muestras analizadas, siendo *Cyclospora* sp. el más prevalente, seguido de *Giardia* sp. y, por último, *Cryptosporidium* sp. que no fue detectado en ninguna muestra analizada de aire y agua proveniente de los 12 sitios de muestreo de la Bahía de Panamá.
- Se logró detectar en la temporada seca, un mayor número de muestras positivas, obteniéndose un 94% (68/72) de muestras positivas, y en la temporada lluviosa, se detectó solo un 36% (26/72) de muestras positivas, observándose cierta temporalidad, quizás, por influencia directa de las lluvias, que podrían diluir los microorganismos en el agua y precipitar los microorganismos en los aerosoles.

6. Recomendaciones

- Realizar un seguimiento al plan de saneamiento de la Bahía de Panamá, y evaluar la eficiencia de este con investigaciones como detecciones moleculares mediante PCR en tiempo real o técnicas de identificación mediante inmunofluorescencia.
- Aumentar el volumen de muestra colectada, ya que de ésta depende la sensibilidad del estudio.
- Aplicar más tratamientos para aumentar la concentración de ooquistes y su purificación en estudios posteriores, para mejorar la extracción y amplificación de *Cryptosporidium* sp. en muestras ambientales.
- Usar compuestos inhibidores de nucleasas, para evitar la degradación de los ácidos nucleicos extraídos.
- Conseguir fondos para ampliar las investigaciones y orientarlas a áreas de salud pública y ambiental.
- Invertir más en la educación de la población por la autoridades de salud, con respecto a estos resultados obtenidos en este estudio, que impactan de una u otra manera en la salud pública de la población.

Referencias Bibliográficas

1. MINSA. (2015). Análisis de situación de salud (ASIS). Panamá.
2. Grey, A., Domínguez, V., Castellero, M. (2014). Determinación de Indicadores Físicoquímicos y Microbiológicos de calidad del agua superficial en la bahía de Manzanillo. (Panamá). I+D Tecnológico, 10(1):16-27. Recuperado de: <https://revistas.utp.ac.pa/index.php/idtecnologico/article/view/10>
3. Manjarrez, G., Blanco, J., González, B., Botero, C., Díaz-Mendoza, C. (2019). Parásitos en playas turísticas: propuesta de inclusión como indicadores de calidad sanitaria. Revisión para América Latina. (Perú). Ecol.apl. 18(1):91-100.
4. NIOSH. (2010). Enfermedades respiratorias asociadas al trabajo. Cincinnati, Estados Unidos. DHHS (NIOSH), 144:1-2.
5. Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Rev. Habanera de Ciencias Médicas, 16(3):402-419. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&tlng=es.
6. Zahedi, A., U, Ryan (2020). Cryptosporidium – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. Recuperado de: [Cryptosporidium – An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission - ScienceDirect](#)
7. Solarte, Y., Peña, M., Sanit, I., Madera, C. (2006). Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. Colomb. med.; 37(1): 74-82
8. MINSA. (2014). Indicadores básicos del país. Recuperado de http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/ind_basicos_pma_2014.pdf
9. Castillo, A., Rovira, D. (2020). Agua como factor de riesgo para la transmisión de protozoarios y helmintos. ISSN: 2411-0353.
10. Análisis de salud (MINSA) 2015. https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicaciones/asis_2015.pdf

11. Arosemena, V., Castillo, C., Guerra, G. (2014). Detección de entero parasitosis humana y fuentes de contaminación ambiental en el Río Chagres, Panamá. *Revista Venezolana de Salud Pública*. 35-44
12. Rojo-Marcos, G., Cuadros-González, J. (2016). Malaria and intestinal protozoa. *34(3)*: 191-204. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.009>
13. Tenesaca Maliza, J. (2019). Identificación de parásitos intestinales en superficies de buses del transporte público de Quito durante el periodo Abril-Julio del 2019. Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Bioquímico Clínico. Carrera de Bioquímica Clínica. Quito: UCE. 92 p.
14. Soriano M. (s.f). Giardia y giardiosis. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset Aleixandre. Valencia. Investigación
15. Guillén, M. (2016). Detección de endoparásitos en agua y aire de 12 puntos de la bahía de Panamá. (Tesis de licenciatura). Universidad de Panamá, Panamá.
16. Baker, J., Muller, R. (1993). Avances en Parasitología. *32(2)*:72-100.
17. Rodney, A. (2001). Biología de Giardia lamblia. *Clinical Microbiology Reviews*. *14(3)*:447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
18. Huang, D. B., White, A. C. (2006). Una revisión actualizada sobre Cryptosporidium y Giardia. *Gastroenterology Clinics of North America*. *35(2)*:291–314. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2006.03.006>
19. Chacín-Bonilla, L. (2006). Cryptosporidium filogenia y taxonomía. Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela *Investigación Clínica*. *48(1)*: 1-4.
20. García Dávila, P., Rivera Fernández, N. (2017). El ciclo biológico de los coccidios intestinales y su aplicación clínica. a Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. UNAM. Ciudad de México, México. *60 (6)*: 40-46.
21. Ortega, Y. R., Sánchez, R. (2010). Actualización sobre Cyclospora cayetanensis, un parásito transmitido por los alimentos y el agua. In *Clinical Microbiology Reviews* *23, (1)*, 218–234). <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-09>
22. Chacín-Bonilla, L., Barrios, F. (2011). Cyclospora cayetanensis: biología, distribución ambiental y transferencia. In *Biomédica (Vol. 31)*.

23. Cama, V. A., Mathison, B. A. (2015). Infecciones por *Coccidia* Intestinal y *Giardia* duodenalis. En *Clínicas en Medicina de Laboratorio* 35, (2), pp. 423–444. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.010>
24. Villalba-Vizcaíno, V., Buelvas, Y., Arroyo-Salgado, B., & Castro, L. R. (2018). Identificación molecular de *Giardia* intestinalis en dos ciudades de la Costa Caribe Colombiana. *Experimental Parasitology*. 189:1–7
25. Eman M. Hassan, Banu Örmeci, Maria C. DeRosa, Brent R. Dixon, Syed A. Sattar and Asma Iqbal (2021) Una revisión de *Cryptosporidium* spp. y su detección en el agua, *Water Science & Technology*, vol. 35.
26. Jinneman, KC, Wetherington, JH, Hill, WE, et al. (1999). Un ensayo de ligadura de oligonucleótidos para diferenciación entre *Cyclospora* y *Eimeria* spp. productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa. *J. Alimentos Prot.* 62, 682–685
27. Juan C. Garcia, Nigel French, Anthony Pita, Niluka Velathanthiri, Rima Shrestha, David Hayman. (2017). Diversidad genética local y global de parásitos protozoarios: Distribución espacial de los genotipos *Cryptosporidium* y *Giardia*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005736>
28. Sonia Almeria, Hediye N. Cinar & Jitender P. Dubey. (2019). *Cyclospora* cayetanensis y Cyclosporiasis: An Update. doi:10.3390/microorganisms7090317
29. Silverlas, C., Naslund, K., Bjorkman, C. and Mattsson, J. G. (2010). Caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* de ganado lechero sueco en relación con la edad, la diarrea y la región. *Parasitología Veterinaria* 169, 289–295.
30. Patel, S., Pedraza-Diaz, S. and McLauchlin, J. (1999). La identificación de especies de *Cryptosporidium* y *Cryptosporidium parvum* directamente a partir de heces enteras mediante el análisis de una PCR multiplex del gen 18S rRNA y mediante PCR/RFLP del gen de la proteína de la pared exterior de *Cryptosporidium* (COWP). *International Journal for Parasitology* 29, 1241–1247.
31. Sebastián Méndez-Álvarez, Eduardo Pérez-Rotha (2004). La PCR múltiple en *Microbiología Clínica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22, 183-192

32. Nohemí Gabriela Cortés-López, Perla Lucía Ordóñez-Baquera, Joel Domínguez-Viveros (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. *Rev Mex Cienc Pecu* 2020;11(4):1150-1173.
33. Efstratiou, A., Ongerth, J. & Karanis, P. (2017). Evolución del seguimiento de *Giardia* y *Cryptosporidium* en agua. *Water Res.* 123, 96–112.
34. Shields, J.M., Olson, B.H., 2003. Método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de PCR para la detección de *Cyclospora cayetanensis* en aguas ambientales sin confirmación microscópica. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4662–4669
35. Monis, P. T. & Saint, C. P. (2001). Desarrollo de un ensayo de PCR anidado para la detección de *cryptosporidium parvum* en agua tratada. *Water Res.* 35, 1641–1648
36. Marco Lallea, Edoardo Pozioa, Gioia Capellib, Fabrizio Bruschi, Daniele Crotti, Simone M. Caccio (2005). Heterogeneidad genética en el locus b-giardin entre aislamientos humanos y animales de *Giardia duodenalis* e identificación de subgenotipos potencialmente zoonóticos. *International Journal for Parasitology* 35, 207–213.
37. Lalonde, L.F.; Gajadhar, A.A. Optimización y validación de métodos para el aislamiento y la identificación por PCR en tiempo real de ooquistes de protozoos en vegetales de hojas verdes y frutos rojos. *Food Waterborne Parasitol.* 2016, 2, 1–7.
38. Giangaspero, A.; Marangi, M.; Arace, E. *Cyclospora cayetanensis* viaja en agua corriente en trenes italianos. *J. Water Health* 2015, 13, 210–216.
39. Varma, M., Hester, JD, Schaefer III, FW, et al., 2003. Detección de *Cyclospora cayetanensis* usando un Ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real. *J. Microbiol. Métodos.* 53, 27–36.
40. Verweij JJ, Laeijendecker D, Brienen EA, van Lieshout L, Polderman AM. Detección de *Cyclospora cayetanensis* en viajeros que regresan de los trópicos y subtropicales usando microscopía y PCR en tiempo real. *Int J Med Microbiol.* 2003; 293: 199–202.

41. Carolina N. Resendiz-Nava, Guadalupe E. Orozco-Mosqueda, Edmundo M. Mercado-Silva, Susana Flores-Robles, Hilda V. Silva-Rojas y Gerardo M. Nava (2020). Una herramienta molecular para la detección y trazabilidad rápidas de *Cyclospora cayetanensis* en bayas frescas y suelos agrícolas de bayas. *Foods*, 9, 261.
42. Jae-Ran Yu, Soo-Ung Lee y Woo-Yoon Park (2009). Sensibilidad comparativa de los juegos de cebadores de PCR para la detección de *Cryptosporidium parvum*. *Korean J Parasitol*. Vol. 47, No. 3: 293-297.
43. Bartłomiej Kozera y Marcin Rapacz (2013). Genes de referencia en PCR en tiempo real. *Journal of Applied Genetics* 54, 391–406
44. Hyeng-Il Cheun, Cheon-Hyeon Kim, Shin-Hyeong Cho, Da-Won Ma, Bo-La Goo, Mun-Su Na, Seung-Ki Youn, Won-Ja Lee (2013). The First Outbreak of Giardiasis with Drinking Water in Korea. *Osong Public Health Res Perspect* 2013 4(2), <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrp.2013.03.003>
45. Holberton, D., Baker, D.A., Marshall, J., 1988. Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. *J. Mol. Biol.* 204, 789–95.
46. Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447–75.
47. Faubert, G., 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 35–54.
48. Spano, R., C. Puri, L. Ranucci, L. Putignani y A. Crisanti. 1997. Clonación de todo el gen COWP de *Cryptosporidium parvum* y localización ultraestructural de la proteína durante el desarrollo de la etapa sexual. *Parasitología* 114: 427-437. [[PubMed](#)]
49. Tamirat T. Temesgen, Kristoffer R. Tysnes y Lucy J. Robertson. 2019. Un nuevo protocolo para la detección molecular de *Cyclospora cayetanensis* como contaminantes de las bayas. Universidad Noruega de Ciencias de la Vida, Oslo, Noruega. doi: 10.3389/fmicb.2019.01939.
50. Irshad M. Sulaiman, Ynes Ortega, Steven Simpson, Khalil Kerdahi. 2014. Caracterización genética de parásitos *Cyclospora cayetanensis* patógenos

- humanos de tres regiones endémicas en el locus de ARN ribosómico 18S. Vol22, 229-234, ISSN 1567-1348. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.015>.
51. Stapf Valdés, Alice Vanessa (2022) Detección de protozoos en el agua y aire provenientes de la Bahía de Panamá en época lluviosa de 2019. tesis, Universidad de Panamá.
 52. García, G., Domínguez, B. (2023). Detección de protozoos y otros endoparásitos en muestras de agua y aire de la bahía de panamá durante la estación seca del 2021. Tesis no publicada.
 53. Díaz-lee., et al. (2014). Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* Aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar. Arch Med Vet 47, 91-96 (2015)
 54. Nikaeen, N., et al. (2005). A Nested-PCR Assay for Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Water Samples. Iranian J Publ Health, 2005, Vol. 34, No. 1, pp.13-18.
 55. Tarqui-Terrones K, Silva-Molina JI, Beltrán-Fabián M, Zevallos-Vara S, Mayta-Huatuco E. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN de *Giardia spp.* medidos por PCR convencional. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2019;36 (3):423-32. doi:<http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4160>
 56. Balderrama-Carmona, A. P., Gortáres-Moroyoqui, P., et al. (2014). Occurrence and quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in soil and air samples.
 57. Hermida, R. C., Ayala, D. E., & Arroyave, R. J. (1990). Circannual Incidence of *Giardia Lamblia* in Mexico. Chronobiology International, 7(4), 329–340. doi:10.1080/07420529009064639
 58. Naganathan T, O'Connor A, Sargeant JM, Shapiro K, Totton S, Winder C, Greer AL (2022). The prevalence of *Cyclospora cayetanensis* in water: a systematic review and meta-analysis. Epidemiology and Infection 150, e15, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0950268821002521>
 59. USDA (United States Department of Agriculture) (2023). Response to questions posed by the Food and Drug Administration (FDA): *Cyclospora cayetanensis* in

Produce. Recuperado de:
https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/NACMCF_Cyclospora_Report_2023_Final.pdf

60. Kitajima, Masaaki; Haramoto, Eiji; Iker, Brandon C.; Gerba, Charles P. (2014). Occurrence of Cryptosporidium, Giardia, and Cyclospora in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Science of The Total Environment*, 484, 129–136. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.036
61. Pepper, I. Gerba, C. (2015). *Environmental Microbiology || Aeromicrobiology*. , (5), 89–110. doi:10.1016/b978-0-12-394626-3.00005-3
62. Almeria S, Chacin-Bonilla L, Maloney JG, Santin M. *Cyclospora cayetanensis: A Perspective (2020–2023) with Emphasis on Epidemiology and Detection Methods*. *Microorganisms*. 2023; 11(9):2171. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092171>

ANEXOS

- Kits utilizados en la extracción de ADN totales



Figura 93. GenElute™ Stool DNA Isolation Kit de Sigma-Aldrich.



Figura 104. QIAamp Fast DNA Stool mini kit de Qiagen.



Figura 15. Nucleospin Soil de Macherey-Nagel Kit de Extracción

- **Muestras y Procesamiento:**



Figura 16. Crio cajas con las 144 muestras correspondientes a temporada seca y lluviosa.



Figura 11. Proceso de extracción ADN para las 144 muestras

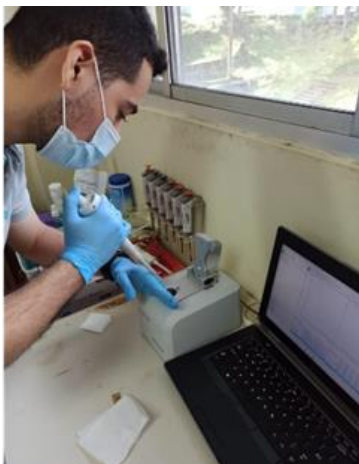


Figura 138. Cuantificación de ADN total.



Figura 129. Preparación de la corrida electroforesis en gel de agarosa.

- **Resultados obtenidos en electroforesis para la temporada seca.**
 - ***Giardia* sp.**

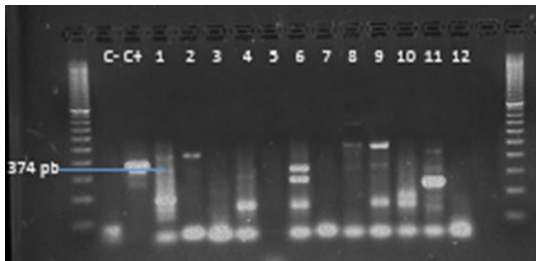


Figura 20. Electroforesis para detección de *Giardia* sp. en temporada seca marzo (matriz agua).

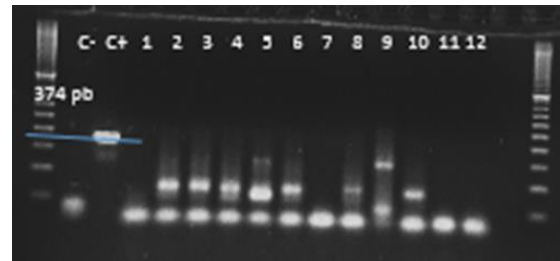


Figura 21. Electroforesis detección de *Giardia* sp. Temporada seca abril (matriz agua).

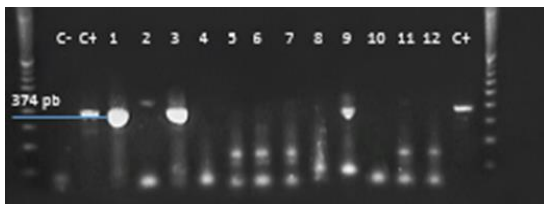


Figura 142. Electroforesis detección de *Giardia* sp. Temporada seca mayo (matriz agua).

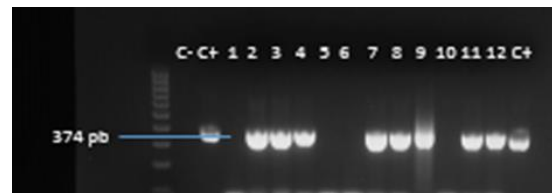


Figura 23. Electroforesis para detección de *Giardia* sp. en temporada seca marzo (matriz aire).

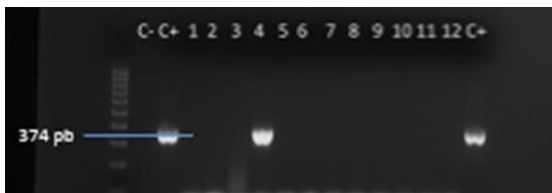


Figura 24. Electroforesis detección de *Giardia* sp. en temporada seca abril (matriz aire).

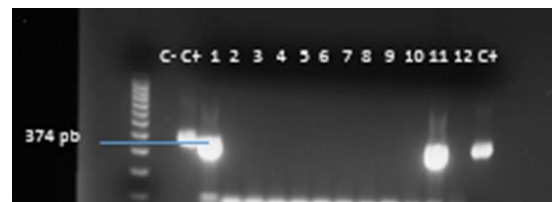


Figura 25. Electroforesis para detección de *Giardia* sp. Temporada seca mayo (matriz aire).

○ **Cryptosporidium sp.**



Figura 156. Electroforesis detección *Cryptosporidium sp.* Temporada seca marzo (matriz agua).



Figura 27. Electroforesis detección *Cryptosporidium sp.* Temporada seca abril (matriz agua).

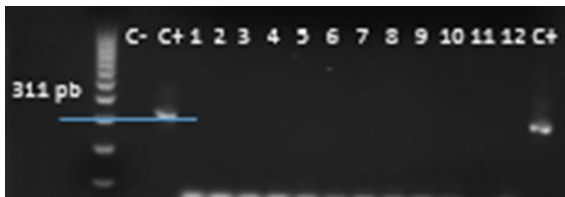


Figura 28. Electroforesis detección *Cryptosporidium sp.* Temporada seca mayo (matriz agua).

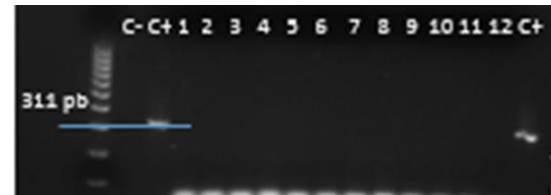


Figura 16. Electroforesis detección *Cryptosporidium sp.* Temporada seca marzo (matriz aire).

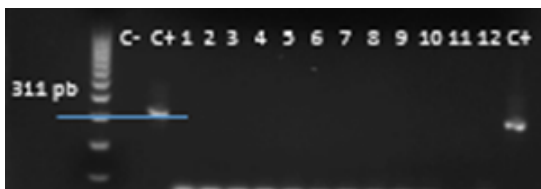


Figura 30. Electroforesis detección *Cryptosporidium sp.* Temporada seca abril (matriz aire).

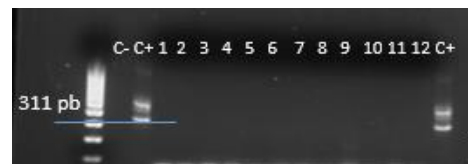


Figura 31. Electroforesis detección *Cryptosporidium sp.* Temporada seca mayo (matriz aire).

○ **Cyclospora sp:**

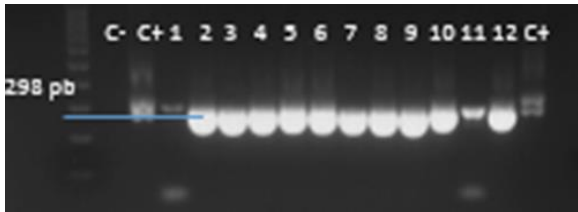


Figura 32. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada seca marzo (matriz agua).

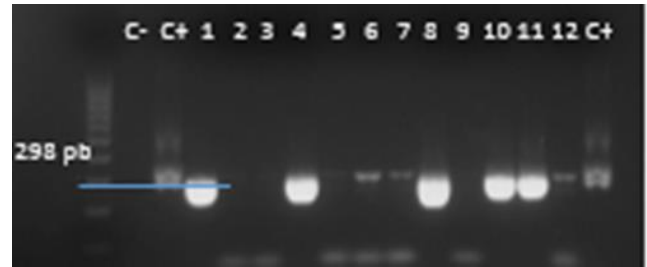


Figura 33. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada seca abril (matriz agua).

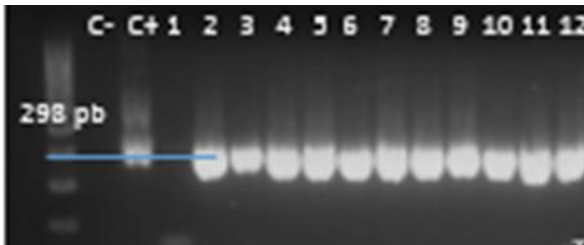


Figura 34. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada seca mayo (matriz agua).

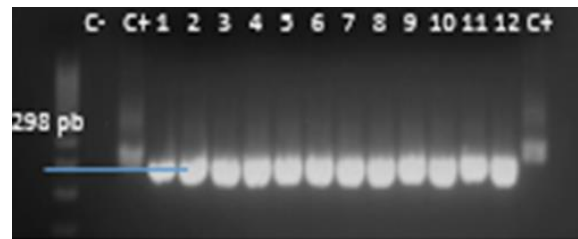


Figura 35. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada seca marzo (matriz aire).

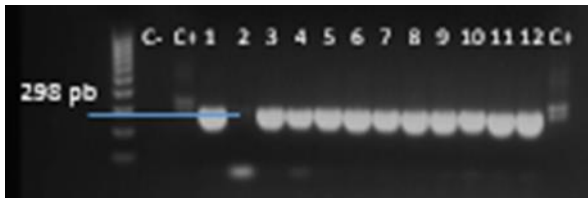


Figura 36. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada seca abril (matriz aire).

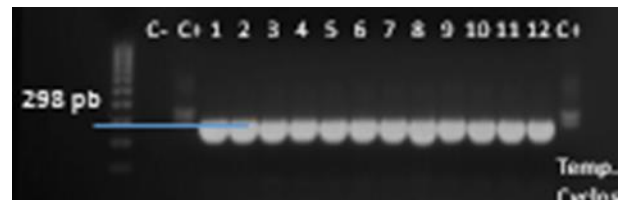


Figura 37. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada seca mayo (matriz aire).

- **Resultados obtenidos en electroforesis para la temporada lluviosa.**

- ***Giardia* sp.:**



Figura 38. Electroforesis detección de *Giardia* sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz agua).

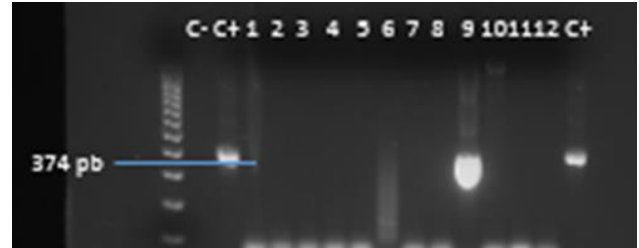


Figura 39. Electroforesis detección de *Giardia* sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz agua).

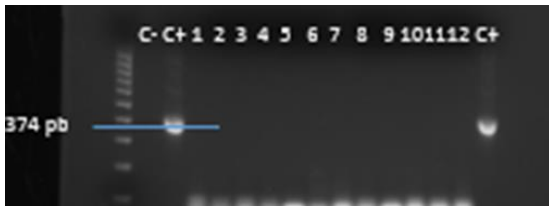


Fig. 40. Electroforesis detección de *Giardia* sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz agua).

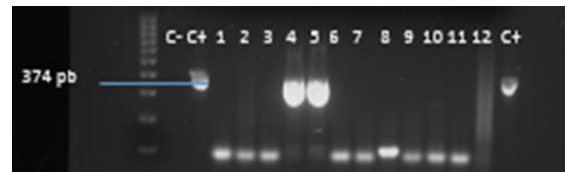


Fig.41. Electroforesis detección de *Giardia* sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz aire).

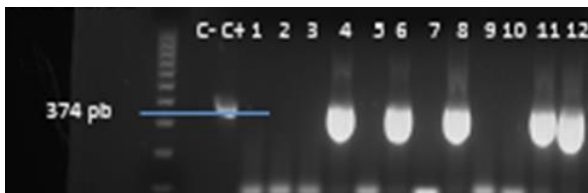


Figura 42. Electroforesis detección de *Giardia* sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz aire).

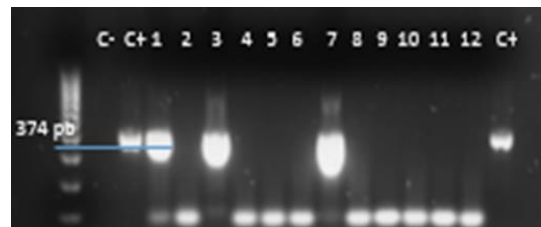


Fig 43. Electroforesis detección de *Giardia* sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz aire).

○ *Cryptosporidium* sp.:

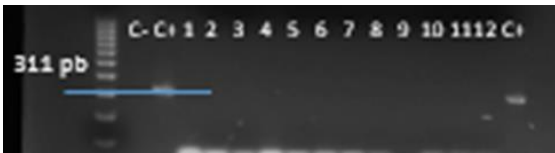


Figura 44. Electroforesis detección *Cryptosporidium* sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz agua).

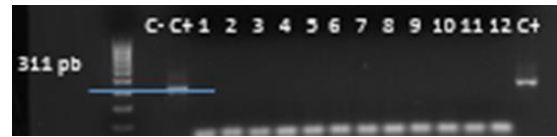


Fig. 45. Electroforesis detección *Cryptosporidium* sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz agua).

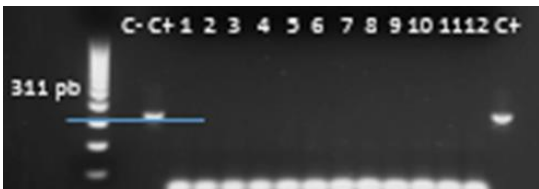


Fig. 46. Electroforesis detección *Cryptosporidium* sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz agua).

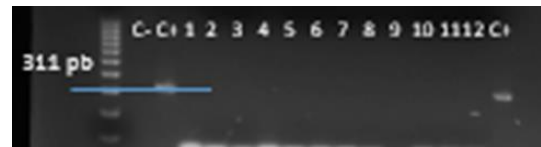


Fig. 47. Electroforesis detección *Cryptosporidium* sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz aire).

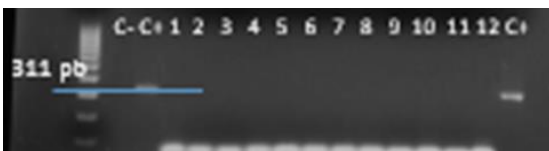


Fig. 48. Electroforesis detección *Cryptosporidium* sp. Temporada lluviosa noviembre (matriz aire).

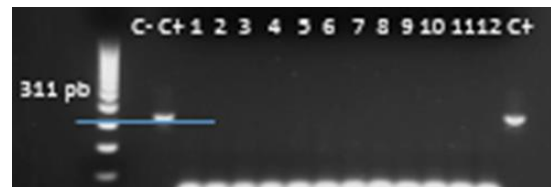


Fig. 49. Electroforesis detección *Cryptosporidium* sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz aire).

○ *Cyclospora* sp.:

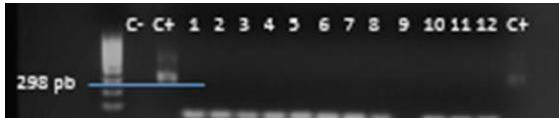


Figura 50. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa octubre (matriz agua).

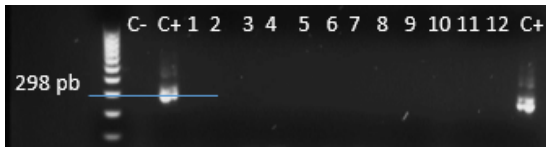


Fig. 52. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa diciembre (matriz agua).

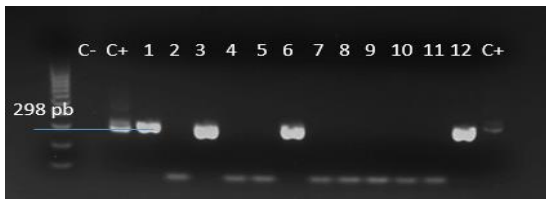


Fig. 54. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz aire).



Fig. 51. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa, noviembre (matriz agua).

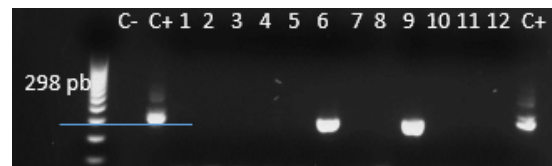


Fig. 53. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa, octubre (matriz aire).

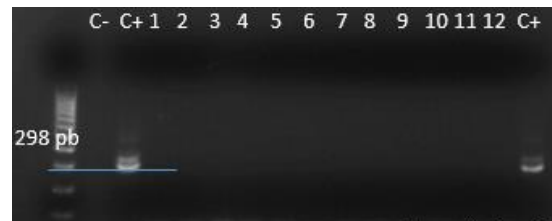


Fig. 55. Electroforesis detección *Cyclospora* sp. en temporada lluviosa, diciembre (matriz aire).

- **Tablas y gráficos extras**

Tabla 5. Resumen general de la detección de parásitos.

Parásito	Temporada Seca				Temporada Lluviosa			
	Marzo	Abril	Mayo	Total	Octubre	Noviembre	Diciembre	Total
<i>Giardia sp</i>	10	2	5	17	3	6	3	12
<i>Cryptosporidium sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cyclospora sp</i>	24	20	23	67	2	15	0	17

Tabla 6. Resultados específicos para las muestras analizadas.

	Temporada seca												Temporada Lluviosa											
	Mar			Abr			May			Oct			Nov			Dic								
	aire	agua	Cyc	aire	agua	Cyc	aire	agua	Cyc	aire	agua	Cyc	aire	agua	Cyc	aire	agua	Cyc						
Costa del Este		1		1		1	1	1	1	1	1				1		1	1						
Panamá la Vieja	1	1		1		1		1		1							1							
Coco del mar	1	1		1		1		1	1	1					1		1	1						
Boca la caja	1	1		1	1	1		1		1	1			1			1							
Club unión		1		1		1		1		1	1						1							
Río Matasnillo		1	1	1		1		1		1		1	1		1	1	1							
Hospital Santo Tomás	1	1		1		1		1		1							1	1						
Mercado del marisco	1	1		1		1		1		1				1			1							
Las Bóvedas	1	1	1	1		1		1	1	1		1				1	1							
Muro de los poetas		1		1		1		1		1							1							
Antigua ARI	1	1		1		1	1	1		1				1										
Isla Flamenco	1	1		1		1		1		1				1	1		1							
Total	8	12	2	12	1	12	1	8	2	12	3	11	2	2	1	5	4	1	11	3				

Tabla 7. Tablas comparativas entre detección clásica y molecular (ambas matrices).

Temporada Lluviosa 2019						
Sitio	Det. clásica			Det. Molecular		
	<i>Gia</i>	<i>Cry</i>	<i>Cyc</i>	<i>Gia</i>	<i>Cry</i>	<i>Cyc</i>
Costa del Este	+	+	+	+	-	+
Panamá la Vieja	+	+	+	-	-	+
Coco del mar	+	+	+	+	-	+
Boca la caja	+	+	+	+	-	+
Club unión	+	+	+	+	-	+
Río Matasnillo	+	+	+	+	-	+
Hospital Santo Tomás	+	+	-	+	-	+
Mercado del marisco	+	+	+	+	-	+
Las Bóvedas	+	+	-	+	-	+
Muro de los poetas	+	+	-	-	-	+
Antigua ARI	+	+	+	+	-	+
Isla Flamenco	+	+	+	+	-	+

Temporada Seca 2021						
Sitio	Det. clásica			Det. Molecular		
	<i>Gia</i>	<i>Cry</i>	<i>Cyc</i>	<i>Gia</i>	<i>Cry</i>	<i>Cyc</i>
Costa del Este	+	-	+	+	-	+
Panamá la Vieja	-	-	-	+	-	+
Coco del mar	+	+	+	+	-	+
Boca la caja	+	+	+	+	-	+
Club unión	-	+	+	-	-	+
Río Matasnillo	-	-	-	+	-	+
Hospital Santo Tomás	-	+	+	+	-	+
Mercado del marisco	+	+	+	+	-	+
Las Bóvedas	-	-	-	+	-	+
Muro de los poetas	-	-	+	-	-	+
Antigua ARI	-	+	-	+	-	+
Isla Flamenco	-	+	-	+	-	+

Gráfico 2

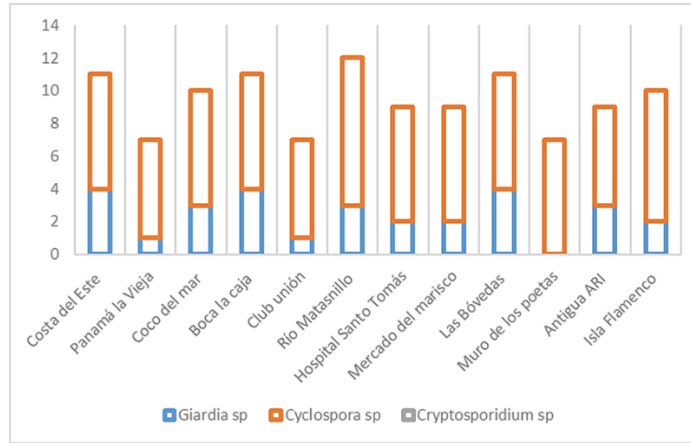


Figura 56. Resultados agrupados detección de parásitos por sitio de muestreo.

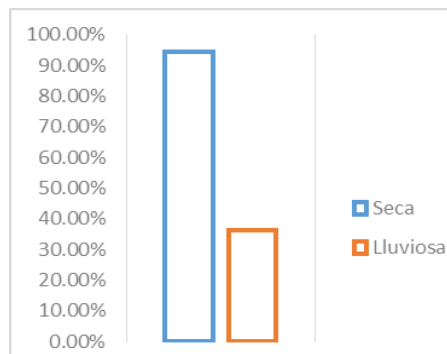


Figura 57. Comparación de positivos entre las temporadas.