

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“Caracterización molecular mediante PCR-RFLP del Gen SSU rRNA
de *Cryptosporidium* aislado de heces de pacientes de Hermosillo y
de la Ciudad de México”



TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Q.B.C. Mariana de Jesús González Díaz

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON




**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**




Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Mariana de Jesús González Díaz**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



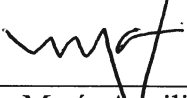
Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Director Académico



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Secretario



Dra. Adriana Garibay Escobar
Vocal



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a Dios, por todas las bendiciones que me ha dado a lo largo de mi vida. Ésta es tan solo una de ellas. Muchas gracias!

A mis padres por permitirme sentir su confianza y su respaldo, y por alentarme a cada momento. A mis hermanos: Daniela, Angélica y Sergio, por ser un gran ejemplo de vida, inspirarme seguridad y enseñarme que en lo que se hace día a día, hay que buscar la felicidad. A mi sobrino, César Daniel por la alegría de llamarme “tía Ana”. Los amo familia!

A mi directora de tesis, la Dra. Olivia Valenzuela, por su dedicación, trabajo y esfuerzo para que este proyecto pudiera llevarse a cabo y por demostrarme que si se quiere, se puede. Gracias porque me ha permitido no sólo terminar esta tesis, sino también por formarme profesionalmente y como persona.

A mi Comité Sinodal: Dra. Adriana Garibay, Dr. Eduardo Ruiz Bustos y Dra. Mary Islas, gracias por la disposición para colaborar con su asesoría y revisión de este trabajo.

Al Dr. Jesús Hernández, gracias infinitas por su enorme colaboración en todo el desarrollo de mi tesis. A la Q.B. Mónica Resendiz, por su apoyo y asesoría en el desarrollo técnico del proyecto.

A la Universidad de Sonora, al Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud por todo el apoyo en el desarrollo de mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a lo largo de la realización de este trabajo.

Al Hospital Infantil del Estado de Sonora, en especial a la Q.B. Josefina López, al Q.B. Ernesto Chávez y a la Dra. Durazo, por sus valiosas contribuciones a esta investigación.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez, a la Dra. Rosa María Bernal y a la M.C. Gie Bele Vargas, por su amable colaboración y apoyo en el diagnóstico microscópico.

A Yadel Magaña y Ariel Ochoa por su apoyo en la recolección de muestras.

A mis compañeros del CABB que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización y cumplimiento de esta meta. En especial a Ana Laura, Mario, Wences, Heriberto y Sergio, por su amistad y apoyo.

A mis compañeros de Posgrado: Andrea, Raúl, Julia, Juan, Iliana, Alejandro y Sandybell, por el tiempo compartido en el desarrollo de esta etapa de nuestras vidas.

A mis amigos y familia que de lejos o de cerca, han sido una grata compañía y un gran respaldo en mi vida!

A todos mi sincero agradecimiento!

Mariana González Díaz

DEDICATORIA

Al Creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad de mi corazón, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

De igual manera, dedico esta tesis a mi madre que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante.

*“Lo que sabemos es una gota, lo que ignoramos un inmenso océano.
La admirable disposición y armonía del universo, no ha podido
sino salir del plan de un Ser omnisciente y omnipotente”*

Isaac Newton

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xii
OBJETIVOS	xiv
Objetivo General	xiv
Objetivos Particulares	xiv
RESUMEN	xv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Criptosporidiosis	3
El Parásito: <i>Cryptosporidium</i> spp.	4
Especies de <i>Cryptosporidium</i>	5
Taxonomía	7
El Ooquiste	9
Ciclo Biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.	11
Transmisión de la Infección	15
Agua Potable	15
Aguas Recreativas	15
Alimentos	17
De Persona a Persona	17

De Animal a Persona	17
Patología de la Criptosporidiosis	18
Manifestaciones Clínicas	20
Prevención	22
Epidemiología y Distribución Geográfica de la Criptosporidiosis	23
Diagnóstico de la Criptosporidiosis	26
Tratamiento de la Criptosporidiosis	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Diseño del Estudio	30
Declaraciones de Ética	30
Los Pacientes y el Control	30
Muestras y Procesamiento de la Materia Fecal	31
Diagnóstico de Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. por el Método de Kinyoun	32
Extracción de ADN	32
Amplificación por PCR del Gen SSU rRNA	33
PCR primaria	33
PCR anidada	34
Análisis de RFLP del Gen SSU rRNA	34
Detección de los Productos Amplificados	35
Secuenciación	35
RESULTADOS	37
Aislados y Prueba de Kinyoun	37
Características de los Pacientes	37

Identificación Molecular de <i>Cryptosporidium</i>	41
Identificación de Especies de <i>Cryptosporidium</i> Mediante Secuenciación	46
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXO I	65
ANEXO II	67
ANEXO III	70
ANEXO IV	72

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Especies reconocidas del género <i>Cryptosporidium</i> .	6
2	Características clínicas de la criptosporidiosis.	21
3	Características especiales de <i>Cryptosporidium</i> que son relevantes para su epidemiología y transmisión.	25
4	Características demográficas de los casos de criptosporidiosis.	39
5	Especies y genotipos del gen SSU rRNA identificados en este estudio.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de un <i>Apicomplexa</i> .	8
2	Observación microscópica de <i>Cryptosporidium</i> spp.	10
3	Ooquistes y esporozoítos de <i>Cryptosporidium</i> spp.	12
4	Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	14
5	Vías de transmisión de <i>Cryptosporidium</i> spp.	16
6	Micrografía que muestra la criptosporidiosis.	19
7	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados con la tinción de Kinyoun.	38
8	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los amplificadores correspondientes a la región SSU rRNA de <i>Cryptosporidium</i> .	42
9	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión de la PCR anidada con la enzima <i>VspI</i> .	44
10	Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región SSU rRNA de <i>C. parvum</i> (Cp), <i>C. hominis</i> (Ch) y <i>C. felis</i> (Cf) identificadas en este estudio.	48

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
col.	Colaboradores
COWP	Proteína de la pared del ooquiste de <i>Cryptosporidium</i>
CSL	Ligando tipo circunsporozoíto
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
F	Femenino
FDA	Administración Nacional de Alimentos y Drogas
g	Gramos
<i>g</i>	Gravedades
GP60	Glicoproteína de 60 kDa
HIES	Hospital Infantil del Estado de Sonora
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
HSP	Proteína de choque térmico
ICZN	Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica
M	Masculino
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mg	Miligramo

min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ND	No hay dato
NIH	Instituto Nacional de Salud
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
s	Segundo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSU rRNA	Subunidad menor del ARN ribosomal
TRAP	Proteína adhesiva relacionadas con las trombospondinas
USON	Universidad de Sonora
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
<i>xg</i>	Fuerza centrífuga relativa
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
-	Negativo
%	Porcentaje
+	Positivo

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar molecularmente mediante PCR-RFLP el gen SSU rRNA de *Cryptosporidium* aislado de heces de pacientes en Hermosillo y la Cd. de México.

Objetivos Específicos

Identificar los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de heces de pacientes, mediante la técnica de Kinyoun.

Amplificar el gen SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. mediante PCR a partir del ADN genómico obtenido de las heces de los pacientes.

Identificar la especie de *Cryptosporidium* mediante RFLP, empleando las enzimas de restricción *SspI* y *VspI*.

RESUMEN

Cryptosporidium es el agente causante de criptosporidiosis, una infección diarreica que puede conducir a la deshidratación severa y muerte en pacientes inmunocomprometidos. Este parásito tiene una distribución mundial, se han descrito 20 especies, así como un gran número de nuevas variantes de *Cryptosporidium*. Los síntomas más comunes de la criptosporidiosis incluyen diarrea, náusea, vómitos, dolor abdominal y malestar general. La forma infectante y diagnóstica es el ooquiste. La introducción de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionó un diagnóstico específico a nivel de especie con alta sensibilidad, permitiendo un examen rápido, repetible y de alta precisión, con la capacidad de analizar gran número de muestras. Las herramientas moleculares han sido aplicadas generalmente para la identificación de los aislados de *Cryptosporidium* en los seres humanos y animales a nivel de especie y genotipo. En la actualidad, no existen estudios llevados a cabo en México para la identificación de las especies y genotipos circulantes de este parásito. El presente estudio está dirigido a caracterizar molecularmente mediante PCR-RFLP el gen SSU rRNA de *Cryptosporidium* aislado de heces de pacientes en Hermosillo y la Cd. de México para la identificación de las especies y genotipos circulantes de este parásito, permitiendo así el avance en el diagnóstico etiológico certero. En este trabajo se analizaron 17 casos positivos: se identificaron tres especies de *Cryptosporidium*: seis casos fueron *C. parvum* (genotipo bovino), diez casos *C. hominis* (genotipo humano) y un caso *C. felis*. Estos resultados se confirmaron mediante secuenciación de los productos de PCR anidados y su análisis. Este trabajo representa el primer reporte publicado de *Cryptosporidium* en muestras de heces humanas en México.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium es un género de parásitos protozoos que afecta a todas las especies de mamíferos, peces, reptiles, y aves. En los últimos años, distintas causas de inmunosupresión, en particular el VIH-SIDA, han situado a *Cryptosporidium* spp. como un patógeno emergente. El género *Cryptosporidium* pertenece al Phylum *Apicomplexa*, clase *Coccidia*, orden *Eucoccidiorida*, familia *Cryptosporidiidae* (Casemore, 1990). Varias características distinguen al género *Cryptosporidium* del resto de los coccidios, a pesar de las similitudes en su ciclo de vida: relativa especificidad de hospedador, capacidad de autoinfección endógena, localización intracelular y extracitoplasmática en la célula hospedadora, y resistencia a la terapéutica antiparasitaria (Smith y col., 2007). Veinte especies forman parte del género *Cryptosporidium* en la actualidad (Rossle y col., 2013). Entre todas las especies identificadas, *Cryptosporidium hominis* (anteriormente conocido como *C. parvum* genotipo I) infecta casi exclusivamente humanos. *Cryptosporidium parvum* (anteriormente conocido como *C. parvum* genotipo II) tiene una amplia gama de hospederos incluidos los seres humanos y los animales y ha sido considerado como una especie de zoonosis. Por otra parte, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium muris* y *Cryptosporidium suis* también han sido aislados de los seres humanos inmunocompetentes (Xiao y col., 2001; Xiao y col., 2004; Fayer, 2010).

La transmisión ocurre por la ingesta de agua contaminada con ooquistes, siendo esta vía la más significativa. Muchos brotes epidémicos de EE.UU. han ocurrido en parques acuáticos y albercas públicas, aunque esta vía de transmisión por aguas recreacionales es de menor importancia. Algo similar ocurre con alimentos contaminados, tanto frescos como mal cocidos. La transmisión directa entre individuos se produce por falta de higiene o por contacto sexual anal-oral. Los hospitales y guarderías favorecen la dispersión entre individuos, no necesariamente inmunocomprometidos, porque los ooquistes excretados en las heces son completamente infectivos. La criptosporidiosis es una de las más graves infecciones oportunistas en

pacientes con SIDA. Un paciente con SIDA con conteos de linfocitos T CD4⁺ <150 células/mm³ puede desarrollar una infección persistente, a menudo con una diarrea crónica y mortal (Chen y col., 2002). Los resultados de los estudios epidemiológicos moleculares han permitido una mejor apreciación de la importancia en salud pública de las especies y genotipos de *Cryptosporidium* en varios animales y mejorando el entendimiento de la infección en humanos. Las áreas geográficas, la temporada y las diferencias socioeconómicas en la distribución de *Cryptosporidium* spp. en humanos han sido identificadas y han sido atribuidas a diferencias en la fuente de infección en humanos. El cuadro clínico dependerá de características propias del hospedador, como edad y estado inmunológico, así como también de la especie parasitaria involucrada y la dosis infectiva (Carey y col., 2004). El signo clínico más común de la criptosporidiosis es la diarrea, presente en el 92% de los casos (Cacciò y col., 2006), aunque han sido informadas infecciones asintomáticas (Fayer y col, 2008).

Para la identificación de especies y genotipos son indispensables los estudios de biología molecular (Fayer y col, 2010). La introducción de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa proporciona un diagnóstico específico a nivel de especie con alta sensibilidad. La reacción en cadena de la polimerasa permite un examen rápido, repetible y de alta precisión, con la capacidad de analizar un gran número de muestras (Rossle y col., 2013). La PCR y el RFLP son útiles para diferenciar las especies y genotipos de *Cryptosporidium* (Sulaiman y col., 1999).

En la actualidad, la nitazoxanida está aprobada para el tratamiento de la criptosporidiosis en niños y adultos inmunocompetentes en los EE.UU. Sin embargo, la nitazoxanida no es eficaz sin una respuesta inmune apropiada y por lo tanto ineficaz contra individuos inmunocomprometidos (Gargala, 2008).

ANTECEDENTES

Criptosporidiosis

La criptosporidiosis constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, hasta el punto de ser considerada en la actualidad como una enfermedad emergente. La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por especies del género *Cryptosporidium*, ha sido reportada en más de 40 países en seis continentes, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos (Dillingham y col., 2002). La criptosporidiosis tiene una mayor incidencia en los países en desarrollo, especialmente en niños, pacientes institucionalizados, desnutridos y en personas inmunodeficientes (VIH) (Fayer y col., 2000).

Principalmente, la criptosporidiosis es responsable de la diarrea aguda autolimitada en personas inmunocompetentes y diarrea potencialmente mortal en personas inmunocomprometidas, especialmente en personas que reciben medicamentos inmunosupresores y pacientes con SIDA (Rossle y col., 2013). En estudios de heces de pacientes con gastroenteritis, la prevalencia de *Cryptosporidium* es del 1%-4% en Europa y América del Norte y del 1%-37% en África, Asia, Australia y América del Sur y Centroamérica (Menon y col., 2001; Tzipori y col., 2002; Mahgoub y col., 2004; Muñoz-Antoli y col., 2011). Entre las especies de *Cryptosporidium* más comunes en los seres humanos se encuentra, *C. parvum* y *C. hominis*, los cuales son responsables de más del 90% de los casos humanos de la criptosporidiosis (Xiao y col., 2004).

El primer caso de criptosporidiosis humana fue reportado en 1976, siendo descrito como una enterocolitis aguda, autolimitada en un niño de 3 años de edad (Nime y col., 1976). Dos meses más tarde, se informó de los primeros casos de criptosporidiosis en pacientes inmunodeficientes, y los médicos comenzaron a reconocer a *Cryptosporidium* spp. como un patógeno oportunista que causa diarrea crónica en pacientes con SIDA. Posteriormente, se reconocieron muchos casos y numerosas epidemias. En la primavera de 1993, Milwaukee tuvo un brote de criptosporidiosis

asociada con un aumento en la contaminación de las fuentes de agua y una ruptura en el proceso de filtración del agua en la Planta de Tratamiento de Agua en la Avenida Howard (la Planta Sur), provocando un fuerte aumento en la turbidez del agua. Más de 400 000 personas se enfermaron, y más de 100 personas inmunocomprometidas murieron como resultado de la infección por *Cryptosporidium*. Esta epidemia fue la más grande de la enfermedad a base de agua reportada en los Estados Unidos (Naumova y col., 2003).

Numerosos brotes nosocomiales de la criptosporidiosis se han producido entre los trabajadores de la salud, así como pacientes en las unidades de trasplante de médula ósea, los hospitales pediátricos y salas con pacientes infectados por el VIH (Rossle y col., 2013). Además, los pacientes hospitalizados de edad avanzada también están en riesgo de infección por *Cryptosporidium* (Giroto y col., 2013; Ajjampur y col., 2011, Naumova y col., 2003).

El Parásito: *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium fue reconocido por primera vez en el laboratorio por Tyzzer en el año de 1907, quien describió y aisló a *Cryptosporidium muris* del estómago de los ratones de laboratorio (Tyzzer, 1910). Después, en 1912, Tyzzer describió una segunda especie aislada en ratones de laboratorio, *C. parvum* (Tyzzer, 1912). Esta nueva especie difiere de *C. muris*, no sólo mediante la infección del intestino delgado en lugar del estómago, sino también por tener pequeños ooquistes. Se consideró a *Cryptosporidium* como un comensal hasta su asociación con diarreas en pavos jóvenes en los años 50, y con brotes importantes de diarrea en terneros en los años 70.

Cryptosporidium es un patógeno importante tanto en animales domésticos y de granja como en humanos, siendo reconocido como un problema de zoonosis; es considerado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) como un patógeno infeccioso emergente (Guerrant, 1997). Este parásito puede transmitirse por

contacto directo entre seres humanos y animales, o por contaminación de los alimentos, aunque la mayoría de los brotes de criptosporidiosis en humanos están asociados con agua potable o de recreo como piscinas o parques acuáticos. Debido a la fácil diseminación de *Cryptosporidium* en el suministro de agua es difícil controlar la infección, causando un efecto devastador para las comunidades. Este parásito aparece como uno de los agentes prioritarios transmitidos por el agua, de categoría B en los programas de investigación de biodefensa en el Instituto Nacional de Salud (NIH) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos (Mac Kenzie y col., 1994).

Especies de *Cryptosporidium*

Hasta la fecha, 20 especies y cerca de 60 genotipos de *Cryptosporidium* se han clasificado con la invalidación de algunas antiguas y la introducción de otros nuevos, los cuales han sido encontrados con base a secuencias del gen SSU rRNA (Tabla 1) (Insulander y col., 2013; Rossle y col, 2013). Las especies de *Cryptosporidium* fueron clasificadas por las características morfológicas de los ooquistes y por su habilidad de infectar a un único hospedero específico (Insulander y col., 2013).

Entre todas las especies identificadas, *C. hominis* (anteriormente conocido como el *C. parvum* genotipo I) infecta casi exclusivamente humanos. *C. parvum* (anteriormente conocido como el *C. parvum* genotipo II) tiene una amplia gama de hospederos incluidos los seres humanos y los animales y ha sido considerado como una especie de zoonosis. Por otra parte, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium muris* y *Cryptosporidium suis* también han sido aislados de los seres humanos inmunocompetentes (Xiao y col., 2001; Xiao y col., 2004; Fayer, 2010).

Tabla 1. Especies reconocidas del género *Cryptosporidium*.

Especie	Hospedero	Referencia
<i>C. hominis</i>	Humano	Morgan-Ryan y col., 2002
<i>C. parvum</i>	Bovino, humano	Gomez-Bautista y col., 2000
<i>C. andersoni</i>	Bovino	Lindsay y col., 2000
<i>C. muris</i>	Roedor	Pavlašek y col., 2007
<i>C. suis</i>	Cerdo	Ryan y col., 2004
<i>C. felis</i>	Gato	Morgan y col., 2000
<i>C. canis</i>	Perro	Fayer y col., 2001
<i>C. wrairi</i>	Cobayo	Vetterling y col., 1971
<i>C. baileyi</i>	Gallina, pavo	Current y col., 1986
<i>C. meleagridis</i>	Pavo, humano, aves	Xiao y col., 2001
<i>C. bovis</i>	Bovino, oveja	Fayer y col., 2005
<i>C. galli</i>	Aves	Ryan y col., 2003
<i>C. serpentis</i>	Reptil	Pedraza-Díaz y col., 2009
<i>C. saurophilum</i>	Lagarto, serpiente	Xiao y col., 2004
<i>C. molnari</i>	Pescado	Alvarez-Pellitero y col., 2002
<i>C. scophtalmi</i>	Pescado	Alvarez-Pellitero y col., 2004
<i>C. xiaoi</i>	Oveja, cabra	Fayer y col., 2009
<i>C. fragile</i>	Rana	Jirků y col., 2008
<i>C. ryanae</i>	Bovino	Fayer y col., 2008
<i>C. fayeri</i>	Canguro	Ryan y col., 2008

Fuente: Rossle y col., 2013.

Taxonomía

Egyed y col. propusieron que las únicas especies de *Cryptosporidium* aceptables debían ser aquellas que estuvieran caracterizadas de manera morfológica, biológica y genéticamente (Egyed y col., 2003). Xiao y col. publicaron un consenso de los requisitos mínimos para nuevas especies de *Cryptosporidium* que incluían datos morfométricos de los ooquistes, caracterización genética (incluyendo caracterizaciones multilocus cuando sea posible), la identificación de hospederos y la adhesión a las reglas de la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (Xiao y col., 2004).

Cryptosporidium pertenece al phylum *Apicomplexa*, clase *Coccidia*, orden *Eucoccidiorida*, familia *Cryptosporidiidae*. El phylum *Apicomplexa* está conformado por numerosos géneros de parásitos eucariotas patógenos de los seres humanos (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora*) (Pérez, 2006). Una característica del phylum *Apicomplexa* es la presencia de un conjunto de organelos en la zona apical como roptrías, micronemas, gránulos densos, microtúbulos y mitocondria (Figura 1) sólo visibles por microscopía electrónica; éstos organelos le confieren al parásito la capacidad de invadir las células y multiplicarse como parásitos intracelulares. Las roptrías, micronemas y gránulos densos contienen una mezcla compleja de proteínas que son secretadas, ya sea en el extremo apical del zoíto o dentro de la célula. Esas proteínas cumplen funciones de adhesión, unión específica a la célula hospedera, locomoción y formación de la vacuola parasitófora (Smith, 2007). El conoide es un cono de fibrillas que favorece la penetración a las células del hospedero, los microtúbulos están relacionados con la motilidad del parásito y los microporos participan en la ingestión de alimento durante la vida intracelular. Los estadios invasivos especializados zoítos poseen motilidad direccional de deslizamiento a lo largo de su eje longitudinal (Blackman y col., 2001).

Los coccidios son parásitos obligados de vertebrados e invertebrados que presentan ciclos de vida complejos, monoxenos o heteroxenos, e infectan células epiteliales del intestino, hígado u otros órganos (Blackman y col., 2001). A pesar de las

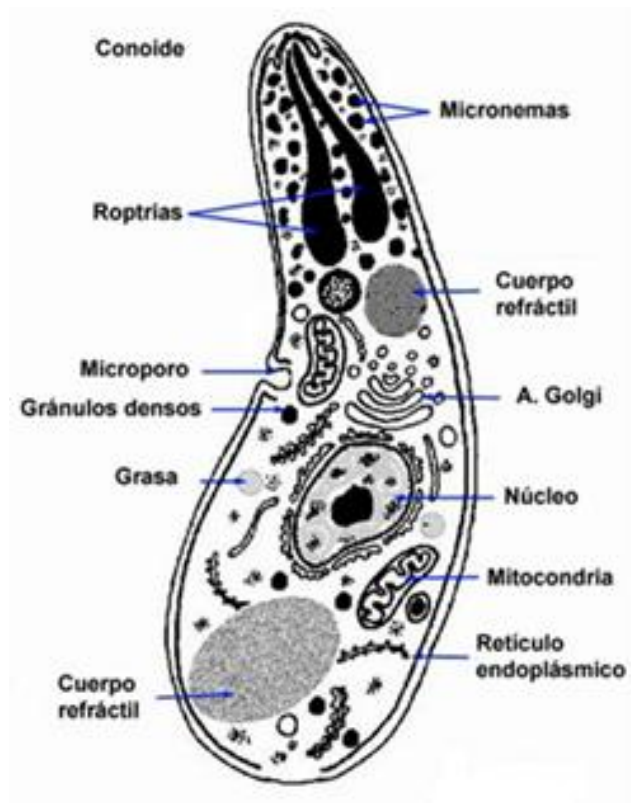


Figura 1. Estructura de un *Apicomplexa*.

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

similitudes en sus ciclos de vida, varias características distinguen al género *Cryptosporidium* del resto de los coccidios: relativa especificidad de hospedador, capacidad de autoinfección endógena, localización intracelular y extracitoplasmática en la célula hospedadora, y resistencia a la terapéutica antiparasitaria (Smith y col., 2007).

El Ooquiste

La única forma infectiva y de diagnóstico es el ooquiste, en materias fecales observadas en fresco, se ven como cuerpos esféricos o elípticos, refringentes y muy pequeños que no permiten hacer el diagnóstico, por lo que se requiere hacer coloraciones especiales como la técnica modificada de ácido-resistencia o Kinyoun, métodos de Giemsa o nuevos métodos de inmunoensayos (Figura 2). A la coloración se observan cuerpos esféricos, de 4 a 6 μm , rojos o rosados o transparentes porque toman el colorante de manera no homogénea, de pared gruesa, con cuatro esporozoítos, una vacuola y un cuerpo residual. En las células epiteliales del intestino presentan un tamaño entre 2 y 6 μm y se encuentran localizados en vacuolas parasitóforas. Tienen ocho cromosomas de tamaños moleculares semejantes y presenta uno de los genomas más pequeños de los organismos unicelulares eucarióticos (Rossle y col., 2013).

La dosis infecciosa es baja (menos de 10 ooquistes para algunas cepas (Fayer, 2004; Pantenburg y col., 2008). El período de prepatencia (desde la ingesta de los ooquistes hasta su aparición en la materia fecal) varía con el hospedador, la especie de *Cryptosporidium* involucrada y la dosis infectiva. En terneros, se estableció un período de prepatencia de 2 a 7 días, mientras que en el humano tiene una duración de 4 a 22 días, según se trate de individuos inmunocompetentes o inmunocomprometidos. El período de patencia (eliminación de ooquistes) tiene una duración de 1 a 12 días en terneros, y de entre 1 y 20 días en humanos (Del Coco y col., 2009). Las personas inmunocomprometidas experimentan la infección crónica a largo plazo, a menudo duran varios meses (Fayer, 2004). El número de ooquistes excretados por un individuo infecta-

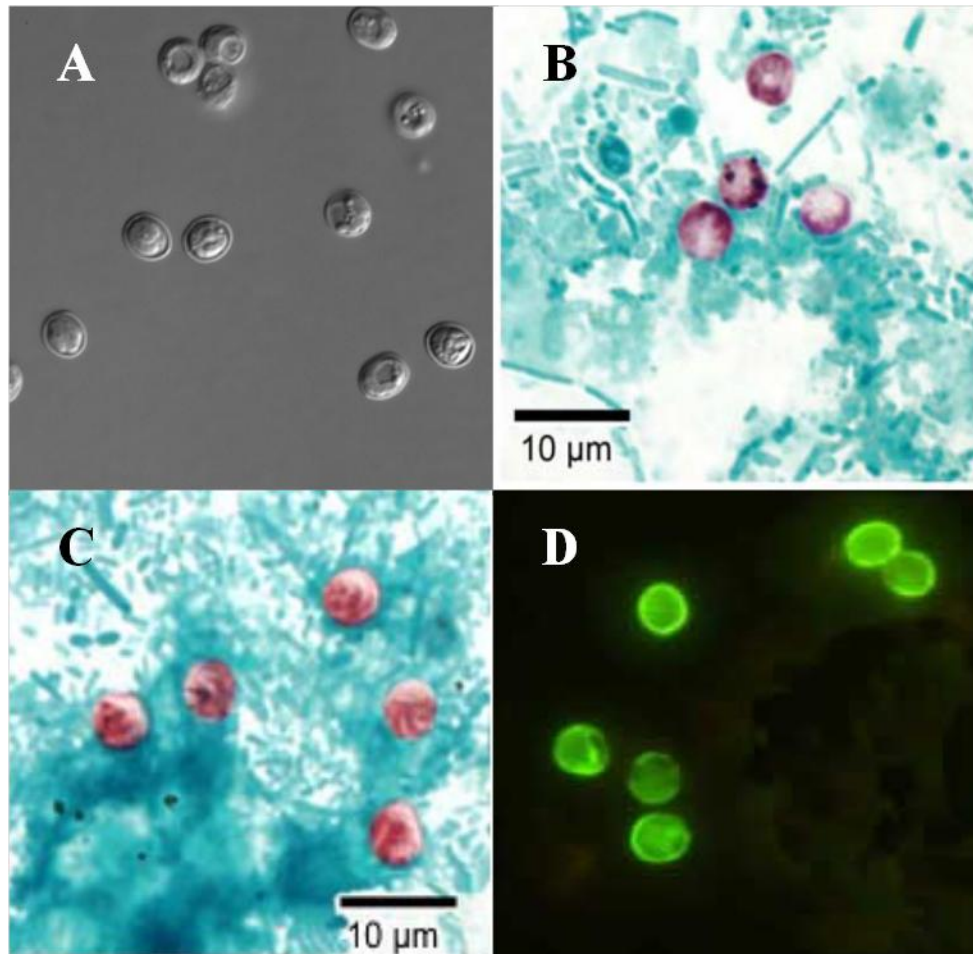


Figura 2. Observación microscópica de *Cryptosporidium* spp. (A) Microscopía de contraste diferencial de interferencia; (B) Tinción de Kinyoun; (C) Tinción con safranina; (D) Ensayo de anticuerpos fluorescentes directos.

Fuente: <http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>

do puede variar en gran medida; pueden sobrevivir en el ambiente por largos períodos de tiempo por debajo de 22 °C (Dillingham y col., 2002).

Ciclo Biológico de *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium tiene un ciclo de vida complejo, que tiene lugar dentro de la célula epitelial intestinal y se completa en un solo hospedero. El ciclo evolutivo es monoxeno y similar al de otros coccidios entéricos, con las fases de merogonia, gametogonia y esporogonia. El sitio primario de infección de *C. parvum* y *C. hominis* es el intestino delgado. En animales y humanos con inmunodeficiencias graves, este parásito también ha sido encontrado en sitios extraintestinales como vías biliares, hígado, vesícula biliar, páncreas y pulmones (Chen y col., 2002). Otras especies como *C. muris*, *C. andersoni* y *C. serpentis* se alojan en la mucosa gástrica, mientras que *C. baileyi* afecta al aparato respiratorio.

Una vez ingeridos los ooquistes por el hospedador susceptible se produce el desenquistamiento, es decir, la apertura de la pared del ooquiste a lo largo de una línea de sutura; esto permite que los cuatro esporozoítos sean liberados para producir la invasión (Figura 3) (Fayer, 2004). El desenquistamiento es un proceso que se cumple exclusivamente en parásitos metabólicamente activos y que involucra la acción de enzimas parasitarias como la proteinasa de cisteína, cuya función es degradar moco, y en segundo lugar, la acción de enzimas intestinales, así como cambios en la temperatura, el pH y sales biliares (Petry, 2004; Boulter-Bitzer y col., 2007). El contacto directo entre los ooquistes y el ácido siálico presente en la superficie de las células intestinales también constituye un estímulo para el desenquistamiento (Del Coco y col., 2009).

El phylum *Apicomplexa* se caracteriza por presentar un sistema de invasión celular muy sofisticado. Los esporozoítos liberados son móviles e invaden activamente la célula hospedadora. El extremo anterior de cada esporozoíto se adhiere a través del ligando tipo circunsporozoíto (CSL) a un receptor presente en las microvellosidades in-

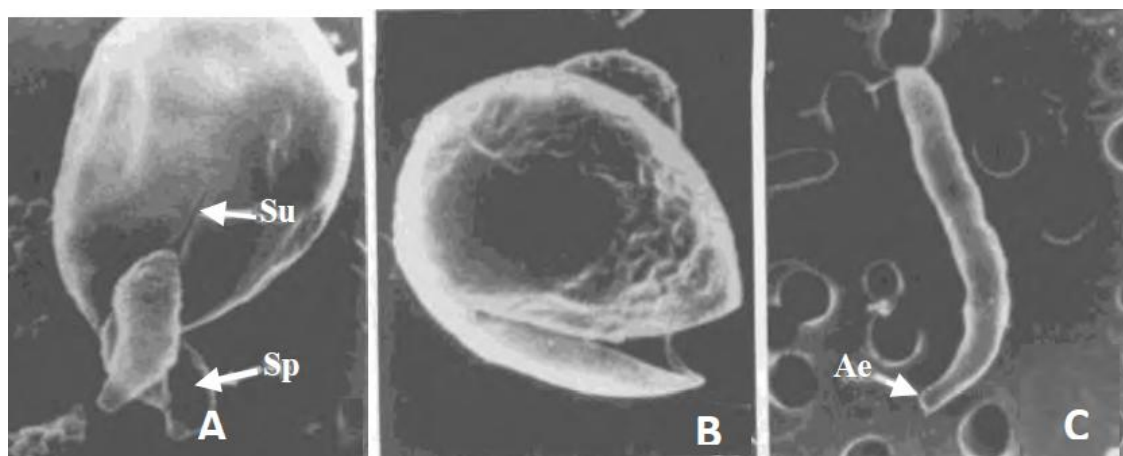


Figura 3. Ooquistes y esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. Microscopía electrónica de barrido, aumento 16 000 X. A: esporozoítos (Sp) desenquistando a través de la línea de sutura (Su); B: ooquiste vacío; C: esporozoíto desenquistado; Ae: extremo apical.

Fuente: Fayer y col., 2008.

testinales. Del extremo anterior del parásito surge una vacuola que se fusiona con la membrana de la célula para formar una interfase hospedador-parásito. El parásito queda contenido en una vacuola denominada parasitófora, de ubicación intracelular pero extracitoplasmática.

Un organelo único de alimentación o fijación se desarrolla entre el parásito y el citoplasma de la célula. Allí el parásito crece y sufre una reproducción asexual o fisión múltiple (merogonia) y origina el meronte I, con 8 merozoítos en su interior; luego de la ruptura del meronte I, los merozoítos liberados ingresan en una nueva célula epitelial y desarrollan en su interior un meronte I (con 8 merozoítos) o II (con 4 merozoítos). Esto se debe a que algunos merozoítos I son capaces de reciclarse indefinidamente con la producción continua de merontes I. Los merozoítos liberados por el meronte II parasitan nuevas células y se diferencian en macrogameto (femenino) y microgameto (masculino). El macrogameto evoluciona a macrogameto inmóvil femenina uninucleada y permanece en el interior del enterocito.

El microgameto se multiplica por fisión múltiple y origina 16 microgametos móviles que abandonan la célula parasitada en busca del macrogameto. Luego de la fecundación del macrogameto se origina el huevo o cigoto, único estado diploide del ciclo, que resultará en el ooquiste al adquirir la pared quística. Se produce la esporogonia, en la cual el núcleo diploide sufre una meiosis y se forman cuatro células haploides, los esporozoítos, que quedan contenidos dentro del ooquiste. Éste se libera finalmente del enterocito y es eliminado al medio ambiente (Figura 4) (Del Coco y col., 2009).

El 20% de los ooquistes producidos sufren una falla en la formación de la pared y se denominan ooquistes de pared fina. Éstos liberan los esporozoítos en la luz intestinal y pueden ingresarse en nuevos enterocitos. Así, *C. parvum* y *C. hominis* tienen 2 ciclos autoinfectivos: el reciclado continuo de los merontes tipo I, por un lado, y los esporozoítos derivados de los ooquistes de pared fina, por el otro (Del Coco y col., 2009).

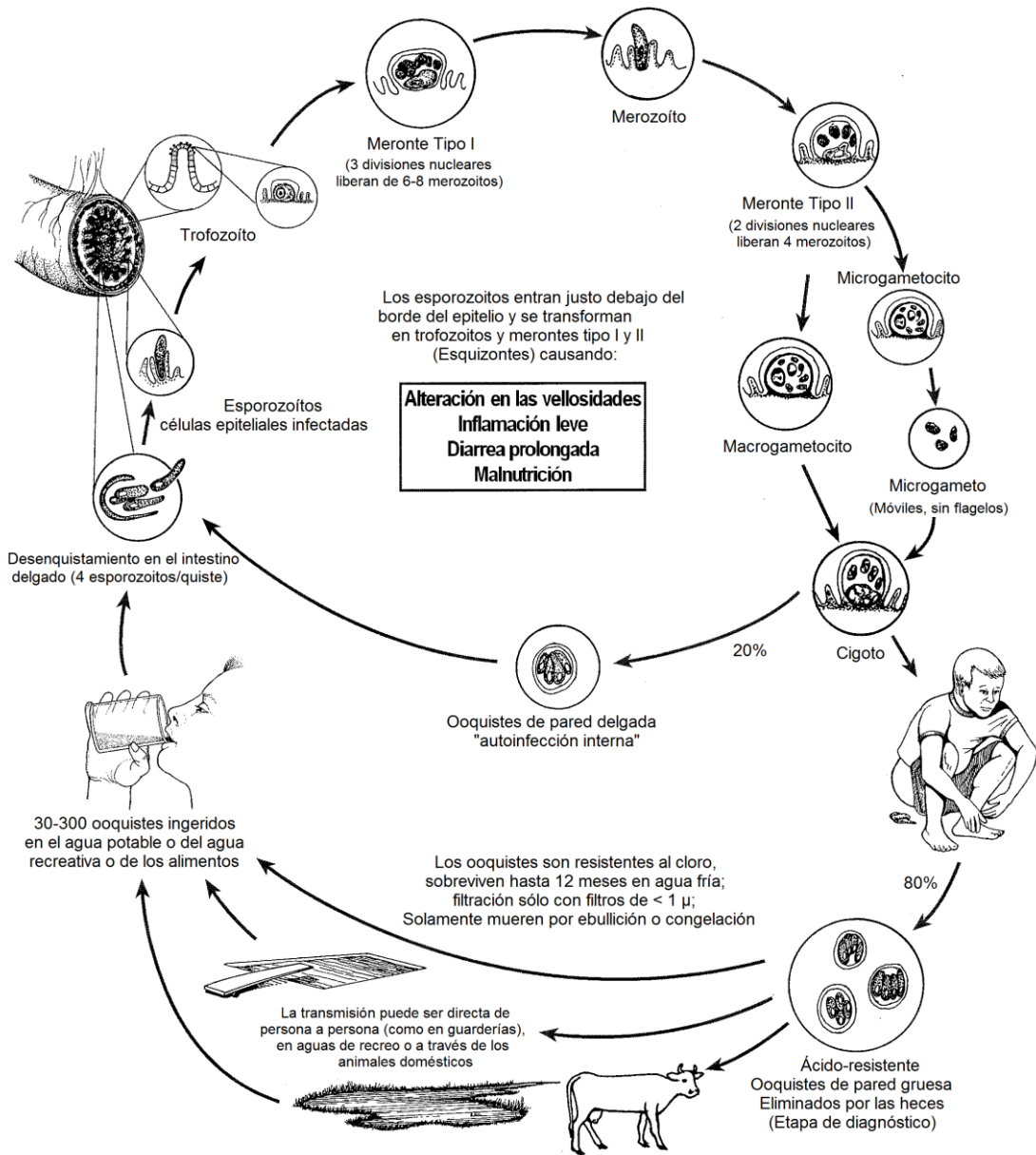


Figura 4. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

Fuente: Dillingham y col., 2002.

Transmisión de la Infección

El parásito se transmite por vía fecal-oral y la infección puede ser adquirida por las siguientes vías (véase Figura 5).

Agua Potable

Probablemente lo más común es la transmisión por el agua, ya sea en el agua potable clorada totalmente (que ha sido contaminada por lo general a través de las aguas superficiales contaminadas) o de efluentes de aguas residuales, ya que el tratamiento de aguas residuales a menudo no mata el parásito (Korich y col., 1990; Fayer y col., 2000). Fayer y col. (2000) han revisado unos 50 brotes hídricos reportados en todo los EE.UU., Reino Unido, Canadá y Nueva Zelanda, y la documentación de la contaminación fecal generalizada con ooquistes en las aguas residuales, el lodo activado, aguas superficiales y subterráneas, y el agua potable tratada. Aunque sigue habiendo dudas sobre la viabilidad, las especies y fuentes de ooquistes encontrados en el agua de la llave, numerosos brotes (incluyendo el enorme brote de Milwaukee) documentan ampliamente la importancia de la transmisión por el agua de las infecciones por *C. parvum* en los seres humanos (Dillingham y col., 2002).

Aguas Recreativas

Además, se han reportado 31 brotes (Fayer y col., 2000) que afectaron a más de 10 000 personas y se han asociado con la exposición a la criptosporidiosis en aguas de recreo, a pesar de la cloración y a menudo relacionados con los accidentes fecales frecuentes de los recién nacidos, niños pequeños que usan pañales o personas incontinentes.

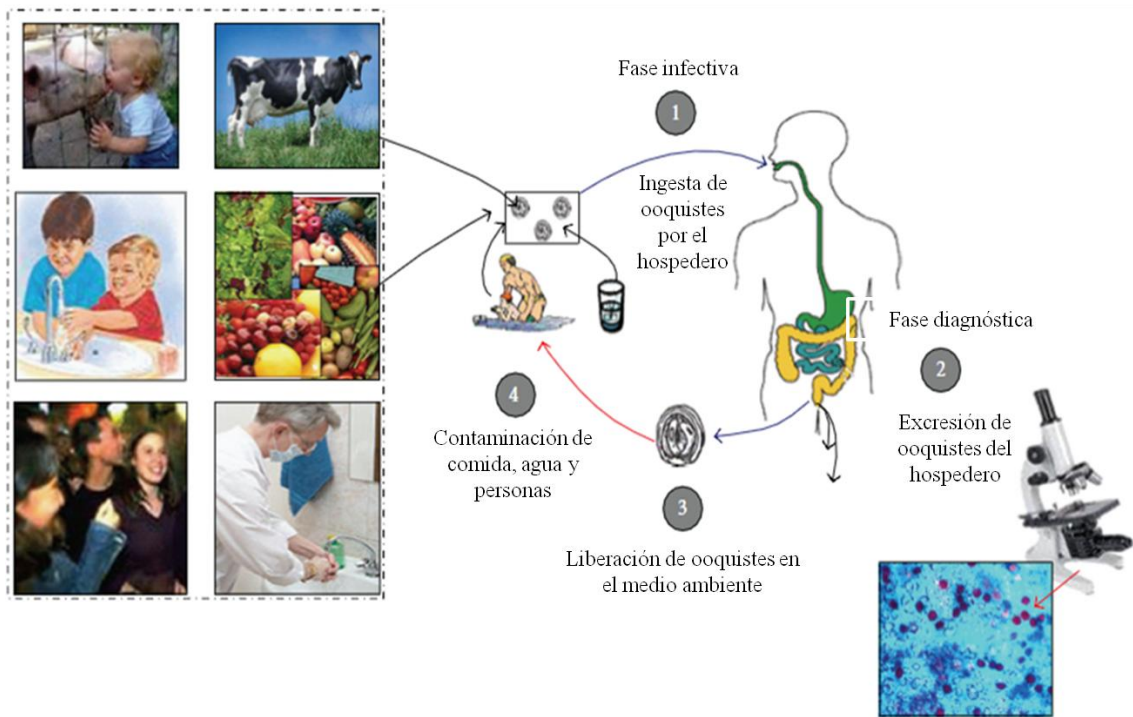


Figura 5. Vías de transmisión de *Cryptosporidium* spp.

Fuente: Putignani y col., 2010.

Alimentos

Mientras que el agua es un vector bien conocido para la transmisión de *Cryptosporidium*, recientemente se está viendo que los alimentos pueden jugar un papel muy importante en la transmisión de este parásito. Se han documentado varios brotes asociados con alimentos, entre los cuales está la sidra fresca de Maine y Nueva York (Millard y col., 1994; Fayer y col., 2000), la leche pasteurizada en forma incorrecta en el Reino Unido (Gelletlie y col., 1997), ensalada de pollo en Minnesota (CDC, 1996), las cebollas verdes crudas en Spokane, Washington, y una cocinera infectada por cortar verduras y frutas frescas en una cafetería de Washington, DC (Quiroz y col., 2000).

De Persona a Persona

La transmisión de persona a persona, se produjo en los hogares en un 5,4% (de los contactos familiares que desarrollaron la enfermedad sintomática en el brote de Milwaukee) al 19% (de los familiares de los niños infectados en Fortaleza, Brasil) (Mac Kenzie y col., 1994). Los brotes nosocomiales están probablemente relacionados con la propagación directa de persona a persona en ambientes institucionales, donde el saneamiento es difícil. La asociación con la exposición sexual anal también refleja una propagación directa de persona a persona.

De Animal a Persona

El brote de criptosporidiosis entre los estudiantes de veterinaria en la década de 1980 ilustra el potencial para la transmisión directa de animal a persona de *C. parvum* (Current y col., 1983). Los casos de infección humana con genotipos de gato, perro, y pavo también implican la transmisión de animales a personas (Newman y col., 1994).

Patología de la Criptosporidiosis

Cryptosporidium ha sido reconocido como una causa de enfermedad gastrointestinal, tanto en pacientes inmunocompetentes e inmunodeficientes. El sitio principal de infección es el intestino delgado (Figura 6), aunque la infección puede propagarse a través del tracto gastrointestinal y los sitios extraintestinales como vías biliares, hígado, vesícula biliar, páncreas y pulmones (Rani y col., 2009).

En los pacientes con VIH, las infecciones del intestino delgado suelen provocar diarrea grave y reducir las tasas de supervivencia. En comparación con una fuerte infección del colon que, en ausencia de infección del intestino delgado, puede causar diarrea intermitente o incluso una infección asintomática (Chalmers y col., 2010). Aunque la infección duodenal fue la más común en pacientes con SIDA, una infección generalizada en todo el mineral en el tracto intestinal se asoció con diarreas más graves.

Cryptosporidium interrumpe la función de la barrera intestinal y aumenta su permeabilidad, conduce al desplazamiento de la frontera de las microvellosidades y pérdida de la superficie del epitelio, provocando cambios en la arquitectura de las vellosidades causando atrofia de las mismas y la infiltración de células mononucleares en la lámina propia (Chalmers y col., 2010), disminuye la absorción y aumenta la secreción de líquido, electrolitos y nutrientes, lo que conduce a la desnutrición y la diarrea acuosa (Rossle y col., 2013). En los países en desarrollo, donde los niños son más susceptibles a la infección, la criptosporidiosis en la primera infancia puede estar asociada con el desarrollo físico y cognitivo deficiente posterior, incluso en ausencia de diarrea (Guerrant y col., 2011). La criptosporidiosis es una de las más graves infecciones oportunistas en pacientes con SIDA. Un paciente con SIDA con conteos de células T $CD4^+ < 150/mm^3$ puede desarrollar una infección persistente, a menudo con una diarrea crónica y mortal (Chen y col., 2002).

Cryptosporidium spp. invade las células del epitelio biliar por la superficie luminal de la membrana plasmática y realiza en ella ambos ciclos causando efectos

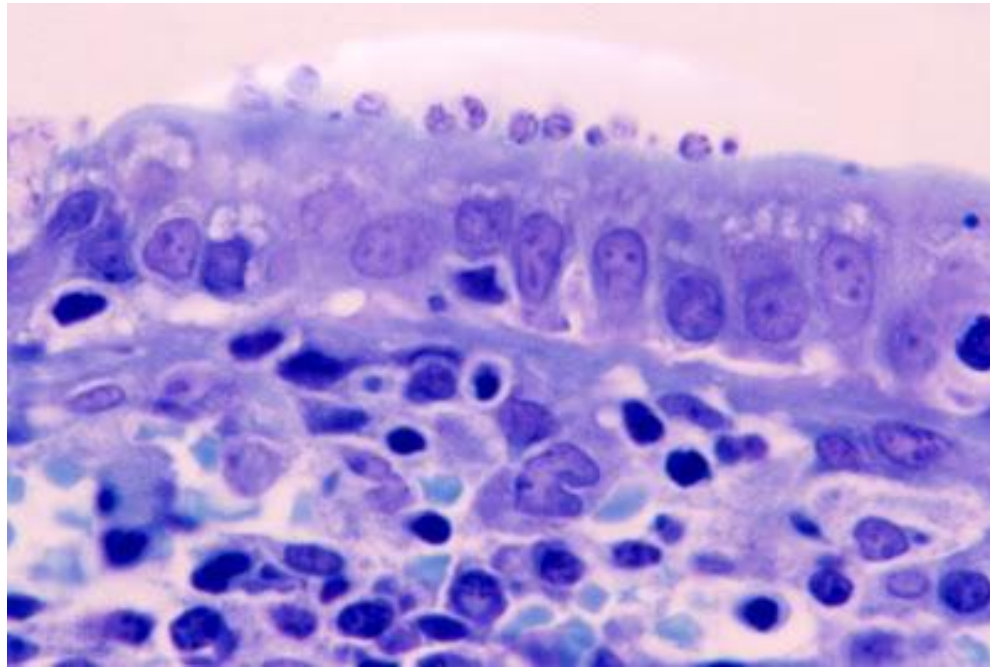


Figura 6. Micrografía que muestra la criptosporidiosis. Material de biopsia de intestino delgado evidenciando atrofia de vellosidades y la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* firmemente adheridos a la superficie epitelial de los enterocitos.

Fuente: Leite y col., 2006.

citopáticos (cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad celular) y apoptosis. Los parásitos se encuentran adheridos al epitelio de los conductos biliares, observándose edema, infiltración linfocítica y destrucción de la mucosa subyacente. Esta patología no ha sido informada en pacientes inmunocompetentes con criptosporidiosis. En biopsia pulmonar se ha encontrado neumonitis intersticial y trofozoítos de *Cryptosporidium* spp. en el exudado inflamatorio alveolar teñido (Dillingham y col., 2002).

Manifestaciones Clínicas

Se han reportado infecciones asintomáticas. Para otros, el curso clínico y la gravedad de la infección pueden variar considerablemente de persona a persona, dependiendo en gran parte del estado inmune del hospedero y en menor medida, el número de ooquistes ingeridos (Tabla 2) (Fayer, 2004). El síntoma más notable en personas inmunológicamente sanas es la diarrea, generalmente de manera voluminosa y acuosa, a veces con presencia de moco, pero la sangre y leucocitos son raros. Problemas de malestar abdominal, anorexia, náuseas, vómitos, pérdida de peso, fiebre, fatiga y respiratorias pueden acompañar la diarrea. Estas diarreas son la manifestación de un cuadro de enteritis, que afecta fundamentalmente al yeyuno e íleon (Idris y col., 2010).

En personas inmunocompetentes, la infección puede ser asintomática o producir manifestaciones clínicas, generalmente de aparición brusca y siempre autolimitadas donde el síntoma más frecuente es la diarrea, que puede acompañarse de cólicos abdominales y persisten durante 3 a 12 días, rara vez más de 2 semanas. Clínicamente no se puede distinguir de otras enfermedades diarreicas. Se ha mencionado que por la similitud de los síntomas y signos pueden confundirse con la intolerancia a la lactosa (Fayer, 2004).

De manera general, en los individuos inmunodeficientes las manifestaciones clínicas de la criptosporidiosis, en particular las diarreas, son más intensas y de larga

Tabla 2. Características clínicas de la criptosporidiosis.

Característica	Personas inmunocompetentes	Personas inmunocomprometidas
Población susceptible	Niños, especialmente menores de 1 año de edad y adultos de cualquier edad	Personas con SIDA, transplantados, personas sometidas a quimioterapia para cáncer
Lugar de infección	Usualmente intestinal	Intestinal o extraintestinal
Presentación entérica	Asintomática, aguda o persistente	Asintomática, transitoria, crónica y fulminante
Síntomas clínicos comunes	Diarrea, fiebre, dolor abdominal, vómito, náuseas y pérdida de peso	Diarrea, fiebre, dolor abdominal, vómito, náuseas y pérdida de peso. Manifestaciones extraintestinales dependiendo del sitio de infección
Duración clínica	Hasta 2 semanas	De 2 días hasta la muerte
Gravedad según el recuento de TCD4+		
>200 células/ μ L		Resolución espontánea
<100 células/ μ L		Infección crónica y extraintestinal
<50 células/ μ L		Fulminante
Desarrollo de la infección	Alta mortalidad en recién nacidos y niños en países en desarrollo	Transitoria o asintomática, crónica o fulminante
Tratamiento	No requiere tratamiento específico	Terapia antirretroviral altamente activa sola o en combinación con agentes antiparasitarios

Fuente: Chen y col., 2002.

duración. En personas desnutridas, sobre todo en niños, las diarreas son particularmente intensas y prolongadas. Estas diarreas, en unos casos acentúan la desnutrición y en otros, los más graves, llevan a trastornos hidroelectrolíticos severos que, a veces, pueden conducir a la muerte del paciente. En individuos con inmunodeficiencias reversibles, la intensidad y duración de las diarreas dependen del grado de incompetencia del sistema inmunológico. Generalmente, estas personas se recuperan cuando la causa de la inmunodeficiencia se elimina. La criptosporidiosis es la infección entérica de mayor significado clínico y epidemiológico en pacientes con SIDA. En estos casos ha sido demostrado que la severidad del cuadro clínico está relacionada con la cantidad de células CD4⁺ en sangre periférica (a menor número de éstas, mayor gravedad y duración de los síntomas).

Las diarreas suelen ser severas y persistentes, con importantes pérdidas de líquidos (se han cuantificado 10 L o más de diarreas acuosas en un solo día). La deshidratación y desbalances hidroelectrolíticos a que dan lugar estas diarreas pueden conducir a la muerte del paciente. En particular en casos con severas reducciones del número de células CD4⁺ en sangre periférica (menor de 200 células/mL), también puede ocurrir la extensión de la infección al resto del sistema digestivo y al aparato respiratorio. La localización extraintestinal de la infección por criptosporidiosis ha sugerido la posible diseminación hematogena de esta parasitosis. En este último tipo de pacientes, hay casos en los que se han registrado más de 70 evacuaciones por día, con una pérdida de hasta 25 litros de líquido (Chalmers y col., 2010).

Prevención

Las medidas profilácticas son de gran importancia en el control de la criptosporidiosis. Debido a que la transmisión se produce principalmente a través del contacto directo y el consumo de agua contaminada, las medidas generales de higiene y el tratamiento del

agua de consumo constituyen las principales medidas de prevención (Del Coco y col., 2009).

La eliminación de este microorganismo de las aguas constituye un desafío permanente para las plantas de tratamiento, aún en países con tecnología avanzada. El proceso de potabilización para lograr agua potable que cumpla los requisitos exigidos por la legislación vigente, abarca las etapas de coagulación, floculación, decantación, filtración y desinfección. Dado que los ooquistes resisten las condiciones del medio ambiente, que el cloro a las concentraciones usadas para potabilizar el agua no los destruye y que son infectivos aún en bajas dosis, es obvio que, una vez superadas las barreras de coagulación, filtración y desinfección, el microorganismo estará en condiciones de infectar un nuevo hospedero. Las medidas que se toman habitualmente durante el procesamiento de alimentos (pH bajo, congelamiento, calentamiento a 55°C por 30 segundos o a 70 °C por 5 segundos) para controlar la transmisión de enfermedades infecciosas y zoonosis son útiles para eliminar el parásito (Dillingham y col., 2002).

Por otro lado, para las personas inmunocomprometidas, las mejores medidas de profilaxis son las buenas prácticas de higiene, evitar la recreación en albercas públicas, evitar el consumo de aguas superficiales no potabilizadas y evitar el contacto con animales jóvenes. En hospitales, laboratorios y centros de atención de la salud debería minimizarse el contacto con fuentes de infección; esto implica el aislamiento de personas infectadas, el manejo cuidadoso de todo material biológico peligroso, la correcta gestión y disposición de residuos biológicos (Luján y col., 2008).

Epidemiología y Distribución Geográfica de la Criptosporidiosis

La criptosporidiosis es una infección de considerable incidencia tanto en países desarrollados como en desarrollo. Si bien los primeros casos fueron notificados en 1976, la enfermedad adquirió verdadera importancia a partir del verano de 1993, cuando se

produjo el brote epidémico más importante a nivel mundial, en Milwaukee, EE.UU., que afectó a más de 403 000 personas (Fayer, 2004). Desde entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40 países. La prevalencia de infecciones humanas es menor en los países industrializados en los cuales la población tiene acceso a mejores servicios sanitarios y agua de bebida más limpia que en los países menos desarrollados (Luján y col., 2008).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. presentan características biológicas trascendentales para la epidemiología y su propagación: ooquistes que son altamente resistentes al cloro (y ácido), tamaño relativamente pequeño, baja dosis infecciosa, naturaleza completamente esporulado e infeccioso inmediatamente después del vertimiento y su potencial zoonótico (al menos para las cepas distintas de *C. parvum*, genotipo 1) (Tabla 3) (Dillingham y col., 2002; Fayer, 2004). La transmisión zoonótica y antroponótica de *C. parvum* ocurre mediante la exposición a animales infectados o al agua contaminada por las heces de esos animales. Con respecto a la transmisión antroponótica de *C. hominis*, la dispersión ocurre por contacto directo con individuos infectados o por ingesta de aguas contaminadas por heces.

Los resultados de los estudios epidemiológicos moleculares han permitido una mejor apreciación de la importancia en salud pública de las especies y genotipos de *Cryptosporidium* en varios animales y mejorando el entendimiento de la infección en humanos. Las áreas geográficas, la temporada y las diferencias socioeconómicas en la distribución de *Cryptosporidium* spp. en humanos han sido identificadas y han sido atribuidas a diferencias en la fuente de infección en humanos.

C. hominis y *C. parvum* son los agentes que mayormente causan criptosporidiosis en individuos tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, pero su prevalencia varía en diferentes regiones del mundo. Distintos análisis macro-epidemiológicos muestran que *C. hominis* es más prevalente en el Norte y Sur de América, Australia y África, donde *C. parvum* causa más infecciones en humanos en Europa, especialmente en Reino Unido. Particularmente *C. meleagridis* puede ser con-

Tabla 3. Características especiales de *Cryptosporidium* que son relevantes para su epidemiología y transmisión.

Característica	Importancia epidemiológica
Ooquistes resistentes al cloro (y ácido)	Fácilmente extendido en agua o piscinas totalmente clorados y en alimentos ácidos (por ejemplo, la sidra)
Tamaño relativamente pequeño	Difícil para filtrar; es una amenaza a la industria del agua
Baja dosis infecciosa	Adquirida fácilmente, con altas tasas de infección (por ejemplo, agua de Milwaukee, hospitales y hogares)
Totalmente infeccioso al contacto	Propagación de persona a persona (por ejemplo, hogares, hospitales y guarderías)
Potencial zoonótico	Contacto con animales (por ejemplo, los estudiantes de veterinaria; ganado y los brotes en zoológicos)

Fuente: Dillingham y col., 2002.

firmado como un patógeno emergente del humano, siendo responsable de 1% de todas las infecciones en Inglaterra y cerca del 10% en Perú, donde prevalece altamente *C. parvum*.

El genoma completo de *C. parvum* y *C. hominis* ha facilitado el descubrimiento de numerosos polimorfismos genéticos, los cuales han sido usados como marcadores genéticos para la caracterización de rutas de transmisión y población de parásitos (Widmer, 2009).

Diagnóstico de la Criptosporidiosis

El diagnóstico de rutina de la criptosporidiosis en la mayoría de los países se ha basado en la detección microscópica de ooquistes después de la tinción del frotis fecal. Los métodos de concentración que utilizan los principios de flotación y sedimentación se han utilizado ampliamente, con soluciones tales como sacarosa, sal, sulfato de zinc y de formol-éter (Blagburn y col., 2006; Tuli y col., 2010); la utilización de métodos de concentración de materia fecal aumenta la sensibilidad del diagnóstico microscópico (Del Coco y col., 2009). Suelen utilizarse las técnicas de coloración de Ziehl-Neelsen modificada o Kinyoun (Zaglool y col., 2013). El método de Kinyoun es eficiente y confiable para el diagnóstico de *Cryptosporidium* (Figura 2); sin embargo, a pesar de ser fácil y de bajo costo, no pueden distinguir entre especies y genotipos de *Cryptosporidium* (Morgan y col., 1997).

Se han desarrollado métodos inmunológicos basados en la detección de antígenos que utilizan anticuerpos para detectar ooquistes. Es preferible la prueba de anticuerpos monoclonales que anticuerpos policlonales, ya que no mostró reactividad cruzada con otras especies (Latif y col., 2008). Los kits basados en la inmunofluorescencia, utilizan un anticuerpo monoclonal con isotiocianato de fluoresceína conjugado anti-*Cryptosporidium* que reconoce epítomos de la superficie del ooquiste de *Cryptosporidium* (Chalmers y col., 2011); sin embargo, este tipo de métodos es caro y

necesita equipo especializado como microscopio de fluorescencia.

La introducción de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporciona un diagnóstico específico a nivel de especie con alta sensibilidad. La PCR permite el examen rápido, repetible y de alta precisión, con la capacidad de analizar un gran número de muestras (Fayer y col., 2000). Una variedad de loci de genes se utilizan en el diagnóstico de ADN *Cryptosporidium*, incluyendo la pequeña subunidad del rRNA (también conocido como 18S ARNr) (Xiao y col., 1999), la proteína de choque térmico (gen HSP70) (Sulaiman y col., 2000), el gen de la proteína de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP) (Patel y col., 1999), la glicoproteína GP60 (Xiao, 2010), el gen para la proteína adhesiva relacionada a tromboespondina de *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1) (Spano y col., 1998) y el gen de la actina (Sulaiman y col., 2002).

Sin lugar a dudas, los marcadores de ADN están en la vanguardia en los estudios de *Cryptosporidium* spp. El SSU rRNA ha sido el marcador genético utilizado con mayor frecuencia para *Cryptosporidium*. En la actualidad, 28 de las 30 especies nombradas se pueden identificar mediante el análisis completo o parcial de SSU rRNA, que actúa como un "código de barras" que permite la reconstrucción filogenética de todo el género *Cryptosporidium* (Slapeta, 2013).

El estudio de los genes de la subunidad pequeña del rRNA (SSU rRNA) divide a las especies del género *Cryptosporidium* en dos grupos; uno formado por *C. muris* y *C. serpentis*, y otro formado por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi* y *C. parvum*. Este estudio (gen SSU rRNA) es utilizado generalmente en la genotipificación de *Cryptosporidium* en humanos, animales y muestras de agua. Una revisión de estudios originales de genotipificación de *Cryptosporidium* en los últimos años reveló el uso de herramientas basadas en el gen SSU rRNA en 100 (86%) de 116 publicaciones. En particular, una herramienta de uso común por PCR-RFLP utiliza la amplificación de un fragmento hipervariable de 830 pb del gen ribosomal y el uso de las enzimas de restricción *SspI* y *VspI* para la genotipificación se ha reportado en 70 (60%) de 116 publicaciones. El uso generalizado del gen SSU rRNA en la genotipificación de

Cryptosporidium se debe principalmente a la naturaleza multicopia del gen y la presencia de las regiones semiconservadas e hipervariables, que facilitan el diseño de cebadores específicos para el género (Xiao y col., 2009). Se han descrito ocho genotipos en *C. parvum* al estudiar los genes que codifican la proteína externa de membrana (COWP), la proteína adhesiva relacionada a trombospondina C1 (TRAP-C1) y el gen SSU rRNA, siendo los de origen humano y bovino los que presentan mayor importancia clínica. El genotipo bovino se asocia a infecciones humanas producidas por contacto directo con bovinos infectados o sus heces (Xiao y col., 2008).

Las herramientas basadas en el análisis de los genes codificantes de la proteína de la pared del ooquiste (COWP) se utilizaron en sólo 23 de las 116 publicaciones originales (muchos de ellos en combinación con herramientas basadas en SSU rRNA) y otros genes se utilizaron raramente. Las herramientas de PCR basadas en estos genes en general, sólo amplifican el ADN de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* y especies/genotipos estrechamente relacionados con *C. parvum* (Xiao y col., 2009).

Estas herramientas son cada vez más utilizadas en los estudios epidemiológicos de la criptosporidiosis en las zonas endémicas y epidémicas, lo que ha mejorado significativamente la comprensión de la transmisión de la criptosporidiosis en humanos y animales (Xiao, 2010).

Tratamiento de la Criptosporidiosis

En las últimas décadas, los conocimientos sobre la fisiopatología, el ciclo biológico y el diagnóstico de *Cryptosporidium*, han avanzado notoriamente. Sin embargo, en los campos de la terapéutica y la profilaxis, han fracasado los intentos destinados al hallazgo de un agente quimioterápico efectivo contra el parásito. Aunque más de 200 drogas han sido probadas tanto *in vivo* como *in vitro*, ninguna de ellas resultó totalmente efectiva en el tratamiento de la infección (Cacciò y col., 2006). La elevada prevalencia de infección y las limitadas opciones de tratamiento actuales impulsan el desarrollo de nuevos

agentes terapéuticos (Rossignol, 2010).

En la actualidad, la nitazoxanida está aprobada por la FDA para el tratamiento de la criptosporidiosis en niños y adultos en los EE.UU.; sin embargo, la nitazoxanida no es eficaz sin una respuesta inmune apropiada y por lo tanto ineficaz en aquellos individuos inmunocomprometidos (Gargala, 2008). El tratamiento que se aplica actualmente a los pacientes inmunocompetentes es la rehidratación y reposición de sales.

Las tasas de recuperación y supervivencia ha mejorado dramáticamente con el uso de la terapia antirretroviral de gran actividad, lo que provoca un aumento en la cuenta de linfocitos T CD4⁺ en individuos inmunocomprometidos (Carey y col., 2004). La introducción de los inhibidores de la proteasa en la terapia antirretroviral es altamente efectiva, interfiriendo directamente con el ciclo de vida del parásito (Hommel y col., 2003). Cuando no es posible administrar una terapia antirretroviral o la misma resulta inefectiva, se recurre a la combinación de un agente antiparasitario y uno antidiarreico.

Las drogas antiparasitarias comúnmente usadas son paromomicina, azitromicina y nitazoxanida, solas o en diferentes combinaciones, las cuales resultan moderadamente efectivas. La interpretación contrapuesta de los resultados de ensayos clínicos para probar la efectividad de drogas antiparasitarias puede ser atribuida, al menos parcialmente, al uso de diferentes genotipos de *Cryptosporidium* por diferentes grupos de investigación (Luján y col., 2008).

Dado que no hay ningún fármaco que logra la completa eliminación de *Cryptosporidium* en el hospedero, se prefiere la terapia de apoyo, tanto en humanos y animales domésticos; esto consiste en el reemplazo de líquidos y electrolitos, apoyo nutricional y medicamentos contra la diarrea (Zintl y col., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia.

El presente estudio se llevó a cabo de agosto del 2012 a junio del 2014 en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Sonora. Se recolectaron muestras en guarderías públicas y privadas (Hermosillo, Sonora), en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Sonora (Hermosillo, Sonora), en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES, Hermosillo, Sonora) y en el Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG, Cd. de México, Distrito Federal).

Declaraciones de Ética

El reclutamiento de los pacientes infectados con *Cryptosporidium* spp. diagnosticados por el método de Kinyoun se llevó a cabo en la Universidad de Sonora, en el HIES y las muestras positivas del HIMFG fueron proporcionadas por la Dra. Rosa María Bernal. El análisis del gen SSU rRNA de *Cryptosporidium* se realizó en la Universidad de Sonora.

Todos los participantes firmaron previamente un consentimiento informado (ANEXO I), explicando el objeto de la investigación, incluidos los riesgos y beneficios, todo esto buscando siempre salvaguardar la integridad del individuo. El proyecto fue evaluado y aprobado por el comité de ética del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

Los Pacientes y el Control

Las muestras incluidas en este proyecto de investigación fueron de pacientes que

acudieron al servicio del Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), del Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Sonora y del Laboratorio de Parasitología y Micología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Los criterios de inclusión de los participantes fueron: género indistinto, edad indistinta, muestra de heces con resultado positivo a ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por el método de Kinyoun, con o sin síntomas de la infección; los criterios de exclusión fueron: muestra identificada incorrectamente, con cantidad de heces insuficiente o muestra contaminada con hongos y los criterios de eliminación fueron: que el participante no firmará el consentimiento, que decidiera no participar en el estudio o que el diagnóstico parasitológico por el método de Kinyoun fuese negativo a ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Se contó con ADN de dos especies diferentes de *Cryptosporidium*: *C. parvum* y *C. hominis* de pacientes con VIH en Perú, previamente identificados por el análisis de PCR-RFLP del gen SSU rRNA y la secuenciación de ADN del gen GP60 (Cama y col., 2007).

Muestras y Procesamiento de Materia Fecal

Las muestras fueron recolectadas en recipientes especiales (de plástico con boca ancha y tapón de rosca) por el paciente o tutor. Las muestras de Sonora fueron transportadas en hieleras con refrigerantes al Laboratorio de Investigación de la Universidad de Sonora, así también las muestras de la Cd. de México fueron enviadas por paquetería al mismo laboratorio. Todas las muestras fueron procesadas y evaluadas microscópicamente en busca de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante el método de Kinyoun (Ziehl-Neelsen modificado). Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis. Después se realizó la extracción de ADN genómico para proceder a realizar el diagnóstico molecular por PCR-RFLP del gen SSU rRNA.

Diagnóstico de Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por el Método de Kinyoun

Se elaboró un frotis delgado de la muestra de heces y se fijó con calor. Después se colocó el portaobjetos en un puente de tinción, donde se agregó metanol y se dejó secar por 5 s. Se cubrió con fucsina básica al 1% durante 2 min y se lavó con agua de la llave. Se decoloró con ácido sulfúrico al 10%, luego se lavó con agua por varias ocasiones hasta lograr un rosa pálido. Se cubrió con verde brillante al 1% durante 30 s para lograr una coloración de contraste, se lavó con agua y se dejó secar. Se observó el frotis al microscopio con aceite de inmersión con el objetivo 100x en busca de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (ANEXO II).

Extracción de ADN

Se colocaron 1.4 mL de amortiguador de lisis (ASL) en un tubo eppendorf, se adicionaron 200 µL de una suspensión de la muestra de heces. Se aplicaron 5 cambios de temperatura de -80 °C a 96 °C. Se mezcló en vórtex por 1 min en cada ciclo, después se centrifugó a 16 000 g por 1 min, se pasaron 1.2 mL del sobrenadante a otro tubo de 2 mL. Se adicionó una tableta Inhibitex (para adsorción de impurezas) y se mezcló de inmediato en vórtex por 3 min, luego se dejó 1 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar por 3 min a 20 000 g. Se pasó todo el sobrenadante a otro tubo de 1.5 mL y se centrifugó por 3 min a 16 000 g. Se colocaron en otro tubo de 1.5 mL, 15 µL de proteinasa K (descomposición de proteínas) y 200 µL del sobrenadante del paso anterior, además se agregaron 200 µL de amortiguador AL (solución de lisis a base de guanidina), esto se mezcló en vórtex por 15 s. La mezcla se calentó a 70 °C por 10 min y se centrifugó por 1 min a 16 000 g. Posteriormente se adicionaron 200 µL de etanol absoluto, se mezcló en vórtex y se centrifugó 1 min a 16 000 g. Se pasó todo el sobrenadante a una columna QIAamp spin y se centrifugó 1 min a 16 000 g. Se cambió la columna a otro tubo de colección y se adicionaron a la columna 500 µL de amortiguador AW1 (solución de lavado astringente a base de etanol que contiene una

baja concentración de guanidina), se centrifugó 1 min a 16 000 g, luego se cambió la columna a otro tubo de colección. Se adicionaron a la columna 500 µL de amortiguador AW2 (solución con etanol a base de Tris que elimina cualquier sal presente) y se centrifugó por 3 min a 16 000 g. Se cambió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 200 µL de amortiguador de elusión AE (solución de Tris-EDTA que eluye el ADN unido a la membrana). Se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min a 16 000 g para eliminar la columna y se guardó el ADN filtrado a -20 °C (Jiang y col., 2005).

Amplificación por PCR del Gen SSU rRNA

PCR primaria

Se etiquetó un tubo como mezcla de reacción y se añadieron los reactivos por orden: 28.1 µL de agua, 5.0 µL de amortiguador 10X, 3.0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2.0 µL de albúmina sérica bovina (10 mg/mL), 8.0 µL de dNTP (1.25 mM), 1.3 µL de iniciador F1 (10 µM), 1.3 µL de iniciador R1 (10 µM) y 0.3 µL de *Taq* Polimerasa (2.5 U/µL). Se multiplicaron todas las cantidades de los reactivos por el total de muestras a amplificar con objeto de que al realizar esta mezcla se tenga la cantidad exacta de los reactivos que conforman la mezcla de reacción y sea la cantidad adecuada para que se pueda llevar a cabo la amplificación. Se colocaron 49 µL de la mezcla de reacción a cada tubo de PCR y se agregó 1 µL de ADN extraído de la muestra a cada tubo. Se etiquetaron los tubos controles y los tubos de las muestras, y se colocaron en el termociclador. Se realizaron 35 ciclos de amplificación (94 °C durante 45 seg, 55 °C durante 45 seg, y 72 °C durante 1 min), con una temperatura inicial de 94 °C por 3 min y una extensión final de 72 °C durante 7 min. Los iniciadores que se utilizaron en la amplificación primaria fueron: iniciador F1 (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') y el iniciador R1 (3'-CCCATTTCTTCGAAACAGGA-5'), obteniendo un amplicón de 1322 pb (Xiao y col., 1999).

PCR anidada

Se etiquetó un tubo como mezcla de reacción y se añadieron los reactivos por orden: 26.5 µL de agua, 5.0 µL de amortiguador 10X, 3.0 µL de MgCl₂ (25 mM), 8.0 µL de dNTP (1.25 mM), 2.6 µL de iniciador F2 (10 µM), 2.6 µL de iniciador R2 (10 µM) y 0.3 µL de *Taq* Polimerasa (2.5 U/µL). Se multiplicaron todos los reactivos por el total de muestras a amplificar. Se añadieron 48 µL de la mezcla de reacción a cada tubo de PCR y se agregaron 2.0 µL del producto de la PCR primaria a cada tubo. Se etiquetaron los tubos controles y los tubos de las muestras, y se colocaron en el termociclador.

Se emplearon condiciones de PCR estándar, con una desnaturalización de 3 min a 94 °C seguida de 35 ciclos de amplificación (94 °C durante 45 seg, 55 °C durante 45 seg, y 72 °C durante 1 min), finalizando con una elongación de 72°C durante 7 min. Para la PCR anidada, se utilizaron: el iniciador F2 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGA TAAAG-3') y el iniciador R2 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'), obteniendo un amplicón de 826 a 864 pb (Xiao y col., 1999).

Análisis de RFLP del Gen SSU rRNA

Se etiquetó un tubo como mezcla de reacción *SspI* y se añadieron los reactivos por orden: 5 µL de amortiguador *SspI* y 1 µL de la enzima de restricción *SspI*. De igual forma se etiquetó otro tubo como mezcla de reacción *VspI* y se añadieron: 5 µL de amortiguador D, 1 µL de albúmina sérica bovina y 1 µL de la enzima de restricción *VspI*. Se multiplicaron todos los reactivos por el total de muestras a digerir con objeto de que al realizar estas mezclas se obtuviera la cantidad exacta de los reactivos que conforman las mezclas de reacción y sean la cantidad adecuada para que se pueda llevar a cabo la digestión de restricción. Se transfirieron 6 µL de la mezcla *SspI* a cada tubo y se añadieron 10 µL del producto de la PCR anidada a cada tubo y se mezcló; se transfirieron 7 µL de la mezcla *VspI* a cada tubo y se añadieron 10 µL del producto de

PCR anidada a cada tubo y se mezcló. Se dejó incubando a 37 °C durante 4 horas. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, utilizando 6 µL del producto de la reacción de digestión de restricción y 2 µL del amortiguador de carga en cada pozo. Se identificaron las especies de *Cryptosporidium* y genotipos con base en los patrones de las bandas de RFLP (ANEXO III) (Meamar y col., 2006; Dearen, 2009).

Detección de los Productos Amplificados

La detección de los productos amplificados se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Para preparar el gel fue necesario pesar 0.36 g de agarosa, colocándola después en 30 mL de amortiguador TAE 1X con el colorante Sybersafe. Se calentó la agarosa por 30 s en un horno de microondas. El gel se vertió en el soporte para su solidificación y luego se montó el gel en la cámara de electroforesis, donde previamente se agregaron 300 mL de solución TAE 1X. En cada pozo se adicionaron 5 µL de muestra de ADN obtenido de la PCR anidada más 2 µL del amortiguador de carga. En uno de los pozos del gel se agregaron 4 µL del marcador de peso molecular 1000 bp Molecular Ruler (BIORAD) más 2 µL del amortiguador de carga. Se realizó la corrida electroforética a 90 volts por 30 min, pasado el tiempo se realizó un cambio de voltaje (100 volts) por 20 min. Se escurrió el gel y se colocó en un transiluminador UV (BIORAD) para ser fotodocumentado.

Secuenciación

La identificación de los genotipos de *Cryptosporidium* se confirmó secuenciando los productos de PCR anidado del gen SSU rRNA. Los productos de PCR se procesaron mediante el protocolo de GFX™ PCR DNA and gel band purification kit, de QIAGEN. Una vez purificados y cuantificados se secuenciaron según el método descrito por Sanger en el laboratorio de la Universidad de Arizona (Genomic Analysis and

Technology Core; GATC). Las secuencias se compararon con los aislados en la base de datos GenBank utilizando el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Se realizaron también alineamientos de secuencias múltiples (CLUSTALW; <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislados y Prueba de Kinyoun

En este estudio se caracterizaron los aislados de pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos en los cuales se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por microscopía en muestras de heces diarreicas y no diarreicas teñidas por el método de Kinyoun (Ziehl-Neelsen modificado) (Figura 7). Se obtuvieron 17 muestras de heces positivas mediante la tinción de Kinyoun para ooquistes de *Cryptosporidium* spp.; 10 muestras procedentes de la Ciudad de México, Distrito Federal y 7 muestras de Hermosillo, Sonora.

En México, los datos epidemiológicos acerca de la criptosporidiosis son escasos, ya que son pocos los hospitales que declaran la presencia de *Cryptosporidium* spp. mediante la observación e identificación de ooquistes esto llevado a cabo mediante la tinción de Kinyoun o Ziehl-Neelsen modificada. De ahí la importancia de mostrar que esta prueba presuntiva es fácil y de manera rápida identifica a pacientes portadores de este parásito. Una vez identificadas las muestras positivas se puede continuar con la identificación de la especie.

Características de los Pacientes

Doce pacientes eran de sexo masculino; 9 de las 17 muestras positivas fueron de pacientes inmunocomprometidos (53%): 3 pacientes con infección con VIH, 3 pacientes con desnutrición, 1 paciente con VIH y desnutrición y 2 pacientes sometidos a trasplante. Tres de 17 (18%) muestras positivas fueron de pacientes inmunocompetentes con diarrea y uno con síndrome de Down. Cabe mencionar que no se obtuvieron los datos clínicos de 4 pacientes con Kinyoun positivo procedentes del HIMFG (Tabla 4).

Es lógico pensar que los pacientes inmunocomprometidos, especialmente aque-

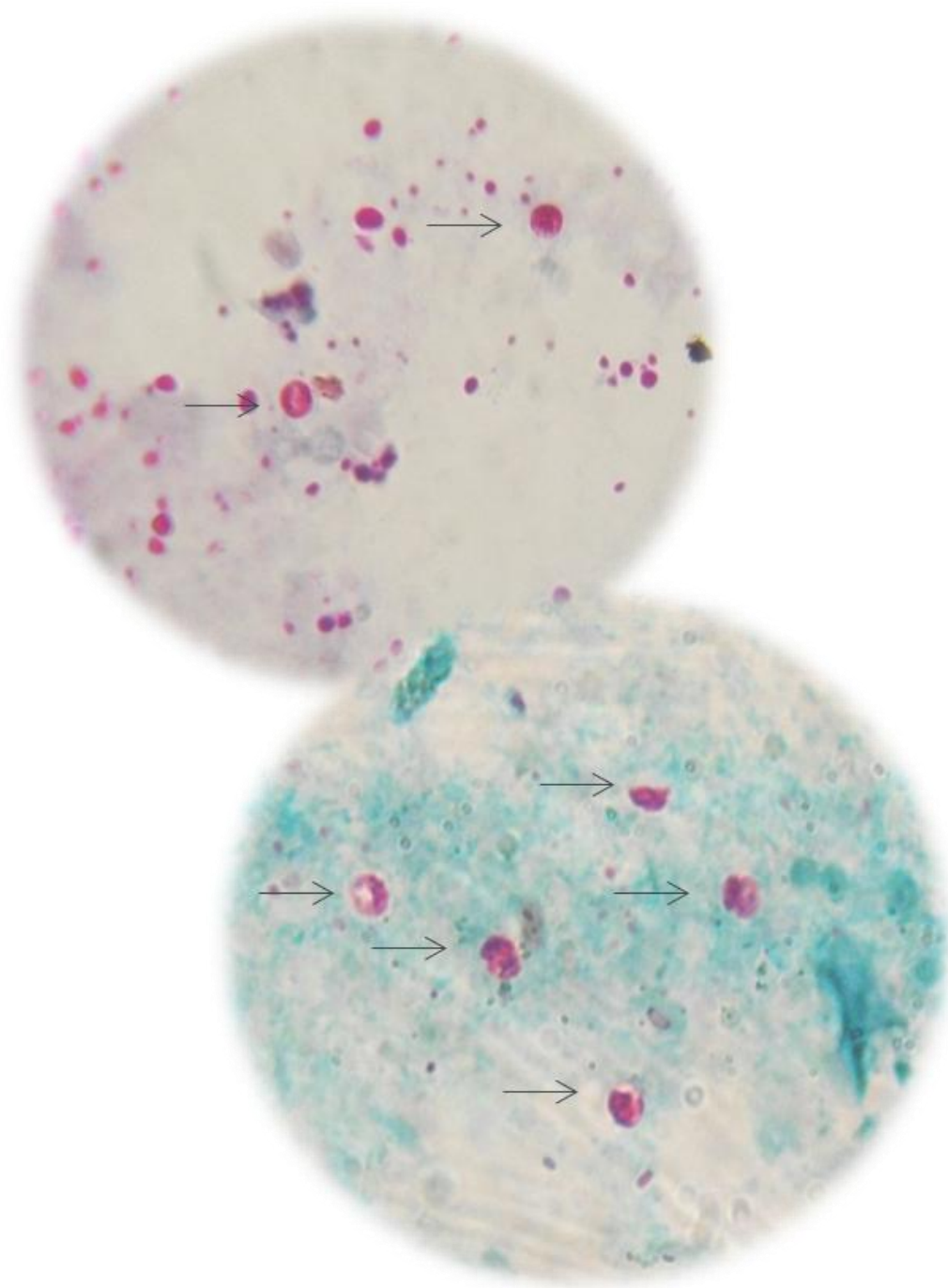


Figura 7. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. observados con la tinción de Kinyoun. Los ooquistes se encuentran señalados.

Tabla 4. Características demográficas de los casos de criptosporidiosis.

Paciente	Edad	Sexo	Origen	Aspectos Clínicos
M2	1 año	M	HIMFG	ND
M3	14 años	M	HIMFG	Insuficiencia renal crónica, trasplante de riñón
M4	3 años	F	HIMFG	Síndrome de Down, glaucoma congénito
M5	5 años	M	HIMFG	VIH, Discapacitado mentalmente
M6	4 años	M	HIMFG	VIH
M8	9 meses	M	HIMFG	ND
M10	9 años	M	HIMFG	ND
M11	10 años	F	HIMFG	VIH
M12	3 años	M	HIMFG	Postrasplante, gastroenteritis aguda, deshidratación
M13	2 años	M	HIMFG	ND
S1	9 años	M	HIES	VIH, desnutrición severa, candidiasis oral, gastroenteritis, sepsis
S2	1 año	M	HIES	Neumonía, desnutrición moderada, gastroenteritis aguda, enfermedad granulomatosa pulmonar
S3	8 meses	M	HIES	Deshidratación, gastroenteritis aguda
S4	7 meses	F	HIES	Gastroenteritis aguda, deshidratación, desnutrición leve, neumonía
S5	9 meses	F	HIES	Desnutrición severa, diarrea crónica, infección en vías urinarias
S6	42 años	M	USON	Diarrea
S7	6 años	F	HIES	Anemia, diarrea

llos con VIH, podrían ser más susceptibles a infecciones oportunistas con una amplia variedad de especies y genotipos del parásito.

En relación con el tipo de inmunocompromiso, los pacientes con infección por VIH/SIDA se infectan mayoritariamente con *C. hominis* en E.U.A., Perú, Brasil, Kenia, Malawi, Vietnam e India (Muthusamy y col., 2006; Gatei y col., 2006; Cama y col., 2007) y con *C. parvum* en el Reino Unido (Thompson y col., 2005). Estos datos sugieren que los pacientes infectados con VIH tienen mayor riesgo de infección con *C. hominis* y *C. parvum* como sucedió en este estudio, donde sólo en un caso se detectó *C. felis*. En algunas zonas geográficas este tipo de pacientes parecen ser más propensos a otras especies de origen animal, tales como: *C. andersoni*, *C. canis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. wrairi*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. saurophyllum* y *C. serpentis* (Xiao, 2010), lo que sugiere que la transmisión zoonótica juega un papel importante en pacientes inmunodeficientes (Xiao y col., 2000). Sin embargo, aunque las especies identificadas en humanos pueden ser genéticamente similares a las de los animales, existe poca evidencia de que se produzcan infecciones cruzadas. Se pensaba que estas especies sólo infectaban a pacientes inmunodeficientes y actualmente se sabe que también infectan a individuos inmunocompetentes (Xiao y col., 2004; Xiao, 2010).

En pacientes sometidos a trasplantes, *C. parvum* ocasiona diarrea (Roncoroni y col., 1989) o infecciones asintomáticas. Se ha aislado en 34,8% y 18,8% de los pacientes receptores de trasplante renal en Brasil (Chieffi y col., 1998) y Turquía (Ok y col., 1997), respectivamente. En este estudio dos pacientes recibieron trasplante (no mencionan el órgano transplantado), para ambos casos la infección se identificó a *C. hominis* como el agente causante de la infección. Estos pacientes constituyen un grupo de riesgo para patógenos oportunistas y deberían periódicamente someterse a estudios coproparasitológicos para búsqueda de *Cryptosporidium* spp., aparte de manejar medidas de prevención para evitar infecciones transmitidas por fecalismo.

Cryptosporidium felis se ha detectado en algunas ocasiones en humanos. Durante la caracterización de 14 469 casos de criptosporidiosis humana en Reino Unido, *C. felis*

se colocó en la cuarta especie más común (38 casos). En un estudio realizado en Reino Unido los factores de riesgo significativos fueron que los sujetos eran inmunocomprometidos o estaban en contacto con gatos (Elwin y col., 2012). Tanto los adultos como los niños se infectan con *C. felis* y tanto inmunocompetentes como sujetos VIH positivos han sido reportados (Pieniazek y col., 1999; Cacciò y col., 2002). Está reportado que la eliminación de ooquistes puede durar por lo menos 6 meses en un sujeto VIH positivo sintomático (Pieniazek y col., 1999). En Perú, un solo niño sin VIH y sin diarrea fue reportado con *C. felis* en una ocasión (Xiao y col., 2001). Esta especie del parásito es de moderada importancia para la salud pública.

Identificación Molecular de *Cryptosporidium*

Mediante la herramienta molecular de PCR-RFLP se logró amplificar el gen SSU rRNA de *Cryptosporidium* de las 17 muestras, observándose una banda de 826 a 864 pb (Figura 8). Se incluyeron 2 controles proporcionados y caracterizados previamente como *C. parvum* y *C. hominis* de pacientes con VIH en Perú (Cama y col., 2007).

El diagnóstico de la especie se realizó mediante la digestión del producto de la PCR anidada con la enzima *SspI*, y la diferenciación de los genotipos de *C. parvum* con la digestión de la enzima *VspI*. La digestión de los productos de la PCR anidada con la enzima *SspI*, mostró un patrón de bandas (ANEXO III) característico para la especie de *C. parvum* tanto genotipo bovino como humano, con tres bandas visibles de 449, 254 y 108 pb. Para diferenciar los genotipos humanos y bovinos de *C. parvum*, el producto de la PCR anidada se digirió con *VspI*. El genotipo bovino de *C. parvum* produjo dos bandas visibles de 628 y 104 pb, mientras que el genotipo humano produjo tres bandas visibles de 561, 104, y 70 pb. El análisis de RFLP de los productos de la PCR anidada reveló la presencia de 3 genotipos de *Cryptosporidium* (Figura 9).

El aplicar técnicas de biología molecular (PCR-RFLP) nos permitió determinar la especie y genotipo en México. Con esto se generó el primer reporte de la caracterización

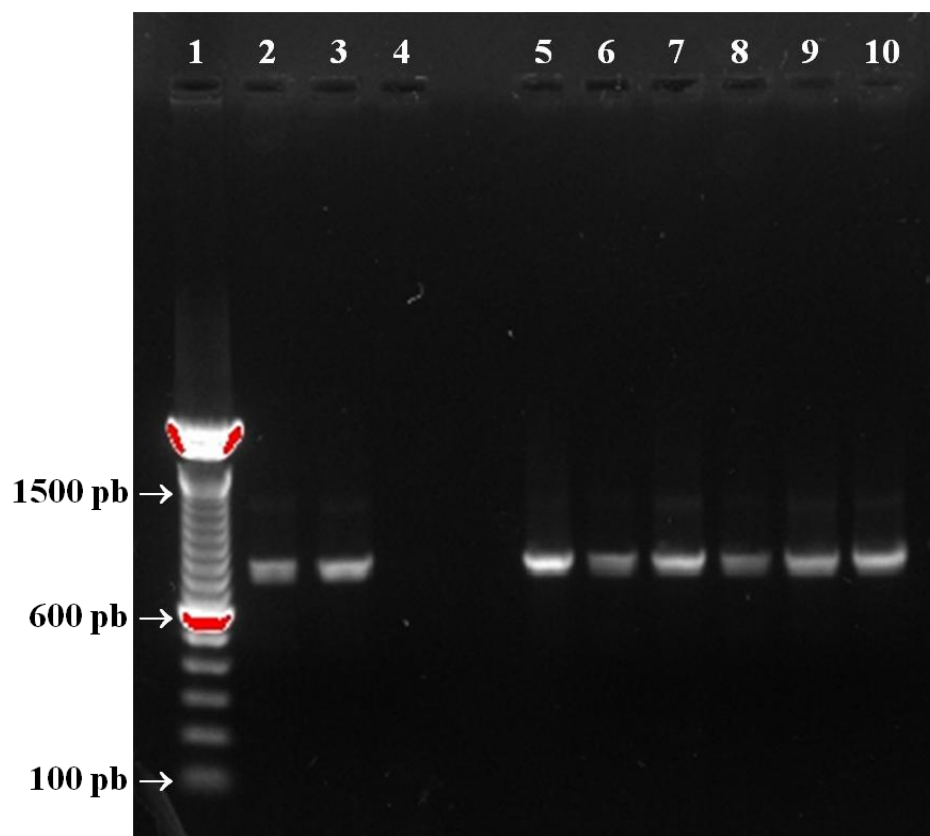


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los amplificados correspondientes a la región SSU rRNA de *Cryptosporidium*. Línea 1: marcador de pares de bases (Invitrogen); Línea 2: control *C. parvum*; Línea 3: control *C. hominis*; Línea 4: control H₂O; Líneas 5-10: amplicones de las muestras obtenidas de pacientes con criptosporidiosis. El tamaño del amplicón es de 826-864 pb.

Tabla 5. Especies y genotipos del gen SSU rRNA identificados en este estudio.

Muestra	Especie / Genotipo	No. de Acceso Genbank
M2	<i>C. hominis</i>	EU331242.1
M3	<i>C. hominis</i>	JX644912.1
M4	<i>C. hominis</i>	EU331242.1
M5	<i>C. parvum</i>	KC569976.1
M6	<i>C. hominis</i>	AB638282.1
M8	<i>C. hominis</i>	AJ849462
M10	<i>C. parvum</i>	KC748018.1
M11	<i>C. felis</i>	AF159113
M12	<i>C. hominis</i>	JX644911.1
M13	<i>C. hominis</i>	KF146224.1
S1	<i>C. parvum</i>	AB746195.1
S2	<i>C. hominis</i>	GU319779.1
S3	<i>C. hominis</i>	GQ983348.1
S4	<i>C. hominis</i>	GQ983348.1
S5	<i>C. parvum</i>	AF159111.1
S6	<i>C. parvum</i>	EU553557.1
S7	<i>C. parvum</i>	AF308600.1

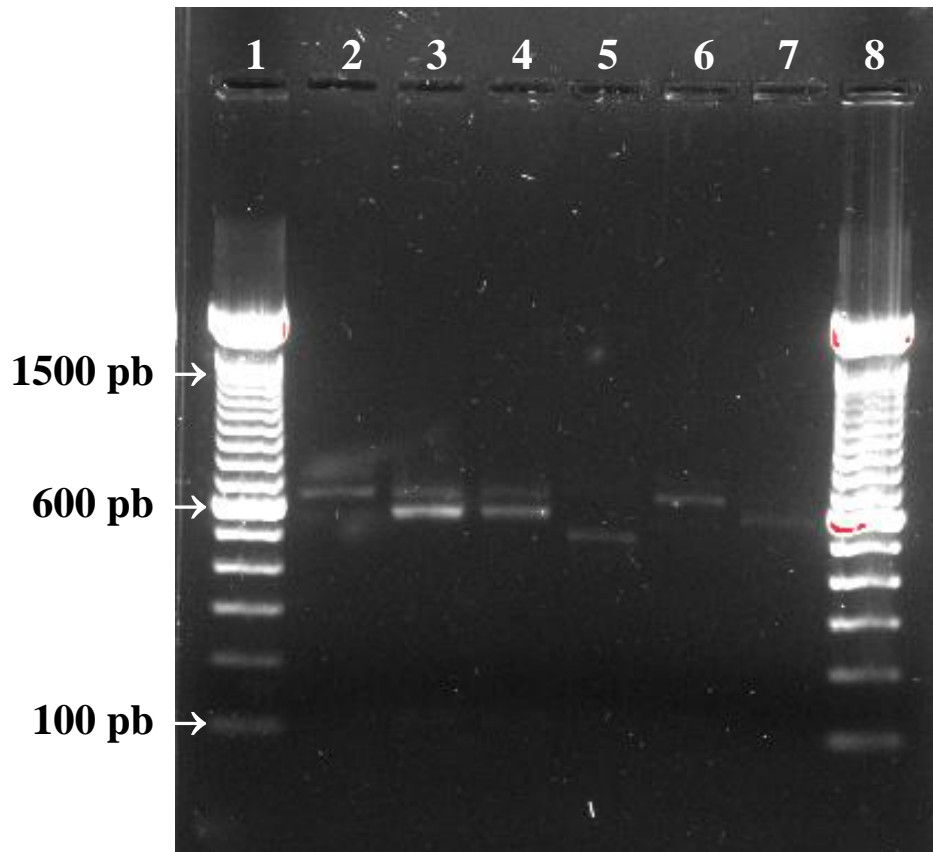


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de digestión de la PCR anidada con la enzima *VspI*. Líneas 1 y 8: marcador de pares de bases (Invitrogen); Línea 2: control *C. parvum*; Líneas 3 y 7: *C. parvum* genotipo humano (561, 104 pb); Línea 4: control de *C. hominis*; Línea 5: *C. felis* (476, 104 pb); Línea 6: *C. parvum* genotipo bovino (628, 104 pb).

molecular de *Cryptosporidium* a partir de muestras de heces de humano en México. Se logró determinar la presencia de tres especies de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. hominis*, y *C. felis*. Esto demostró la transmisión zoonótica y antroponótica del parásito en México. De las 17 muestras positivas, los 10 casos de *C. hominis* corresponden a una transmisión antroponótica. Puesto que la transmisión de *C. parvum* (6/17 casos en este estudio) puede ser antroponótica o zoonótica. La presencia de un caso de *C. felis* corresponde a una transmisión zoonótica.

En nuestro estudio la especie predominante ha sido *C. hominis*, como muestran algunos estudios realizados en África en pacientes infectados por el VIH y en pacientes inmunocompetentes en Tanzania (Haupt y col., 2005) y en Kenia (Gatei y col., 2006), también nuestros resultados coinciden con estudios previos que muestran una mayor prevalencia de *C. hominis* frente a *C. parvum* en España (Llorente y col., 2007), indicando que la transmisión antroponótica juega un papel importante.

Las investigaciones realizadas utilizando técnicas moleculares, han demostrado que la gran mayoría de los casos humanos son causados por *C. hominis* y *C. parvum*. Curiosamente, se han constatado diferencias en la distribución geográfica y temporal, presentaciones de la enfermedad y los factores de riesgo para la infección tanto para *C. hominis* y *C. parvum*. Además, los análisis moleculares han puesto de manifiesto que otras especies, incluyendo *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* y *C. muris*, pueden infectar a los humanos y estar vinculadas a la enfermedad clínica, no sólo en inmunocomprometidos sino también en individuos inmunocompetentes (Cacciò, 2005).

La distribución de *C. parvum* y *C. hominis* en humanos difiere según las regiones geográficas; *C. hominis* es más prevalente (62%) en algunos países de América del Norte y del Sur, Australia y África; en países europeos ambas especies son comunes en seres humanos (Neira y col., 2012). En el Medio Oriente, predomina *C. parvum* y en el resto del mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo, *C. hominis* es, por lo general, la especie más frecuente en los seres humanos. También se ha demostrado, en E.U.A. e Irlanda que la proporción de infección por *C. parvum* es mayor que *C. hominis*

en áreas rurales que urbanas (Cacciò, 2005; Feltus y col., 2006; Zintl y col., 2009).

Identificación de Especies de *Cryptosporidium* Mediante Secuenciación

El proceso de secuenciación fue realizado con éxito en las 17 muestras, las cuales fueron secuenciadas para confirmar las especies. Después de la secuenciación de los productos amplificados, se obtuvieron los siguientes resultados: de 17 casos de criptosporidiosis, 10 (59%) correspondieron a *C. parvum* genotipo humano; 6 (35%) casos a *C. parvum* genotipo bovino; y 1 (6%) caso fue *C. felis*.

Se identificó en pacientes inmunodeficientes con VIH: 2 *C. parvum*, 1 *C. hominis* y 1 *C. felis*. En los otros pacientes inmunocomprometidos no infectados por VIH, se identificó 4 *C. hominis* y 1 *C. parvum*. En pacientes inmunocompetentes se identificó dos *C. parvum* y dos *C. hominis*.

Para los casos de infección por *C. parvum* genotipo humano, renombrada como *C. hominis*, de las 17 muestras positivas, en la región amplificada del SSU rRNA se obtuvieron 10 amplicones cuyas secuencias correspondían con las publicadas con número de Genbank: EU331242.1 para dos aislados, JX644912.1, AB638282.1, AJ849462, JX644911.1, KF146224.1, GU319779.1, GQ983348.1 para dos aislados. Para los casos de infección por *C. parvum* genotipo bovino, de las 17 muestras positivas, en la región amplificada del SSU rRNA se obtuvieron 6 amplicones cuyas secuencias correspondían con las publicadas con número de Genbank: KC569976.1, KC748018.1, AB746195.1, AF159111.1, EU553557.1, AF308600.1. Un caso de infección por *C. felis* fue diagnosticado en una niña de 10 años con VIH desde el nacimiento procedente de la Cd. de México (Tabla 4). En la región de diagnóstico del SSU rRNA se obtuvo una secuencia idéntica a la publicada con número de Genbank: AF159113 (Tabla 5).

De las secuencias obtenidas se llevó a cabo el alineamiento múltiple de nucleótidos correspondientes a la región SSU rRNA mostrando una identidad que oscila entre el 97% y el 100% cuando se compararon con la secuencia elegida como referencia

de *C. parvum*, *C. hominis* y *C. felis*. Posteriormente, se eligieron dos secuencias representativas de *C. parvum*, dos de *C. hominis* y una secuencia de *C. felis* identificados en este estudio para realizar un alineamiento múltiple utilizando Clustal W (Figura 10). Las diferencias entre las secuencias de *C. parvum* y *C. hominis* se observan en un recuadro con línea discontinua, mientras que las diferencias entre estos dos genotipos y *C. felis* se muestran en un recuadro con línea continua.

Los resultados de los estudios epidemiológicos moleculares recientes han mejorado nuestro conocimiento acerca de la criptosporidiosis humana. Ahora tenemos una mejor comprensión de la complejidad de la infección por *Cryptosporidium* en los seres humanos a nivel de especie y genotipo. La caracterización molecular de *Cryptosporidium* permite establecer el riesgo para la salud pública, debido a que ciertas especies y genotipos del género son zoonóticas y la diseminación de los ooquistes en agua, alimentos y suelo en la región puede ser causa de criptosporidiosis en humanos.

En México, todos los ooquistes de *Cryptosporidium* detectados en personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas han sido identificadas como *C. parvum* y *C. hominis* (Valenzuela y col., 2014) (ANEXO IV). En este estudio se describe el primer caso de infección humana con *C. felis* en México, presente en un paciente VIH positivo.

Cp_S1 TAATAACTTTACGGATCACAAATAAT-----GTGACATATCATTCAGTTTCTGACCTA
 Cp_M5 TAATAACTTTACGGATCACAAATAAT-----GTGACATATCATTCAGTTTCTGACCTA
 Ch_M13 TAATAACTTTACGGATCACAAATAAT-----GTGACATATCATTCAGTTTCTGACCTA
 Ch_S2 TAATAACTTTACGGATCACAAATAAT-----GTGACATATCATTCAGTTTCTGACCTA
 Cf_M11 TAATAACTTTACGGATCACAAATAATTTTTTTGTGACATATCATTCAGTTTCTGACCTA

Cp_S1 TCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGG
 Cp_M5 TCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGG
 Ch_M13 TCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGG
 Ch_S2 TCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGG
 Cf_M11 TCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAGG

Cp_S1 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGCG
 Cp_M5 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGCG
 Ch_M13 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGCG
 Ch_S2 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGCG
 Cf_M11 GTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGGCG

Cp_S1 CGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTT
 Cp_M5 CGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTT
 Ch_M13 CGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTT
 Ch_S2 CGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTT
 Cf_M11 CGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTT

Cp_S1 TTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGC
 Cp_M5 TTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGC
 Ch_M13 TTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGC
 Ch_S2 TTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGC
 Cf_M11 ACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGC

Cp_S1 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGC
 Cp_M5 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGC
 Ch_M13 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGC
 Ch_S2 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGC
 Cf_M11 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGC

Cp_S1 AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGT-----AT
 Cp_M5 AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGT-----AT
 Ch_M13 AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGT-----AT
 Ch_S2 AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGT-----AT
 Cf_M11 AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTAATAACCTTATATAAATATTTTTTTTTAA

Cp_S1 GAATATTTATAAATAATTAACATAATTCATATTACTATTT-----TTAGT
 Cp_M5 GAATATTTATAAATAATTAACATAATTCATATTACTATAT-----ATTTTAGT
 Ch_M13 GAATATTTATAAATAATTAACATAATTCATATTACTATTT-----TTTTTAGT
 Ch_S2 GAATATTTATAAATAATTAACATAATTCATATTACTAT-----TTTTTTAGT
 Cf_M11 ATATTAATATGTAAGATTAACATAATTCATATTTTTAAGACTGAATTTTTAGTTTTGATA

Cp_S1 ATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCCTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACT
 Cp_M5 ATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCCTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACT
 Ch_M13 ATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCCTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACT
 Ch_S2 ATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCCTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACT
 Cf_M11 ATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCCTAAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACT

Cp_S1 CCAGCATGGAATAATAATTAAG---ATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGCGC
 Cp_M5 CCAGCATGGAATAATAATTAAG---ATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAG---
 Ch_M13 CCAGCATGGAATAATAATTAAG---ATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAG---
 Ch_S2 CCAGCATGGAATAATAATTAAG---ATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAG---
 Cf_M11 CCAGCATGGAATAATAATAAGATTTTTATCTTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAAA---


```

Cp_S1      CTGCCAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAA
Cp_M5      -----AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAA
Ch_M13     -----AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAA
Ch_S2      -----AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAA
Cf_M11     -----AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAT

Cp_S1      ATTCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTA
Cp_M5      ATTCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTA
Ch_M13     ATTCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTA
Ch_S2      ATTCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTA
Cf_M11     ATTCTTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGCGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTTCATTA

Cp_S1      ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTGGTAGTCTTAAACCATAA
Cp_M5      ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTGGTAGTCTTAAACCATAA
Ch_M13     ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTAGTTCCTATAACCCATAA
Ch_S2      ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTAGTTCCTATAACCCATAA
Cf_M11     ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTGGATGCTACCTAACATG

```

Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la región SSU rRNA de *C. parvum* (Cp), *C. hominis* (Ch) y *C. felis* (Cf) identificadas en este estudio. Las muestras originarias de Sonora se indican con la letra S, seguido por el número de muestra; las muestras procedentes de la Cd. de México se indican con la letra M, seguido por el número de muestra. Las diferencias entre las secuencias se encuentran en recuadros de línea continua y línea discontinua. Las diferencias entre *C. parvum* y *C. hominis* están en línea discontinua, mientras que las diferencias entre estos dos genotipos con *C. felis* se señalan con una línea continua.

CONCLUSIONES

Se logró identificar a los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. a partir de heces humanas por medio de la tinción de Kinyoun.

Este estudio descriptivo permitió la caracterización molecular mediante PCR-RFLP del gen SSU rRNA de tres especies de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. hominis* y *C. felis*, aislados de pacientes de Hermosillo y de la Ciudad de México.

Para conocer el riesgo para la salud pública de la criptosporidiosis es importante la correcta identificación de especies y genotipos en muestras humanas, siendo imprescindible el uso de técnicas de PCR.

El presente estudio constituye el primer reporte publicado referente a la caracterización molecular de *Cryptosporidium* aislado de humanos en nuestro país.

RECOMENDACIONES

Filtrar y hervir el agua de consumo humano, llevar a cabo medidas de saneamiento ambiental, realizar campañas de promoción de la salud en la población, así como un sistema adecuado del tratamiento de agua municipal.

Realizar nuevos estudios que permitan comprender mejor la epidemiología y las rutas de infección responsables de la criptosporidiosis humana en México.

Establecer la importancia en la salud pública de las distintas especies, genotipos y subtipos pertenecientes al género *Cryptosporidium*.

BIBLIOGRAFÍA

Ajjampur, S. S., R. Sarkar, G. Allison, K. Banda, A. Kane, J. Muliyl, E. Naumova, H. Ward, and G. Kang. 2011. "Serum IgG response to *Cryptosporidium* immunodominant antigen gp15 and polymorphic antigen gp40 in children with cryptosporidiosis in South India." *Clin Vaccine Immunol* 18 (4):633-9. doi: 10.1128/CVI.00464-10.

Alvarez-Pellitero, P., and A. Sitjà-Bobadilla. 2002. "*Cryptosporidium molnari* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L." *Int J Parasitol* 32 (8):1007-21.

Alvarez-Pellitero, P., M. I. Quiroga, A. Sitjà-Bobadilla, M. J. Redondo, O. Palenzuela, F. Padrós, S. Vázquez, and J. M. Nieto. 2004. "*Cryptosporidium scophthalmi* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study." *Dis Aquat Organ* 62 (1-2):133-45. doi: 10.3354/dao062133.

Blackman, M. J., and L. H. Bannister. 2001. "Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation." *Mol Biochem Parasitol* 117 (1):11-25.

Blagburn, B. L., M. W. Dryden, P. Payne, M. K. Rust, D. E. Jacobs, R. Bond, M. J. Hutchinson, I. Denholm, H. Mehlhorn, M. Vaughn, N. Mencke, I. Schroeder, J. Hostetler, and M. Endrizzi. 2006. "New methods and strategies for monitoring susceptibility of fleas to current flea control products." *Vet Ther* 7 (2):86-98.

Boulter-Bitzer, J. I., H. Lee, and J. T. Trevors. 2007. "Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*." *Biotechnol Adv* 25 (1):13-44. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.08.003.

Cacciò, S., E. Pinter, R. Fantini, I. Mezzaroma, and E. Pozio. 2002. "Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review." *Emerg Infect Dis* 8 (1):85-6.

- Cacciò, S. M. 2005. "Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis." *Parassitologia* 47 (2):185-92.
- Cacciò, S. M., and E. Pozio. 2006. "Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis." *Expert Rev Anti Infect Ther* 4 (3):429-43. doi: 10.1586/14787210.4.3.429.
- Cama, V. A., J. M. Ross, S. Crawford, V. Kawai, R. Chavez-Valdez, D. Vargas, A. Vivar, E. Ticona, M. Navincopa, J. Williamson, Y. Ortega, R. H. Gilman, C. Bern, and L. Xiao. 2007. "Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons." *J Infect Dis* 196 (5):684-91. doi: 10.1086/519842.
- Carey, C. M., H. Lee, and J. T. Trevors. 2004. "Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst." *Water Res* 38 (4):818-62. doi: 10.1016/j.watres.2003.10.012.
- Casemore, D. P. 1990. "Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis." *Epidemiol Infect* 104 (1):1-28.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 1996. "Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum*--Minnesota, 1995." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 45 (36):783-4.
- Chalmers, R. M., and A. P. Davies. 2010. "Minireview: clinical cryptosporidiosis." *Exp Parasitol* 124 (1):138-46. doi: 10.1016/j.exppara.2009.02.003.
- Chalmers, R. M., B. M. Campbell, N. Crouch, A. Charlett, and A. P. Davies. 2011. "Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK." *J Med Microbiol* 60 (Pt 11):1598-604. doi: 10.1099/jmm.0.034181-0.
- Chen, X. M., J. S. Keithly, C. V. Paya, and N. F. LaRusso. 2002. "Cryptosporidiosis." *N Engl J Med* 346 (22):1723-31. doi: 10.1056/NEJMra013170.
- Chieffi, P. P., Y. A. Sens, M. A. Paschoalotti, L. A. Miorin, H. G. Silva, and P. Jabur. 1998. "Infection by *Cryptosporidium parvum* in renal patients submitted to renal

transplant or hemodialysis." *Rev Soc Bras Med Trop* 31 (4):333-7.

Current, W. L., N. C. Reese, J. V. Ernst, W. S. Bailey, M. B. Heyman, and W. M. Weinstein. 1983. "Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission." *N Engl J Med* 308 (21):1252-7. doi: 10.1056/NEJM198305263082102.

Current, W. L., S. J. Upton, and T. B. Haynes. 1986. "The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. spp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens." *J Protozool* 33 (2):289-96.

Dearen T. SOP: Detection and differentiation of *Cryptosporidium* oocysts in water by a PCR-RFLP technique using FastDNA SPIN Kit (For Soil). Last Updated: October 6, 2009.

Del Coco, V. F., M. A. Córdoba, and J. A. Basualdo. 2009. "Cryptosporidiosis: an emerging zoonosis." *Rev Argent Microbiol* 41 (3):185-96.

Dillingham, R. A., A. A. Lima, and R. L. Guerrant. 2002. "Cryptosporidiosis: epidemiology and impact." *Microbes Infect* 4 (10):1059-66.

Egyed, Z., T. Sréter, Z. Széll, and I. Varga. 2003. "Characterization of *Cryptosporidium* spp.--recent developments and future needs." *Vet Parasitol* 111 (2-3):103-14.

Elwin, K., S. J. Hadfield, G. Robinson, and R. M. Chalmers. 2012. "The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008." *Epidemiol Infect* 140 (4):673-83. doi: 10.1017/S0950268811000860.

Fayer, R., U. Morgan, and S. J. Upton. 2000. "Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification." *Int J Parasitol* 30 (12-13):1305-22.

Fayer, R., J. M. Trout, L. Xiao, U. M. Morgan, A. A. Lai, and J. P. Dubey. 2001. "*Cryptosporidium canis* n. spp. from domestic dogs." *J Parasitol* 87 (6):1415-22. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[1415:CCNSFD]2.0.CO;2.

- Fayer, R. 2004. "*Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite." *Vet Parasitol* 126 (1-2):37-56. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.09.004.
- Fayer, R., M. Santín, and L. Xiao. 2005. "*Cryptosporidium bovis* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*)." *J Parasitol* 91 (3):624-9. doi: 10.1645/GE-3435.
- Fayer, R., M. Santín, and J. M. Trout. 2008. "*Cryptosporidium ryanae* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*)." *Vet Parasitol* 156 (3-4):191-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.05.024.
- Fayer, R., and M. Santín. 2009. "*Cryptosporidium xiaoi* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*)." *Vet Parasitol* 164 (2-4):192-200. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.011.
- Fayer, R. 2010. "Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*." *Exp Parasitol* 124 (1):90-7. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.005.
- Fayer, R., M. Santín, and D. Macarisin. 2010. "*Cryptosporidium ubiquitum* n. spp. in animals and humans." *Vet Parasitol* 172 (1-2):23-32. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.028.
- Feltus, D. C., C. W. Giddings, B. L. Schneck, T. Monson, D. Warshauer, and J. M. McEvoy. 2006. "Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin." *J Clin Microbiol* 44 (12):4303-8. doi: 10.1128/JCM.01067-06.
- Gargala, G. 2008. "Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*." *Parasite* 15 (3):275-81.
- Gatei, W., C. N. Wamae, C. Mbae, A. Waruru, E. Mulinge, T. Waithera, S. M. Gatika, S. K. Kamwati, G. Revathi, and C. A. Hart. 2006. "Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya." *Am J Trop Med Hyg* 75 (1):78-82.
- Gelletlie, R., J. Stuart, N. Soltanpoor, R. Armstrong, and G. Nichols. 1997. "Cryptosporidiosis associated with school milk." *Lancet* 350 (9083):1005-6. doi: 10.1016/S0140-6736(05)64071-8.

- Giroto, K. G., D. F. Grama, M. J. da Cunha, E. S. Faria, J. E. Limongi, R. e M Pinto, and M. C. Cury. 2013. "Prevalence and risk factors for intestinal protozoa infection in elderly residents at Long Term Residency Institutions in Southeastern Brazil." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55 (1):19-24.
- Gomez-Bautista, M., L. M. Ortega-Mora, E. Tabares, V. Lopez-Rodas, and E. Costas. 2000. "Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*)." *Appl Environ Microbiol* 66 (5):1866-70.
- Guerrant, R. L. 1997. "Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat." *Emerg Infect Dis* 3 (1):51-7. doi: 10.3201/eid0301.970106.
- Guerrant, R. L., R. B. Oria, S. R. Moore, R. Scharf, and A. A. Lima. 2011. "Enteric protozoa and human potential." *Ann Trop Paediatr* 31 (3):201-3. doi: 10.1179/146532811X13006353133911.
- Hommer, V., J. Eichholz, and F. Petry. 2003. "Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*." *J Antimicrob Chemother* 52 (3):359-64. doi: 10.1093/jac/dkg357.
- Haupt, E. R., O. Y. Bushen, N. E. Sam, A. Kohli, A. Asgharpour, C. T. Ng, D. P. Calfee, R. L. Guerrant, V. Maro, S. Ole-Nguayine, and J. F. Shao. 2005. "Short report: asymptomatic *Cryptosporidium hominis* infection among human immunodeficiency virus-infected patients in Tanzania." *Am J Trop Med Hyg* 73 (3):520-2.
- Idris, N. S., P. G. Dwipoerwantoro, A. Kurniawan, and M. Said. 2010. "Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response." *J Infect Dev Ctries* 4 (5):309-17.
- Insulander, M., C. Silverlås, M. Lebbad, L. Karlsson, J. G. Mattsson, and B. Svenungsson. 2013. "Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden." *Epidemiol Infect* 141 (5):1009-20. doi:

10.1017/S0950268812001665.

Jiang, J., K. A. Alderisio, and L. Xiao. 2005. "Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York." *Appl Environ Microbiol* 71 (8):4446-54. doi: 10.1128/AEM.71.8.4446-4454.2005.

Jirků, M., A. Valigurová, B. Koudela, J. Krížek, D. Modrý, and J. Slapeta. 2008. "New species of *Cryptosporidium tyzzer*, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny." *Folia Parasitol (Praha)* 55 (2):81-94.

Korich, D. G., J. R. Mead, M. S. Madore, N. A. Sinclair, and C. R. Sterling. 1990. "Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability." *Appl Environ Microbiol* 56 (5):1423-8.

Latif, B. M., and E. B. Jakubek. 2008. "Determination of the specificities of monoclonal and polyclonal antibodies to *Neospora*, *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* by fluorescent antibody test (FAT)." *Trop Biomed* 25 (3):225-31.

Leite, C. A., R. C. Succi, F. R. Patrício, and U. Fagundes-Neto. 2006. "Functional, microbiological and morphological intestinal findings among human immunodeficiency virus infected children." *Arq Gastroenterol* 43 (4):310-5.

Lindsay, D. S., S. J. Upton, D. S. Owens, U. M. Morgan, J. R. Mead, and B. L. Blagburn. 2000. "*Cryptosporidium andersoni* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*." *J Eukaryot Microbiol* 47 (1):91-5.

Luján Z.N., Garbossa G. *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42(2): 195-201.

Llorente, M. T., A. Clavel, M. P. Goñi, M. Varea, C. Seral, R. Becerril, L. Suarez, and R. Gómez-Lus. 2007. "Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain." *Parasitol Int* 56 (3):201-5. doi: 10.1016/j.parint.2007.02.003.

Mac Kenzie, W. R., N. J. Hoxie, M. E. Proctor, M. S. Gradus, K. A. Blair, D. E. Peterson, J. J. Kazmierczak, D. G. Addiss, K. R. Fox, and J. B. Rose. 1994. "A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public

- water supply." *N Engl J Med* 331 (3):161-7. doi: 10.1056/NEJM199407213310304.
- Mahgoub, E. S., A. Almahbashi, and B. Abdulatif. 2004. "Cryptosporidiosis in children in a north Jordanian paediatric hospital." *East Mediterr Health J* 10 (4-5):494-501.
- Meamar, A. R., M. Rezaian, S. Rezaie, M. Mohraz, E. B. Kia, E. R. Houpt, and S. Soleymani-Mohammadi. 2006. "*Cryptosporidium parvum* bovine genotype oocysts in the respiratory samples of an AIDS patient: efficacy of treatment with a combination of azithromycin and paromomycin." *Parasitol Res* 98 (6):593-5. doi: 10.1007/s00436-005-0097-4.
- Menon, B. S., S. Abdullah, F. Mahamud, U. M. Morgan, A. S. Malik, K. E. Choo, and B. Singh. 2001. "Low prevalence of *Cryptosporidium parvum* in hospitalized children in Kota Bharu, Malaysia." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32 (2):319-22.
- Millard, P. S., K. F. Gensheimer, D. G. Addiss, D. M. Sosin, G. A. Beckett, A. Houck-Jankoski, and A. Hudson. 1994. "An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider." *JAMA* 272 (20):1592-6.
- Morgan, U. M., C. C. Constantine, D. A. Forbes, and R. C. Thompson. 1997. "Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis." *J Parasitol* 83 (5):825-30.
- Morgan, U., R. Weber, L. Xiao, I. Sulaiman, R. C. Thompson, W. Ndiritu, A. Lal, A. Moore, and P. Deplazes. 2000. "Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States." *J Clin Microbiol* 38 (3):1180-3.
- Morgan-Ryan, U. M., A. Fall, L. A. Ward, N. Hijjawi, I. Sulaiman, R. Fayer, R. C. Thompson, M. Olson, A. Lal, and L. Xiao. 2002. "*Cryptosporidium hominis* n. spp. (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) from *Homo sapiens*." *J Eukaryot Microbiol* 49 (6):433-40.
- Muthusamy, D., S. S. Rao, S. Ramani, B. Monica, I. Banerjee, O. C. Abraham, D. C. Mathai, B. Primrose, J. Muliylil, C. A. Wanke, H. D. Ward, and G. Kang. 2006.

- "Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India." *J Clin Microbiol* 44 (2):632-4. doi: 10.1128/JCM.44.2.632-634.2006.
- Muñoz-Antoli, C., A. Pavón, A. Marcilla, R. Toledo, and J. G. Esteban. 2011. "Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in schoolchildren from department of Rio San Juan (Nicaragua)." *Trop Biomed* 28 (1):40-7.
- Naumova, E. N., A. I. Egorov, R. D. Morris, and J. K. Griffiths. 2003. "The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection: gastroenteritis hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee outbreak." *Emerg Infect Dis* 9 (4):418-25. doi: 10.3201/eid0904.020260.
- Neira O, P., N. Muñoz S, G. Wilson L, M. E. Barthel M, M. J. Rosales L, and C. Henríquez R. 2012. "*Cryptosporidium* species in immunodeficient and immunocompetent patients of Valparaíso: a descriptive study." *Rev Chilena Infectol* 29 (1):63-71. doi: 10.4067/S0716-10182012000100011.
- Newman, R. D., S. X. Zu, T. Wuhib, A. A. Lima, R. L. Guerrant, and C. L. Sears. 1994. "Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil." *Ann Intern Med* 120 (6):500-5.
- Nime, F. A., J. D. Burek, D. L. Page, M. A. Holscher, and J. H. Yardley. 1976. "Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*." *Gastroenterology* 70 (4):592-8.
- Ok, U. Z., M. Cirit, A. Uner, E. Ok, F. Akçiçek, A. Başçi, and M. A. Ozcel. 1997. "Cryptosporidiosis and blastocystosis in renal transplant recipients." *Nephron* 75 (2):171-4.
- Pantenburg, B., S. M. Dann, H. C. Wang, P. Robinson, A. Castellanos-Gonzalez, D. E. Lewis, and A. C. White. 2008. "Intestinal immune response to human *Cryptosporidium* spp. infection." *Infect Immun* 76 (1):23-9. doi: 10.1128/IAI.00960-07.
- Patel, S., S. Pedraza-Díaz, and J. McLauchlin. 1999. "The identification of

Cryptosporidium species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene." *Int J Parasitol* 29 (8):1241-7.

Pavlassek, I., and U. Ryan. 2007. "The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat." *Vet Parasitol* 144 (3-4):349-52. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.10.005.

Pedraza-Díaz, S., L. M. Ortega-Mora, B. A. Carrión, V. Navarro, and M. Gómez-Bautista. 2009. "Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles." *Vet Parasitol* 160 (3-4):204-10. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.11.003.

Petry, F. 2004. "Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*." *Microsc Microanal* 10 (5):586-601. doi: 10.1017/S1431927604040929.

Pieniazek, N. J., F. J. Bornay-Llinares, S. B. Slemenda, A. J. da Silva, I. N. Moura, M. J. Arrowood, O. Ditrich, and D. G. Addiss. 1999. "New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons." *Emerg Infect Dis* 5 (3):444-9. doi: 10.3201/eid0503.990318.

Putignani, L., and D. Menichella. 2010. "Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*." *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010. doi: 10.1155/2010/753512.

Pérez Cordón, Gregorio. 2006. "La confusa taxonomía de *Cryptosporidium*." *Revista peruana de biología* 13 (1):143-144.

Quiroz, E. S., C. Bern, J. R. MacArthur, L. Xiao, M. Fletcher, M. J. Arrowood, D. K. Shay, M. E. Levy, R. I. Glass, and A. Lal. 2000. "An outbreak of cryptosporidiosis linked to a foodhandler." *J Infect Dis* 181 (2):695-700. doi: 10.1086/315279.

Rani, H., V. Gupta, N. Gulati, and J. Chander. 2009. "Cryptosporidial oocysts in gastric aspirate of an infant." *Indian J Med Microbiol* 27 (2):172-4. doi: 10.4103/0255-0857.49441.

Roncoroni, A. J., M. A. Gomez, J. Mera, P. Cagnoni, and M. D. Michel. 1989. "*Cryptosporidium* infection in renal transplant patients." *J Infect Dis* 160 (3):559.

- Rossignol, J. F. 2010. "*Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs." *Exp Parasitol* 124 (1):45-53. doi: 10.1016/j.exppara.2009.07.005.
- Rossle, N. F., Latif, B. 2013. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(11): 916-924.
- Ryan, U., L. Xiao, C. Read, L. Zhou, A. A. Lal, and I. Pavlasek. 2003. "Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic." *Appl Environ Microbiol* 69 (7):4302-7.
- Ryan, U. M., P. Monis, H. L. Enemark, I. Sulaiman, B. Samarasinghe, C. Read, R. Buddle, I. Robertson, L. Zhou, R. C. Thompson, and L. Xiao. 2004. "*Cryptosporidium suis* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*)." *J Parasitol* 90 (4):769-73. doi: 10.1645/GE-202R1.
- Ryan, U. M., M. Power, and L. Xiao. 2008. "*Cryptosporidium fayeri* n. spp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*)." *J Eukaryot Microbiol* 55 (1):22-6. doi: 10.1111/j.1550-7408.2007.00299.x.
- Slapeta, J. 2013. "Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow?" *Int J Parasitol* 43 (12-13):957-70. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.005.
- Smith, D. M. 2007. "Cryptosporidiosis: still a problem." *AIDS Read* 17 (8):381-2, 388-9.
- Smith, H. V., S. M. Cacciò, N. Cook, R. A. Nichols, and A. Tait. 2007. "*Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses." *Vet Parasitol* 149 (1-2):29-40. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.015.
- Spano, F., L. Putignani, S. Guida, and A. Crisanti. 1998. "*Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin." *Exp Parasitol* 90 (2):195-8. doi: 10.1006/expr.1998.4324.

- Stark, D., S. E. Al-Qassab, J. L. Barratt, K. Stanley, T. Roberts, D. Marriott, J. Harkness, and J. T. Ellis. 2011. "Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples." *J Clin Microbiol* 49 (1):257-62. doi: 10.1128/JCM.01796-10.
- Sulaiman, I. M., L. Xiao, and A. A. Lal. 1999. "Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques." *Appl Environ Microbiol* 65 (10):4431-5.
- Sulaiman, I. M., U. M. Morgan, R. C. Thompson, A. A. Lal, and L. Xiao. 2000. "Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene." *Appl Environ Microbiol* 66 (6):2385-91.
- Sulaiman, I. M., A. A. Lal, and L. Xiao. 2002. "Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus." *J Parasitol* 88 (2):388-94. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0388:MPAERO]2.0.CO;2.
- Thompson, R. C., M. E. Olson, G. Zhu, S. Enomoto, M. S. Abrahamsen, and N. S. Hijjawi. 2005. "*Cryptosporidium* and cryptosporidiosis." *Adv Parasitol* 59:77-158. doi: 10.1016/S0065-308X(05)59002-X.
- Tuli, L., D. K. Singh, A. K. Gulati, S. Sundar, and T. M. Mohapatra. 2010. "A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients." *BMC Microbiol* 10:11. doi: 10.1186/1471-2180-10-11.
- Tyzzar E.E. 1910. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Spp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res.* 23 (3): 487-510.
- Tyzzar E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (spp. Nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protis* 26: 394-412.
- Tzipori, S., and H. Ward. 2002. "Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease." *Microbes Infect* 4 (10):1047-58.
- Valenzuela, O., M. González-Díaz, A. Garibay-Escobar, A. Burgara-Estrella, M. Cano,

- M. Durazo, R. M. Bernal, J. Hernandez, and L. Xiao. 2014. "Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico." *PLoS One* 9 (4):e96128. doi: 10.1371/journal.pone.0096128.
- Vetterling, J. M., H. R. Jervis, T. G. Merrill, and H. Sprinz. 1971. "*Cryptosporidium wrairi* spp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus." *J Protozool* 18 (2):243-7.
- Widmer, G. 2009. "Meta-analysis of a polymorphic surface glycoprotein of the parasitic protozoa *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*." *Epidemiol Infect* 137 (12):1800-8. doi: 10.1017/S0950268809990215.
- Xiao, L., L. Escalante, C. Yang, I. Sulaiman, A. A. Escalante, R. J. Montali, R. Fayer, and A. A. Lal. 1999. "Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus." *Appl Environ Microbiol* 65 (4):1578-83.
- Xiao, L., U. M. Morgan, J. Limor, A. Escalante, M. Arrowood, W. Shulaw, R. C. Thompson, R. Fayer, and A. A. Lal. 1999. "Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species." *Appl Environ Microbiol* 65 (8):3386-91.
- Xiao, L., U. M. Morgan, R. Fayer, R. C. Thompson, and A. A. Lal. 2000. "*Cryptosporidium* systematics and implications for public health." *Parasitol Today* 16 (7):287-92.
- Xiao, L., C. Bern, J. Limor, I. Sulaiman, J. Roberts, W. Checkley, L. Cabrera, R. H. Gilman, and A. A. Lal. 2001. "Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru." *J Infect Dis* 183 (3):492-7. doi: 10.1086/318090.
- Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan, and S. J. Upton. 2004. "*Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health." *Clin Microbiol Rev* 17 (1):72-97.
- Xiao, L., and U. M. Ryan. 2004. "Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology." *Curr Opin Infect Dis* 17 (5):483-90.
- Xiao, L., and Y. Feng. 2008. "Zoonotic cryptosporidiosis." *FEMS Immunol Med Microbiol* 52 (3):309-23. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x.

- Xiao, L., M. C. Hlavsa, J. Yoder, C. Ewers, T. Dearen, W. Yang, R. Nett, S. Harris, S. M. Brend, M. Harris, L. Onischuk, A. L. Valderrama, S. Cosgrove, K. Xavier, N. Hall, S. Romero, S. Young, S. P. Johnston, M. Arrowood, S. Roy, and M. J. Beach. 2009. "Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype." *J Clin Microbiol* 47 (9):3017-20. doi: 10.1128/JCM.00226-09.
- Xiao, L. 2010. "Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update." *Exp Parasitol* 124 (1):80-9. doi: 10.1016/j.exppara.2009.03.018.
- Zaglool, D. A., A. Mohamed, Y. A. Khodari, and M. U. Farooq. 2013. "Crypto-Giardia antigen rapid test versus conventional modified Ziehl-Neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis." *Asian Pac J Trop Med* 6 (3):212-5. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60025-5.
- Zintl, A., A. F. Proctor, C. Read, T. Dewaal, N. Shanaghy, S. Fanning, and G. Mulcahy. 2009. "The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland." *Epidemiol Infect* 137 (2):270-7. doi: 10.1017/S0950268808000769.

ANEXO I

**“Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de *Cryptosporidium* spp.
en pacientes sintomáticos y asintomáticos”**

Responsable del Proyecto: Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Sede donde se realizará el estudio: Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Químico Biológicas

Nombre del padre o tutor:

Se le invita a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted y su hijo/a, hábitos y antecedentes médicos, y sus respuestas serán incluidas en una base de datos para su análisis. Una vez que acepte participar se le pedirá que nos done 3 muestras de heces y una muestra de suero de su hijo/a. Todos los procedimientos diagnósticos serán por parte de la Universidad de Sonora y Usted será informado de los resultados obtenidos.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio está considerado como de bajo riesgo de acuerdo a la Ley General de Salud ya que sólo implica la recolección de muestras de heces y suero, **TOTALMENTE VOLUNTARIO**.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aún cuando el Investigador responsable no se lo solicite, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al Investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, puede ser publicada en revistas científicas de impacto nacional o internacional; sin embargo, la identidad de los participantes en el estudio, será mantenida con estricta confidencialidad.

• **ES IMPORTANTE INFORMARLE QUE LA SECRETARIA DE SALUD DEL ESTADO ESTÁ INFORMADA DEL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO.**

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar esta Carta de Consentimiento Informado.

Firma y Fecha

Dudas y/o aclaraciones:

Dra. Olivia Valenzuela Antelo. Email: valenzuela.o@gmail.com. Teléfono: 2592163-2592164.

ANEXO II

Preparación de reactivos para la técnica de Kinyoun.

La tinción utiliza colorantes especiales para teñir los ooquistes de parásitos coccídeos como *Cryptosporidium*, empleando la fucsina básica ($C_{20}H_{20}ClN_3$) que disuelve los lípidos de las paredes celulares de los ooquistes formando un complejo ácido-alcohol resistente, permitiendo la resistencia a la decoloración con ácido sulfúrico (H_2SO_4). El material restante se decolora con el ácido y se tiñe con el colorante verde brillante haciendo un contraste entre éste y el ooquiste.

Reactivos:

- **Fucsina básica**

Fucsina básica.....1 g
Etanol al 90%.....25 mL
Fenol.....8 mL
Agua destilada.....67 mL

Procedimiento:

1. Disolver el colorante en el etanol.
2. Adicionar el agua destilada y el fenol.
3. Filtrar y guardar en un frasco ámbar.

- **Verde brillante**

Verde brillante.....1 g
Agua destilada.....100 mL

Procedimiento:

1. Disolver el colorante en el agua destilada.
2. Filtrar y guardar en frasco ámbar.

• **Ácido sulfúrico**

Ácido sulfúrico concentrado.....10 mL

Agua destilada.....90 mL

Procedimiento:

1. Medir el agua destilada en una probeta.
2. Adicionar despacio y en segundo término el ácido sulfúrico (reacción exotérmica).

ANEXO III

RFLP del gen SSU-rRNA de varias especies de *Cryptosporidium* spp.

Especies	Fragmento de PCR	Patrones de banda	
		<i>SspI</i> *	<i>VspI</i> *
<i>C. parvum</i>	834	11, 12, 108, 254, 449	102, 104, 628
<i>C. hominis</i>	837	11, 12, 111, 254, 449	70 , 102, 104, 561
<i>C. felis</i>	864	390, 426	104 , 182, 476

* Los números en negrita son los tamaños de las bandas visibles en el gel de electroforesis

Fuente: Meamar y col., 2006.

ANEXO IV



Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico

Olivia Valenzuela^{1*}, Mariana González-Díaz¹, Adriana Garibay-Escobar¹, Alexel Burgara-Estrella¹, Manuel Cano², María Durazo², Rosa M. Bernal³, Jesús Hernandez⁴, Lihua Xiao⁵

1 Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, **2** Servicio de Infectología, Hospital Infantil del Estado de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, **3** Laboratorio de Parasitología y Micología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México Distrito Federal, México, **4** Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo, Sonora, México, **5** Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America

Abstract

Cryptosporidiosis is a parasitic disease caused by *Cryptosporidium* spp. In immunocompetent individuals, it usually causes an acute and self-limited diarrhea; in infants, infection with *Cryptosporidium* spp. can cause malnutrition and growth retardation, and declined cognitive ability. In this study, we described for the first time the distribution of *C. parvum* and *C. hominis* subtypes in 12 children in Mexico by sequence characterization of the 60-kDa glycoprotein (GP60) gene of *Cryptosporidium*. Altogether, 7 subtypes belonging to 4 subtype families of *C. hominis* (Ia, Ib, Id and Ie) and 1 subtype family of *C. parvum* (IIa) were detected, including IaA14R3, IaA15R3, IbA10G2, IdA17, IeA11G3T3, IIaA15G2R1 and IIaA16G1R1. The frequency of the subtype families and subtypes in the samples analyzed in this study differed from what was observed in other countries.

Citation: Valenzuela O, González-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, et al. (2014) Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico. PLoS ONE 9(4): e96128. doi:10.1371/journal.pone.0096128

Editor: Yung-Fu Chang, Cornell University, United States of America

Received: March 6, 2014; **Accepted:** April 2, 2014; **Published:** April 22, 2014

Copyright: © 2014 Valenzuela et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been funded by University of Sonora funds and the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: o_valenzuela@guayacan.uson.mx

Introduction

Cryptosporidiosis is a parasitic disease caused by *Cryptosporidium* spp. These parasites belong to the phylum Apicomplexa and are intracellular protozoa that infect mammals, birds, reptiles and amphibians. They are cosmopolitan, mostly affecting people with immunodeficiency and, in some cases, can be deadly. In immunocompetent individuals, *Cryptosporidium* causes acute diarrhea, usually self-limited, nausea, vomiting, loss of appetite, weight loss and fever [1–5]. In infants, infection with *Cryptosporidium* spp. may cause malnutrition and permanently affect growth, resulting in a functional decline in physical fitness and cognitive ability [6–10]. Parasite transmission occurs via the fecal-oral route through the ingestion of contaminated water or food, person-person contact, or animal contact [11–13].

Human cryptosporidiosis is mainly caused by the species *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* [14]; the distribution of these species varies temporally and geographically [15]. The former mainly infects humans (>70% of human cryptosporidiosis is caused by *C. hominis* in most countries) [16], while the latter infects humans as well as domestic and wild ruminants [17,18]. A few other species have been reported in humans, including *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. suis*, *C. muris*, and *C. andersoni* [16,19–22].

The identification of oocysts in stool using the Ziehl-Neelsen modified stain commonly known as Kinyoun [23–25] is the most commonly used method in diagnosing cryptosporidiosis. However, it does not allow for the identification of species, which are

morphologically indistinguishable but genetically distinct. To determine *Cryptosporidium* species, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis is often performed based on the gene of the small subunit rRNA (SSU rRNA) or the *Cryptosporidium* oocyte wall protein (COWP) [14,26–33]. To differentiate subtype families of *Cryptosporidium*, the gene encoding the 60-kDa glycoprotein (GP60) is employed [34,35]. In the case of *C. hominis*, 6 subtype families have been identified (Ia, Ib, Id, Ie, If and Ig), with at least 78 subtypes. In *C. parvum*, 10 subtype families (IIa, IIb, IIc, IId, IIE, IIe, IIh, IIi, IIj, IIk) have been identified, with at least 78 subtypes [16,34–40]. The majority of subtype families infect both humans and animals (especially ruminants); however, the IIc (formerly Ic) subtype family has only been isolated in humans [38].

In Mexico, there have been very few studies of human cryptosporidiosis [41–43], and none of these determined *Cryptosporidium* species and subtypes. The objective of this work was to characterize *Cryptosporidium* spp. identified in stool samples of children in Mexico.

Methodology

Ethics Statement

The protocol of this project was approved by the Ethics Committee of Hospital Infantil del Estado de Sonora. Informed consent was obtained from each *Cryptosporidium*-infected patient who voluntarily participated after a clear explanation of the research objectives. Parents or guardians signed consent on behalf of the children enrolled in this study. Samples obtained from

Hospital Infantil Federico Gómez in Mexico City were originally submitted for parasitic analysis, positive samples to *Cryptosporidium* included in this study were kindly provided by Dr. Rosa Maria Bernal. The stool samples of infants were carriers of *Cryptosporidium* spp., diagnosed on microscopic observation of oocysts [44]. The inclusion criteria of participation was: *Cryptosporidium* spp. infected patients regardless of age, gender, with or without clinical symptoms and patients who consented to the study, whereas the exclusion criteria were those who were not *Cryptosporidium* spp infected and who did not give their consent to participate in the study. Clinical data were obtained from patient's medical record with patient's consent and permission from health authorities. Fecal samples were stored at 4°C for further analysis.

Stool Samples

Stool samples were analyzed from 12 children (2 girls and 10 boys) from 7 months to 14 years of age who were carriers of *Cryptosporidium* spp. as diagnosed on microscopic observation of oocysts [44]. Four samples were obtained from the Hospital Infantil del Estado de Sonora, and 8 were obtained from the Hospital Infantil Federico Gómez in Mexico City (Table 1). They were diagnosed as *Cryptosporidium*-positive by modified Kinyoun method described by Henriksen [44]. The cases included in this study occurred from October 2010 to July 2013 (Table 1).

Oocyst Concentration

1 to 2 g of feces was homogenized with 10 ml of physiological saline solution (PSS). The suspension was filtered through cheesecloth into a 15-ml conical tube and centrifuged at 2,000 rpm for 1 minute. The supernatant was decanted, and the pellet was resuspended with 15 ml of PSS. The process was repeated 2 to 3 times until the supernatant was clear. Then, 10 ml of 5% formalin was added to the supernatant, mixed and allowed to stand 10 minutes. Next, 5 ml of ethyl acetate was added, and then the tube was capped and shaken vigorously for 30 seconds, uncovered carefully and centrifuged at 1,500 rpm for 2 minutes. A wooden applicator was inserted into the tube to release the border of the layers. Carefully, the layers were decanted without disturbing the sediment. The sediment was resuspended in 3 ml of 0.2 N NaOH. The mixture was incubated at 37°C for 30 minutes, washed twice with PSS and centrifuged at 2,000 rpm. The PSS was removed with a pipette and, the number of oocysts in the sediment was determined by staining of a smear of the sediment using the Kinyoun method described above.

DNA Extraction

DNA extraction was performed directly from ~200 µl of stool or ~200 µl of the oocyst concentrate using the QIAamp DNA Stoll Mini Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA) following the recommendation of the supplier after 5 cycles of freezing and thawing (-70°C to boiling) of the oocysts. The extracted DNA obtained was stored at -20°C until further processing. As positive controls, we used DNA preparations (one each) from *C. parvum* and *C. hominis* from HIV patients in Peru, previously identified by PCR-RFLP analysis of the SSU rRNA gene and DNA sequencing of the gp60 gene [45].

Molecular Characterization of *Cryptosporidium*

The molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. was conducted by nested PCR analyses of 3 molecular markers: the small subunit rRNA (SSU rRNA) [21], COWP gene and GP60 [38], generating products that were of 826 to 864, 540 and 350 bp, respectively. To determine the species of *Cryptosporidium*,

Table 1. Demographics of cryptosporidiosis cases from México and genotypes *Cryptosporidium* isolates in this study.

Sample ID	Age	Gender	Clinical symptom	Geographic origin	Collection date	DNA origin	COWP sequencing specie/genotype	18S rRNA PCR-RFLP specie/genotype	GP60 sequencing specie/genotype	GP60 sequencing subtype family and subtype
S1	9 Y	Male	HIV, CO SM III, AGE, S	HS	June 2013	Feces	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	Ila A15G2R1
S2	14 M	Male	P, MM, AGE	HS	June 2013	Feces	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ie A11G3T3
S3	8 M	Male	AGE	HS	July 2013	Feces	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ie A11G3T3
S4	7 M	Female	AGE, P, MM	HS	July 2013	Feces	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ie A11G3T3
M2	12 M	Male	NA	DF	October 2010	Conatin	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ia A15R3
M3	14 Y	Male	CRI, TK	DF	April 2011	Conatin	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ia A14R3
M4	4 Y	Female	SD, CG	DF	May 2011	Conatin	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ia A14R3
M5	5 Y	Male	HIV, M	DF	July 2011	Conatin	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	Ila A16G1R1
M6	4 Y	Male	HIV, NA	DF	September 2011	Conatin	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ia A14R3
M8	9 M	Male	NA	DF	December 2011	Conatin	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ib A10G2
M12	3 Y	Male	PT, AGE	DF	August 2012	Conatin	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Id A17
M13	2 Y	Male	NA	DF	October 2012	Conatin	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i>	Ia A15R3

All 12 samples were from urban areas in México: HS, Hermosillo, Sonora, DF, Distrito Federal. Y, years. M, months. SM, severe malnutrition. MM, moderate malnutrition. AGE, acute gastroenteritis. CRI, chronic renal illness. SD, Syndrome Down. M, mentally handicapped. P, pneumonia. CO, candidiasis oral. S, sepsis. CG, congenital glaucoma. PT, posttransplant. HIV, HIV-positive. TK, transplant of kidney. NA, not available. doi:10.1371/journal.pone.0096128.t001

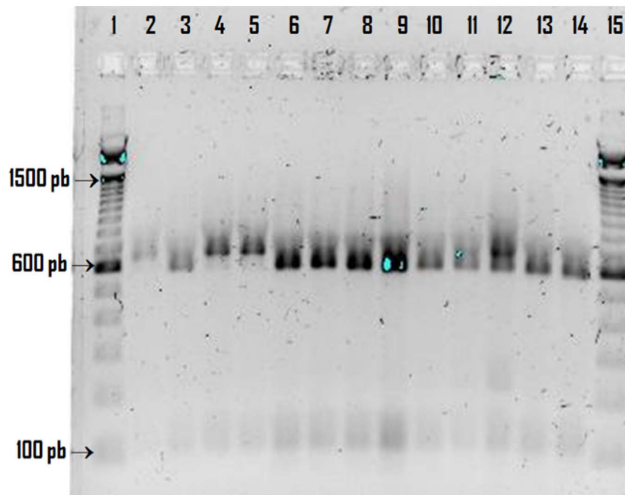


Figure 1. Results of *VspI* restriction digestion of the SSU rRNA gene of *Cryptosporidium* from México. Lane 1 and 15:100-pb marker; lane 2: *C. parvum* control; lane 3: *C. hominis* control; lane 4: sample S1; lane 5: sample M5; lane 6: sample M3; lane 7: sample M4; lane 8: M2; lane 9: sample M13; lane 10: sample M8; lane 11: sample M12; lane 12: sample S2; lane 13: sample S3; lane 14: sample S4. doi:10.1371/journal.pone.0096128.g001

the nested PCR product of the 18S rRNA gene was digested using the *VspI* restriction enzyme (Promega, USA) [21]. To identify subtype families and subtypes of *Cryptosporidium*, PCR products of the GP60 gene were sequenced and subtype families were named as proposed by Strong et al., [35]. Each species of *Cryptosporidium* identified was assigned a Roman numeral; *C. hominis* was assigned I and *C. parvum* II. After indicating the species, the subtype family was identified with a lower case letter. For *C. hominis* the subtype families included Ia, Ib, Id, Ie, If and Ig; for *C. parvum* the subtype families included IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIIf, IIh, IIi, IIj, IIk. Subtypes within each subtype family were named according to the nomenclature proposed by Sulaiman [34], depending on the trinucleotide (TCA, TCG, and TCT) encoding the amino acid serine. Each time these sequences were repeated, they were assigned the capital letters A, G, and T, respectively. For *C. parvum* subtype family IIa, Sulaiman [46] used the letter R for the number of sequence ACATCA after the trinucleotide repeats, with R1 (one copy of TCAACA) for most of the IIa subtypes. Nucleotide GP60 sequences of *Cryptosporidium* obtained in this study have been deposited in the GenBank under accession nos. KJ460362, KJ460363, KJ460364, KJ460365, KJ460366, KJ460367, KJ460368, KJ460369, KJ460370, KJ460371, KJ460372, KJ460373.

Results

Age and Gender of Children with Cryptosporidiosis

Of the 12 children included in the study, 83% were boys (10/12) and 17% were girls (2/12). Of the children infected with *C. hominis*, 75% (9/12) were 0 to 4 years of age. The only 2 cases of *C. parvum* were boys, ages 5 and 9 years old, who were also diagnosed with HIV (Table 1).

Species of *Cryptosporidium* Identified

After determining the presence of *Cryptosporidium* using the Kinyoun method, the SSU rRNA gene was amplified and nested PCR products were digested with the restriction enzyme *VspI*, producing the characteristic bands of *C. hominis* (102/104 bp and

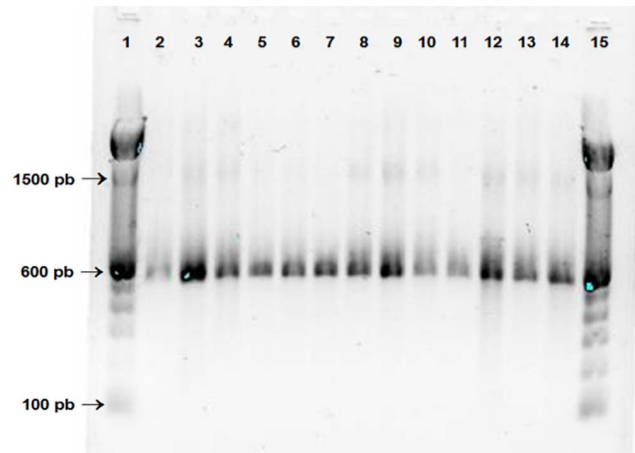


Figure 2. Results of the nested PCR of COWP gene of *Cryptosporidium* from México. Lane 1 and 15:100-pb marker; lane 2: *C. parvum* control; lane 3: *C. hominis* control; lane 4: sample S1; lane 5: sample M5; lane 6: sample M3; lane 7: sample M4; lane 8: M2; lane 9: sample M13; lane 10: sample M8; lane 11: sample M12; lane 12: sample S2; lane 13: sample S3; lane 14: sample S4. doi:10.1371/journal.pone.0096128.g002

561 bp) in 10 children (2 girls and 8 boys) and *C. parvum* (102/104 bp and 628 bp) in 2 boys (Figure 1), this result was confirmed by sequence analysis of the nested PCR products. The COWP gene was amplified and nested PCR products was confirmed by sequence analysis (Figure 2).

Subtypes of *Cryptosporidium* Identified

Analysis of the GP60 gene sequences identified four subtype families in *C. hominis*: Ia (5/10), Ib (1/10), Id (1/10) and Ie (3/10) (Table 1). Within the Ia, we identified 2 subtypes: IaA15R3 (2/10) and IaA14R3 (3/10). For the Ib, Id and Ie, we identified only 1 subtype of each of these alleles: IbA10G2 (1/10), IdA17 (1/10) and IeA11G3T3 (3/10) (Table 1). For *C. parvum*, we detected the presence of only IIa subtype family, with 2 subtypes: IIaA15G2R1 (1/2) and IIaA16G1R1 (1/2).

Discussion

In this work, we determined the species, subtype families, and subtypes of *Cryptosporidium* in stool samples in the state of Sonora and Mexico City. Of the 12 cases of cryptosporidiosis included in this study, we identified *C. hominis* in 10 cases and *C. parvum* in 2 cases. Our results are consistent with findings in developing countries where *C. hominis* is considered the predominant species in humans [47–49]. Despite the small number of *Cryptosporidium*-positive specimens in this study, we identified all 4 common subtype families of GP60 in *C. hominis*, including Ia, Ib, Id and Ie. Previously, Ib was the most frequently identified *C. hominis* subtype family [36], although in this study Ia and Ie were identified in 8 of 10 *C. hominis* samples. In this study, subtype IbA10G2 was only identified in one 9-month-old child, although it is the most common Ib subtype (88.5% within subtype Ib). The IbA10G2 subtype is considered the most common cause of outbreaks of waterborne cryptosporidiosis [16,36,50,51], and has been identified in humans in Africa [39], Asia [34], Australia [50,52], and in cattle in South American [16,36,50,53].

The Id subtype, which was only identified in a 3-year-old child, was IdA17. There have been a few reports of this subtype isolated in humans in Australia (Western Region), Netherlands and Kenya (Nairobi) [54,55]. In contrast, the IeA11G3T3 is the most

prevalent Ie subtype [36]. In this study, IaA11G3T3 was one of the most prevalent and was identified in 3 patients in Sonora. These results agreed with the data by other researchers in India (Kolkata) [56], United Kingdom [57], US [58], Australia [52], Kuwait [34], Ecuador, Pakistan and Uganda [37,56] and no reports in animals. In this study, 2 subtypes of family subtype Ia were identified: IaA15R3 (in 2 patients) and IaA14R3 (in 3 patients).

Most of the subtypes found in this study have been previously reported in humans in various countries, except IaA15R3 subtype, which has only been reported once by Hadfield in 2011 in a patient in the United Kingdom (GenBank HQ149032) [57].

In this study, 3 children participated in the study were diagnosed with HIV; unfortunately one of the children died. Two of the three children were infected with *C. parvum*; the child who died had IaA15G2R1, and another child had the IaA16G1R1 (Table 1). The two subtypes have been identified in farm animals [59–62] [62–65]. In addition, IaA15G2R1 e has been reported as the most common subtype in HIV+ patients in Malaysia [66], and is commonly seen in humans in other countries such as Australia [50], Egypt [67] and the Netherlands [63]. The IaA16G1R1 subtype has also been identified in humans in Slovenia [65] and the US [68,69]. The subtype family Ia is the most common *C. parvum* (57.8%) and is the second most frequently

reported subtype family in humans (25.5%), with a global distribution (26 countries) [36].

In conclusion, in this work, *C. hominis* was the predominant species in 12 *Cryptosporidium*-positive children analyzed in Mexico. The frequency of the *C. hominis* subtypes identified in this study appear to be different from what was reported in other areas of the world. However, additional studies with a larger sample size in multiple states are needed to determine the subtypes of *C. hominis* and *C. parvum* in the country, better understand the transmission of cryptosporidiosis in humans, and assess the role of zoonotic transmission in cryptosporidiosis epidemiology.

Acknowledgments

We thank Mónica Reséndiz for her technical assistance; Christian Magaña, Ariel Ochoa and Gie-Bele Vargas for supporting diagnosis of *Cryptosporidium* spp. and the administrative and medical staff of the hospital. The participation of volunteers is also acknowledged.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OV. Performed the experiments: OV MG. Analyzed the data: OV MG ABE JH LH. Contributed reagents/materials/analysis tools: OV MC MD RMB AG JH LX. Wrote the paper: OV MG JH LX.

References

- Domenech C, Rabodonirina M, Bleyzac N, Pages MP, Bertrand Y (2011) Cryptosporidiosis in children with acute lymphoblastic leukemia on maintenance chemotherapy. *Journal of pediatric hematology/oncology* 33: 570–572.
- Siwila J, Phiri IG, Enemark HL, Nchito M, Olsen A (2011) Seasonal prevalence and incidence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* and associated diarrhoea in children attending pre-school in Kafue, Zambia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 102–108.
- Asma I, Johari S, Sim BL, Lim YA (2011) How common is intestinal parasitism in HIV-infected patients in Malaysia? *Tropical biomedicine* 28: 400–410.
- Kurniawan A, Dwintarsari SW, Connelly L, Nichols RA, Yunihastuti E, et al. (2013) *Cryptosporidium* species from human immunodeficiency-infected patients with chronic diarrhea in Jakarta, Indonesia. *Annals of epidemiology*.
- Assefa S, Erko B, Medhin G, Assefa Z, Shimelis T (2009) Intestinal parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count. *BMC infectious diseases* 9: 155.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM (2002) Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet* 359: 564–571.
- Huang DB, Chappell C, Okhuysen PC (2004) Cryptosporidiosis in children. *Seminars in pediatric infectious diseases* 15: 253–259.
- Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, et al. (2007) Cryptosporidiosis in developing countries. *Journal of infection in developing countries* 1: 242–256.
- Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG (2004) Management of children with infection-associated persistent diarrhea. *Seminars in pediatric infectious diseases* 15: 229–236.
- Checkley W, Epstein LD, Gilman RH, Black RE, Cabrera L, et al. (1998) Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. *American journal of epidemiology* 148: 497–506.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ (2004) *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical microbiology reviews* 17: 72–97.
- Smith HV, Caccio SM, Tait A, McLauchlin J, Thompson RC (2006) Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in parasitology* 22: 160–167.
- Fayer R (2004) *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary parasitology* 126: 37–56.
- Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, et al. (2006) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology research* 99: 346–352.
- Xiao L, Ryan UM (2004) Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current opinion in infectious diseases* 17: 483–490.
- Xiao L (2010) Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental parasitology* 124: 80–89.
- Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, et al. (1997) Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging infectious diseases* 3: 567–573.
- Sulaiman IM, Xiao L, Yang C, Escalante L, Moore A, et al. (1998) Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging infectious diseases* 4: 681–685.
- Berrilli F, D'Alfonso R, Giangaspero A, Marangi M, Brandonisio O, et al. (2012) *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Cote d'Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106: 191–195.
- Wang R, Zhang X, Zhu H, Zhang L, Feng Y, et al. (2011) Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in humans in Henan, China. *Experimental parasitology* 127: 42–45.
- Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, et al. (2001) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of infectious diseases* 183: 492–497.
- Gatei W, Wamae CN, Mbae C, Waruru A, Mulinge E, et al. (2006) Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75: 78–82.
- Clarke SC, McIntyre M (2001) Acid-fast bodies in faecal smears stained by the modified Ziehl-Neelsen technique. *Br J Biomed Sci* 58: 7–10.
- Magi B, Canocchi V, Tordini G, Cellesi C, Barberi A (2006) *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitol Res* 98: 150–152.
- Ma P, Soave R (1983) Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *The Journal of infectious diseases* 147: 824–828.
- Pereira M, Li X, McCowan B, Phillips RL, Atwill ER (2010) Multiple unique *Cryptosporidium* isolates from three species of ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*, *S. beldingi*, and *S. lateralis*) in California. *Applied and environmental microbiology* 76: 8269–8276.
- Misic Z, Abe N (2007) Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology* 134: 351–358.
- Karanis P, Eiji T, Palomino L, Boonrod K, Plutzer J, et al. (2010) First description of *Cryptosporidium bovis* in Japan and diagnosis and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pre-weaned calves in Hokkaido. *Veterinary parasitology* 169: 387–390.
- Nuchjareed C, Boonrod K, Ongert J, Karanis P (2008) Prevalence and molecular characterization of human and bovine *Cryptosporidium* isolates in Thailand. *Parasitology research* 103: 1347–1353.
- Goncalves EM, da Silva AJ, Eduardo MB, Uemura IH, Moura IN, et al. (2006) Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in Sao Paulo. *Clinics* 61: 119–126.
- Trotz-Williams LA, Martin SW, Martin D, Duffield T, Leslie KE, et al. (2005) Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Veterinary parasitology* 134: 15–23.
- Kato S, Lindergard G, Mohammed HO (2003) Utility of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene in a nested PCR approach for detection infection in cattle. *Veterinary parasitology* 111: 153–159.

33. Pedraza-Diaz S, Amar C, Nichols GL, McLauchlin J (2001) Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerging infectious diseases* 7: 49–56.
34. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, et al. (2005) Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of clinical microbiology* 43: 2805–2809.
35. Strong WB, Gut J, Nelson RG (2000) Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and immunity* 68: 4117–4134.
36. Jex AR, Gasser RB (2010) Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies—research review. *Biotechnology advances* 28: 17–26.
37. Jex AR, Gasser RB (2008) Analysis of the genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scanning. *Electrophoresis* 29: 4119–4129.
38. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, et al. (2003) Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of clinical microbiology* 41: 2744–2747.
39. Leav BA, Mackay MR, Anyanwu A, RM OC, Cevallos AM, et al. (2002) Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infection and immunity* 70: 3881–3890.
40. Peng MM, Matos O, Gatei W, Das P, Stantic-Pavlinic M, et al. (2001) A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *The Journal of eukaryotic microbiology Suppl*: 28S–31S.
41. Diaz E, Mondragon J, Ramirez E, Bernal R (2003) Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 68: 384–385.
42. Larrosa-Haro A, Ruiz-Perez M, Aguilar-Benavides S (2002) [Utility of studying feces for the diagnosis and management of infants and preschool children with acute diarrhea]. *Salud publica de Mexico* 44: 328–334.
43. Solorzano-Santos F, Penagos-Paniagua M, Meneses-Esquivel R, Miranda-Novales MG, Leanos-Miranda B, et al. (2000) [*Cryptosporidium parvum* infection in malnourished and non malnourished children without diarrhea in a Mexican rural population]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* 52: 625–631.
44. Henriksen SA, Pohlenz JF (1981) Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta veterinaria Scandinavica* 22: 594–596.
45. Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, et al. (2007) Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis* 196: 684–691.
46. Sulaiman IM, Hira PR, Zhou L, Al-Ali FM, Al-Shelahi FA, et al. (2005) Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol* 43: 2805–2809.
47. Chalmers RM, Ferguson C, Caccio S, Gasser RB, Abs ELOYG, et al. (2005) Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International journal for parasitology* 35: 397–410.
48. Jex AR, Pangasa A, Campbell BE, Whipp M, Hogg G, et al. (2008) Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. *Journal of clinical microbiology* 46: 2252–2262.
49. O'Brien E, McInnes L, Ryan U (2008) *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Experimental parasitology* 118: 118–121.
50. Waldron LS, Dimeski B, Beggs PJ, Ferrari BC, Power ML (2011) Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Applied and environmental microbiology* 77: 7757–7765.
51. Chalmers RM, Hadfield SJ, Jackson CJ, Elwin K, Xiao L, et al. (2008) Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. *Emerg Infect Dis* 14: 496–498.
52. Waldron LS, Ferrari BC, Power ML (2009) Glycoprotein 60 diversity in *C. hominis* and *C. parvum* causing human cryptosporidiosis in NSW, Australia. *Experimental parasitology* 122: 124–127.
53. Abeywardena H, Jex AR, Nolan MJ, Haydon SR, Stevens MA, et al. (2012) Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12: 1984–1993.
54. Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, et al. (2008) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *International journal for parasitology* 38: 809–817.
55. Ng JS, Pingault N, Gibbs R, Koehler A, Ryan U (2010) Molecular characterisation of *Cryptosporidium* outbreaks in Western and South Australia. *Experimental parasitology* 125: 325–328.
56. Gatei W, Das P, Dutta P, Sen A, Cama V, et al. (2007) Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 7: 197–205.
57. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM (2011) Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 49: 918–924.
58. Widmer G, Lee Y (2010) Comparison of single- and multilocus genetic diversity in the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*. *Applied and environmental microbiology* 76: 6639–6644.
59. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, et al. (2003) Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol* 41: 2744–2747.
60. Chalmers RM, Ferguson C, Caccio S, Gasser RB, Abs ELOYG, et al. (2005) Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int J Parasitol* 35: 397–410.
61. Alves M, Ribeiro AM, Neto C, Ferreira E, Benoliel MJ, et al. (2006) Distribution of *Cryptosporidium* species and subtypes in water samples in Portugal: a preliminary study. *J Eukaryot Microbiol* 53 Suppl 1: S24–25.
62. Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, et al. (2006) Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitol Res* 99: 346–352.
63. Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, et al. (2008) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol* 38: 809–817.
64. Brook EJ, Anthony Hart C, French NP, Christley RM (2009) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet J* 179: 378–382.
65. Soba B, Logar J (2008) Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology* 135: 1263–1270.
66. Iqbal A, Lim YA, Surin J, Sim BL (2012) High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS one* 7: e31139.
67. Helmy YA, Krucken J, Nockler K, von Samson-Himmelstjerna G, Zessin KH (2013) Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Veterinary parasitology* 193: 15–24.
68. Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, et al. (2006) Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J Clin Microbiol* 44: 4303–4308.
69. Herges GR, Widmer G, Clark ME, Khan E, Giddings CW, et al. (2012) Evidence that *Cryptosporidium parvum* populations are panmictic and unstructured in the Upper Midwest of the United States. *Applied and environmental microbiology* 78: 8096–8101.