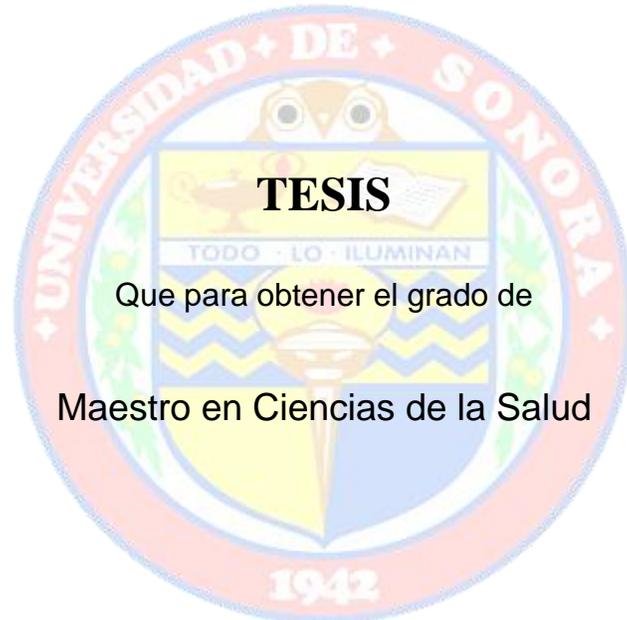


UNIVERSIDAD DE SONORA

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

Subgenotipificación de *Cryptosporidium* mediante el análisis del polimorfismo del gen de la GP60 en muestras de heces humanas



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

Presenta

QBC. Alejandro Urrea Quezada

Hermosillo, Sonora

Agosto 2015

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 **Alejandro Urrea Quezada**, 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 de Tesis



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Secretario



Dr. Alexél Jesús Burgara Estrella
Sinodal



Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

“Cuando bebas agua, recuerda la fuente”

Gracias, uno largo, profundo y sincero a todos quienes han sido parte de este proyecto. Su ayuda ha sido invaluable y generadora de muchos frutos, como el alcanzar uno de mis mayores anhelos.

Agradezco al equipo de trabajo al que pertenezco, Dra. Olivia, Mariana e Isaac juntos hemos avanzado a pasos agigantados, siempre con la bandera del servicio, gracias Dra. Olivia Valenzuela por sus consejos, regaños, felicitaciones y esa valiosa confianza que depositó en mí.

A los sinodales que han moldeado este proyecto y han sacado lo mejor de mí, muchas gracias.

Agradezco también la colaboración del Dr. Jesús Hernández y la Q.B. Mónica Reséndiz de CIAD por su apoyo incondicional al proyecto y todo lo que implica, sin su ayuda esto no se hubiera logrado.

Agradezco a los grandes amigos que formé a lo largo del proyecto en las instituciones de Salud que acudiera y que fueran parteaguas en la colección de muestras. A la Q.B. Josefina, a la Dra. Durazo, al Dr. Gómez, a las enfermeras Marta, Marta Rita y Diana, todos del Hospital Infantil de Sonora. También al M.C. Román, a la Q.B. Rosario del Centro Médico Dr. Ignacio Chávez.

Muchas gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de investigación, quienes lograron imprimir un poco de su esencia en mi formación académica y en la parte experimental.

Unas gracias infinitas a mi hermosa familia, a mis Padres que me han enseñado a luchar por ser mejor siempre sirviendo al prójimo. A mis cuatro hermanos que son un rayo de luz en un día nublado, los amo. A mis primos y primas, tíos y tías que me han adoptado de forma única y me han enseñado que solo se necesita amor para ser parte de una familia.

También quiero agradecer de forma especial al MVZ Alejandro Gutierrez, al MVZ Luis Aparicio y a la QB Diana por su apoyo incondicional.

Por último y no menos importante, quiero agradecer a Dios, por su infinita misericordia y amor.

DEDICATORIA

Es una muestra de agradecimiento el dedicar este logro maravilloso, a una familia hermosa, una de corazón tan enorme que me dejó entrar en sus corazones haciéndome parte de sus alegrías, su amor, su entrega y generosidad y también en sus tristezas y triunfos. Lo más grande que he alcanzado hasta este día se los ofrendo a ustedes Francisco, Lupita, Beto e Ivette, como muestra de un cariño profundo y una admiración sin fronteras.

Gracias por sus palabras y gran apoyo que he recibido de cada uno, pues sin estos pedazos de cielo no hubiera logrado lo que me fije desde el principio.

Sepan que los amo con celo y siempre pediré a Dios que los llene de vida, fuerza, sabiduría, amor y muchas bendiciones por tan enorme gesto de amor y servicio que han tenido conmigo.

Se dice que quien ha encontrado un amigo ha encontrado un tesoro y yo digo que más valioso que un tesoro es conocer el amor que puedes dar y darlo sin límites, sin media, ni duda y aún más valioso es poder compartirlo, gracias familia por compartir de ese amor conmigo y hacer de mi vida algo sumamente valioso por tenerlos a mí lado.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
OBJETIVOS.....	x
Objetivo General.....	x
Objetivos Particulares.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	4
Ciclo de vida.....	5
Patogenia	7
Diagnóstico.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Diseño de Estudio	14
Declaraciones Éticas.....	14
Kinyoun	14
Extracción de DNA	14
Reacción en Cadena de la Polimerasa	15
Electroforesis en gel de agarosa	18
Secuenciación	18
Análisis de las secuencias.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Identificación microscópica y población de estudio.....	19
Especies y subtipos de <i>Cryptosporidium</i> identificados.....	19
Análisis de secuencias.....	21
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

ANEXO	37
Anexo 1. Alineación de los indicadores en una secuencia de la GP60	37
Anexo 2. Secuencia de los subtipos de <i>Cryptosporidium</i> encontrados.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	6
2	Ooquistes de algunas especies diferentes de <i>Cryptosporidium</i>	10
3	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> teñidos con la tinción de Kinyoun y vistos en un microscopio óptico.	20
4	Electroforesis de la PCR anidada del gen de la GP60 de <i>Cryptosporidium</i>	23
5	Secuencias de dos subtipos (IbA12G3R2 y IeA11G3T3) de <i>C. hominis</i> comparada con secuencias reportadas en Australia.	25
6	Secuencias de dos subtipos (IIcA5G3 y IIaA15G2R1) de <i>C. parvum</i> comparadas con secuencias reportadas en Estados Unidos y Japón.	26

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Mezcla de reacción para la amplificación y amplificación anidada del gen GP60 de <i>Cryptosporidium</i> .	7
2	Información demográfica de los casos de criptosporidiosis y los genotipos y subtipos de <i>Cryptosporidium</i> de pacientes del Hospital Infantil del Estado de Sonora y del centro Médico Dr. Ignacio Chávez.	24

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los subtipos de *Cryptosporidium* mediante el análisis del polimorfismo del gen de la GP60 aislado de heces de habitantes del Estado de Sonora.

Objetivos específicos

Identificar a *Cryptosporidium spp.* mediante la técnica de Kinyoun, en muestras de heces humanas.

Identificar los subtipos de familia de *Cryptosporidium* mediante el análisis de la secuencia del gen de la GP60.

RESUMEN

Cryptosporidium es un parásito patógeno emergente que afecta a una gran variedad de animales incluyendo al hombre. A la enfermedad ocasionada por este parásito se le conoce como criptosporidiosis, provoca síntomas como diarrea, dolor y distensión abdominal, vómito entre otros. Las personas más susceptibles a padecerla son niños y pacientes inmunodeficientes. En una investigación sobre los casos de criptosporidiosis detectados entre 1989 y 2008 realizado en Inglaterra y Gales se encontró que la edad en el paciente es un factor principal en la epidemiología de la infección; los niños de 0 a 4 años tienen un riesgo mayor de padecer criptosporidiosis, debido a la inmadurez del sistema inmune asociado a mucosas, como la células dendríticas encargadas de presentar antígenos de *Cryptosporidium* a linfocitos T cooperadores y así eliminar la infección.

Cryptosporidium parvum y *Cryptosporidium hominis* son las especies responsables del 90% de las infecciones en humanos. En los últimos años se han realizado importantes revisiones del género *Cryptosporidium* con la identificación de nuevas especies/genotipos y recientemente “subtipos”, usando genes como la pequeña subunidad del ribosoma (SSU rRNA) y la glicoproteína de 60 kDa (GP60). La identificación de las especies del parásito es de suma importancia para los estudios epidemiológicos, también lo es la identificación de los subtipos pues nos permite conocer la variabilidad genética del parásito. Para la identificación de los subtipos, el gen de la GP60 es el más utilizado debido a que contiene múltiples regiones que muestran altas tasas de mutación, incluyendo una región hipervariable de microsatélite con repeticiones en tándem de tres nucleótidos que codifican para el nucleótido serina. Estas repeticiones son las que permiten nombrar a los subtipos de *C. parvum* y *C. hominis*. El análisis de la secuencia del gen de la GP60 ha permitido la clasificación en diferentes subtipos. Existen 11 subtipos de familia para *C. parvum* (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIe, IIe, IIg, IIh, Ili, IIk y III) y 6 para *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If y Ig).

En México solamente se ha publicado un artículo que incluye la caracterización molecular de *Cryptosporidium* en heces humanas; sin embargo, son pocos los casos que se analizaron. Por lo que la presente investigación identificó la variabilidad genética en un mayor número de casos. Se analizaron 18 muestras positivas a *Crpyotposridium spp.*, los pacientes procedían del Hospital Infantil del Estado de Sonora y del Centro Médico Dr. Ignacio Chávez, en total se obtuvo que 61% eran niños (11/18) y 39% eran niñas (7/18) y todos los infantes tenían una edad menor a 9 años. De esa forma se hace notar que los menor de edad, principalmente menores de 5 años tiene un riesgo mayor de padecer la enfermedad al conjuntarse una serie de variables como el sistema inmune asociado a mucosas inmaduro del niño, los pocos hábitos de higiene y variables externas como la falta de agua potable. La manifestación clínica más frecuente entre estos pacientes fue diarrea seguido de la desnutrición.

Los subtipos de familia encontrados dentro de *C. hominis* fueron: Ia (1/9), Ib (3/9) y Ic (5/9); mientras que en *C. parvum*: IIa (7/8) y IIc (1/8). Dentro del subtipo de familia Ia de *C. hominis* se identificó un solo subtipo: IaA15G1R1 (1/9). Para Ib se encontraron 3 subtipos IbA12G3R2 (3/9) y para Ic dos subtipos: IcA11G3T3 (2/9). En *C. parvum* se identificó dentro del subtipo de familia IIa a 5 subtipos: IIaA15G2R1 (5/8) y un solo subtipo IIcA5G3 (1/8) dentro del subtipo de familia IIc. También se identificó el primer caso de *Cryptosporidium canis* en México, reconociendo que la transmisión zoonótica no carece de importancia en la región a pesar de que la transmisión antroponótica fue más predominante, además, se identificaron los subtipos IIcA5G3, IaA15G1R1 y IbA12G3R2 que no han sido reportado en México.

INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por especies del género *Cryptosporidium*; éstos son cosmopolitas y afectan principalmente a niños menores de 4 años y personas con alguna inmunodeficiencia, llegando a ser mortal en algunos casos. (Chalmers y Davies, 2010; Abe y col., 2006; Cabral y col., 2002). En individuos inmunocompetentes es causa de diarrea aguda, normalmente autolimitada, mientras que en pacientes inmunodeficientes la enfermedad puede adquirir formas graves y potencialmente fatales (Del Coco y col., 2009). La transmisión del parásito ocurre vía fecal-oral, lo cual se facilita por la ingesta de agua o comida contaminada, además puede ocurrir vía persona-persona o transmisión animal a humano (Borad y Ward, 2010). La forma infectiva y a la vez el único estado exógeno de *Cryptosporidium spp.* corresponde al ooquiste, elemento de resistencia del parásito que permite la diseminación de la infección.

El sitio primario de infección de *Cryptosporidium* es el intestino delgado, aunque en individuos con inmunodeficiencias graves, este parásito también ha sido encontrado en sitios extraintestinales como vías biliares, hígado, vesícula biliar, páncreas y pulmones (Del Coco y col., 2009; Rani y col., 2008). La invasión de las células del hospedero por el parásito se limita a la frontera luminal de los enterocitos y conduce a la atrofia de las vellosidades produciendo una infiltración de células mononucleares en la lámina propia (Chalmers y Davies, 2010).

La criptosporidiosis es una infección de considerable incidencia tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Luján y Garbossa, 2008). Si bien, los primeros casos fueron notificados en 1976, la enfermedad adquirió verdadera importancia a partir de 1993, en la que se produjo el brote epidémico más importante a nivel mundial, en Milwaukee, EE.UU., que afectó a más de 400,000 personas. 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 potable que en los países menos desarrollados (Luján y Garbossa, 2008).

La forma de diagnóstico del parásito es por medio de la identificación del ooquiste en muestras de heces usando una técnica llamada Ziehl-Neelsen modificada o Kinyoun, ésta utiliza la característica de ácido-alcohol resistente del parásito para teñirlo de rosa mexicano (acción de la fucsina básica) en un fondo de contraste (verde brillante). Se observa al microscopio óptico con el objetivo 100x. Esta técnica es eficiente y confiable para el diagnóstico de *Cryptosporidium spp.* pero no discrimina entre especies del parásito pues son morfológicamente indistintos (Muraleedharan, 2009). El uso de herramientas moleculares como PCR, RFLP que usan genes como de la glicoproteína de 60 kDa (GP60), el SSU rRNA y COWP han permitido diferenciar al parásito en especies, genotipos y subtipos. La diferenciación del parásito es muy importante, la importancia no radica en el tratamiento contra la criptosporidiosis, sino en trazar rutas de transmisión y conocer la variabilidad genética, también proveer pistas dentro de los mecanismos de infección de estos organismos y permite sentar las bases para modalidades de terapia efectiva (Nichiro, 2006; Iqbal, 2012; Sharma, 2013).

Actualmente, el gen de la GP60 es el marcador genético más adecuado y ampliamente usado para la diferenciación de los ooquistes de *Cryptosporidium*. Este locus es usado por muchos estudios porque contiene múltiples regiones que muestran altas tasas de mutaciones, incluyendo, en particular una región hiper variable de microsatélite. (Xiao, 2010; Iqbal, 2012; Muraleedharan, 2009).

Las consecuencias graves y potencialmente fatales de la infección, que suelen afectar a niños y hospedadores inmunodeficientes, principalmente, motivan la necesidad de avanzar en aspectos vinculados con la prevención, el diagnóstico etiológico certero y el tratamiento de la criptosporidiosis. Los registros escasos y aislados de criptosporidiosis existentes en nuestro país motivan al desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas que permiten conocer realmente la situación

epidemiológica de esta infección en nuestro medio. Por lo que en este trabajo tiene como objetivo identificar, tanto, las especies como los subtipos de *Cryptosporidium* en muestras de heces del Estado de Sonora y de esta forma comparar con subtipos que han sido identificados anteriormente en este mismo Estado. Asimismo, concientizar a la comunidad hospitalaria de la importancia de un diagnóstico certero contra la criptosporidiosis.

ANTECEDENTES

Cryptosporidium es un patógeno intracelular de importancia global que provoca enfermedades entéricas en por lo menos 260 especies de vertebrados incluyendo al hombre. Afecta principalmente a pacientes inmunodeficientes y se dice que los menores de 4 años tienen un riesgo mayor de ser afectados. (De Lucca y col., 2009; Abrahamsen y col., 2004; Shi y col., 2010). Fueron primeramente reconocidos por Tyzzer en 1907, quien describió a *Cryptosporidium muris* en el estómago de un ratón de laboratorio. Después en 1912, Tyzzer describió una segunda especie, *C. parvum*, en un ratón de laboratorio. Esta nueva especie difirió de *C. muris* no solo por infectar el intestino en lugar del estómago, sino también por tener ooquistes más pequeños. 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. 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., 2008). Dos meses más tarde, se informó de los primeros casos de criptosporidiosis en pacientes inmunodeficientes, y los médicos comenzaron a reconocer a *Cryptosporidium* como un patógeno oportunista que causaba diarrea crónica y potencialmente mortal en pacientes con SIDA (Lucca y col., 2009).

La criptosporidiosis es una infección de considerable incidencia tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Si bien los primeros casos fueron notificados en 1976 en humanos, la enfermedad adquirió verdadera importancia a partir de 1993, en la que se produjo el brote epidémico más importante a nivel mundial, en Milwaukee, EUA, que afectó a más de 403,000 personas. Desde entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40 países (Corso y col., 2003). La prevalencia de infecciones humanas es menor en los países industrializados en los cuales la población tiene acceso a mejores servicios sanitarios y agua potable que en los países menos desarrollados

(Luján y Garbossa, 2008; Corso y col., 2003). En una investigación sobre los casos de criptosporidiosis detectados entre 1989 y 2008 realizado en Inglaterra y Gales, se encontró que la edad en el paciente es un factor principal en la epidemiología de la infección, presentando los niños de 0 a 4 años un riesgo mayor de padecer criptosporidiosis (Bouzid y col., 2008). Asimismo se reportó en Irlanda que el 70% de los casos positivos a *Cryptosporidium* se presentó en niños menores de 5 años (Zintl y col., 2011).

El género *Cryptosporidium* pertenece al Phylum Apicomplexa, clase Coccidia, orden Eucoccidiorida, familia Cryptosporidiidae. A pesar de las 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 (Del Coco y col., 2009).

Actualmente existen cinco especies que pueden infectar a humanos: *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis* y *C. canis*, siendo *C. hominis* y *C. parvum* los más comunes encontrados en humanos. El primero infecta casi exclusivamente a humanos, por lo que es considerado un parásito antroponótico; mientras que el último infecta al hombre y a animales domésticos y salvajes por lo que es considerado un patógeno zoonótico (De Lucca y col., 2009; Xiao y col. 2010; Amer, 2010).

Ciclo de Vida

El ciclo evolutivo es monoxeno y similar al de otros coccidios entéricos (Figura 1). 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. La forma infectiva y a la vez el único estado exógeno de *Cryptosporidium* corresponde al ooquiste, elemento de resistencia del parásito que

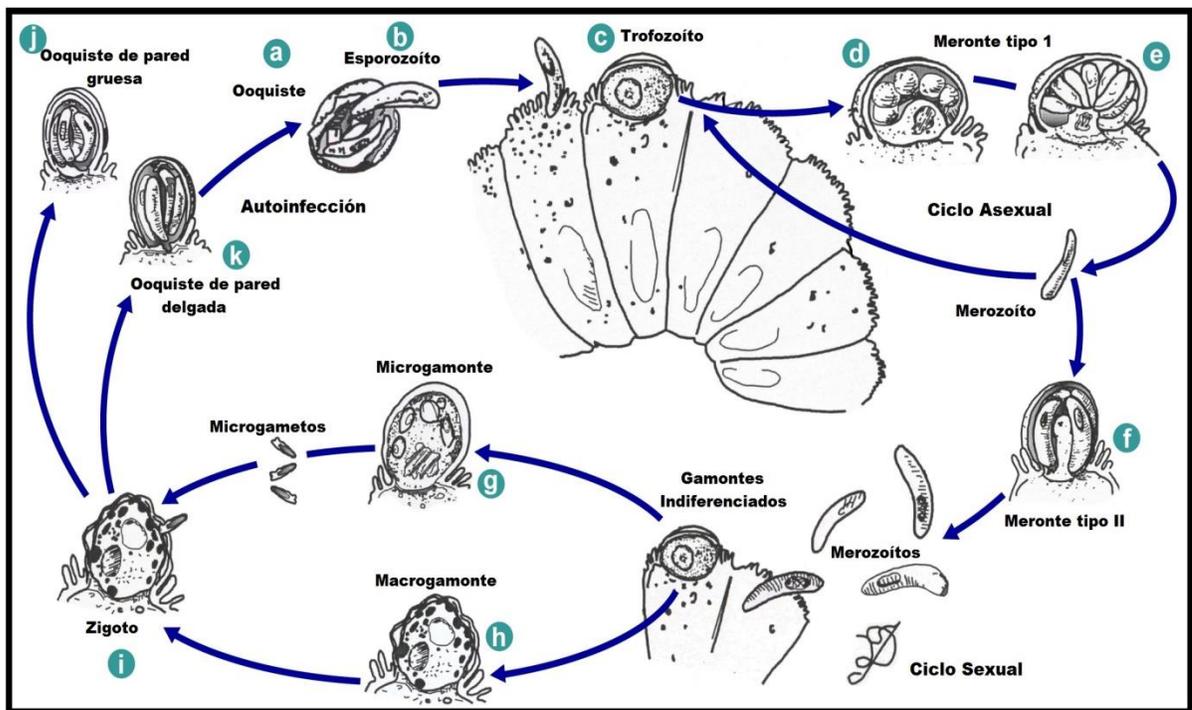
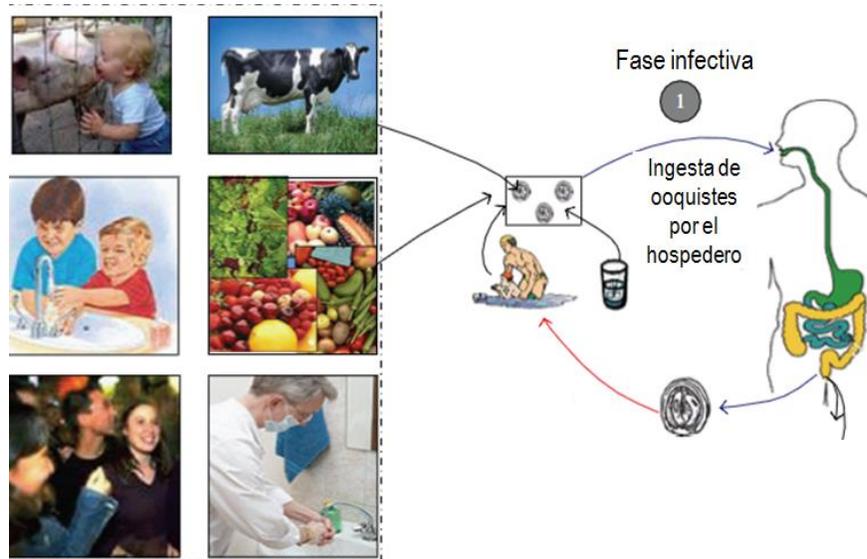


Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

permite la diseminación de la infección (Chen y col., 2002; Del Coco y col., 2009). El ooquiste sobrevive bien en medio ambiente húmedo, también a la mayoría de los desinfectantes usados en concentraciones normales recomendadas. La adquisición de la infección es principalmente por la ingestión del ooquiste, al contacto directo con el hombre o con heces de animales o exposición con agua contaminada, comida o por fómites y vía fecal-oral. Se necesitan tan solo 10 ooquistes viables para la infección (Chalmers y Davies, 2010; Neira y col., 2005).

Los requerimientos necesarios para iniciar el desenquistamiento incluyen cambios en la temperatura y el pH, sales biliares y acción de proteasas. 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). Del ooquiste son liberados 4 esporozoítos móviles, éstos se adhieren, invaden y colonizan las células del intestino delgado, los enterocitos, parasitando de una forma intracelular pero extracitoplasmática en una vacuola parasitófora. Los esporozoítos se transforman a trofozoítos y éstos a su vez, a meronte tipo I, el cual continúa con un ciclo de reproducción asexual para producir merozoítos que pueden seguir dos vías: la primera, invadir una nueva célula y reproducirse de forma asexual de nuevo. En la segunda, el merozoíto puede diferenciarse a meronte tipo II para reproducirse de manera sexual. Los merozoítos que son liberados del meronte tipo II se transforman en gametocitos no diferenciados, que se diferenciarán a microgamote (masculino) multinucleado y libera microgametos dentro del lumen, el cual penetra a través de la vacuola parasitófora para fertilizar al macrogamote (femenina) y formar el cigoto. Siguiendo la meiosis, el cigoto se diferencia en 4 esporozoítos envueltos en una pared madura del ooquiste listo para ser liberado dentro del lumen (Chamler, 2010).

Patogenia

La invasión de la célula hospedera se restringe a la barrera luminal de los enterocitos y produce un desplazamiento de las microvellosidades y la pérdida de

la superficie del epitelio, causando un cambio en la arquitectura de las vellosidades (atrofia, ensanchamiento de las puntas, hiperplasia de las criptas e infiltración mononuclear en la lámina propia) (Chalmers y Davies, 2010).

Aunque existen algunas diferencias en las cifras reportadas, el período de incubación de la infección por criptosporidios es relativamente corto: 5 a 28 días, con una media de 7 días. Las manifestaciones clínicas que se producen, y la evolución de éstas, dependen de la inmunocompetencia del individuo infectado y, en menor medida, del número de ooquistes ingeridos (Machado y col., 2008; Abeywardena y col., 2012).

En personas inmunocompetentes, la infección puede ser asintomática o producir manifestaciones clínicas, generalmente de aparición brusca y siempre autolimitada. El síntoma más frecuente es la diarrea, que suele ser acuosa, profusa y pueden contener moco, pero casi nunca sangre o leucocitos. Estas diarreas son la manifestación de un cuadro de enteritis, que afecta fundamentalmente al yeyuno e íleon (Idris y col., 2010; Ras y col., 2015).

De manera general, en los individuos inmunocomprometidos las manifestaciones clínicas de la criptosporidiosis, en particular las diarreas, son más intensas y de más larga duración. En personas desnutridas, sobre todo en niños, las diarreas son particularmente intensas y prolongadas. 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. Así ocurre con los enfermos que reciben tratamiento inmunodepresor por trasplantes o cáncer; en pacientes con infecciones virales que producen inmunodeficiencia transitoria, como sarampión o varicela y en individuos desnutridos (Machado y col., 2008; Bailey y Erramouspe, 2004).

Diagnóstico

El diagnóstico de la criptosporidiosis intestinal se efectúa mediante la búsqueda e identificación de ooquistes en la materia fecal. Para la identificación de los ooquistes al microscopio óptico, suelen utilizarse las técnicas de coloración de Ziehl-Neelsen y Kinyoun. La utilización de métodos de concentración de materia fecal aumenta la sensibilidad del diagnóstico microscópico (Muraleedharan, 2009; Del Coco y col., 2009).

La discriminación entre las especies y genotipos de *Cryptosporidium* no es posible por métodos tradicionales aplicados en el diagnóstico de rutina en el laboratorio como se observa en la figura 2 (Chalmers y Davies, 2010). Por muchos años han sido desarrolladas y utilizadas técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y métodos relacionados con ésta para la detección y diferenciación de *Cryptosporidium*. Los métodos moleculares fueron inicialmente empleados para la diferenciación de las especies y con una segunda generación de herramientas moleculares, la identificación de subtipos para una mayor discriminación molecular que ha permitido el estudio de una variación intraespecie, principalmente dentro de *C. parvum* y *C. hominis*, desde que se codificaron sus genomas completos en el 2003 (Robinson y Chalmers, 2012; Wildmer, 2009; Abrahamsen y col., 2004).

En el 2003 los genomas completos de *C. parvum* y *C. hominis* fueron liberados de CryptoB (Investigación genómica de *Cryptosporidium*) (<http://cryptodb.org>) y las descripciones fueron publicadas poco después. El genoma (~9.2 Mb) muestra una alta similitud de la secuencia de DNA (95-97%) con 30% de contenido de GC en ocho cromosomas. No hay grandes inserciones, deleciones o rearrreglos entre ellos y las proteínas y RNA de los dos genomas son esencialmente idénticos. Se presume que las diferencias fenotípicas que se observan entre *C. parvum* y *C. hominis* son debidas a polimorfismos sutiles y una regulación génica diferencial (Xu y col., 2004; Abrahamsen y col., 2004).

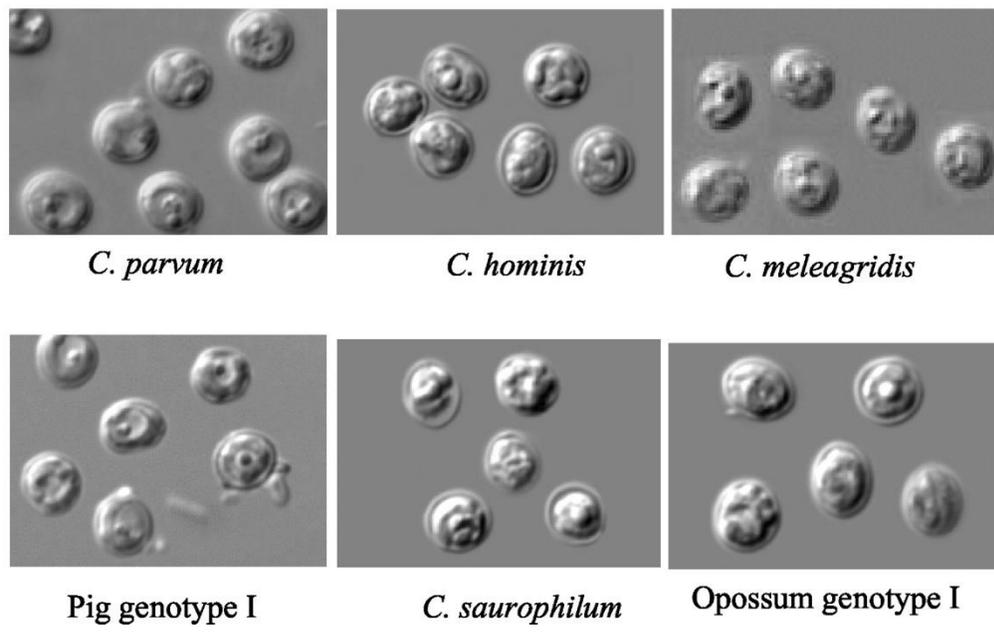


Figura 2. Ooquistes de algunas especies diferentes de *Cryptosporidium*.

La disponibilidad de los genomas de los parásitos ha permitido la exploración de la variación intra como también interespecie, facilitando la identificación de posibles marcadores genéticos. Durante la primera década del siglo 21 los ensayos para aislar los subtipos de *C. parvum* y *C. hominis* se incluyeron cada vez más en los estudios epidemiológicos (Robinson y Chalmers, 2012; Widmer, 2009).

La secuenciación del gen de la glicoproteína de 60 kDa (GP60) es actualmente el método de identificación de subtipos más utilizado debido a la heterogeneidad y relevancia del gen en la biología del parásito; contiene múltiples regiones que muestran altas tasas de mutación, incluyendo, en particular, una región hipervariable de microsatélite (Díaz, 2012; O'Connor y col., 2007). El análisis de la secuencia del gen de la GP60 ha permitido la clasificación en diferentes subtipos. Existen 11 subtipos de familia para *C. parvum* (IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIe, IIg, IIh, Ili, IIk y III) y 6 para *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If y Ig) (Xiao L., 2010; Valenzuela y col., 2014). Dentro de cada subtipo de familia, los subtipos se diferencian dependiendo del número de repeticiones de trinucleótidos (TCA, TCG, TCT) que codifican para el aminoácido serina. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en Kuwait por Sulaiman y col., en el subtipo de familia IIa, se identificaron dos subtipos, un subtipo tenía 15 copias del trinucleótido TCA y 1 copia de TCG, mientras que el otro subtipo tenía 15 copias de TCA y dos copias de TCG. Así, los dos subtipos fueron designados como IIaA15G1R1 y IIaA15G2R1, respectivamente. En el nombre de IIaA15G1R1, IIa indica que el subtipo pertenece al subtipo de familia IIa, A15 indica que el subtipo tiene 15 copias de TCA, y G1 indica que el subtipo tiene 1 copia de TCG. Debido a que algunos subtipos tienen una copia de la secuencia ACATCA inmediatamente después de las repeticiones de trinucleótidos y otros tienen dos repeticiones de esta secuencia de nucleótidos, R1 y R2 son usados para diferenciar estas secuencias. (Sulaiman y col., 2005; Ajjampur y col., 2010)

Entre los seis subtipos de familia de *C. hominis*, cuatro se han encontrado en humanos en India, Perú, Nueva Orleans, Malawi, Sur de África, Kuwait y Portugal. En contraste, solamente dos subtipos de familia *C. parvum* (IIa y IIc) se observaron en humanos en las mismas áreas (Iqbal y col., 2012). La discriminación de las especies y subtipos de *Cryptosporidium* es crucial para los estudios epidemiológicos y la prevención y control de la enfermedad (Abal-Fabeiro y col., 2013).

Las proteínas y glicoproteínas expresadas en la superficie de esporozoítos y merozoítos de *Cryptosporidium* tienen un papel muy importante en la movilidad, la adhesión e invasión de las células epiteliales del hospedero. La proteína GP60 también conocida como GP60/45/15 debido a la alta resolución genética, fue clonada y caracterizada por Strong y col. en el 2000. Codifica para una proteína precursora, la cual sufre una ruptura proteolítica para producir en las superficie de células maduras a las proteínas GP45/GP40 y GP15 implicadas en la adhesión e invasión de esporozoítos y merozoítos, en las células blanco, los enterocitos. La proteína codificada por el gen de la GP15/45/60 contiene muchos rasgos característicos de una glicoproteína de superficie unida a la membrana incluyendo una secuencia señal N-terminal, muchas serinas O-glicosiladas y residuos de treonina, un sitio de N-glicosilación y un sitio de adhesión para el ancla de GPI (glicosilfosfatidilinositol) en el extremo C-terminal (Stensvold y col., 2014; Strong y col., 2000; Cevallos y col., 2000).

En México, la presencia de la criptosporidiosis fue documentada primeramente en vacas lecheras en 1983, desde entonces no se ha realizado el análisis de los genotipos de *Cryptosporidium*; sin embargo, existen algunos reportes de prevalencia de *Cryptosporidium* usando los métodos moleculares. En Aguascalientes, México, se reportó una prevalencia del 75% (95/126) por microscopía, pero por técnicas moleculares (el gen de 18S rRNA) fue de 67% (85/126) en heces de becerros lactantes (García, 2009; Castillo, 2009).

Las consecuencias graves y potencialmente fatales de la infección, que suelen afectar principalmente a niños y hospedadores inmunocomprometidos, motivan la necesidad de avanzar en aspectos vinculados con la prevención, el diagnóstico etiológico certero y el tratamiento de la criptosporidiosis. Los registros escasos y aislados de criptosporidiosis en México requieren el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas rápidas y confiables que permitan conocer realmente la situación epidemiológica de esta infección en nuestro medio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio transversal descriptivo con muestreo por conveniencia.

Declaraciones éticas

El proyecto contó con la aprobación del Comité de Ética de la Secretaría de Salud del Estado de Sonora, así como el consentimiento informado por parte del Padre/Madre o tutor de los pacientes incluidos.

Kinyoun

Se elaboró un frotis delgado de la muestra de heces en un portaobjetos y se dejó secar. Se colocó el portaobjetos en una gradilla para teñir y se fijó con metanol hasta secarse, se cubrió con fucsina básica al 1% durante dos minutos, después se lavó con agua de la llave. Se decoloró con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10% y se lavó, nuevamente con agua, repitiendo el lavado hasta lograr un rosa pálido. Se cubrió con verde brillante al 1% durante treinta segundos para lograr una coloración de contraste, se lavó con agua corriente y se dejó secar al aire. Se observó al microscopio en el objetivo 100x con aceite de inmersión en busca de ooquistes de *Cryptosporidium*.

Extracción de DNA

Se colocó en un microtubo 1.4 mL de amortiguador de lisis (ASL), se adicionó 200 µL de una suspensión de muestra de heces. Se aplicó de 3 a 5 cambios de temperatura de -20°C a 96°C. Se mezcló en vórtex por un minuto, posteriormente se centrifugó a 16,000 g por un minuto, se pasó 1.2 mL del sobrenadante a otro tubo de 2 mL. Se adicionó una tableta inhibitex y se mezcló de inmediato en vórtex por tres minutos. Se dejó un minuto a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarse a tres minutos a 20,000 g. Se pasó todo el sobrenadante a otro tubo

de 1.5 mL y se centrifugó tres minutos a 16,000 g. Se colocó en otro tubo de 1.5 mL, 15 µL de proteinasa K. Se adicionó 200 µL del sobrenadante del paso anterior y se agregó 200 µL de amortiguador AL, se mezcló en vórtex quince segundos, se calentó a 70°C por diez minutos y se centrifugó por un minuto a 16,000 g y posteriormente se adicionó 200 µL de etanol absoluto, se mezcló en vórtex y se centrifugó un minuto a 16,000 g. Se pasó todo el sobrenadante a una columna QIAamp spin y se centrifugó un minuto a 16,000 g, se cambió la columna a otro tubo de colección y se adicionó a la columna 500 µL de amortiguador AW1, se centrifugó un minuto a 16,000 g, a continuación se cambió la columna a otro tubo de colección y se adicionó a la columna 500 µL de amortiguador AW2, se centrifugó por tres minutos a 16,000 g, se cambió la columna a un microtubo de 1.5 mL y se adicionó 200 µL de amortiguador de elusión AE, se incubó un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó un minuto a 16,000 g para eliminar la columna y se guardó el DNA filtrado a -20°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se etiquetó un tubo como mezcla y se vació en él los reactivos por orden. Se multiplicaron todos los reactivos por el total de muestras a amplificar con objeto de que al realizar esta mezcla se vaciará 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 y después la amplificación anidada. Se prepararon los tubos controles y los tubos con las muestras y se colocaron en el termociclador, se encendió y programó con las condiciones específicas según las iniciadores utilizados, como lo muestra la tabla I. Los iniciadores utilizados para la amplificación son 5'ATAGTCTCCGCTGTATTC3' y 5'GGAAGGAACGATGTATCT3', para la amplificación anidada 5'TCCGCTGTATTCTCAGCC3' y 5'GCAGAGGAACCAGCATC3', éstos sirven para amplificar un fragmento del gen completo, los primero iniciadores generan un amplicón de 920 pares de bases, mientras el segundo par, uno de 880 pares de

bases. En el apartado de anexos se encuentra la secuencia del gen de la GP60 y se muestran dónde los iniciadores se alinean.

Tabla I. Mezcla de reacción para la amplificación primaria y anidada del gen *GP60* de *Cryptosporidium*.

	Amplificación primaria	Amplificación anidada
Agua	28.1 μL	26.5 μL
Amortiguador 10X	5.0 μL	5.0 μL
MgCl ₂ (25 mM)	3.0 μL	3.0 μL
Nucleótidos (2.5 mM)	8.0 μL	8.0 μL
Taq Polimerasa (2.5 U/ μL)	0.3 μL	0.3 μL
Iniciadores PCR: 5' GP60FWP (10 μM) 3' GP60FWS (10 μM) 5' GP60RVP (10 μM) 3' GP60RVS (10 μM)	1.3 μL 1.3 μL	2.6 μL 2.6 μL
Albumina de suero bovino (10 mg/mL)	2.0 μL	-
Total	49 μL	48 μL
DNA	1.0 μL	2.0 μL
Volumen Final	50.0 μL	50.0 μL

Inicial	94 °C - 3 min	Inicial	94 °C - 3 min
35 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 94\text{ °C} - 45\text{ s (Desnaturalización)} \\ 50\text{ °C} - 45\text{ s (Alineación)} \\ 72\text{ °C} - 60\text{ s (Extensión)} \end{array} \right.$	35 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 94\text{ °C} - 45\text{ s (Desnaturalización)} \\ 55\text{ °C} - 45\text{ s (Alineación)} \\ 72\text{ °C} - 60\text{ s (Extensión)} \end{array} \right.$
Final	72 °C - 10 min	Final	72 °C - 10 min
∞	4 °C	∞	4 °C

Electroforesis

Se calentaron los reactivos (Gel de agarosa y Buffer TAE 1X con Sybersafe) por dos minutos en baño maría dentro del microondas en un frasco de vidrio, se esperó hasta que se enfrió y se dejó gelificar en el soporte para el gel. Se montó el gel en la cámara de electroforesis, se agregó aproximadamente 300 mL de solución TAE 1X. Se adicionó en cada pozo 5 μ L de muestra de DNA obtenido del amplificado de la PCR y 2 μ L del buffer de carga. En un pozo se agregaron 5 μ L del marcador de pares de bases más 2 μ L del buffer de carga. Se realizó la corrida electroforética con 100 volts por cuarenta minutos, acabado el tiempo se escurrió el gel, se colocó en un transiluminador BIORAD de UV para tomar la foto y así documentarse.

Secuenciación

Las muestras que tenían la banda esperada para el gen de la GP60 se enviaron a secuenciar a la Universidad de Arizona. Para enviarse se colocaron en un tubo de 1.5 mL 10 μ L del producto de PCR anidado a secuenciar. En dos tubos de 1.5 mL se colocaron 100 μ L de cada iniciador a una concentración de 3 pM.

Análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias se hizo por medio del programa Chromas Lite versión 2.1. Se utilizó el programa Clustalw para alinear múltiples secuencias y con esto detectar las diferencias y similitudes entre las diferentes secuencias de DNA de las muestras obtenidas. Por último, para comparar las secuencias identificadas en este trabajo con otras reportadas en el mundo se empleó el programa Blastn.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación Microscópica y Población de Estudio

Se trabajaron aproximadamente 2200 muestras de heces que se obtuvieron de un muestreo diario en los hospitales que autorizaron el desarrollo del proyecto, como el Hospital Infantil del Estado de Sonora, el centro Médico Dr. Ignacio Chávez, así como de muestras particulares que acudían al laboratorio de la Universidad de Sonora y también se trabajaron muestras del laboratorio de Parasitología en la Universidad de Sonora. Del total de las muestras, 18 resultaron positivas a *Crpyotposridium spp.* por medio de la técnica de Kinyoun. En la figura 3, donde se ve una fotografía de una muestra positiva a *Cryptosporidium* teñida con la técnica de Kinyoun, el parásito es coloreado de rosa en un fondo verde que sirve de contraste, el parásito tiene un tamaño de 4 μm y una forma circular o elíptica. De los pacientes con criptosporidiosis, 61% eran niños (11/18) y 39% eran niñas (7/18). Todos los infantes tenían una edad menor a 9 años.

Los niños fueron diagnosticados con gastroenteritis (11/18), con desnutrición/deshidratación (4/18), donde las manifestaciones clínicas más frecuentes entre estos pacientes fueron la diarrea seguido de la desnutrición; sin embargo, tres pacientes no presentaron manifestaciones clínicas para la infección con *Cryptosporidium*, es decir, estos pacientes cursaron la enfermedad de forma asintomática, dos de éstos tuvieron diagnóstico de otitis aguda (2/18) y el otro no tuvo diagnóstico (Tabla 2).

Especies y Subtipos de *Cryptosporidium* Identificados

Después de determinar la presencia del parásito usando el método de Kinyoun, el gen de la GP60 fue amplificado y anidado usando los reactivos y métodos que se describen en el apartado correspondiente. La figura 4 muestra una fotografía de la amplificación anidada del gen de la GP60 de *Cryptosporidium*, también nos permite observar dos muestras positivas debido a la banda característica de 880 a

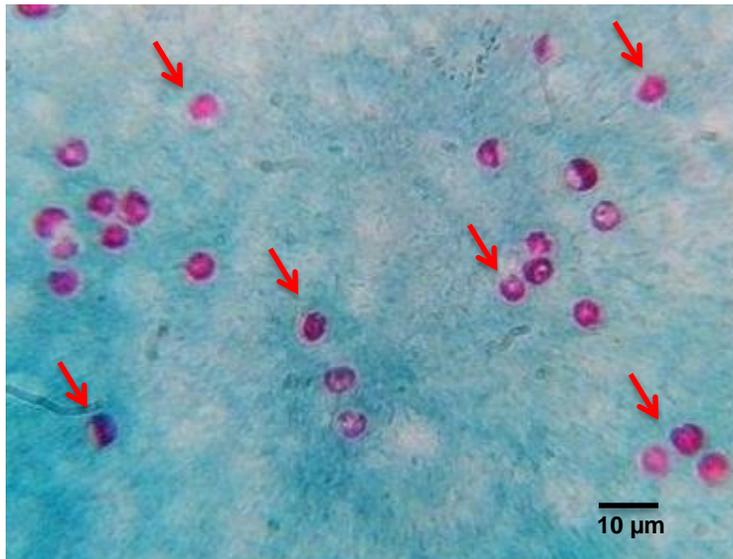


Figura 3. Ooquistes de *Cryptosporidium* teñidos con la tinción de Kinyoun y vistos en un microscopio óptico. Aumento: 100x.

900 pares de bases y que se puede comparar con los controles positivos en los carriles 1 y 2. Aunque estas bandas nos permiten saber que las muestras son positivas a *Cryptosporidium*, no revela la especie/genotipo del parásito y tampoco los subtipos.

Análisis de Secuencias

Una vez que las muestras fueron secuenciadas en la universidad de Arizona continuamos con el análisis de éstas, utilizando el programa Chromas Lite, lo que nos permitió observar cada nucleótido identificado en la secuencia y de esta forma quitar impurezas y nucleótidos mal identificados. Con otro servidor llamado Clustalw comparamos nuestras dos secuencias (comúnmente llamadas Forward y Reverse) para obtener finalmente una sola secuencia, y este mismo análisis identificó a *C. hominis* en el 50% de los casos (9/18) (5 niñas y 4 niños), a *C. parvum* en el 44.4% de los pacientes (4 niñas y 4 niños) y en un paciente (5.6%) se identificó a *C. canis*.

Dentro del análisis de las secuencias de nucleótidos la comparación de éstas con otras reportadas en el mundo permite confirmar que se trata de la misma secuencia y esto se logra utilizando el servidor llamado Blastn, en las siguiente figuras (Figuras 5 y 6) se muestran las secuencias de *C. hominis* (IeA11G3T3 y IbA12G3R2) y de *C. parvum* (IlcA5G3 y IlaA15G2R1), las cuales, se comparan con otras reportadas en Japón, EU y Australia, con el fin de ejemplificar el análisis de la secuencias utilizando el servidor de Blastn, donde se pueden comparar buscando las diferencias y similitudes de secuencias que han sido reportadas en otras partes del mundo por investigadores que trabajan con *Cryptosporidium* y así reconocer los subtipos iguales, como se mencionó antes. En las figuras se observan las diferencias de las secuencias en color amarillo.

De esta forma se logró identificar los subtipos de *Cryptosporidium* circulantes en el Estado de Sonora, lo cuales, dentro de *C. hominis* fueron: Ia (1/9), Ib (3/9) y Ic (5/9); mientras que en *C. parvum*: Ila (7/8) y Ilc (1/8). Dentro del

subtipo de familia Ia de *C. hominis* se identificó un solo subtipo: IaA15G1R1 (1/9). Para Ib se encontraron 3 subtipos IbA12G3R2 (3/9) y para Ie dos subtipos: IeA11G3T3 (2/9). En *C. parvum* se identificó dentro del subtipo de familia IIa 5 subtipos: IIaA15G2R1 (5/8) y un solo subtipo IIcA5G3 (1/8) dentro del subtipo de familia IIc (Tabla 2)

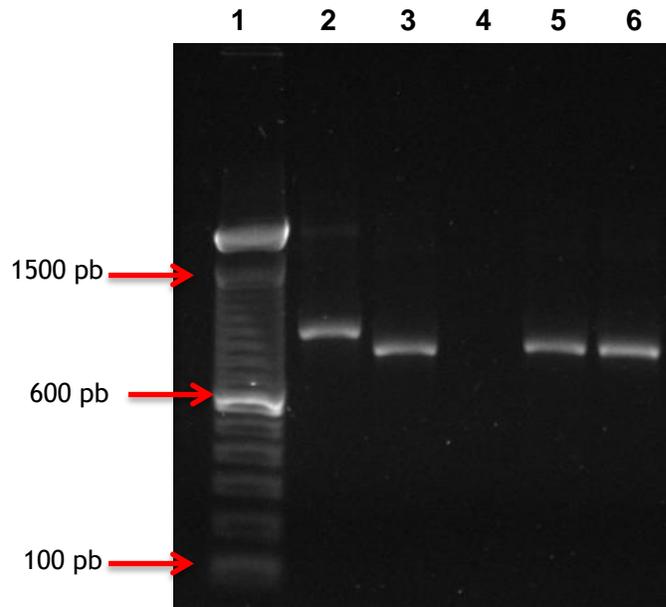


Figura 4. Resultados de la amplificación anidada del gen de la GP60 de *Cryptosporidium*. Carril 1: marcador de 100-pb; carril 2: *C. hominis*; carril 3: *C. parvum*; carril 4: control negativo; carril 5: muestra S8; carril 6: muestra S9.

Tabla 2. Información demográfica de los casos de criptosporidiosis, así como los genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* aislados de heces de pacientes del Estado de Sonora.

Muestra ID	Edad ⁽¹⁾	Género ⁽²⁾	Manifestaciones Clínicas ⁽³⁾	Origen Geográfico ⁽⁴⁾	Fecha de Colección ⁽⁵⁾	GP60 Especie	GP60 Subtipo de familia y subtipo
S1	9 A	M	VIH/Desnutrición/GEA/Candidiasis oral/Sepsis	HIES	04 / 2013	<i>C. parvum</i>	Ila A15G2R1
S2	1 A	M	Desnutrición/GEA/Neumonía/Enfermedad granulomatosa pulmonar	HIES	06 / 2013	<i>C. hominis</i>	Ie A11G3T3
S3	8 M	M	Deshidratación/GEA	HIES	07 / 2013	<i>C. hominis</i>	Ie A11G3T3
S4	7 M	F	Desnutrición/GEA/Deshidratación/Neumonía	HIES	07 / 2013	<i>C. hominis</i>	Ie A11G3T3
S8	4 A	F	GEA	HS	03 / 2014	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
S9	3 A	F	GEA	HS	04 / 2014	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
S10	1 A	F	GEA/Desnutrición/Diarrea	HS	06 / 2014	<i>C. parvum</i>	IlcA5G3
S11	4 A	M	GEA/Diarrea	HS	08 / 2014	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
S12	6 A	M	VIH/GEA/Desnutrición	HIES	08 / 2014	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
S13	3 A	M	GEA/Deshidratación	HS	09 / 2014	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
S14	5 M	F	Desnutrición/Deshidratación	HS	09 / 2014	<i>C. hominis</i>	IbA12G3R2
S15	3 A	F	Desnutrición	HS	09 / 2014	<i>C. hominis</i>	IeA11G3T3
S16	2 A	M	Otitis aguda	HS	09 / 2014	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1
S17	1 A	M	Desnutrición/Deshidratación/Diarrea	HS	09 / 2014	<i>C. hominis</i>	IaA15G1R1
S18	3 A	M	Doudenitis/Colitis	HS	10 / 2014	<i>C. hominis</i>	IeA11G3T3
S19	4 A	F	Otitis aguda	HS	10 / 2014	<i>C. hominis</i>	IbA12G3R2
S21	2 A	F	SD	HS	11 / 2014	<i>C. hominis</i>	IbA12G3R2
S22	2 A	M	Desnutrición	HIES	11 / 2014	<i>C. canis</i>	-

Las 12 muestras fueron de áreas urbanas de la ciudad de Hermosillo, Sonora. HS, Hermosillo, Sonora. (1) A, años; M, meses. (2) F, femenino. M, masculino. (3) DS, desnutrición severa; DM, desnutrición moderada; GEA, gastroenteritis aguda; SD, sin diagnóstico. (4) HIES, Hospital Infantil del Estado de Sonora; HS, Hospital de Sonora. (5) Mes/Año.

```

Son_IbA12G3R2   TCATCATCATCATCG---TCATCATCATCGTCATCATCGTCAACAACAACCCCGCACCA
Aut_IbA12G3R2   TCATCATCATCATCG---TCATCATCATCGTCATCATCGTCAACAACAACCCCGCACCA
Son_IeA11G3T3   TCATCTTCATCATCGTCTTTCATCTTCATCATCATCATCGTCGTCACAACAACCCCGCACCA
Aust_IeA11G3T3  TCATCTTCATCATCGTCTTTCATCTTCATCATCATCATCGTCGTCACAACAACCCCGCACCA
*****:*****      *****:*****.*****.*****.:*****.*****

Son_IbA12G3R2   GCTCCAAAGAAGGCAAGAGAAGCAGATGGCGGAGAAGAAAAGAACAATGAAGAAAG-----
Aust_IbA12G3R2  GCTCCAAAGAAGGCAAGAGAAGCAGATGGCGGAGAAGAAAAGAACAATGAAGAAAG-----
Son_IeA11G3T3   GCTTCAAAGAAGGTAAGAGAAGCAGAAGGCAGTGAAGAAAAGGACAGCGAAGAAAAGGAC
Aust_IeA11G3T3  GCTTCAAAGAAGGTAAGAGAAGCAGAAGGCAGTGAAGAAAAGGACAGCGAAGAAAAGGAC
*** ***** *****:***.:.*****.***. *****.

Son_IbA12G3R2   -----CCAAACTCCCGCTAGTCTGGAAGTGGTGGG
Aut_IbA12G3R2   -----CCAAACTCCCGCTAGTCTGGAAGTGGTGGG
Son_IeA11G3T3   AGTGAAGAAAAGGGCAGTGAAGAAGGTAGCCAAACTCCCGCTAGTCTGGAAGTGGAGGG
Aust_IeA11G3T3  AGTGAAGAAAAGGGCAGTGAAGAAGGTAGCCAAACTCCCGCTAGTCTGGAAGTGGAGGG
*****.*****.***.***

Son_IbA12G3R2   GTGAGTGAAGGACAAGATACTCAAGGTGGCTCCAAAGGAGACGCTGAGGAAGGCACTGAA
Aut_IbA12G3R2   GTGAGTGAAGGACAAGATACTCAAGGTGGCTCCAAAGGAGACGCTGAGGAAGGCACTGAA
Son_IeA11G3T3   GTGAGTGAAG---GAGATACTCAAGGTGACTCTAAAGGAGACGGAGTTAGTTCAGATGAG
Aust_IeA11G3T3  GTGAGTGAAG---GAGATACTCAAGGTGACTCTAAAGGAGACGGAGTTAGTTCAGATGAG
*****      .*****.*** ***** :*: .:. .*.***.

Son_IbA12G3R2   GACAATGAACAAGCCGATGAGAGTGCTACCCAACCTTCTACCCAGGTCAAGGCTCCGTT
Aut_IbA12G3R2   GACAATGAACAAGCCGATGAGAGTGCTACCCAACCTTCTACCCAGGTCAAGGCTCCGTT
Son_IeA11G3T3   AACCAAAGTCAAGGTGGGGACGCTACTCCCGGATCTAGCACCCAAACCTCAAGTACTGAA
Aust_IeA11G3T3  AACCAAAGTCAAGGTGGGGACGCTACTCCCGGATCTAGCACCCAAACCTCAAGTACTGAA
.*.*:..:**** *. ** .*.***.*.* ***: ****.*. ***** :* *.:

Son_IbA12G3R2   AAA---ACCGAATCCACAGAACTACTCCAAAGGAGAAGTGCGGTACTTCATTTGTTATG
Aut_IbA12G3R2   AAA---ACCGAATCCACAGAACTACTCCAAAGGAGAAGTGCGGTACTTCATTTGTTATG
Son_IeA11G3T3   AAAGAACCCGGATCTTCAGAAGCTACTCCAAAGGAAGAGTGCGGTACTTCATTTGTAATG
Aust_IeA11G3T3  AAAGAACCCGGATCTTCAGAAGCTACTCCAAAGGAAGAGTGCGGTACTTCATTTGTAATG
*** .***.*** :*****.*****.*****.*****.*****:***

Son_IbA12G3R2   TGGTTCGGACAGGGTGTTCCAGTTCGCAACTTTGAAGTGCGGTGACTATACTATGGTCTAT
Aut_IbA12G3R2   TGGTTCGGACAGGGTGTTCCAGTTCGCAACTTTGAAGTGCGGTGACTATACTATGGTCTAT
Son_IeA11G3T3   TGGTTCGGACAGGGTGTTCCAGTTCGCAACTTTGAAGTGCGGTGACTATACTATGGTCTAT
Aust_IeA11G3T3  TGGTTCGGACAGGGTGTTCCAGTTCGCAACTTTGAAGTGCGGTGACTATACTATGGTCTAT
*****.***** * ***** ***** .*****

```

Figura 5. Secuencias de dos subtipos (IbA12G3R2 y IeA11G3T3) de *C. hominis* comparada con secuencias reportadas en Australia. (Pangasa y col. 2010). Son: Sonora; Aut/Aust: Australia.

```

Son_IIcA5G3      AAGGTAAGAGAAAGCGAAGAAGGGAAGAACAGTGAAGATAGTCAAACCTCCCCTAGTCCT
EU_IIcA5G3      AAGGTAAGAGAAAGCGAAGAAGGGAAGAACAGTGAAGATAGTCAAACCTCCCCTAGTCCT
Son_IIaA15G2R1  AAGGCAAGAAGTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCT
Jap_IIaA15G2R1  AAGGCAAGAAGTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCT
                ****  ****      *  *****  *  *  ****  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Son_IIcA5G3      GGAAGT---GATTCTCAGGATAGCTCTAAAGGAGACGAAGCTGTAGATGGAGCCGCTTCC
EU_IIcA5G3      GGAAGT---GATTCTCAGGATAGCTCTAAAGGAGACGAAGCTGTAGATGGAGCCGCTTCC
Son_IIaA15G2R1  GGTAGCCAGGGTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGTCTTCC
Jap_IIaA15G2R1  GGTAGCCAGGGTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGTCTTCC
                **  **      *  ****  *  **      **  *  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Son_IIcA5G3      GGATCTAGTACCCCAACTCAAGCTGCTGAAAAGGAGCCCGAAACTCCAGAATCTACTCCA
EU_IIcA5G3      GGATCTAGTACCCCAACTCAAGCTGCTGAAAAGGAGCCCGAAACTCCAGAATCTACTCCA
Son_IIaA15G2R1  CAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCA
Jap_IIaA15G2R1  CAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCA
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Son_IIcA5G3      AAGGAAGAATGTGGTACTTCATTTATAATGTGGTTCGGAGAAGGTACTCCAGCCACAAC
EU_IIcA5G3      AAGGAAGAATGTGGTACTTCATTTATAATGTGGTTCGGAGAAGGTACTCCAGCCACAAC
Son_IIaA15G2R1  AAAGAAGAATGCGGCACCTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCAGCTGCGACA
Jap_IIaA15G2R1  AAAGAAGAATGCGGCACCTTCATTTGTAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCAGCTGCGACA
                **  *****  *  *  *****  *****  *****  *****  *  *  *  *  *  *

Son_IIcA5G3      TTGAAGTGCGGTGGCTACACTATCGTCTATGCACCAGAAAAGGATAATAAAGAACCCGCA
EU_IIcA5G3      TTGAAGTGCGGTGGCTACACTATCGTCTATGCACCAGAAAAGGATAATAAAGAACCCGCA
Son_IIaA15G2R1  TTGAAGTGCGGTGGCTACACTATCGTCTATGCACCAGAAAAGGATAATAAAGAACCCGCA
Jap_IIaA15G2R1  TTGAAGTGCGGTGGCTACACTATCGTCTATGCACCAGAAAAGGATAATAAAGAACCCGCA
                *****  ****  *****  *****  *****  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Son_IIcA5G3      CCAAGATACATCTCTGGTGATGTTAAGGCTGTAACCTTTGAAAAGGGAGAAGATAATACA
EU_IIcA5G3      CCAAGATACATCTCTGGTGATGTTAAGGCTGTAACCTTTGAAAAGGGAGAAGATAATACA
Son_IIaA15G2R1  CCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCTGTAACCTTTGAAAAGAGTG---ATAATACA
Jap_IIaA15G2R1  CCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCTGTAACCTTTGAAAAGAGTG---ATAATACA
                *****  *****  *****  *****  *****  *****  *  *  *****

Son_IIcA5G3      GTTAAATCAAGGTTGATGGTAAGGAGTTCAGTACTCTCTCTTCTAGCTCAAGCAGTCCA
EU_IIcA5G3      GTTAAATCAAGGTTGATGGTAAGGAGTTCAGTACTCTCTCTTCTAGCTCAAGCAGTCCA
Son_IIaA15G2R1  GTTAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTTCAGCACTCTCTCTGCTAATTCAGTAGTCCA
Jap_IIaA15G2R1  GTTAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTTCAGCACTCTCTCTGCTAATTCAGTAGTCCA
                *****  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 6. Secuencias de dos subtipos (IIcA5G3 y IIaA15G2R1) de *C. parvum* comparadas con secuencias reportadas en Estados Unidos y Japón (Strong y col. 2000; Ichikawa-Seki y col. 2014).

En una investigación sobre los casos de criptosporidiosis detectados entre 1989 y 2008 realizado en Inglaterra y Gales se encontró que la edad en el paciente es un factor principal en la epidemiología de la infección, los niños de 0 a 4 años tienen un riesgo mayor de padecer criptosporidiosis. Asimismo se encontró en una investigación en Irlanda que el 70% de los casos se presentó en niños menores de 5 años (Bouzid y col., 2008; Zintl y col., 2011).

De los 18 casos positivos en el presente estudio, en 9 se encontró a *Cryptosporidium hominis*, en 8 de los infantes se identificó a *Cryptosporidium parvum* y en un paciente se identificó *Cryptosporidium canis*. Si bien en otros estudios se han encontrado resultados que indican que *C. hominis* es predominante como en el caso de niños de Malawi (Peng y col., 2003), en esta investigación se observaron las dos especies de *Cryptosporidium* más comunes, esto debido a que el Estado de Sonora es uno de los 10 estados de mayor producción de ganado en el país, según el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) que emite SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y *C. parvum* tradicionalmente es asociado a animales de granja, lo que permite inferir que existe una transmisión zoonótica, además que *C. canis* es predominante en perros.

Dentro de *C. parvum* se identificaron dos subtipos de familia: IIa y IIc. El subtipo de familia IIa es comúnmente encontrado en terneras. En todos los niños infectados con el subtipo de familia IIa (7/8) tenían el subtipo IIaA15G2R1, éste se ha reportado en humanos en Bélgica, Holanda, Portugal, Eslovenia, Etiopía, Kuwait, USA y México, y es una causa común de brote en Reino Unido, sin embargo también se ha reportado en ganado en Reino Unido, Bélgica, Holanda, Alemania, Portugal, Italia, España, Eslovenia, USA y Canadá. Este subtipo es uno de los más predominantes resultado de una transmisión zoonótica (Zintl y col., 2011; Valenzuela y col., 2014; Sulaiman y col., 2005). Otro subtipo de familia encontrado fue IIc (antes llamado Ic) que junto al subtipo de familia IIa son de los más comunes, el primero se ha identificado solo en humanos a diferencia de

otros subtipos de familia que se han observado en humanos y ganado vacuno. Dentro del subtipo de familia Ilc se encontró un único subtipo el IlcA5G3 al igual que en un estudio en la India se reportó este subtipo (Stensvold, 2014; Sharma y col., 2013).

En México existen muy pocos estudios moleculares donde se identifique los genotipos de *Cryptosporidium* y solo un artículo donde se reportan los subtipos de familia, es el caso de un estudio llevado a cabo por el mismo cuerpo de investigación en el 2013, donde buscaron los subtipos de pacientes infantiles del Hospital Infantil de Sonora. Al comparar los subtipos identificados en el mismo Hospital, un año después, con este estudio, se encontró el subtipo IlaA15G2R1 sin embargo no se había reportado al subtipo IlcA5G3.

En los pacientes infectados con *C. hominis* se encontraron tres subtipos de familia diferentes: Ia, Ib, Ie. Previamente se ha observado que el subtipo de familia Ib es el más frecuente, como ocurrió en este estudio (3/9), y es el principal responsable de la transmisión por agua y comida en muchos países (Li N y col., 2013; Alyousefi y col., 2013). En Perú mostró que este subtipo de familia (Ib) fue más virulento que otros subtipos de familia en niños (Adamu y col., 2014). Dentro del subtipo de familia Ib se identificó únicamente al subtipo IbA12G3R2. En el subtipo de familia Ia se encontró al subtipo IaA15G1R1 en un solo paciente y dentro del subtipo de familia Ie se encontró en dos pacientes al subtipo IeA11G3T3.

Cryptosporidium canis, la especie de *Cryptosporidium* más comúnmente identificada en perros, es considerada potencialmente zoonótica basado en su presencia en pacientes humanos del Reino Unido, Jamaica, Kenya, Perú, Thailandia y los Estados Unidos. En un paciente del Hospital Infantil del Estado de Sonora se identificó a *C. canis*, el paciente refería una desnutrición crónica (tabla 2). Se han reportado pocos casos de infección con *C. canis* en humanos. En un estudio llevado a cabo en Gales e Inglaterra, donde se recolectaron 16 mil muestras positivas a *Cryptosporidium* solo se identificaron dos pacientes con la especie *canis*. Recientes estudios sugieren que la criptosporidiosis de mascotas como

perros y gatos poseen solamente un riesgo zoonótico mínimo, las posibles implicaciones de salud pública de *C. canis*, sin embargo el significado económico de la infección por *C. canis* en perros y otros animales no puede ser ignorada (Jian y col., 2014).

La alta incidencia de criptosporidiosis en niños probablemente refleja una falta de inmunidad debido a pocas exposiciones previas y la inmadurez de la mucosa intestinal. Aunado a las pobres prácticas de higiene que tienen los infantes debido a que están en aprendizaje de sus hábitos de higiene, además de factores externos como lo son: mala potabilización del agua, falta de drenaje y pavimentación en muchos países en vías de desarrollo y en comunidades con alta marginación. (Bouzid y col., 2008).

CONCLUSIONES

La edad en el paciente es un factor principal en la epidemiología de la infección, los niños de ≤ 5 años tienen un riesgo mayor de padecer criptosporidiosis.

El 50% de los casos de criptosporidiosis son causados por *C. hominis* lo que permite ver que es predominante la transmisión antroponótica entre los habitantes de Sonora, sin embargo, no carece de importancia la transmisión zoonótica.

Se han encontrado los subtipos IlcA5G3, IaA15G1R1 y IbA12G3R2 que no han sido reportado en México.

Se identificó el primer caso de *Cryptosporidium canis* en México.

BIBLIOGRAFÍA

- Abal-Fabeiro, J.L., Maside, X., Llovo, J., Bello, X., Torres, M., Treviño, M., Moldes, L., Muñoz, A., Carracedo, A., Bartolomé, C. 2013. High-throughput genotyping assay for the large-scale genetic characterization of *Cryptosporidium* parasites from human and bovine samples. *Parasitology*. 141: 491-500.
- Abe, N., Matsubayashi, M., Kimata, I., Iseki, M. 2006. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitol Res*. 99: 303–305
- Abeywardena H., Jex A.R., Nolan M. J., Haydon S. R., Stevens M. A., McAnulty R. W., Gasser R.B. 2012. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: Discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infect Genet Evol*. 12(8): 1984-1993
- Abrahamsen, M., Templeton, T., Enomoto, S., Abrahante, J., Zhu, G., Lancto, Ch., Deng, M., Liu, Ch., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G., Xu, P., Bankier, A., Dear, p., Konfortov, B., Spriggs, H., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V. 2004. Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 304(5669): 441-445.
- Adamu, H., Petros, B., Zhang, G., Kassa, H., Amer S., Ye J., Feng Y., Xiao, L. 2014. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis*. 17(8): e281.
- Ajjampur S.S.R., Sarkar R., Allison G., Banda K., Kane A., Muliylil J., Naumova E., Ward H., Kang G. 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): 633–639

- Alyousefi, N.A., Mahdy, M.A.K., Lim, Y.A., Xiao, L. Mahmud. 2013. First molecular characterization of *Cryptosporidium* in Yemen. *Parasitology*. 140(6): 729–734.
- Amer, S., Fayed, M., Honma, H., Fukuda, Y., Tada, C., Nakai, Y. 2010. Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium parvum* from Egypt. *Parasitol Res*. 107(5):1043-1047
- Bailey J. M., Erramouspe J. 2004. Nitazoxanide Treatment for Giardiasis and Cryptosporidiosis in Children. *Ann Pharmacother*. 38(4): 634-640.
- Borad, A., Ward, H. 2010. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol*. 5(3): 507-519.
- Bouزيد, M., Hunter, P., Chalmers, R.M., Tyler, K.M. 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev*. 26(1): 115-134.
- Castillo, C., Cruz, C., López, R., Sánchez, M., Rosario, R., Vitela, I., Medina, L. 2009. Frecuencia e identificación molecular de *Cryptosporidium* spp. en Becerras lactantes mantenidas en confinamiento en Aguascalientes, México. *Téc Pecu Méx*. 47 (4): 425-434.
- Cevallos A. M., Zhang X., Waldor M. K., Jaison S., Zhou X., Tzipori S., Neutra M. R., Ward H. D. 2000. Molecular Cloning and Expression of a Gene Encoding *Cryptosporidium parvum* Glycoproteins gp40 and gp15. *Infect immun*. 68 (7): 4108-4116.
- Chalmers, R.M., Davies, A.P. 2010. Minireview: Clinical criptosporidiosis. *Exp Parasitol*. 124(1): 138–146.
- Chen, X.M., Keithly, J. S., Paya, C.V., LaRusso, N.F. 2002. Criptosporidiosis. *N Engl J Med*. 346(22): 1723-31.
- Cheng Y.J., Lin W.C., Liu C.E., Ji D.D. 2014. First microbiologically confirmed case of cryptosporidiosis due to *Cryptosporidium hominis* gp60-If sub-genotype in a patient with HIV-1 infection in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 113(4): 264-265.
- Corso, P.S., Kramer, M.H., Kathleen, A.B., AddissD.G., Davis J.P., Haddix A.C. 2003. Cost of Illness in the 1993 Waterborne *Cryptosporidium* Outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 9 (4): 426-431.

- Cabral M. D.G., Robert E., Barbosa A.P., Silva S.A., García A. 2002. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (6): 787-793.
- Del Coco, V.F., Córdoba, M.A., Basualdo, J.A. 2009. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev Argent Microbiol.* 41(3): 185-196.
- De Lucca, P., De Gaspari, E., Bozzoli, L., Funada, M., De Souza, S., Luliano, W., Soares, R. 2009. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from HIV infected patients from an urban area of Brazil. *Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 51(6):341-343.
- Díaz, P., Hadfield, S., Quílez, J., Soilán, M., López, C., Panadero, R., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Chalmers, R. 2012. Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in north west Spain. *Vet Parasitol.* 186(3-4): 188-195.
- García, M., Cruz, C., Quezada, T., Silva, E., Valdivia, A., Vazquez, A., Ramos, M. 2009. Cryptosporidiosis in Dairy calves from Aguascalientes, México: Risk infection in relation with the season and month of sampling. *J Animal Vet Advan.* 8 (8): 1579-1583.
- Ichikawa-Seki, M., Aita, J., Masatani, T., Nisikawa, Y. 2014. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* detected from two different prefectures in Japan. Sin publicar.
- Idris, N.S., Dwipoerwanto, P.G., Kurniawan, A., Said, M. 2010. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *Infect Dev Ctries.* 4(5):309-317.
- Iqbal, A., Lim, Y., Surin, J., Sim, B. 2012. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting GP60 gene. *PLoS ONE*; 7(2): e31139.
- Jian, F., Qi, M., He, X., Wang, R., Zhang, S., Dong, H., Zhang, L. 2014. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in Henan Province, China. *BMC Vet Res.* 10(26): 6148

- Li, N., Xia, L., Cama, V.A., Ortega, Y., Gilman, R.H., Guo, M., Feng, Y. 2013 Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerg Infect Dis.* 19(10): 157-1582
- Lucca P., De Gaspari E., Bozzoli L., Fundada M. R., Silva S.O., Iuliano W., Soares R. M. 2009. Molecular characterization of *cryptosporidium* spp. from hiv infected patients from an urban area of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo* 51(6): 341-343.
- Luján, N., Garbossa, G. 2008. *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta de Bioq Clín Latinoam.* 42(2): 195-201.
- Muraleedharan K. 2005. *Cryptosporidium parvum* an emerging protozoan parasite of calves in India associated with diarrhoea among children. *Current Science.* 96: 1562.
- Neira, P., Muñoz, N., Sanchez, M., Rosales, M. 2005. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitol Res.* 97(1): 63–67.
- Nichiro, A., Matsubayashi, M., Kimata, I., Iseki, M. 2006. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitol Res.* 99(3): 303-305
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterol.* 70 (4): 592-598.
- O'Connor R., Wnayiri J.W., Cevallos A.M., Priest J.W., Ward H.D. 2007. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Mol Biochem Parasitol.* 156 (1): 80-83.
- Pangasa A., Jex A.R., Nolan M.J., Campbell B.E., Haydon S.R., Stevens M.A., Gasser R.B. 2010. Highly sensitive non-isotopic restriction endonuclease fingerprinting of nucleotide variability in the gp60 gene within *Cryptosporidium* species, genotypes and subgenotypes infective to humans, and its implications. *Electrophoresis.* 31(10): 1637-1647.

- Peng, M.M., Meshinick, S.R., Cunliffe, N.A., Thindwa, B., Hart, C.A., Broadhead, R.L., Xiao, L. 2003. Molecular epidemiology of Cryptosporidiosis in children in Malawi. *J Eukaryot Microbiol.*50:557-559
- Rani, H., Gupta, V., Gulati, N., Chander, J. 2008. Cryptosporidial oocysts in gastric aspirate of an infant. *J Med Microbiol.* 27(2): 172-174.
- Ras R., Huynh K., Desoky E., Badawy A., Widmer G. 2015. Perturbation of the intestinal microbiota of mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Int J Parasitol.* 45(8): 567-573.
- Robinson, G., Chalmers, R. 2012. Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp Parasit.* 132(2): 200-215.
- Sharma, P., Sharma, A., Sehgal, R., Malla, N., Khurana, S. 2013. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *J Infect Dis;* 17(8): e601-e605.
- Shi, K., Jian, F., Lv, C., Ning, C., Zhang, L., Ren, X., Dearen, T., Li, N., Qi, M., Xiao, L. 2010. Prevalence, genetic characteristics, and zoonotic potential of *Cryptosporidium* species causing infections in farm rabbits in China. *J Clin Microbiol.* 48 (9): 3263-3266.
- Stensvold, C.R., Beser, J., Axén, C., Lebbad, M. 2014. High applicability of a novel method for gp60 subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *J Clin Microbiol.* 52 (7): 2311-2319.
- Strong, W.B., Gut, J., Nelson, R.G. 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. *Infect Immun.* 68 (7): 4117- 4134.
- Sulaiman, I.M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F.M., Al-Shelahi, F.A., Shweiki, H.M., Iqbal, J., Khalid, N., Xiao, L. 2005 Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol.* 43 (6): 2805–2809.
- Valenzuela, O., González, M., Garibay, E., Burgara, E., Cano, M., Durazo, M., Bernal, R., Hernandez, J., Xiao, L. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico. 2014. *PLoS One* 9(4): e96128.

- Weir S.C., Pokorny N.J., Cerreno R.A., Trevors J.T., Lee H. 2002. Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cell Culture. *Appl Environ Microbiol.* 68 (5): 2576-2579.
- Wildmer, G. 2009. Meta-analysis of a polymorphic surface glycoprotein of the parasitic protozoa *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Epidemiol Infect.* 137 (12): 1800 – 1808.
- Xiao, L., Lal, A., Jiang, J. Detection and Differentiation of *Cryptosporidium* oocysts in water by PCR-RFLP. *Methods in Mol Biol.* 268: 163-176.
- Xiao, L., Hlavssa, M.C., Yoder, J., Ewers, C., Dearen, T., Yang, W., Nett, R., Harris, S., Brend, S.M., Harris, M., Onischuk, L., Valderrama, A., Cosgrove, S., Xavier, K., Hall, N., Romero, S., Young, S., Johnston, S.P., Arrowood, M., Roy, S., Beach, M.J. 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): 3017–3020.
- Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol.* 124(1): 80-89.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.R., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G.A. 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature.* 431(7012): 1107-1112
- Zintl, A., Ezzaty-Mirashemi, M., Chalmers, R.M., Elwin, K., Mulcahy, G., Lucy, F.E., Waal, T. 2011. Longitudinal and spatial distribution of GP60 subtypes in human cryptosporidiosis cases in Ireland. *Epidemiol Infect.* 139(12): 1945-1955.

ANEXOS

Anexo 1. Alineación de los iniciadores en una secuencia del gen de la glicoproteína de 60 kDa (GP60) de *Cryptosporidium parvum* (AF203016).

Iniciadores PCR primario: 915pb

Iniciador F1: **ATAGTCTCCGCTGTATTC**

Iniciador R1: TCCGCTGTATTCTCAGCC

Iniciadores PCR secundario: 881pb

Iniciador F2 GGAAGGAACGATGTATCT (INVERSA:
AGATACATCGTTCCTTCC)

Iniciador R2 GCAGAGGAACCAGCATC (INVERSA:
GATGCTGGTTCCTCTGC)

TCTAGAGTAATAGTTAGAGTAGATATTATTCAGAACAACGTCCTAAAGTAAAAATGCATATCGTAATCA
GTTACCCAAAATATTAATAAAAAACGAAAAGTCGCAATTTAGTGCTTAGGAGCTTAGACCTTTTTTTTTTC
CCATTCAGAACAATCCACTGCACTCAGAAATTAATAATCAAAATCAAAAAACCTGTATTAGAGGGA
TAGTAATAAATGCATTTCGCCTCGTCAAAATGCTGGCACGAATTACTCGGTATTCGGAAAAAATAAAT
CACCTTTAGTGCTATTGGAATAGAAAATCTAATTAACCACATTTCAAAAAAATAAGAACGATGATA
ACTTTGGAGTTAATATCTCATTTCGTAGGCTTGAGTGCTCAACAACAATTATACATTAGAATAAAAA
TAAAAGAACATGTAAGAACAATATTTGTGCATTATACGATTGAGATATAATTTTATGCTTAAAT
AAATTAACCTTTTCGCGCAAAAAAATTGAAAAAATAATTTGTATTACGTTCTATAAAAAAATAAAGTG
GTTTTTCGAATTCAATACAAAGAATAGGACTCAATATAAAGTCAACCTTGAAATTAATTAATATAAA
TTTTTAAGAGTAGACTCGTACGTATGAAATGCTTATCGTCTTACATGCATGCAAAAAATACGTGGACT
GGGTGTATCCACATAAAAAAGCAATTAACCACATTTTACCCACACATCTGTAGCGTCGTCAAGTAAAA
ATTGATAACAAATTTTATACATTCGGCTCGACCTTCTATAGGTGATAAATTAGTCAGCTTTAATAAA
GTAGGCAACTAAGGACAAAGGAAGATGAGATTGTCGCTCATTATCGTATTACTCTCCGTT**ATAGTCTC**
CGCTGTATTCTCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGAACCTTAAAGGATGTTCCCTGTTGAGGGCTCAT
CATCGTCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCAACATCAACC
GTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAACTGGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGA
AGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAACTAGTGCTGCTTCCC
AACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAA
TGCGGCACCTTCATTTGTAATGTGGTTTCGGAGAAGGTACCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTA
CACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTA
CATCTGTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACAGTTAAATCAAGGTAAACGGTCAGGATTTTCAGCACT
CTCTCTGCTAATTCAAGTAGTCCAACCTGAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAG
AAGATCACTCTCAGAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCTTTACCCTTGATG
GTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTG
GTTGCAGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGCGGCACACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAA
TGAGAACGGAGACTTGGTTGATAAGGACAACACAGTTCCTTTGAAG**GATGCTGGTTCCTCTGC**TTTTG
GACTC**AGATACATCGTTCCTTCC**GTTTTTGCAATCTTTCAGCCTTATTCGTGTTGTAATTTTTTTTC
AATTAATTTTAAAAGTTTAAAGAGTTTTAAGAGTAATTGCAATGAAATCTTTCGTGCGAATTCGCAT

TAAGGGTTTTGTTTATTACATTGAATCAGGACGCCAGTTTTTACAATGCTGAAGAATAATTAATTTTT
AATTTCCAGAATTTTCCCACGGGTTCCGCAGGTTTTTTTCGTATGAATGAGTTGATTATCGTAAACTT
ATAAGCAAAATAGAGTAAGCAATTTGGCGAGACAATTCGAAGGATTACTTAGAAGATTATTTGGCTAC
TTAGTTTGCCTTGCCTGATGAAGATTTAATGTTTGGAGCTAGATCGAGTGAGGATTAATAACAGAAAA
GACTAATTTTTTATTTAAGCGAGCTTGAAATTTTTTCTAAGTTTCATTTTTTTGTCGGGTTGTGAATT
TTTCTCATGTACCAATGGCGTACAATGGAAAGGCGTGAGGTGGTGTGTCCGAAAAGAAGTCTCCGCGG
TTGACAGGAATGAGTCCCATAGTGCCAGCTTGAAGAGGATGAAGGCGATTCCAAGGAGTGAGTATAG
GCAATATAACCACTTTTTGGATGTTGAACGGCTTCTTGCTGCGCGCTCGATTTCAAGAAAGTTCTTGT
TTGCTTGGATTAATATCTTTACTGCATTAACGAGAGCATAGCTAACGACAAGTATGCTGAAAAATCCG
GCGTTATTACCGCTCATATATAGCATGAAAAACGTCATACCCATGGTTTTAAGTGGCAGATGAGCAAT
GCTCCATGCCTTCTTATCAAAATTGCAAGCTTCGGAGGCATTTTGGTTTGTGTTGATTTCTGCGTTTT
CAATCGCACATACTGTTGGGCCTTGGTGTTTTATTCTGGGGTTTAGCGTCGAGTTACTTGCGCAGTGA
CTGTTAGTATTGCTACTACTTGAGTTGCGGTCTTGCTTTGTACGATCGCAAGGACTTGATCCTATAAG
TACTCGTTTATCAGGACTTTTATTAATTTTTTTTTTCGATAGTTTTTGGATTTATTACCCATGCGTCGT
ACCTGCTCCCAAGATTCGATCTTGTGTCGCTTTCGAGTGTCTCTTCTTGCTCATTFTTCCCTCATTCTT
TGGTTTGCAGTCATTTTTGAGACTTGGGAATGCTTCTTCTTGTGCGGGTTAAATTAATTTGAGCGGGAA
TCTTGGGGGGTGAGTGGTTACATTAATCTGTGCAAAATAGTTTTCTAAATGATATAATTTGTATAAGT
TTTGACTCAAAATTACCAATTAGAATATTCAAGATCATTAAAAAATAATTGAGTCTCTATATGCAT

Anexo 2. Secuencias de los subtipos de *C. hominis* y *C. parvum* encontrados.

C. hominis

> *Cryptosporidium hominis* IbA12G3R2

TTCTCAGCCCCAGCCGTTCCTACTCAGAGGCACCTTGaAAGATGTTTCTGTTGAGAGCTCATCATCATCATCATCAT
CGTCATCATCATCGTCATCATCGTCAACAACAACCCCGCACCAGCTCCAAAGAAGGCAAGAGAAGCAGATGGCGG
AGAAGAAAAGAACAATGAAGAAAGCCAACTCCCGCTAGTCCTGGAAGTGGTGGGGTGAAGTGAAGGACAAGATACT
CAAGGTGGCTCCAAAGGAGACGCTGAGGAAGGCACCTGAAAGACAATGAACAAGCCGATGAGAGTGTACCCAACCTT
CTACCCAGGTCAAGGCTCCGTTAAAACCGAATCCACAGAACTACTCCAAAGGAGAAGTGCAGGACTTCATTTGT
TATGTGGTTCCGACAGGGTGTTCAGTTCGCAACTTTGAAGTGCAGTACTATACTATGGTCTATGCACCAGAAAAG
GACAAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACAACCGTAACCTTTGATAAACAAGAGAGTACAG
TTACAATCAAGGTTAATAATGTAGAGTTCGGCACTCTCTACTAGCTCAAGTAAACCACTGAAAAATAAAGGTGA
GTCTAGCGATCAGGTTGGGTCAAGATCAAGAAGATCACTCACAGAGGAACTAGTGAAGTGCACCCGTCGATTTG
TTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAGTACGAAGATGTATCCAAGAGAAAACA
AGTACAGTTTGGTTGCAAACGATAAGACTTTCTATACCGCGCAAATAGCGGTAATACCACGGTATCTACAGGTT
GAATGATAATGGAGACTGGTgGaCaAGaACAaACCGTTCTTTTGAAGGATGCTGGTTCTCTG

> *Cryptosporidium hominis* IaA15G1R1

TCAGCCCCGGCCGTTCCTACTCAGAGGCACCTTGaAGGATGTTTCTGTTGAGGGATCATCATCATCATCATCAT
CATCATCATCATCATCATCAACATCGACCGTCGCACCAGCTCCAAAGAAAAGAAAGAACTGTAGAGGGCGGCAC
GGAAGGAAAAGAACGAAGAAAGCAGTCCAGGTTCTGAAGAACAAGACGGTGGTAAGGAAGACGGTGGTAAGGAAAAC
GGTGAAGGAGACACAGTAGACGGGGAACAACCGGGAGTGGTTCTCAAGTTACTCCATCTGGAAGTGCAGGCACAG
CTACCGAGTCCACAGCACTACTACTCCAAAGGAAGAATGTGGTACTTCATTTGTGATGTTGGTTCGAGAAAGGCAC
CCCGGTTGCGACTTGAAGTGTGGTGATTACACTATCGTCTATGCACCTATAAAAAGATCAAACAGATCCCGCACCA
AGATATATCTCTGTTGAAGTTACATCTGTATCCTTTGAAAAGAGTGAAGTACAGTTACAATCAAGGTTAATGGTA
AAGAGTTCAAGCACTCTCTGCTAACTCAAGTAGTCCAACTAAAAGATAACGGTGAATCTAGTGACAGTCAAGTTCA
ATCAAGATCAAGAAGATCACTCGCAGAGGAGAATGGTGAACAGTTGCAACAGTTGATTTGTTTGCCTTTACTCTT
GATGGTGGTAGAAGAATTGAAGTGGCTGTGCCAAAGGACGAAAATGCAGACAAAAGAAGCGAGTACAGTTTGGTTG
CAGACGATAAGCCTTTCTATACCGCGCAAACAGTGGCATCACAATGGTGTCTACAAATGGATGAGAAATgGAAA
CTTGGTtGaCaAGGaCAACaAAGTTCTCTTGAAGATGCTGGTTCTCT

> *Cryptosporidium hominis* IaA11G3T3

TCAGCCCCAGCCGTCCCAcTCAGAGGCACCTTGAAGGATGTTTCTGTTGAGGGCTCATCATCATCTTCATCATCGT
CTTCATCTTCATCATCATCATCGTCGTCACAACAACCCAGCACCAGCTTCAAAGAAGGTAAGAGAAGCAGAAGGCAG
TGAAGAAAAGGACAGCGAAGAAAAGGACAGTGAAGAAAAGGGCAGTGAAGAAGGTAGCCAACTCCCGCTAGTCCT
GGAGGTGGAGGGGTGAGTGAAGGAGTACTCAAGGTGACTCTAAAAGGAGACGGAGTTAGTTCAGATGAGAACCAAAA
GTCAAGGTGGGACGCTACTCCCGGATCTAGCACCCAACTCAAGCTACTGAAAAAGAACCAGGATCTTCAGAAGC
TACTCCAAAGGAAGAGTGCAGTACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGACAGGGTGTTCAGTTGTAACCTTTGAAGTGT
GGTGGTTATACTATGGTCTATGCACCAGAAAATGGCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTAAAGTTT
CAACCGTAGACTTTGAAAAACAAGATAGTACAGTTAAAAATCAAGGTTAATGGTGTGGAGTTCAGCACTCTCTCTAC
TAGTCAAGTAATCCAACCTGAAAATAGCGGATCTGAGAGCCAGGCTCAATCAAGATCAAGAAGATCACTCGCAGAG
GATGGTACTGAGACTGTGCAACCGTCGATTTGATTGCCTTCAACCTTCAAGGTGGTAAAAGAATCGAAGTCGCTG
TGCCAAGTGACGAAGATGTATCCAAGAGAAAACAAGTACAGTTTGGTTGCAGGCGATAAGACTTTCTATACCGCGC
AAATAGCGGTAATACCAGCGTATCTACAGGTTGAATGATGATGGAGACTGgTGgACAAGAACAaACCGTTCTT
TTGAAGGATGCTGgTTCTCTG

C. parvum

> *Cryptosporidium parvum* IIaA15G2R1

TGTTGaGGGcTcaTCATCGTcATcGTcATcATCATCATCATcATCATcATCATCAACATCAACCGTCGCa
CCagCaAATAAGGCAaGaaCTgGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCC

AGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAACTAGTGCTgCTTCCCAACCCACTACTCCaGCTCAAAG
TGAAGGCGCAACTaCcGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCGGCACtTCATTTGTAATGTGGTTCGGA
GAAGGTACCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCACCTATAAAAAGACCAAACAGATC
CCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCTGTAACTTTgAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGT
TAACGGTCAGGATTTcAGCACTCTCTCTGcTAATTCAAGTAGTCCAACtGAAAATGGCGGATcTGCGGGTCAGGCT
TCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCAGAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTACCC
TTGATGGTGGTAAAAGAAtTGAAGTGGCTGTACCAaACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGT
TGCaGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGCGCACTACCAATGGTGTCTACAGGttGAATGAGAACGgA
GACTTGgtTgATaAgGaCAACaCAgTTCTTTTGAAGGATGCTGGTTC

> *Cryptosporidium parvum* IlcA5G3

TTTTCCGcTGTATTcTCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGCACTTTAAAGGATGTTTCTGTTGAGAGCTCATCGTC
ATCATCGTCATCGTCAACAACAACCCCCGCACCAGCTCCAAAAGAAGGTAAGAGAAAAGCGAAGAAGGGAAGAACAGT
GAAGATAGTCAAACtCCCGCTAGTCCtGGAAGTGATTCTCAGGATAGCTCTAAAGGAGACGAAGCTGTAGATGGAG
CCGCTTCCGGATCTAGTACCCCAACTCAAGCTGCTGAAAAGGAGCCCGAAACTCCAGAATCTACTCCAAAGGAAGA
ATGTGGTACTTCATTTATAATGTGGTTCGGGAGAAGGTACTCCAGCCCAACTTTGAAGTGCGGTGGCTACACTATC
GTCTATGCACCAGAAAAGGATAATAAAGAACCCGCACCAAGATACATCTCTGGTGTGTTAAGGCTGTAACCTTTG
AAAAGGGAGAAGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTGATGGTAAGGAGTTCAGTACTCTCTTCTAGCTCAAGCAG
TCCAACtGAAAATAACGGATCTACGGGCCAGGTTGCATCAAGATCAAGAAGATCGCTCTCAGAGGAAAATAGTGAA
ACTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTACCCTTGATGGTGGCCGAAGAATTGAAGTTGCTGTACCCAGCGTCG
AAGATGCAACCAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCaaCGGtaAGCtttCtatACCGGcGCaAaCAGcGGCAC
TacCAAtGgTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGAC