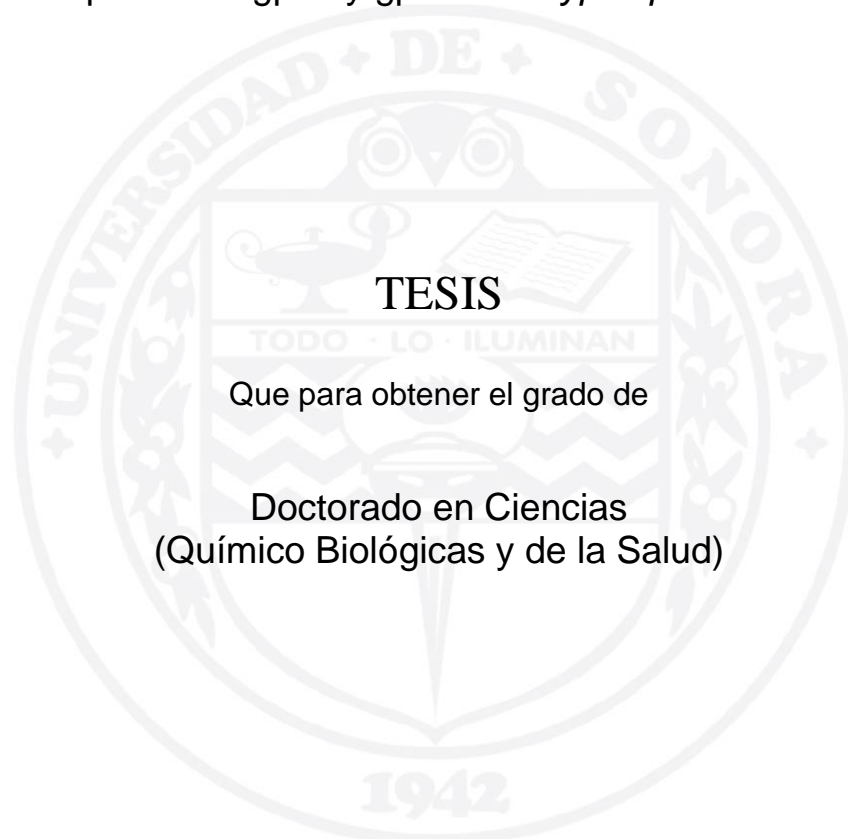


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
(QUÍMICO BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD)

Respuesta inmune humoral de pacientes hacia péptidos de las
proteínas gp15 y gp40 de *Cryptosporidium*



TESIS

Que para obtener el grado de

Doctorado en Ciencias
(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta

Alejandro Urrea Quezada

Hermosillo, Sonora

Noviembre 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



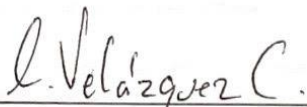
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

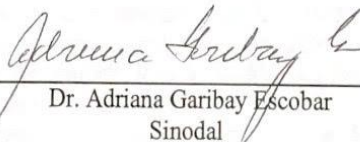
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Alejandro Urrea Quezada, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



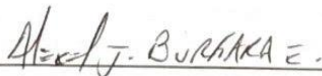
Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Director Académico



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario



Dr. Adriana Garibay Escobar
Sinodal



Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella
Sinodal

PhD Mónica Santín
Sinodal

AGRADECIMIENTO

“El que da, no debe volver a acordarse, pero el que recibe nunca debe olvidar”.

Quiero agradecer sinceramente a todos aquellos que, durante estos 4 años, han caminando a mi lado en esta etapa llena de aprendizaje. Este trabajo no hubiera concluido de la misma forma sin el apoyo, los consejos, las muestras de cariño, sin lo abrazos, ni los regaños de todos ustedes.

Gracias a la Dra. Olivia quien me ha mostrado el camino de la ciencia y ser un ejemplo de que, con el esfuerzo y la perseverancia todo se puede alcanzar; mi admiración siempre. Agradezco a todo el equipo “Emerging Team” por el enorme apoyo que me han dado, Mariana, Isaac, los abrazo con el alma pues las palabras no me alcanzan. A todos los jóvenes que estuvieron haciendo su servicio con nosotros y de los cuales aprendí tanto, muchos de ustedes ahora son Químico Biólogos y otros estudiantes de la Maestría. Gracias a Jorge León, Melissa Munguía y Ruben Balmaceda que pusieron en mí su confianza para trabajar en sus proyectos y alcanzar sus metas, aprendí tanto de ustedes y me hacen sentir muy orgulloso.

Agradezco con el corazón a mis compañeros de los laboratorios de investigación del Departamento Ciencias Químico Biológicas y de la Salud por toda su paciencia, por permitirme aprender de ustedes, por ser auténticos tesoros en los momentos difíciles.

A todo el equipo de los hospitales participantes, al Hospital Infantil del Estado de Sonora y al Centro Médico Dr. Ignacio Chávez; a sus Médicos, Enfermeras, Químicos, que siempre nos brindaron apoyo, su conocimiento; muchas gracias por permitirnos colaborar y ayudar a sus pacientes.

Al Dr. Jesús Hernández, a la M. C. Mónica Reséndiz, al Dr. Aldo Arvizu, por su valiosa aportación a este trabajo.

A los sinodales Dra. Adriana Garibay, Dra. Mónica Santín, Dr. Carlos Velázquez y al Dr. Alexel Burgara por brindarme su conocimiento, experiencia y creatividad que imprimieron en este trabajo.

A mis compañeros y amigos Victoria Medellín, Vanesa Castillo, Gustavo Oroz, que son luz en los días grises, muchas gracias.

Quiero agradecer a mis tíos, primos, que con su ejemplo me han moldeado. A Lupita, Francisco, Adalberto e Iveth por llenarme de fuerzas, de luz, por abrirme su casa y hacerme parte de ustedes, todas mis gracias hacia ustedes no tendrán fin. Gracias por enseñarme el valor de la generosidad y del amor, los Amo.

A mis Padres y Hermanos, por ser mis columnas en los días de terremoto, por ser alegría en mis días tristes, por ser mi fuerza en los días débiles, por ser consejo y abrazo. Gracias a ustedes puedo concluir esta etapa, pues son mi motor cada día, mi conexión a tierra.

DEDICATORIA

Este trabajo, el cual, es fruto del esfuerzo de cada día se la dedico con todo mi amor, mis fuerzas, mi voluntad a mi mamá María Jesús Quezada y a mi papá Francisco Javier Urrea por ser el ejemplo más grande de esfuerzo y constancia, humildad y fe que tengo. Todas las palabras no me alcanzarán para decirles lo que me hacen sentir cada día, pues cada sonrisa, cada caricia y consejo es una dulce caricia a mi alma. Lo que he construido se los ofrendo con toda mi admiración a ustedes mis amados y admirados padres

Qué orgulloso me siento de mi madre, esa sonrisa hermosa y sus palabras sabias son como un susurro de Dios.

Que orgullo llamarte papá, tus consejos y fortaleza me llenan el corazón de paz, esa que solo se lee en la biblia.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
OBJETIVOS.....	ix
Objetivo General.....	ix
Objetivos Particulares.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Ciclo de Vida	5
Patogenia	8
Epidemiología.....	9
Tratamiento	9
Diagnóstico.....	12
Respuesta Inmune	16
Avances en Vacuna contra la Criptosporidiosis	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Diseño de Estudio	27
Declaraciones Éticas	27
Kinyoun	27
Extracción de DNA	28
Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
Electroforesis en Gel de Agarosa.....	29
Secuenciación	29
Análisis de las Secuencias.....	30
Diseño de Péptidos	30
Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.....	31

Análisis de Datos.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Identificación Microscópica y Población de Estudio.....	33
Especies y Subtipos de <i>Cryptosporidium</i> Identificados.....	33
Análisis de Secuencias.....	36
ELISA	42
Seroprevalencia.....	49
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXO	62
Anexo 1. Alineación de los Indicadores en una Secuencia de la GP60	62
Anexo 2. Secuencia de los Subtipos de <i>Cryptosporidium</i> Identificados....	64
Anexo 3. Mezcla de Reacción para la Amplificación Primaria y Anidada del gen <i>GP60</i> de <i>Cryptosporidium</i>	66
Artículo “ <i>Cryptosporidium canis</i> in Two Mexican Toddlers”	67
Artículo “Clinical Manifestations of Cryptosporidiosis and Identification of a New <i>Cryptosporidium</i> Subtype in Patients From Sonora, Mexico”.....	69
Artículo “Follow-up of a Case of Cryptosporidiosis in a Toddler from Mexico: Response to the Treatment.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de Vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	7
2	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp.	13
3	Respuesta Inmune Innata hacia <i>Cryptosporidium</i>	19
4	Localización de la Proteína gp40 en <i>C. parvum</i>	22
5	Localización de la Proteína gp15 en <i>C. parvum</i>	23
6	Electroforesis de la PCR Anidada del Gen de la GP60 de <i>Cryptosporidium</i>	37
7	Gráfica del Reconocimiento de IgG sérica hacia Péptidos Sintéticos de los Casos y Controles.	44
8	Gráfica del Reconocimiento de IgG Sérica hacia Péptidos Sintéticos de los Casos Agrupados por Especie Infectante	45
9	Gráfica del Reconocimiento de IgM e IgG Sérica hacia el Péptido Sintético A133 entre los Casos y Controles	47
10	Gráfica del Reconocimiento de IgM e IgG Sérica hacia el Péptido Sintético A32 entre los Casos y Controles	48
11	Gráfica del Reconocimiento de IgG Sérica hacia Péptidos Sintéticos A133 y A32 de los Controles Agrupados por Síntomas.	52

12	Gráfica del Reconocimiento de IgG Sérica hacia Péptidos Sintéticos A133 y A32 de los Casos y Controles Agrupados por Síntomas.	53
----	--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Tabla de Quimioterapia de la Criptosporidiosis	11
II	Secuencia de Aminoácidos de los Péptidos Diseñados	32
III	Distribución de Casos y Controles por Hospital de Origen	35
IV	Especies y Subtipos de <i>Cryptosporidium</i> Identificados en Sonora	38
V	Tabla de Seroprevalencia	51

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar molecularmente a *Cryptosporidium* mediante el gen de la GP60 y evaluar la respuesta inmune humoral de pacientes hacia péptidos de las proteínas gp15 y gp40.

Objetivos Específicos

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

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

Evaluar el reconocimiento sérico de pacientes con y sin criptosporidiosis a péptidos sintéticos a partir de la gp15 y gp40 de *C. parvum*.

RESUMEN

Cryptosporidium pertenece al Phylum Apicomplexa, son protozoarios intracelulares que infectan a mamíferos, aves, reptiles, peces, anfibios y al hombre. *Cryptosporidium* spp. afecta a individuos de todos los grupos etarios. Las personas inmunocomprometidas y menores de edad (≤ 5 años) son los más vulnerables ante la criptosporidiosis. En individuos inmunocompetentes causa diarrea aguda, generalmente autolimitada. La criptosporidiosis fue incluida en el Catálogo de las Enfermedades Desatendidas de la OMS (WHO Neglected Diseases Initiative) en el 2004 y es considerada como un problema de salud pública.

Las especies asociadas comúnmente con la criptosporidiosis humana son *C. hominis* y *C. parvum*; el primero se transmite de humano a humano, mientras que el segundo se transmite de animales a humanos, por lo que se considera un patógeno de transmisión zoonótica.

Los fármacos usados contra la criptosporidiosis son limitados, la nitozoxanida es la única droga que ha demostrado cierto grado de efectividad contra el parásito en pacientes inmunocompetentes y está aprobada por la FDA (Food and Drug Administration), en pacientes inmunocomprometidos y menores de edad no se ha mostrado la misma efectividad, tampoco se ha evaluado el papel que tiene la droga para resolver la infección y tampoco existe una vacuna contra la criptosporidiosis.

Hay evidencias que sugieren que el desarrollo de una vacuna para prevenir la criptosporidiosis es factible; por ejemplo, el incremento de la susceptibilidad y severidad de la enfermedad en hospedadores inmunocomprometidos. En áreas endémicas se han identificado adultos que son parcialmente inmunes a la reinfección y estudios con humanos inmunocompetentes muestran que la infección es, generalmente, autolimitada; sin embargo, la respuesta inmune protectora hacia *Cryptosporidium* spp. no se

conoce por completo. Es por eso, que investigaciones recientes se han enfocado a las proteínas que tienen un papel muy importante en la movilidad, adhesión e invasión de los esporozoítos y merozoítos a las células blanco en el hospedero (enterocitos) y que se expresan en la superficie de estos zoítos.

En este trabajo se encontró que la manifestación clínica más frecuente entre los pacientes fue la diarrea, seguido del vómito y el dolor abdominal. Se identificaron cinco subtipos de *C. hominis* (IaA14R3, IaA14R11, IaA15R3, IbA12G3, IaA11G3T3), dos subtipos de *C. parvum* (IIaA15G2R1 y IIcA5G3); también se identificaron dos casos con *C. canis*. Todos ellos aislados de heces de pacientes que procedían del Hospital Infantil del Estado de Sonora y del Centro Médico Dr. Ignacio Chávez de Hermosillo Sonora, México.

Mediante ELISA se determinó el reconocimiento sérico (IgM e IgG) hacia péptidos sintéticos generados a partir de la secuencia aminoacídica de las proteínas gp15 y gp40 de *C. parvum*, de cada uno de los casos de criptosporidiosis, así como de pacientes sin criptosporidiosis (controles). Dos de los péptidos diseñados (A133 y A32) a partir de la proteína gp15 de *C. parvum* nos permitieron discriminar ($p < 0.004$) entre individuos infectados (casos) y no infectados (controles). Esto sugiere que pueden ser utilizados para futuras investigaciones. Se requieren otros estudios que evalúen la respuesta inmune en modelos *in vivo* para evaluar la participación protectora de estos péptidos.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium es un protozoario patógeno, emergente y de importancia global que afecta a por lo menos 260 especies de vertebrados incluyendo al hombre (Abrahamsen et al., 2004; Lucca et al., 2009; Shi et al., 2010). En individuos inmunocompetentes es causa de diarrea aguda, generalmente autolimitada; mientras que, en niños menores de 4 años la diarrea es de mayor duración, afectando el desarrollo físico y cognitivo; en inmunocomprometidos la infección puede resultar mortal (Abe, Matsubayashi, Kimata, & Iseki, 2006; Chalmers & Davies, 2010; Pereira, Atwill, Barbosa, Silva, & García-Zapata, 2002). Además de la diarrea, también se han reportado otras manifestaciones clínicas como dolor abdominal, vómito, y malestar general (Cama et al., 2008).

La forma de 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 (A. Borad & 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. Después de la ingestión de los ooquistes, estos se desenquistan en el intestino delgado, liberando cada uno a 4 esporozoítos móviles, los cuales se adhieren e invaden a los enterocitos. La invasión de las células del hospedero por zoítos (esporozoítos y merozoítos) 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 & Davies, 2010); aunque en individuos con inmunocompromiso (recuentos de linfocitos $< 50\text{cel}/\text{mm}^3$), se ha reportado en sitios extraintestinales, como vías biliares, hígado, vesícula biliar, páncreas y pulmones (Del Coco et al., 2014; Rani, Gupta, Gulati, & Chander, 2009).

En los procesos de adhesión e invasión de los zoítos, participan una gran cantidad de proteínas, algunas de ellas se ha determinado su capacidad

inmunogénica, siendo consideradas blanco para generar fármacos y/o vacunas (Ajjampur et al., 2011). Dentro de éstas se encuentra la proteína gp60 que se ubica en complejo apical de los zoítos y que sufre una proteólisis para generar dos proteínas gp15 y gp40, las cuales participan directamente en los procesos de adhesión e invasión (Ajjampur et al., 2011); aunado a esto, el gen de la GP60 es ampliamente usado para la identificación de subtipos de *C. parvum* y *C. hominis*; así mismo, se han empleado proteínas recombinantes a partir de este gen, para determinar la seroprevalencia en diversas zonas del mundo, lo cual ha permitido un avance considerable en cuanto a la epidemiología de la infección (Bartelt et al., 2013; Xiao, 2010).

Anualmente en E.U.A se reportan 748,000 casos de criptosporidiosis y estos reportes solo alcanzan el 1% de todos los casos en el país (Ryan, Fayer, & Xiao, 2014). De los brotes de criptosporidiosis, el de mayor importancia ocurrió en 1993 en Milwaukee, EE. UU; en el cual, 403 000 personas resultaron infectadas. Desde entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40 países (Xiao, Fayer, Ryan, & Upton, 2004).

La secuenciación del gen de la glicoproteína de 60 kDa (GP60) ha mostrado que contiene múltiples regiones que muestran altas tasas de mutación, y una región hipervariable de microsatélite (Diaz et al., 2012; O'Connor, Wanyiri, Cevallos, Priest, & Ward, 2007); estos datos sugieren que es posible identificar epítopes (péptidos) en la proteína GP60/15/40 que sean reconocidos por anticuerpos séricos de pacientes infectados con determinado genotipo/subtipo.

Las consecuencias graves y potencialmente fatales de la infección, motivan la necesidad de avanzar en aspectos vinculados el diagnóstico clínico (manifestaciones clínicas), diagnóstico etiológico, respuesta inmune y el tratamiento de la criptosporidiosis.

ANTECEDENTES

Cryptosporidium spp. pertenece al Phylum Apicomplexa, clase Coccidia, orden Eucoccidiorida, familia Cryptosporidiidae. Este género se distingue de las demás coccidias por su especificidad, capacidad de autoinfección endógena, por su localización intracelular y extracitoplasmática en la célula y por ser resistente al tratamiento antiparasitario (Del Coco et al., 2014). Hasta hace poco tiempo se pensaba que *Cryptosporidium* era un parásito intracelular obligado que solo se replicaba dentro de la célula blanco y que en el medio ambiente no podía multiplicarse (Tzipori & Ward, 2002); sin embargo, diferentes estudios han reportado la capacidad de multiplicarse en cultivos libres de células, incluso todos sus estadios morfológicos se han evidenciado por medio de microscopia electrónica de transmisión (Aldeyarbi & Karanis, 2016). Estas características reportadas en diferentes investigaciones en el área de biología celular y molecular de *Cryptosporidium*, han permitido que *Cryptosporidium* sea formalmente transferido a una nueva subclase, Cryptogregaria junto a los parásitos gregarinas por el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (International Code of Zoological Nomenclature ICZN) (Ryan, Paparini, Monis, & Hijjawi, 2016).

Cryptosporidium fue primeramente reconocido por Tyzzer en 1907, quien describió a *C. muris* en glándulas gástricas del estómago de un ratón. Después en 1912, Tyzzer describió una segunda especie, *C. parvum*, en un ratón, esta nueva especie difirió de *C. muris* no solo por infectar el intestino en lugar del estómago, sino también por tener ooquistes más pequeños (Tyzzer, 1910). 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, Burek, Page, Holscher, & Yardley, 1976). Dos meses más

tarde, se informó de los primeros casos de criptosporidiosis en pacientes inmunocomprometidos, así, los médicos comenzaron a reconocer a *Cryptosporidium* como un patógeno oportunista que causaba diarrea crónica y potencialmente mortal en pacientes con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) (Lucca et al., 2009).

La criptosporidiosis humana adquirió mayor relevancia en el año de 1993, debido a que, en Milwaukee, EUA se produjo el brote epidémico más importante a nivel mundial afectando a más de 403,000 personas. Desde entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40 países (Corso et al., 2003).

Actualmente, cerca de 20 especies de *Cryptosporidium* han sido reportados en humanos, incluyendo a *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *Cryptosporidium cuniculus*, *C. ubiquitum*, *Cryptosporidium viatorum*, *C. muris*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium fayeri*, *C. andersoni*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium scrofarum*, *Cryptosporidium tyzzeri*, *Cryptosporidium erinacei* y *Cryptosporidium horse*, genotipos zorrillo y ardilla (Kváč et al., 2014; Mi et al., 2014; Waldron, Dimeski, Beggs, Ferrari, & Power, 2011; Xiao, 2010). En humanos los genotipos infectantes más frecuentes son *C. hominis* y *C. parvum*, el primero infecta casi exclusivamente a humanos, por lo que es considerado un parásito antroponótico; mientras que el último infecta al hombre y animales domésticos y salvajes por lo que es considerado un patógeno zoonótico (Amer et al., 2010; Lucca et al., 2009; Xiao, 2010). Otras especies, tales como *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ubiquitum* y *C. viatorum* son menos comunes. Estos genotipos infectan a personas inmunocompetentes como a inmunocomprometidos (Ryan et al., 2014; Xiao, 2010) .

Ciclo de Vida

La transmisión del parásito ocurre vía fecal-oral con la ingestión del ooquiste, la forma infectiva y a la vez el único estado exógeno de *Cryptosporidium* que le da resistencia del parásito y le permite la diseminación de la infección (Checkley et al., 2015; Del Coco et al., 2014) por contacto directo con el hombre o con heces de animales, exposición con agua contaminada, comida o por fómites (Chalmers & Davies, 2010; Neira-Otero, Muñoz-Saldías, Sanchez-Moreno, & Rosales-Lombardo, 2005). El ciclo de vida de *Cryptosporidium* es monoxeno, es decir, que necesita un solo hospedero para cumplir su ciclo de vida por completo, y es similar al de otros coccidios entéricos (Del Coco et al., 2014) (Figura 1).

El sitio primario de infección de *Cryptosporidium* es el íleon terminal. 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 (Albuquerque, Silva, Lima, & Magalhães, 2012; Clemente, Caramori, Padula, & Rodrigues, 2000).

El desenquistamiento de *Cryptosporidium* en el hospedero se lleva a cabo por los 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 et al., 2014). 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. 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, generándose así, el ciclo de reproducción sexual. Siguiendo la meiosis, el cigoto se diferencia en 4 esporozoítos envueltos en una pared madura del ooquiste listo para ser liberado dentro del lumen (A. Borad & Ward, 2010; Chalmers & Davies, 2010).

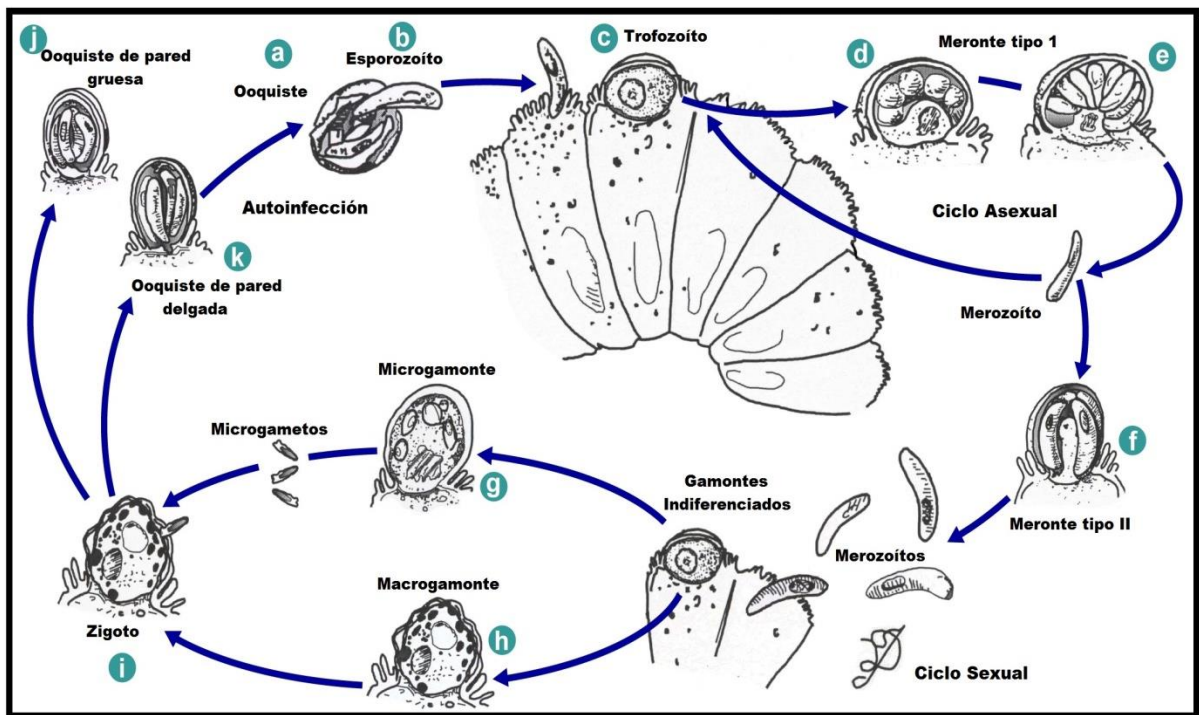
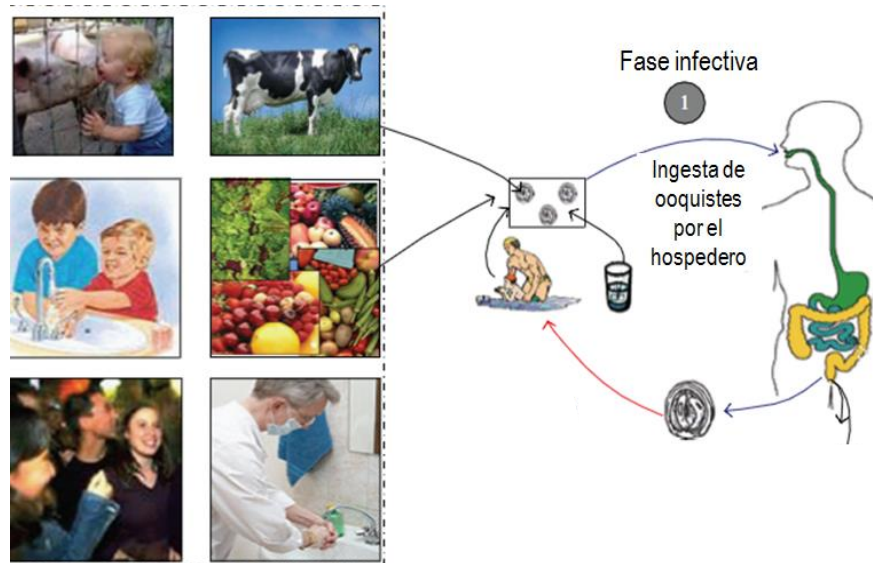


Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. extraído de: <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>

Patogenia

La invasión de la célula hospedera se restringe a la barrera luminal de los enterocitos y produce un acortamiento 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 & Davies, 2010).

Aunque existen algunas diferencias en las cifras reportadas, el período de incubación de la infección por *Cryptosporidium* spp. es relativamente corto: 5 a 28 días, con una media de 7 días (Del Coco et al., 2014). Las manifestaciones clínicas que se producen, y la evolución de éstas, dependen de la inmunocompetencia del individuo infectado y, en menor medida, al número de ooquistes ingeridos (Abeywardena et al., 2012; Riggs, 2002).

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, Dwipoerwantoro, Kurniawan, & Said, 2010; Ras, Huynh, Desoky, Badawy, & Widmer, 2015).

De manera general, en los individuos inmunocomprometidos las manifestaciones clínicas de la criptosporidiosis, en particular las diarreas, son más intensas y de mayor duración, incluso pueden afectarse pulmones, páncreas, e hígado. 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 (Del Coco et al., 2014). 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 (Bailey & Erramouspe, 2004).

Epidemiología

Cryptosporidium es un patógeno emergente de importancia global que provoca enfermedades entéricas en por lo menos 260 especies de vertebrados incluyendo al hombre y ha sido reportado en más de 90 países (Ryan et al., 2014). Afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos y se dice que los menores de 4 años tienen un riesgo mayor de ser afectados (Abrahamsen et al., 2004; Lucca et al., 2009; Shi et al., 2010).

El Global Enteric Multicenter Study, que buscó evaluar las causas, la carga, las manifestaciones clínicas y los resultados adversos de la diarrea moderada a severa en niños en siete sitios en África subsahariana (ubicada al sur del desierto del Sahara) y el sur de Asia, identificó al *Cryptosporidium* como uno de los cuatro principales contribuyentes a enfermedades diarreicas moderadas a severas, durante los primeros 2 años de vida, en todas las ciudades evaluadas. En una visita de seguimiento 2 a 3 meses después del estudio, la criptosporidiosis se asoció con riesgo de mortalidad 2 a 3 veces mayor entre los niños de 12 a 23 meses que tenían diarrea moderada a severa que en los controles sin diarrea. (Collaborators, 2016). También es considerado como uno de los cuatro patógenos responsable de diarrea moderada a severa en personas de país en vías de desarrollo (Ludington & Ward, 2015).

En países en vías de desarrollo se estima que la criptosporidiosis representa el 20% de los casos de diarrea en niños (Ryan et al., 2014).

Tratamiento

El tratamiento contra la criptosporidiosis es limitado. Algunas drogas han mostrado actividad contra *Cryptosporidium in vitro*, en modelos animales y personas. La FDA (Food and Drug Administration) aprobó el uso de la nitazoxanida para el tratamiento de la criptosporidiosis debido a que ha mostrado eficacia en personas inmunocompetentes, así como en niños con desnutrición y sin VIH; esta droga no mostró los mismos resultados en personas con VIH (Tabla I). Otros fármacos como la espiramicina y azitromicina no han mostrado eficacia en personas con SIDA; paromomicina mostró poco efecto al disminuir los síntomas y la excreción de ooquistes en las heces (Checkley et al., 2015).

La nitazoxanida (derivado de nitrotiazolil-salicilamida) es un antimicrobica de amplio espectro con actividad contra protozoarios, nematodos, cestodos, trematodos y bacterias (Amadi et al., 2002). En protozoarios interviene con la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) dependiente de la transferencia de electrones, la cual es esencial en el metabolismo energético. La nitazoxanida es convertida a un metabolito activo, tizoxanida (Bailey & Erramouspe, 2004).

Tabla I. Quimioterapia de la criptosporidiosis

	Mecanismo de acción	Limitaciones
Nitazoxanida	Interviene con la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR); esencial en el metabolismo energético	Eficacia 56-96% en hospederos sanos. No es eficaz en pacientes con SIDA avanzado. El alto costo y la disponibilidad limitan el uso generalizado.
Paromomicina	Inhibe la síntesis de al unirse a la subunidad 16s del ARNr	Eficacia limitada en pacientes con SIDA. No hay datos controlados en otros grupos.
Azitromicina	Inhibe la síntesis de proteínas por unión de la subunidad 50s del ribosoma e inhibiendo la translocación de los péptidos	No es efectivo en pacientes con SIDA avanzado. Eficacia en combinación en pacientes con SIDA.
Rifaximina	Inhibe la síntesis de ARN polimerasa impidiendo la síntesis de ADN	Anécdotas de respuestas en pacientes con SIDA.
Rifabutina	Bloquea a la ARN polimerasa dependiente de ADN	Eficaz en la prevención de la criptosporidiosis en estudios de profilaxis de <i>Mycobacterium avium</i>
Inhibidores de la HIV proteasa	Bloquean la proteasa del VIH	Asociado con la resolución de la criptosporidiosis en pacientes con SIDA Eficacia parcial contra <i>C. parvum</i> en modelos de ratón

Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de la criptosporidiosis se efectúa mediante la búsqueda e identificación de ooquistes en la materia fecal (Figura 2). Las técnicas de coloración de Ziehl-Neelsen modificado (en frío) o también llamada Kinyoun es la más utilizada en los laboratorios de rutina; sin embargo, tiene baja sensibilidad (70%) y depende del entrenamiento del técnico en salud que realice la prueba; la utilización de métodos de concentración de materia fecal aumenta la sensibilidad del diagnóstico microscópico (Del Coco et al., 2014).

La discriminación entre las especies y genotipos de *Cryptosporidium* no es posible por métodos tradicionales aplicados en el diagnóstico de rutina en el laboratorio (Chalmers & 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 la identificación de subtipos, lo que ha permitido el estudio de las variaciones intraespecie, principalmente dentro de *C. parvum* y *C. hominis*, desde que se codificaron sus genomas completos en el 2003 (Abrahamsen et al., 2004; Chalmers & Davies, 2010; Widmer, 2009).

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 (Abrahamsen et al., 2004; Xu et al., 2004).



Figura 2. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. teñidos con la tinción de kinyoun.

La disponibilidad de los genomas de los parásitos ha permitido la exploración de la variación intra-, así como inter-especie, facilitando la identificación de posibles marcadores genéticos. Durante la primera década del siglo XXI los ensayos para aislar los subtipos de *C. parvum* y *C. hominis* se incluyeron cada vez más en los estudios epidemiológicos (Robinson & 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 (Diaz et al., 2012; O'Connor et al., 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, II d, IIe, II f, II g, II h, II i, II k y II l) y 6 para *C. hominis* (Ia, Ib, Id, Ie, If y Ig) (Valenzuela et al., 2014; Xiao, 2010). 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. 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 (Ajjampur et al., 2011; Sulaiman et al., 2005).

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, Maside, Bello, Llovo, & Bartolomé, 2013).

Existen métodos inmunológicos como ensayos inmunocromatográficos, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) basado en la detección de antígenos y anticuerpos que se fundamenta en el uso de anticuerpos o antígenos conjugados con un enzima que al reaccionar con el sustrato específico producen una reacción de color que se puede cuantificar en un espectrofotómetro a una longitud de onda apropiada, y ensayos de inmunofluorescencia presentan una alta sensibilidad (70-100%) (Chalmers, Campbell, Crouch, Charlett, & Davies, 2011; Fereig, Abdelbaky, Ihara, & Nishikawa, 2018).

Respuesta inmune

La resolución y severidad de la infección es dependiente del estado inmune del hospedero; sin embargo, la naturaleza de la respuesta inmune en la criptosporidiosis, particularmente en humanos, es poco entendida (Ajjampur et al., 2011). Mucho de lo que se conoce acerca de la respuesta inmune contra *Cryptosporidium* es por estudios realizados en modelos animales, algunos estudios en humanos se han centrado en la respuesta humoral sistémica, otros han utilizado líneas celulares humanas (A. Borad & Ward, 2010).

Después de que *Cryptosporidium* infecta los enterocitos, éstos activan cascadas de señalización para responder al proceso de invasión, aunada a esta respuesta inmune de mucosas, la respuesta inmune innata y adaptativa son activadas. La respuesta inmune innata tiene un papel importante en la resistencia a *Cryptosporidium* (Figura 3) (Ludington & Ward, 2015).

Las células epiteliales son centinelas en la mucosa, equipadas con varios mecanismos de defensa para combatir los patógenos, como la inducción de apoptosis, producción de péptidos antimicrobianos (β -defensinas), moco, citocinas y quimiocinas (IL-8, CXCL10) para el reclutamiento de células inmunes al sitio de la infección. En cultivos de células in vitro se observó que *Cryptosporidium* induce la expresión de β defensinas 2 (Wehkamp, Schaubert, & Stange, 2007). Las células epiteliales expresan una variedad de receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (PRR), como los receptores de tipo Toll (TLR) en la superficie celular o en endosomas, y los receptores de unión a nucleótidos y de dominio de oligomerización en el citosol. Estos PRR pueden reconocer patógenos o patrones moleculares asociados a microbios y reclutan las proteínas accesorias MyD88 para la consecuente producción de citocinas proinflamatorias (Chen, Splinter, O'Hara, & LaRusso, 2007). En colangiocitos, utilizados como modelos de criptosporidiosis, se requirió una respuesta mediada por TLR4 para la erradicación eficiente de la infección, en el trabajo mencionado

se silenció la expresión de MyD88, TLR2 y TLR4 y provocó un incremento en la infección con este parásito (A. Borad & Ward, 2010; Laurent & Lacroix-Lamandé, 2017) .

Otro componente de la inmunidad innata es la lectina de unión a manosa que puede activar el complemento por la vía de las lectinas. Se reportó en niños haitianos con criptosporidiosis que en aquellos con deficiencia de lectinas a unión de manosa tenían más probabilidad de ser infectados con el parásito (Kirkpatrick et al., 2006).

Varios estudios sugieren que la respuesta inmune innata inicialmente limita el número de parásitos, pero la eliminación de la infección finalmente requiere una respuesta mediada por células T, enfatizando la importancia de las células CD4 + en la inmunidad protectora contra *C. parvum* (Codices et al., 2013).

Los fagocitos mononucleares consisten de monocito, macrófagos y células dendríticas, los cuales tienen funciones muy importantes en la inmunidad innata frente a *Cryptosporidium* (Bedi & Mead, 2012). Durante la infección por *C. parvum* en ratones neonatales, Auray y col. observaron un aumento de 60 veces en el número de monocitos inflamatorios a los 6 días post infección. Curiosamente, estas células no solo estaban ubicadas en la lámina propia de los ratones, sino también en el subepitelio, en contacto cercano con enterocitos infectados. Se ha observado que los macrófagos activados pueden responder secretando IL-1 β y TNF α en una infección con *Cryptosporidium* (Auray, Lacroix-Lamandé, Mancassola, Dimier-Poisson, & Laurent, 2007).

Las células dendríticas (CD) juegan un papel clave en la activación y orientación de las respuestas inmunes. Actualmente se sabe poco sobre el reclutamiento de CD durante la infección por *C. parvum*. Las CD son reclutadas por CXCL9 y CXCL10 (quimiocinas dependientes de IFN- γ) y producen altas cantidades de IL12 e IFN- γ , lo que favorece el control del parásito en las células epiteliales intestinales infectadas, durante la fase aguda de la infección (Lantier et al., 2013). Una vez activados, las CD migran rápidamente al ganglio linfático

de drenaje para activar células T específicas. Los antígenos de *C. parvum* y los parásitos vivos también se capturan en placas de Peyer (Laurent & Lacroix-Lamandé, 2017).

Las células asesinas naturales (NK) contribuyen a la eliminación de la infección en algunos modelos murinos. En ratones, el IFN- γ es crucial, tanto para la respuesta inmune innata, como para la adquirida. Por el contrario, la infección humana en hospederos sin previa infección se asoció con producción de IL15, que puede activar a NK para eliminar la infección *in vitro* (Checkley et al., 2015).

En la respuesta inmune adaptativa, la inmunidad mediada por células ha sido demostrada en modelos murinos. La susceptibilidad que tienen los pacientes con VIH/SIDA infectados con *Cryptosporidium*, cuando los recuentos de linfocitos T CD4+ son 50 cel/mm³ o menos, resalta la importancia de estas células en la resolución de la infección. La respuesta de linfocitos T CD4+ está mediada por IFN- γ . La respuesta es dependiente de MHC II y es caracterizada por la secreción de IFN- γ (Linfocitos Th1) (Zhao et al., 2016).

Las clonas de linfocitos T derivadas de PBMC de pacientes previamente expuestos con *Cryptosporidium* fueron principalmente CD4+ con TCR $\alpha\beta$ (fenotipo de memoria) y se caracterizaron por la hiper producción de IFN- γ (A. Borad & Ward, 2010). En otro estudio donde se estimularon PBMC de pacientes previamente expuestos con *Cryptosporidium* con antígenos crudos y recombinantes (rgp15) se encontró que tanto, linfocitos CD4+ y CD8+ de los pacientes previamente expuestos, produjeron grandes cantidades de IFN- γ comparados con los no expuestos (Preidis et al., 2007). El rol de los linfocitos T CD8+ no está claro; sin embargo, Pantenburg y col. demostraron que linfocitos T CD8+ redujeron la carga parasitaria en células epiteliales intestinales provocando la lisis en aquellas células infectadas por *C. parvum* (Pantenburg et al., 2010).

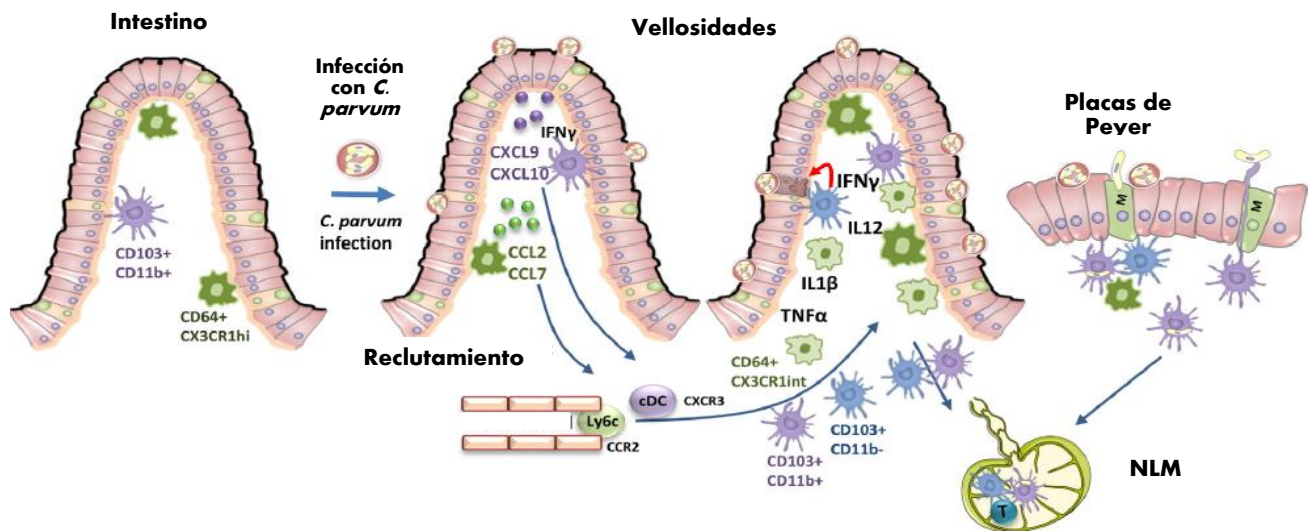


Figura 3. Respuesta innata de mucosas a *Cryptosporidium parvum* (Laurent & Lacroix-Lamandé, 2017).

El rol de la inmunidad humoral en protección de la criptosporidiosis no está claro, pero cumple un rol importante en los estadios invasivos como merozoitos y esporozoitos de *Cryptosporidium*. Estos cuando se encuentran en el lumen intestinal son blancos para los anticuerpos, los cuales bloquean la adherencia e invasión al enterocito (Checkley et al., 2015). Se ha observado una protección parcial de preparaciones de calostro hiperinmunes (derivadas de vacas inmunizadas con *C. parvum*) en infecciones con *Cryptosporidium* en sanos y con SIDA. Sueros de pacientes con SIDA reconocen mucho menos antígenos de *Cryptosporidium* cuando se comparan con personas sanas, sugiriendo que una deficiencia de linfocitos T CD4+ puede resultar en una deficiencia en la respuesta de anticuerpos (Ungar, Soave, Fayer, & Nash, 1986). Altas concentraciones de anticuerpos específicos se asociaron con una corta duración de la enfermedad en niños en Bangladesh (Khan et al., 2004).

Numerosos estudios han demostrado la existencia de IgM, IgG e IgA en el suero de pacientes infectados (Ajjampur et al., 2011; Allison et al., 2011; A. J. Borad et al., 2012; Preidis et al., 2007; Priest et al., 2006). Estudios con voluntarios sugieren que los pacientes con anticuerpos preexistentes de infecciones pasadas protegen parcialmente al experimentar menos diarrea en subsecuentes desafíos (A. Borad & Ward, 2010; Wanyiri et al., 2014); sin embargo, no se conoce si la inmunidad humoral puede proteger al hospedero por si sola (A. Borad & Ward, 2010; Riggs, 2002).

Investigaciones recientes se han enfocado a la búsqueda de antígenos de *Cryptosporidium* responsables de la adhesión e invasión y que además presenten características antigénicas. Más de 300 proteínas se han identificado como antígenos del *Cryposporidium* localizados en la superficie del parásito o excretadas (Cevallos et al., 2000).

Esfuerzos en la identificación de antígenos inmunogénicos de *Cryptosporidium* han llevado a la identificación de la proteína GP60, también

conocida como GP60/45/15, la cual, fue clonada y caracterizada por Strong y col. en el 2000. La GP60 sufre una ruptura proteolítica para producir, en la superficie de células maduras a las proteínas gp40 y gp15 implicadas en la adhesión e invasión de esporozoítos y merozoítos, en los enterocitos. Ambas proteínas quedan asociadas no covalentemente y se localizan en la superficie de zoítos; ambas se han descrito en *C. parvum* y *C. hominis* (Figura 4 y 5) (Preidis et al., 2007).

A pesar del polimorfismo en el gen GP60, la parte que codifica para la gp15 es relativamente conservada. El C-terminal de la gp15 está anclada a la membrana de los estadios invasivos de *Cryptosporidium* mediante un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI) y se elimina durante la motilidad del parásito como lo muestra la figura 5 (Priest et al., 1999). La presencia de anticuerpos séricos preexistentes anti gp15 se ha correlacionado con protección (Frost et al., 2005; Moss et al., 1998). Estudios realizados en adultos quienes se han infectado con *Cryptosporidium* de forma natural o experimental, han asociado la presencia de anticuerpos preexistentes anti gp15 con la disminución tanto de la duración como la severidad de la infección (A. Borad & Ward, 2010; Riggs, 2002), además se ha demostrado que en humanos infectados previamente con *Cryptosporidium*, la gp15 induce una respuesta celular mediada por IFN- γ (Preidis et al., 2007).

En todas las especies y subtipos de familia de *Cryptosporidium* se ha identificado que la gp40 posee dominios conservados (región C-terminal), y dominios polimórficos (región N-terminal). Así mismo, se ha descrito que anticuerpos anti-gp40 inhiben la infección por *C. parvum* in vitro (Cevallos et al., 2000; Strong, Gut, & Nelson, 2000).

Avanzando con los estudios para generar nuevas estrategias para la eliminación de la criptosporidiosis, se ha determinado la respuesta de anticuerpos séricos (IgG) específicos hacia ciertos antígenos de bajo peso molecular de la superficie de los esporozoítos, particularmente los antígenos recombinantes de 27 KDa (Perryman et al., 1996) y de 17 KDa (Elwin et al., 2007).

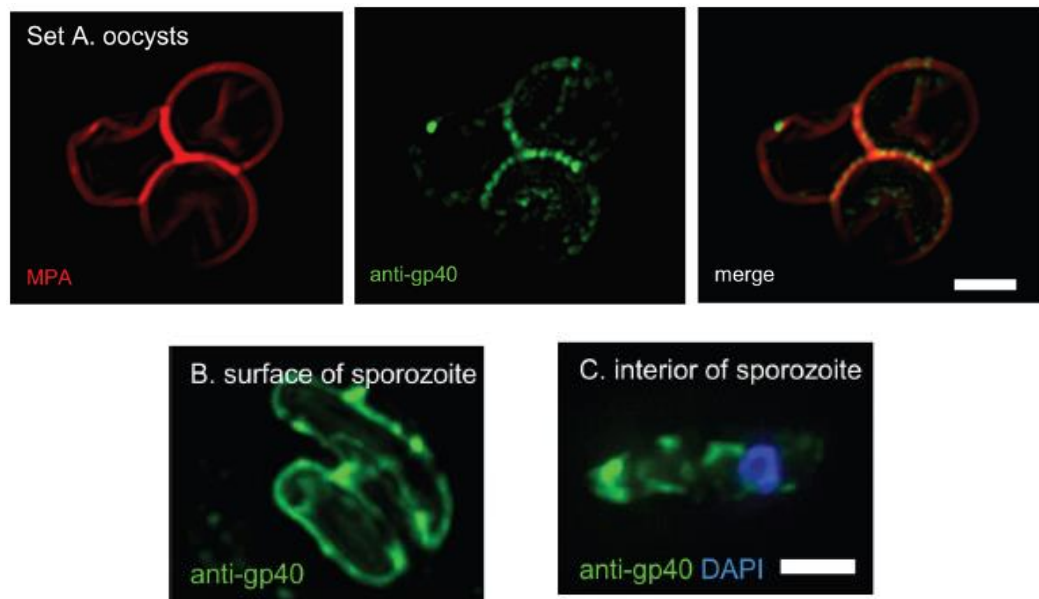


Figura 4. Localización de gp40 en *Cryptosporidium*. (A B y C) Anticuerpos anti gp40 (verde) unido a la superficie interna de la pared del ooquiste (A), superficie de esporozoítos (B), y vesículas dentro del esporozoíto (C). La pared del ooquiste de *C. parvum* es teñida con MPA MPA (A), mientras que el núcleo es teñido con DAPI de color azul (C. B y C muestran la misma magnificación. Barras, 2 μm (A), 1 μm (C) (Chatterjee et al., 2010).

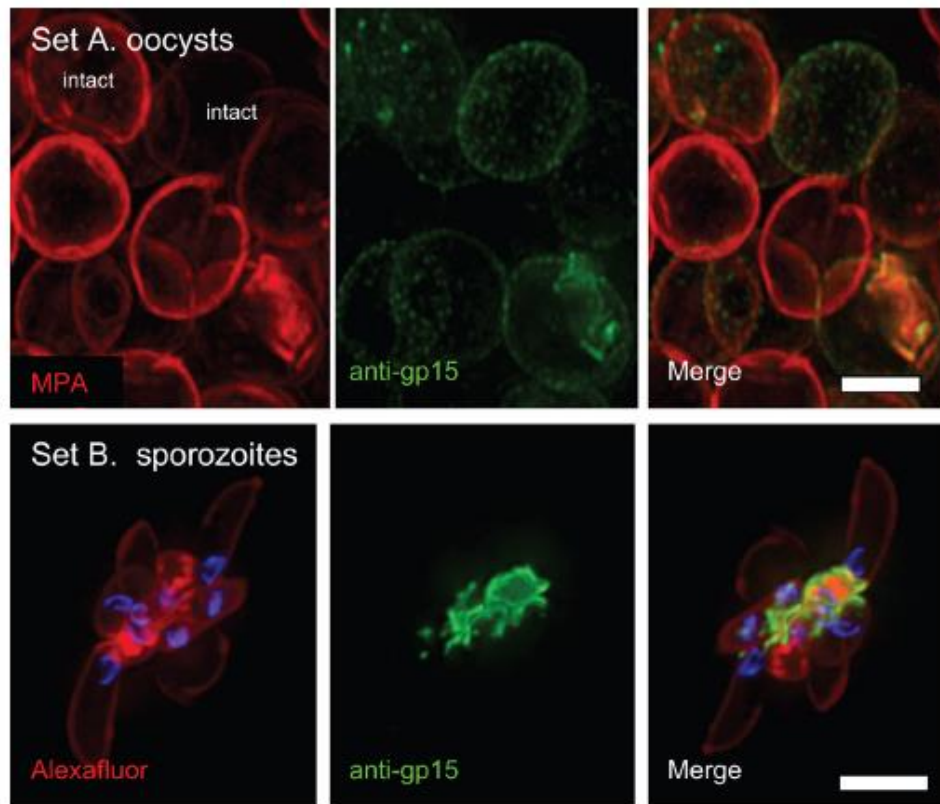


Figura 5. Localización de la proteína gp15 en *Cryptosporidium*. (A) Se observa en el exterior del ooquistes, donde la pared se tiñe con WGA (wheat germ agglutinin) de color rojo. (B) Anticuerpos contra gp15 (verde) se aglutinan en esporozoítos de *C. parvum*, la superficie del zoíto está en color rojo con la tinción de Alexa Fluor. Barras, 2.5 μm (Set A), 1 μm (B), and 250 nm (C) (Chatterjee et al., 2010).

Pacientes con criptosporidiosis sintomática infectados con *C. hominis* presentaron una respuesta cruzada mediada por IgG hacia ambos antígenos recombinantes, lo que suponen la presencia de epítopes comunes en ambas especies; sin embargo, en este mismo estudio, observaron que el título de anticuerpos fue significativamente mayor cuando la respuesta se evaluó utilizando el antígeno recombinante de gp40 de *C. hominis* con sueros de pacientes infectados con esta misma especie (Ajjampur et al., 2011).

Avances en vacuna contra la criptosporidiosis

A pesar de los esfuerzos en la evaluación de más de 1000 agentes terapéuticos, no existe un fármaco que pueda eliminar la criptosporidiosis en todo tipo de hospedero, es por esto que el desarrollo de una vacuna para prevenir la enfermedad o reducir la severidad de la infección es una opción relevante (Mead, 2014). Debido a que el parásito se desarrolla en el intestino delgado, una vacuna que estimule la respuesta inmune en mucosas podría ser un excelente candidato, vacunas que estén compuestas de proteínas inmunogénicas son un ejemplo de esto. Algunos candidatos a vacunas pueden ser las proteínas Cp23, gp15, gp40 porque en diferentes estudios se han identificado respuesta a anticuerpos contra estas proteínas; además, se ha asociado con protección parcial (Ajjampur et al., 2011; Allison et al., 2011).

Existen limitaciones para este tipo de vacunas, ya que el sistema inmunitario de la mucosa en el tracto intestinal generalmente existe en un estado de tolerancia activa a los antígenos alimentarios y las bacterias comensales, puede ser más difícil lograr una respuesta inmune fuerte con una proteína dirigida a los patógenos intestinales (Mead, 2014). Es posible que se deban emplear estrategias para superar esto, como el uso de adyuvantes (Toxinas bacterianas, ligandos TLR, inmunoestimulantes no TLR, entre otros) o sistemas de administración (p. Ej., nanopartículas, polímeros mucoadhesivos) que aumentan

la absorción de la vacuna por células presentadoras de antígeno, células M (Riggs, 2002).

Otra forma de vacunación es la inmunización con ADN, la cual se ha usado para inducir respuestas de células B y T específicas de antígeno en varios modelos de infección (Jenkins, Kerr, Fayer, & Wall, 1995). La primera vacuna de ADN que expresa el gen GP60/15 se inyectó en la glándula mamaria de vacas. Los sueros y el calostro que se generaron confirieron una respuesta protectora cuando se evaluaron en ensayos de cultivo celular infectadas con *Cryptosporidium* indujo, principalmente, una respuesta inmune tipo 1 cuando se inyectó por vía intranasal o intramuscular en ratones, e indujo una producción específica y duradera de IgA anti-gp15 en secreciones intestinales e IgG específica en el suero de ratones, que persistió hasta 1 año después de la primera inoculación de ADN (Sagodira, lochmann, Mevelec, Dimier-Poisson, & Bout, 1999).

Una vacuna con péptidos sintéticos estimula la respuesta contra regiones de la proteína que es crítica para la función de patogenicidad del parásito, puede ser efectiva debido a cierta seguridad al usarlas, pocas dificultades de elaboración y menores condiciones de almacenamiento (Avendaño et al., 2018). Las vacunas de péptidos sintéticos generalmente están compuestas de 20 a 30 aminoácidos que contienen el epítipo específico de un antígeno relacionado con un patógeno infeccioso específico; un epítipo estimulador de células T cooperadoras y un epítipo que estimule una respuesta B específica (mediante un epítipo para células B) o citotóxica específica (mediante un epítipo para células T CD8+) (Mead, 2014). Las respuestas inmunitarias humorales y celulares aumentan si se incluyen múltiples epítipos en una vacuna; sin embargo, las vacunas peptídicas que usan epítipos de antígeno tienden a ser inmunógenos pobres y necesitan la ayuda de adyuvantes y/o sistemas de administración para su eficacia. Avendaño y col. estimularon ratones con cinco péptidos de las proteínas gp15 y CSL (antígeno de circumesporozoíto), ellos

encontraron que estos péptidos sintéticos eran capaces de estimular la producción de anticuerpos y en dos péptidos de gp15 se detectaron anticuerpos neutralizantes (Avendaño et al., 2018).

Comprender las interacciones hospedero-parásito y los elementos esenciales de la inmunidad a *Cryptosporidium*; así mismo, el aumento continuo en los datos de la secuencia del genoma, la caracterización de antígenos, la expresión de proteínas durante las diferentes etapas del ciclo de vida puede conducir al desarrollo de inmunoterapias o vacunas efectivas (Mead, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio de casos y controles.

Declaraciones éticas

Este proyecto está registrado en la Secretaría de Salud del Estado de Sonora (No. 196) y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y del Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDICH) (CEI-09-2015), también se obtuvo el consentimiento informado por parte del padre o tutor de cada paciente donde se explicaba claramente los objetivos del estudio. Las características clínicas de los pacientes se obtuvieron del expediente clínico de cada hospital, previa autorización.

Tinción de 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 (H_2SO_4) 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 adicionaron 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 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. En otro tubo de 1.5 mL se colocaron 15 µL de proteinasa K. Se adicionaron 200 µL del sobrenadante del paso anterior y se agregaron 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 adicionaron 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

Para identificar los genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando dos marcadores

moleculares, SSU rRNA y GP60, los cuales amplifican un amplicón de 826-864 pb y 880-900 pb respectivamente. Los iniciadores utilizados para la amplificación son 5´ATAGTCTCCGCTGTATTC3´ y 5´GGAAGGAACGATGTATCT3´, para la amplificación anidada 5´TCCGCTGTATTCTCAGCC3´ y 5´GCAGAGGAACCAGCATC3´. En el apartado de anexos se encuentra la secuencia del gen de la GP60 y se muestran dónde se alinean los iniciadores, además se describe el protocolo pormenorizado.

Electroforesis

Para saber si se amplificaron las muestras, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, CA USA). Se montó el gel en la cámara de electroforesis y se adicionó en cada pozo 5 µL de muestra de DNA obtenido del amplificado de la PCR y 2 µL del buffer de carga. En un pozo se agregaron 5 µL del marcador de pares de bases más 2 µL 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 (Gel Doc XR+ System, Bio-Rad, Ca USA) de UV para documentar el resultado mediante una fotografía.

Secuenciación

Las muestras que tenían la banda del tamaño esperado en el gen de la amplificación de la GP60 se enviaron a secuenciar a la Universidad de Arizona, quienes la realizan por el método de Sanger, usando didesoxiterminadores fluorescentes y un secuenciador automatizado de DNA que funciona a base de capilares, en los cuales se realizan las separaciones electroforéticas. Se colocaron, en un tubo de 1.5 mL, 10 µL del producto de PCR anidado a

secuenciar. Adicionalmente, en 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.

Péptidos

En este estudio se utilizaron cinco péptidos de *C. parvum* (Tabla II). Los péptidos fueron sintetizados por GenScript (Piscataway, NJ, EE. UU.) a una pureza >70% y se ajustaron a una concentración de 1 mg/mL en agua. Se utilizaron las propiedades físicoquímicas de los aminoácidos como hidrofobicidad/hidrofilicidad que usa algoritmos basados en tiempos de retención de péptidos durante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), flexibilidad que utiliza algunos algoritmos que se basan en la movilidad de segmentos de proteínas sobre la base de factores de temperatura conocidos. También se tomó en cuenta la exposición a la superficie, considerando los residuos de aminoácidos accesibles y transmembranales; para la antigenicidad se usaron algoritmos que utilizan las propiedades físicoquímicas de los residuos de aminoácidos y su frecuencia de ocurrencias en epítomos segmentarios conocidos experimentalmente para predecir determinantes antigénicos en las proteínas. Todos los péptidos se usaron a una concentración final de 0.5 μ g/mL para el ELISA.

Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA se llevó a cabo para la identificación de anticuerpos IgG anti-*Cryptosporidium*. Placas de 96 pocillos de fondo plana se utilizaron para recubrirlas con péptidos a una concentración de 0.5 µg en de buffer de carbonatos 0.1 M, pH 9.6. Las placas de 96 pozos se incubaron toda la noche a 4°C. El exceso de péptido se lavó tres veces con 0.05% Tween 20-PBS, pH 7.4. Las uniones no específicas fueron bloqueadas con una solución de 5% de leche en polvo sin grasa por 4 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con una solución de Tween 20 – PBS, se incubaron con el suero de los pacientes diluido 1:100 en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces para quitar el exceso de suero y se incubaron con anticuerpo IgG anti humano peroxidado (diluido 1:1000) por 1 h a temperatura ambiente. Después se lavó e incubó con una solución de TMB como sustrato por 5 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La reacción se detuvo con H₂SO₄ y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 450 nm.

Análisis de Datos

Los datos se analizaron por medio del software GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software Inc, San Diego, California). Las diferencias entre el grupo de pacientes y el grupo control, además de los niveles de IgG e IgM séricas en casos y controles fueron comparadas usando la prueba estadística *t* de student. La correlación entre los cinco péptidos se calculó usando el coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla II. Péptidos sintéticos de la proteína gp15 y gp40 de *C. parvum*

Nombre	Posición de inicio	Secuencia	Posición final	Tamaño (aminoácidos)
V30	30		47	18
A109	109	Esta información es objeto de protección de las	125	18
A133	133	patentes pendientes No.	151	18
A32	32	MX/a/2019/000000 y No. MX/a/2019/000000	49	18
R61	61		78	18

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación Microscópica y Población de Estudio

En este estudio el grupo de casos estuvo conformado por 41 infantes menores de 10 años (51% del género masculino); el 90% de los casos de criptosporidiosis (37/41) fueron reclutados del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) (Tabla I); el diagnóstico de ingreso más frecuente en ellos fue la gastroenteritis aguda (GEA), desnutrición y deshidratación; sin embargo, se presentaron tres casos cuyo diagnóstico de ingreso era ajeno al trastorno gastrointestinal: otitis aguda, tuberculosis pulmonar, neumonía y bronquiolitis (Tabla III). El 10% de los casos (4/41) fueron reclutados del Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez” (CMDICH); el diagnóstico de ingreso en cada uno de ellos fue diferente, un caso acudió al médico por revisión general, dos por gastroenteritis aguda (GEA) y el último por infección de vías urinarias (IVU) (Tabla III y IV).

El grupo control fue conformado por 90 sujetos, el 47.8% fueron del género femenino (Tabla III). Treinta y cuatro de ellos, fueron reclutados del Servicio de Infectología del HIES, todos ellos menores de 15 años de edad; El 88% de ellos (30/34), con diagnóstico de ingreso de diversas infecciones: de vías respiratorias (16/30), GEA (6/30) (Tabla IV). Treinta y uno de los controles se reclutaron del CMDICH (1-65 años).

Especies y Subtipos de *Cryptosporidium* Identificados

Después de determinar la presencia del parásito usando el método de Kinyoun, los genes SSU rRNA y GP60 fueron amplificados y reamplificados por PCR anidada. La figura 6 muestra una fotografía representativa 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 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, ni los subtipos.

Tabla III. Distribución de casos y controles por hospital de origen

	N	Sexo	
Casos	41	F	M
CMDICH	9.8% (4/41)	25% (1/4)	75% (3/4)
HIES	90.2% (37/41)	45.9 (17/37)	54.1% (20/37)
Controles	90	F	M
CMDICH	34.4% (31/90)	48.4% (15/31)	51.6% (16/31)
HIES	37.8% (34/90)	41.2 % (14/34)	58.8% (20/34)
Voluntarios	27.8% (25/90)	56.0% (14/25)	44.0% (11/25)

N: número de muestra; F: femenino; M: masculino; HIES: Hospital Infantil del Estado de Sonora; CMDICH: Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez”

Análisis de Secuencias

El análisis de las secuencias de aminoácidos del gen SSU rRNA, nos permitió identificar a tres genotipos de *Cryptosporidium*, *C. parvum* en el 58.5%, a *C. hominis* en el 41.5% de los casos y a *C. canis* en el 4.9%. Dentro del análisis de las secuencias de nucleótidos la comparación de éstas con otras reportadas en el mundo nos permite confirmar que se trata del gen de interés.

Con el análisis de la secuencia del gen GP60 se logró identificar los subtipos de *Cryptosporidium* circulantes en el Estado de Sonora, lo cuales, dentro de *C. hominis* se identificó el subtipo: IaA15R3 (3/14), IbA12G3 (3/14), IaA11G3T3 (5/14), IaA14R3 (2/14) y IaA14R11 (1/14). En *C. parvum* se identificó IIaA15G2R1 (19/20) y un solo subtipo IIcA5G3 (1/20) (Tabla IV) En el 7.3% de los casos (3/41), se logró determinar mediante qPCR la coinfección de *C. parvum* y *C. hominis* y en el 2.4% de los casos (1/41) se identificó una coinfección de *C. canis* y *C. hominis*.

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 (Zintl et al., 2011).

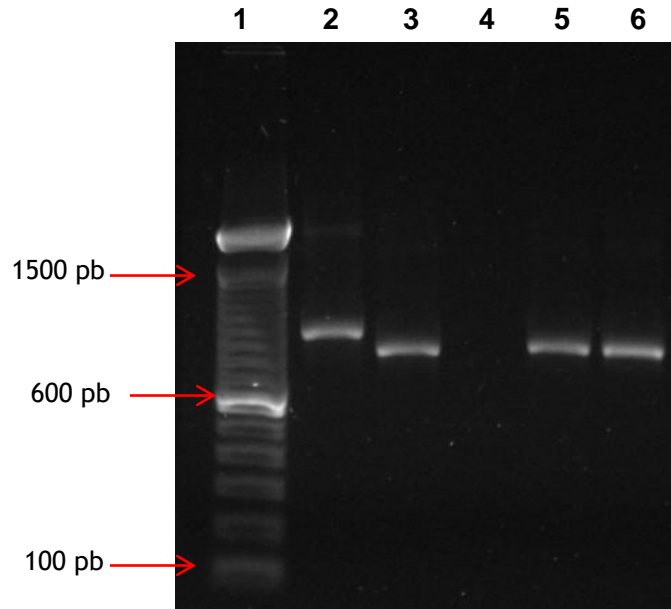


Figura 6. Amplificación anidada del gen de la GP60 de *Cryptosporidium*. Carril 1: marcador de 100-pb; carril 2: *C. hominis*; carril 3: *C. parvum*; carril 4: control negativo; carril 5: muestra S8; carril 6: muestra S9.

Tabla IV. Especies y subtipos de *Cryptosporidium* identificados en Sonora, México.

Especies/Genotipos (n)	Subtipo (n)	Edad	Género	Síntomas clínicos	Numero de GenBank
<i>C. hominis</i> (14)	IaA14R3 (2)	5M	Femenino	SM, FT, F, P, C	
		1A	Masculino	SM, D, DH, F	KY990911 KY990907
	IaA14R11 (1)	1A	Femenino	LM, D, DH, V, FT	KY990908
		IaA15R3 (3)	1A	Femenino	LM, D, FT, AP, V, F, E
	1A		Masculino	D, DH	KY990897
	1A		Masculino	B	-
	IbA12G3 (3)	9M	Femenino	D, AP, V, F	KY990906
		2A	Femenino	NS	KY990900
		4A	Femenino	AP, AOM, HD	KY990899
	IeA11G3T3 (5)	7M	Femenino	LM, D, DH, P	KJ460365
			Masculino	PTB, AP	KJ460371
		1A	Masculino	FT, AP	KY990909
			Femenino	SM, D, V, HPT, H	KY990895
			Masculino	D	KY990898
<i>C. parvum</i> (20)	IIaA15G2R1 (19)	1A	Masculino	D	-
		1A	Masculino	B	-
		1A	Femenino	D, AP, F, HD	KY990914
		1A	Femenino	D, FT, V, F	KY990915
		2A	Femenino	D, FT, AP, V, F	KY990913
		2A	Masculino	D, V, F, AOM	KY990896
		2A	Masculino	AP, FT	KY990917
		2A	Masculino	D, F, IDA	KY990919
		3A	Femenino	D, AP	KY990889
		3A	Femenino	D, FT, AP, V, HD	KY990902
		3A	Masculino	D, FT, AP, V	KY990912
		3A	Masculino	D, AP, DH, V	KY990893
		4A	Femenino	AP, FT	-
		4A	Masculino	D	KY990891
4A	Femenino	D, V	KY990888		
6A	Masculino	D, HD, F, V, FT	-		
6A	Masculino	SM, D, HIV, P, PTB, CO	KY990892		
8A	Femenino	FT, AP, V, F, UTI, HD	KY990916		

		9A	Masculino	HIV, SM, D, CO	KJ460372
	IlcA5G3a (1)	1A	Femenino	SM, D, V, F	KY990890
C. canis (1)		2A	Masculino	D	KT749817
C. canis/C. hominis (1)		1A	Masculino	D, AP, F, V, HD, FT	-
C. parvum/C. hominis (3)		5M	Femenino	LM, D, DH	KY990894
		7A	Masculino	D, FT, AP, V	KY990910
		7A	Femenino	NS	KY990901
ND (2)	ND	1A	Masculino	AS	-
	ND	3A	Masculino	D, AP, F, FT	

A, años; M, meses; SM, Malnutrición severa; MM, Malnutrición moderada; LM, malnutrición leve; D, diarrea; DH, Deshidratación; V, Vomito.; F, Fiebre; AP, Dolor abdominal; IDA, Anemia por deficiencia de hierro; H, Hipotiroidismo; P, Neumonía; CO, candidiasis oral; AOM, Otitis aguda media; S, sinusitis; AR, Rinitis alérgica; PTB, Tuberculosis pulmonar; C, Conjuntivitis; UTI, Infección en tracto urinario; E, Epilepsia; HIV, HIV-positivo; HPT, Hepatitis; HD, Dolor de cabeza; FT, Flatulencia; B, Bronquitis; NS, Sin síntomas; ND, No determinado.

De los 41 casos positivos en el presente estudio, en catorce se encontró a *C. hominis*, en veinte de los infantes se identificó a *C. parvum*, en solo uno a *C. canis* y cuatro coinfecciones, 3 pacientes con *C. hominis* y *C. parvum* y otro paciente infectado con *C. hominis* y *C. canis*. Si bien en otros estudios se han encontrado resultados que indican que *C. hominis* es predominante en humanos (Peng et al., 2003), en esta investigación se observaron las dos especies de *Cryptosporidium* más comunes, esto debido, quizá a que el Estado de Sonora es uno de los 10 estados de mayor producción ganadera 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 nos permite inferir que existe una transmisión zoonótica, además que *C. canis* es predominante en perros. Aun nado a esto, en el grupo de trabajo, se nos solicitó el diagnóstico de criptosporidiosis en becerros lactantes provenientes de una granja lechera en la región. Encontramos que estaban infectadas con *C. parvum*; después de la secuenciación, identificamos que el subtipo infectante de las becerras era el IlaA15G2R1, mismo identificado en 19 niños de este estudio.

Dentro de *C. parvum* se identificaron dos subtipos de familia: Ila y Ilc. El subtipo de familia Ila es comúnmente encontrado en terneras (Xiao, 2010). En todos los niños infectados con el subtipo de familia Ila (7/8) tenían el subtipo IlaA15G2R1, 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 (Xiao, 2010). Este subtipo es uno de los más predominantes, resultado de una transmisión zoonótica (Sulaiman et al., 2005; Valenzuela et al., 2014; Zintl et al., 2011). Otro subtipo de familia encontrado fue Ilc (antes llamado Ic) se ha identificado solo en humanos, a diferencia de otros subtipos que se han observado en humanos y ganado vacuno. Dentro del subtipo de familia Ilc se

encontró al único subtipo IlcA5G3 reportado previamente en personas con HIV de la India (Sharma, Sharma, Sehgal, Malla, & Khurana, 2013; Stensvold, Beser, Axén, & Lebbad, 2014).

En los pacientes infectados con *C. hominis* se encontraron tres subtipos diferentes: Ia, Ib, y Ie. El subtipo Ie fue el más prevalente en nuestro estudio, identificamos al subtipo IeA11G3R3 (n=5), que ha sido uno de los subtipos de *C. hominis* más reportados en países en desarrollo (Xiao, 2010). En un estudio en Perú, se reportó este subtipo en 13 pacientes VIH positivos (13/141); en 3 de estos casos tenían diarrea (Cama et al., 2007). El subtipo Ib es el principal responsable de la transmisión por agua y comida en muchos países (Alyousefi, Mahdy, Lim, Xiao, & Mahmud, 2013; Li et al., 2013). Cama y col., describieron a este subtipo como el más virulento que otros subtipos; esto debido a que fue asociado a náuseas, vómito y malestar general (Cama et al., 2008). Los subtipos IbA12G3 y IaA15R3, se identificaron en tres pacientes, respectivamente. Nuestro trabajo es el primer informe del subtipo IlcA5G3a y IdA23 en México y la primera descripción del subtipo IaA14R11.

Existen estudios que han asociado las manifestaciones clínicas con los genotipos y subtipos infectantes; Cama y col. encontraron asociación en las manifestaciones clínicas de los casos de criptosporidiosis y los genotipos infectantes; se asoció a *C. hominis* en aquellos pacientes con síntomas como náuseas, vómito y malestar general, aunado a la diarrea. En cambio, especies como *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis*, y *C. meleagridis* se asociaron a los casos de pacientes que presentaban solo diarrea (Cama et al., 2008). Para el grupo de pacientes incluidos en este estudio, encontramos una asociación estadísticamente significativa ($X^2=5.22$, $p=0.02$) entre la desnutrición y el genotipo infectante, identificándose mayormente en casos infectados con *C. hominis*. En los casos con GEA identificamos una asociación estadísticamente significativa ($X^2=6.45$, $p=0.01$) entre la desnutrición y la especie/genotipo infectante; así mismo, entre la deshidratación y la especie/genotipo infectante

($X^2=6.18$, $p=0.01$). La desnutrición y deshidratación se presentaron con mayor frecuencia en los casos de *C. hominis* con GEA.

Cryptosporidium canis, es 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 (Jian et al., 2014). En este estudio, se identificó a *C. canis* en dos niños de 2 años de edad, ellos fueron atendidos en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. Presentaron diarrea, dolor abdominal y fiebre, y uno de ellos presentó desnutrición de grado II. En ambos casos, se mantenía contacto con perros en el hogar y lugares visitados con frecuencia; desafortunadamente, no se obtuvieron muestras de esos animales, pero se ha demostrado la transmisión antroponótica de *C. canis*, especialmente en pacientes con SIDA (Cama et al., 2007).

Todos los casos de criptosporidiosis presentados en este estudio corresponden a niños menores de 10 años de edad; esto puede deberse a la alta incidencia de criptosporidiosis en niños, probablemente, por falta de hábitos de higiene, a la inmadurez de la mucosa intestinal o de factores externos comunes en países en vías de desarrollo, mala potabilización del agua, falta de drenaje y pavimentación. (Bouzid y col., 2008).

Respuesta inmune humoral

De los cinco péptidos probados, A133 y A32, fueron los que mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p<0.004$) en cuanto al reconocimiento de IgG sérica entre casos y controles; siendo reconocidos mayormente por los casos (Figura 7). Sin embargo, no fue posible discriminar el genotipo infectante (*C. parvum*, *C. hominis* y *C. canis*), con base al reconocimiento sérico (IgG) hacia los péptidos probados; ya que no existió diferencia estadísticamente significativa ($p>0.4$) al agrupar los casos por especie infectante (Figura 8). En estudios previos, en los cuales evaluaron el reconocimiento (IgG sérica) hacia proteínas

recombinantes de la gp15 (rgp15) de *C. hominis* (Allison et al., 2011) y la rgp40 de *C. parvum* (Ajjampur et al., 2011) encontraron al igual que nuestros resultados, diferencias estadísticamente significativas en el reconocimiento de los antígenos probados entre casos y controles, así como una reactividad cruzada entre epítopes (péptidos) de estos antígenos (rgp15Ch, rgp40Cp). A pesar de que el diseño de los péptidos probados, A109, A133, A32 y R61 se generaron a partir de la secuencia de la gp15 *C. parvum*; después de realizar alineamientos con otras secuencias reportadas, los péptidos A109, A32 y R61 se encuentra en la gp15 de *C. hominis*, por lo que estos péptidos se presentan en la gp15 para ambas especies (epítopes conservados); razón por la cual no encontramos diferencias estadísticamente significativas por especie genotipo infectante; sin embargo, diseñamos dos péptidos (A133 y V30) cuya secuencia se alinea solamente en aislados de *C. parvum*, pero tampoco encontramos diferencias en el reconocimiento por genotipo infectante. Aunque no encontramos diferencias entre los genotipos infectantes no se puede decir que los péptidos no pueden discriminar entre especie infectante debido a que nuestros pacientes no cursaban una infección primaria y pudieron haber tenido diferentes encuentros a lo largo de vida de los casos. Esto puede explicarse debido a que nuestros casos tenían mayor reconocimiento con IgG, reflejo, de células B de memoria; además que la falta de diagnóstico certero en nuestro país, permite que la enfermedad llegue a ser crónica.

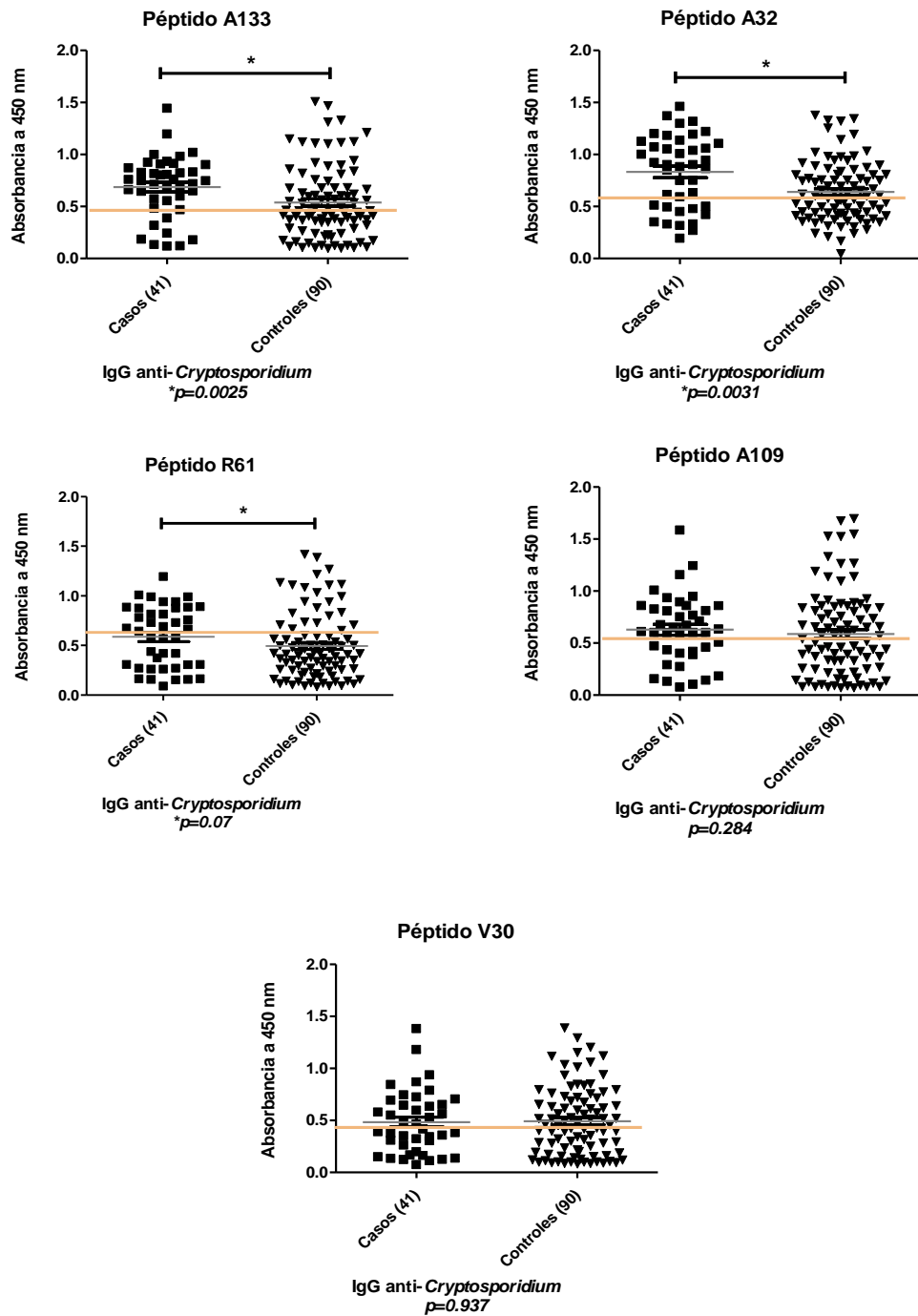


Figura 7. Comparación de las absorbancias obtenidas entre casos y controles con cuatro péptidos de la gp15 (A133, R61, A109 y A32) y uno de la gp40 (V30) de las proteínas gp15 y gp40 de *C. parvum*.

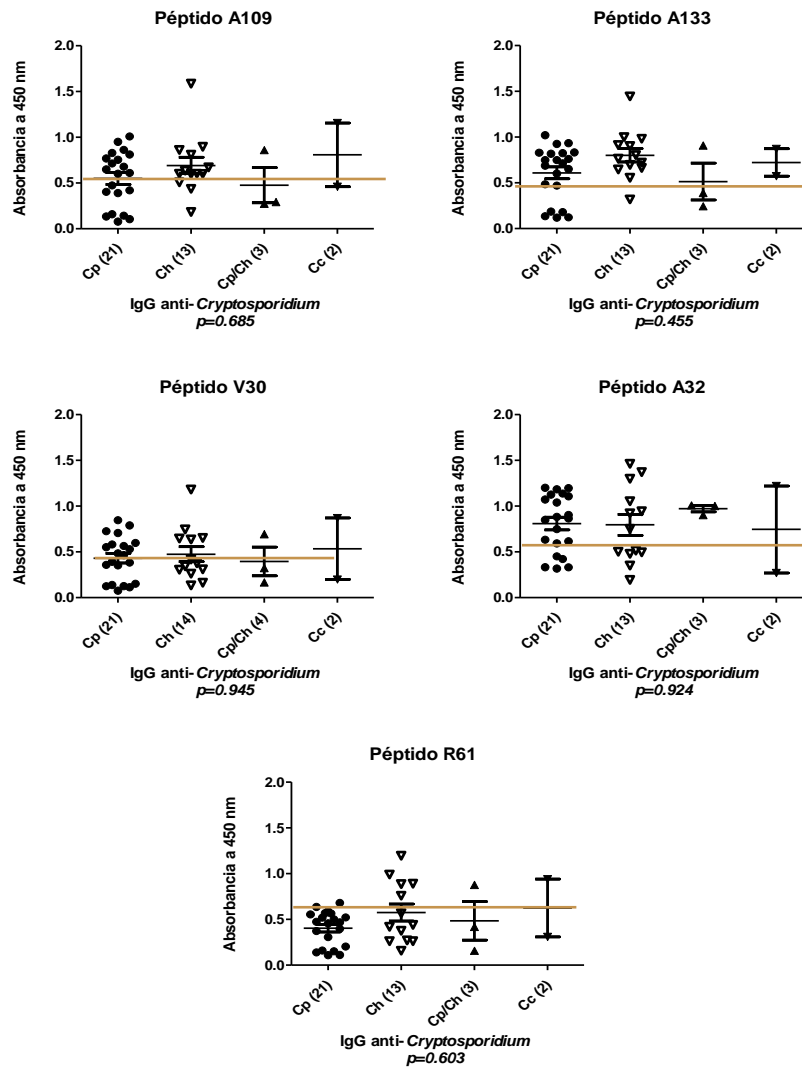


Figura 8. Reconocimiento de los péptidos (A133, R61, V30, A109 y A32) entre las especies infectantes de *Cryptosporidium*. La línea café, muestra la línea de corte (promedio más dos desviaciones estándar) para cada péptido, obtenido del promedio de las absorbancias de los controles. Cp, *C. parvum*; Ch, *C. hominis*; Cc, *C. canis*.

Sabiendo que los péptidos A133 y A32 pudieron discriminar entre casos y controles; decidimos buscar si existían diferencias estadísticamente significativas entre el reconocimiento de IgM e IgG de los casos y controles con estos péptidos (Figura 9 y 10), partiendo del hecho que los individuos con infección aguda tienen mayores títulos de IgM y estos van disminuyendo con el tiempo, pero los títulos de IgG, se incrementa (infecciones crónicas). Encontramos que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0001$) entre los anticuerpos séricos IgM e IgG de los casos y también de los controles observándose mayor reconocimiento con IgG para ambos. Interesantemente, en los controles por arriba de la línea de corte, observamos diferencias estadísticamente significativas entre IgM e IgG, dejando evidencia que estos individuos tenían células B de memoria generadas por encuentros previos.

En estudios previos, se ha demostrado que se requieren múltiples encuentros con el parásito para generar títulos considerables de IgG (DuPont et al., 1995). En este estudio pudimos observar que algunos controles tenían reconocimiento IgG sérica, posiblemente debido a encuentros previos con *Cryptosporidium*, a pesar de que no tenían una infección en el momento de este trabajo.

Existen estudios que exploran la respuesta inmune humoral en pacientes infectados y no infectados utilizando proteínas recombinantes, pero no péptidos sintéticos, este es el primero realizado en México. Avendaño y col. utilizaron cinco péptidos sintéticos de las proteínas gp15 (Cp15) y CSL para evaluar la seroneutralización de éstos en modelos murinos. Ellos encontraron que todos los péptidos diseñados fueron capaces de estimular la producción de anticuerpos, pero solo dos péptidos pudieron neutralizar la entrada del parásito a células de cultivo in vitro (Avendaño et al., 2018).

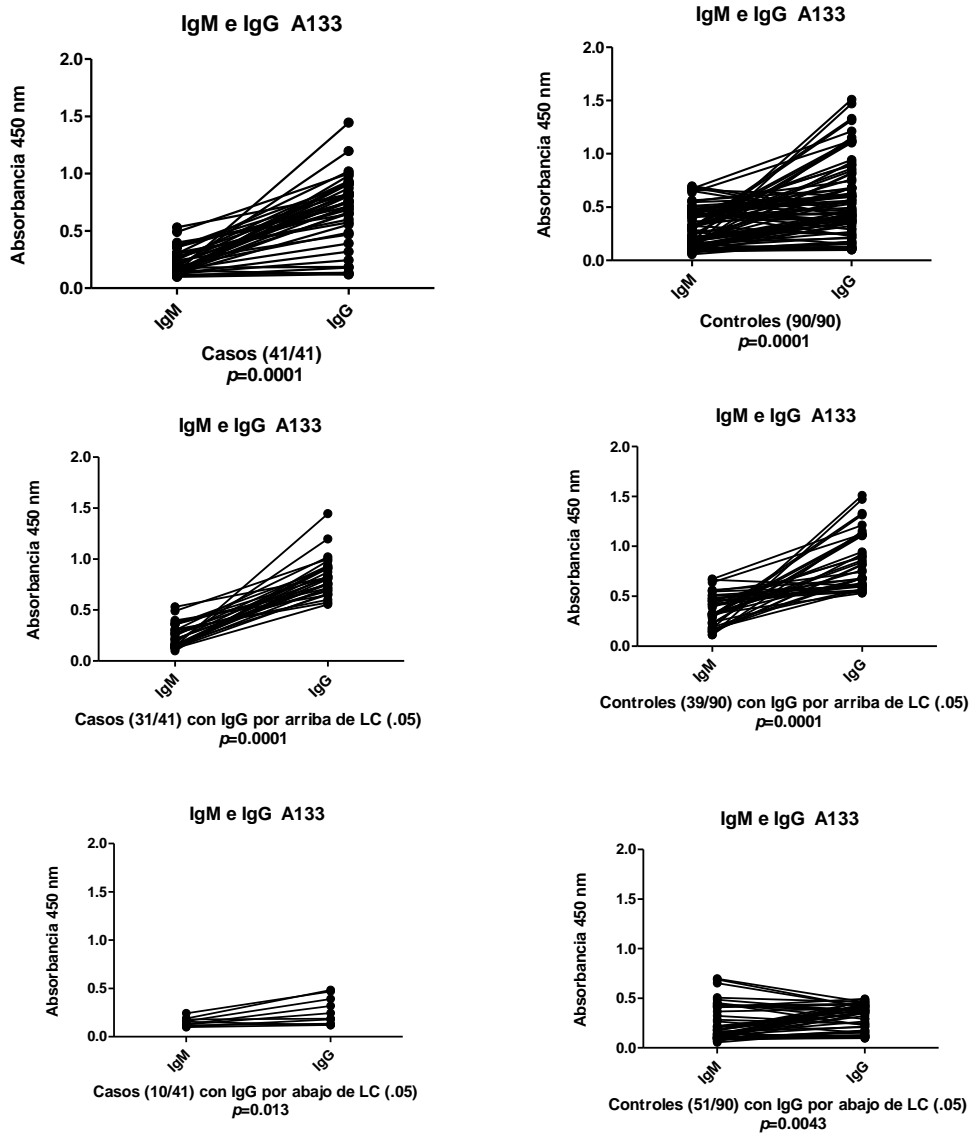


Figura 9. IgM e IgG anti-péptido A133 de *Cryptosporidium*

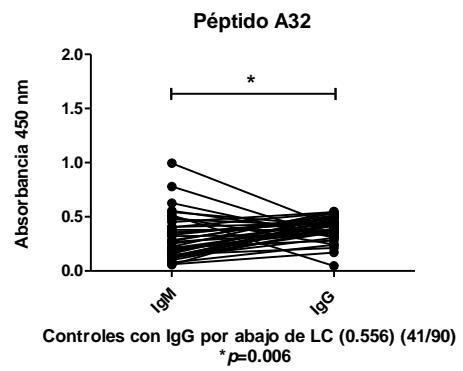
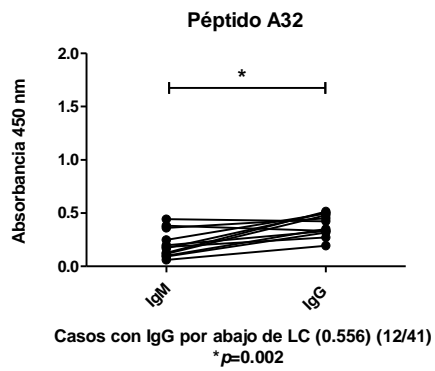
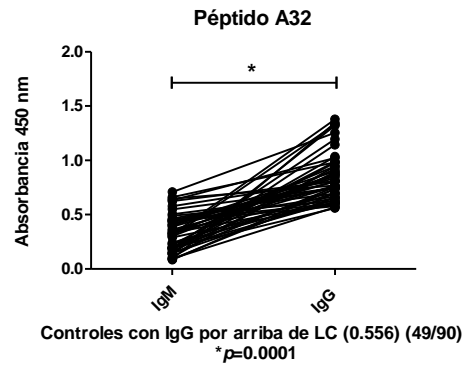
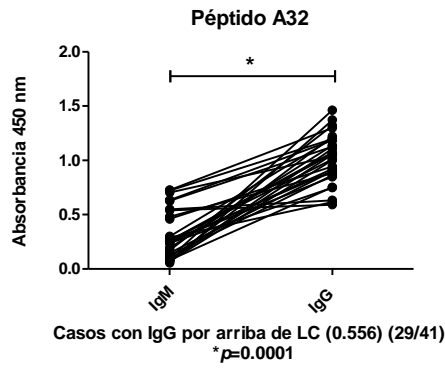
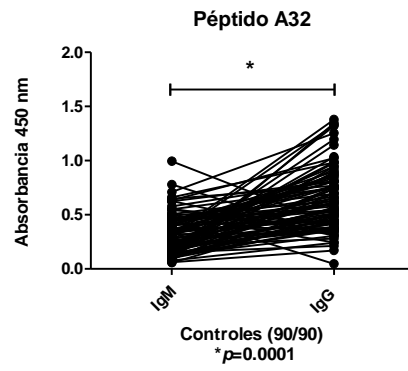
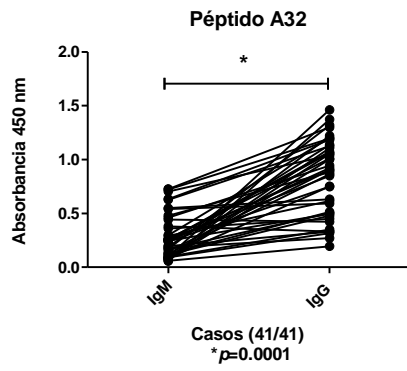


Figura 10. IgM e IgG anti-péptido A32 de *Cryptosporidium*

Seroprevalencia

De los cinco péptidos diseñados en este estudio los péptidos A133 y A32 fueron reconocidos mayormente por el grupo de casos (Tabla V), con una seroprevalencia del 80.4% y 70.7% respectivamente; es decir que 33 y 29 de los 41 casos incluidos en este estudio, tuvieron densidades ópticas mayor a la línea de corte establecida para cada péptido, respectivamente. Por el contrario, los péptidos A109 y R61 fueron los que menos reconocimiento mostraron en el grupo de casos (Tabla V). Las tasas de seroprevalencia de *C. parvum* varían según las condiciones socioeconómicas, la ubicación geográfica y otros factores (Chappell et al., 1999). Leach y cols en el 2000, reportaron la seroprevalencia de *C. parvum* en personas de varios países, considerando en algunos casos niños y en otros adultos. En el caso de los niños sanos se reportó una seroprevalencia de 10.3% (Australia/0-16 años) y del 89.5% (Tailandia/1 mes a 61 meses). En los casos en los cuales se consideró a los adultos sanos, se reportó una seroprevalencia que va de 7.6% (Australia) a 69.9% (Perú) (Leach, Koo, Kuhls, Hilsenbeck, & Jenson, 2000).

Dentro del grupo control, conformado por 90 sujetos, se visualizaron dos grupos de edad: aquellos menores de 15 años y los mayores de 19 años de edad (Tabla V); no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.862/A133$, $p=0.082/A32$) en el reconocimiento de los péptidos A133 y A32 por grupo de edad. Para profundizar más en el análisis de los controles, estos los agrupamos con base a la presencia de síntomas, aquellos con trastornos gastrointestinales (TGI), síntomas diferentes al TGI (otros) y aquellos sin diagnóstico (Sin DX) (Figura 11), con el fin de identificar si alguno de estos grupos pudiera tener diferencias estadísticamente significativas, encontramos que por la variable sintomatología no se encontraron diferencias significativas ($p=0.06$ y $p=0.19$) en el reconocimiento de los péptidos A133 y A32; siendo el grupo sin diagnóstico, los que presentaron un menor reconocimiento a éste péptido (Tabla

V). Al comparar a los casos con los grupos de sintomatología de los controles con el péptido A133, determinamos que el grupo TGI (con trastorno gastrointestinal) es el que no presenta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.255$) con respecto a los casos, es decir, este péptido no nos permite diferenciar entre personas con trastornos gastrointestinal ocasionada por *Cryptosporidium* y ocasionada por otras patologías; sin embargo, con el péptido A32 identificamos que existen diferencias estadísticamente significativas entre casos y los tres grupos de los casos TGI ($p=0.007$), sin DX (0.014) y otros ($p=0.043$), lo cual significa que el péptido A32 tiene la capacidad de discriminar entre pacientes con criptosporidiosis y aquellos sin criptosporidiosis pero con manifestaciones clínicas asociadas a gastroenteritis, dejando en evidencia que este péptido puede ser utilizado para futuras investigaciones.

Tabla V. Seroprevalencia de casos con criptosporidiosis en casos y controles.

% Prevalencia (no. positivos/no. probados).

Población	A109/CpCh % Prevalencia	A133/Cp % Prevalencia	V30/Cp % Prevalencia	A32/CpCh % Prevalencia	R61/CpCh % Prevalencia
Controles (n=90)	48.9 (44/90)	50.0 (45/90)	62.2 (56/90)	52.2 (47/90)	41.1 (37/90)
1mes – 15 años (n=43)	18.9 (17/90)	22.2 (20/90)	31.1 (28/90)	28.9 (26/90)	21.1 (19/90)
19 años-65 años (n=35)	27.8 (25/90)	24.4 (22/90)	22.2 (20/90)	20.0 (18/90)	17.8 (16/90)
TGI (n=30)	27.8 (25/90)	18.9 (17/90)	27.8 (25/90)	15.5 (14/90)	17.8 (16/90)
Otras (n=52)	27.8 (25/90)	20.0 (18/90)	40.0 (36/90)	33.3 (30/90)	24.4 (22/90)
Sin DX (n=8)	3.3 (3/90)	3.3 (3/90)	5.5 (5/90)	4.4 (4/90)	3.3 (3/90)
Casos (n=41)	63.4 (26/41)	80.4 (33/41)	65.9 (27/41)	70.7 (29/41)	58.5 (24/41)
<i>C. parvum</i> (n=21)	29.3 (12/41)	39.0 (16/41)	36.6 (15/41)	39.0 (16/41)	34.1 (14/41)
<i>C. hominis</i> (n=13)	24.4 (10/41)	29.2 (12/41)	19.5 (8/41)	17.0 (7/41)	14.6 (6/41)
<i>C. canis</i> (n=1)	0.0 (0/41)	2.4 (1/41)	0.0 (0/41)	0.0 (0/41)	2.4 (1/41)
<i>C. parvum/C. hominis</i> (n=3)	2.4 (1/41)	2.4 (1/41)	2.4 (1/41)	7.3 (3/41)	2.4 (1/41)
<i>C. canis/C. hominis</i> (n=1)	2.4 (1/41)	2.4 (1/41)	2.4 (1/41)	2.4 (1/41)	2.4 (1/41)

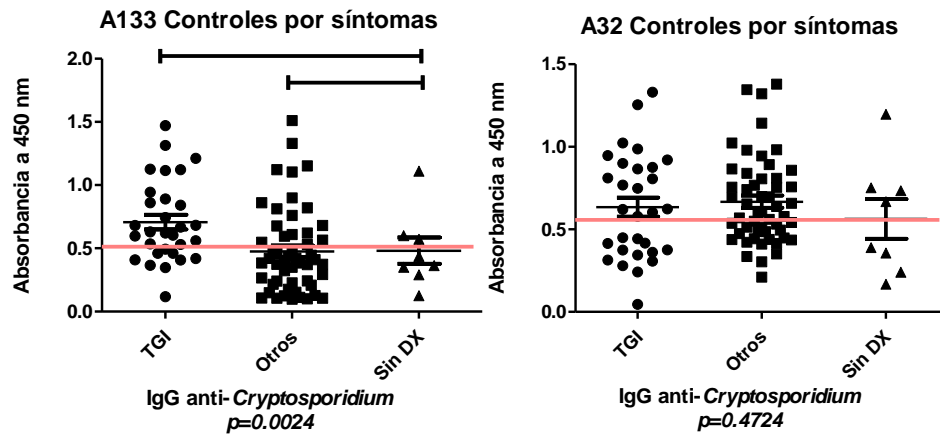


Figura 11. Controles agrupados en sintomatología, trastornos gastrointestinales, otras sintomatologías y sin diagnóstico.

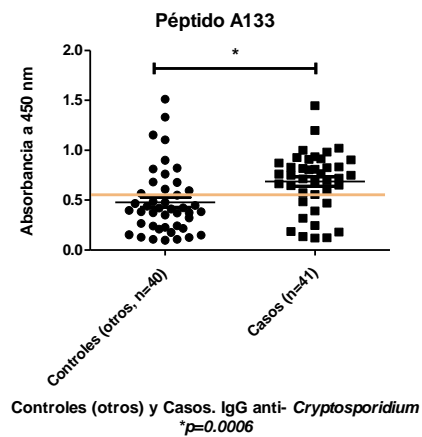
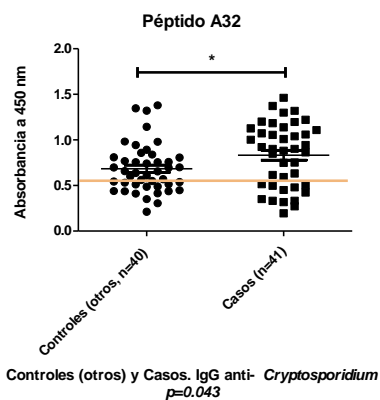
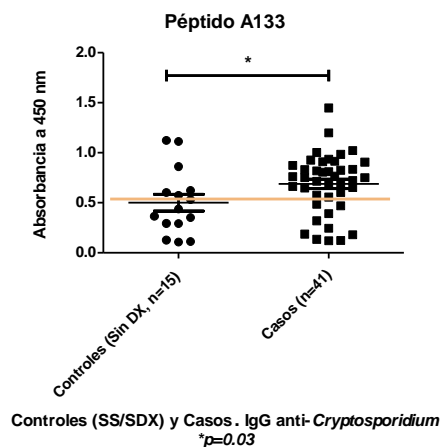
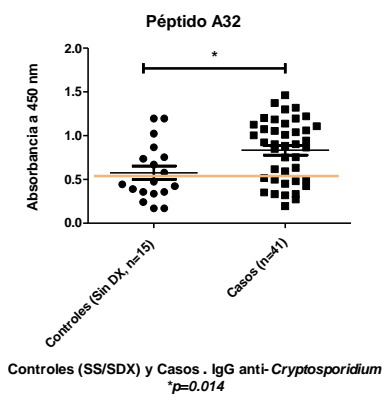
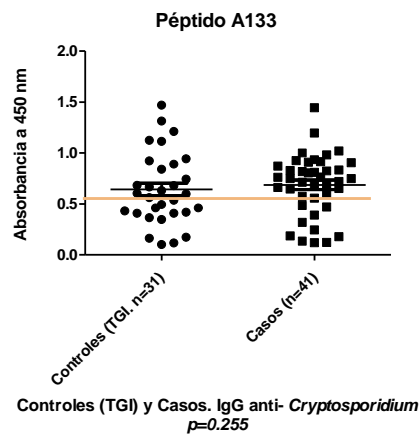
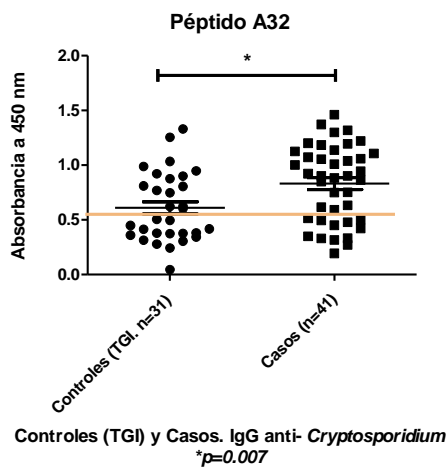


Figura 12. Controles agrupados por síntomas comparados con los casos. Péptido A133 y A32.

CONCLUSIONES

Se caracterizó molecularmente los genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* identificados en 41 pacientes.

Se diseñaron dos péptidos sintéticos que nos permitieron diferenciar estadísticamente significativa el reconocimiento sérico (IgG) entre casos y controles.

Con base a las manifestaciones clínicas, que repercute en el desarrollo de los infantes como lo es la malnutrición y deshidratación identificamos mayormente a *C. hominis* como la especie/genotipo infectante.

Independientemente de la especie infectante se debe tratar y dar seguimiento a los pacientes hasta eliminar definitivamente la infección.

BIBLIOGRAFÍA

- Abal-Fabeiro, J. L., Maside, X., Bello, X., Llovo, J., & Bartolomé, C. (2013). Multilocus patterns of genetic variation across *Cryptosporidium* species suggest balancing selection at the gp60 locus. *Mol Ecol*, *22*(18), 4723-4732. doi:10.1111/mec.12425
- 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. *Parasitology Research*, *99*(3), 303-305. doi:10.1007/s00436-006-0140-0
- 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. *Infection Genetics and Evolution*, *12*(8), 1984-1993. doi:10.1016/j.meegid.2012.08.004
- Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., . . . Kapur, V. (2004). Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, *304*(5669), 441-445. doi:10.1126/science.1094786
- Ajjampur, S. S., Sarkar, R., Allison, G., Banda, K., Kane, A., Muliyl, J., . . . 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. doi:10.1128/CVI.00464-10
- Albuquerque, Y. M., Silva, M. C., Lima, A. L., & Magalhães, V. (2012). Pulmonary cryptosporidiosis in AIDS patients, an underdiagnosed disease. *J Bras Pneumol*, *38*(4), 530-532. doi:10.1590/s1806-37132012000400017
- Aldeyarbi, H. M., & Karanis, P. (2016). The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*, *143*(6), 749-761. doi:10.1017/S0031182016000275
- Allison, G. M., Rogers, K. A., Borad, A., Ahmed, S., Karim, M. M., Kane, A. V., . . . Ward, H. D. (2011). Antibody responses to the immunodominant *Cryptosporidium* gp15 antigen and gp15 polymorphisms in a case-control study of cryptosporidiosis in children in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*, *85*(1), 97-104. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0043
- Alyousefi, N. A., Mahdy, M. A., Lim, Y. A., Xiao, L., & Mahmud, R. (2013). First molecular characterization of *Cryptosporidium* in Yemen. *Parasitology*, *140*(6), 729-734. doi:10.1017/S0031182012001953
- Amadi, B., Mwiya, M., Musuku, J., Watuka, A., Sianongo, S., Ayoub, A., & Kelly, P. (2002). Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet*, *360*(9343), 1375-1380. doi:10.1016/S0140-6736(02)11401-2
- 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. doi:10.1007/s00436-010-1967-y
- Auray, G., Lacroix-Lamandé, S., Mancassola, R., Dimier-Poisson, I., & Laurent, F. (2007). Involvement of intestinal epithelial cells in dendritic cell recruitment during *C. parvum* infection. *Microbes Infect*, *9*(5), 574-582. doi:10.1016/j.micinf.2007.01.026

- Avendaño, C., Jenkins, M., Méndez-Callejas, G., Oviedo, J., Guzmán, F., Patarroyo, M. A., . . . Quílez, J. (2018). Cryptosporidium spp. CP15 and CSL protein-derived synthetic peptides' immunogenicity and in vitro seroneutralisation capability. *Vaccine*, *36*(45), 6703-6710. doi:10.1016/j.vaccine.2018.09.044
- Bailey, J. M., & Erramouspe, J. (2004). Nitazoxanide treatment for giardiasis and cryptosporidiosis in children. *Annals of Pharmacotherapy*, *38*(4), 634-640. doi:10.1345/aph.1D451
- Bartelt, L. A., Sevilleja, J. E., Barrett, L. J., Warren, C. A., Guerrant, R. L., Bessong, P. O., . . . Samie, A. (2013). High anti-Cryptosporidium parvum IgG seroprevalence in HIV-infected adults in Limpopo, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*, *89*(3), 531-534. doi:10.4269/ajtmh.12-0550
- Bedi, B., & Mead, J. R. (2012). Cryptosporidium parvum antigens induce mouse and human dendritic cells to generate Th1-enhancing cytokines. *Parasite Immunol*, *34*(10), 473-485. doi:10.1111/j.1365-3024.2012.01382.x
- Borad, A., & Ward, H. (2010). Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol*, *5*(3), 507-519. doi:10.2217/fmb.09.128
- Borad, A. J., Allison, G. M., Wang, D., Ahmed, S., Karim, M. M., Kane, A. V., . . . Ward, H. D. (2012). Systemic antibody responses to the immunodominant p23 antigen and p23 polymorphisms in children with cryptosporidiosis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*, *86*(2), 214-222. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0273
- Cama, V. A., Bern, C., Roberts, J., Cabrera, L., Sterling, C. R., Ortega, Y., . . . Xiao, L. (2008). Cryptosporidium species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis*, *14*(10), 1567-1574. doi:10.3201/eid1410.071273
- Cama, V. A., Ross, J. M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., . . . Xiao, L. (2007). Differences in clinical manifestations among Cryptosporidium species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis*, *196*(5), 684-691. doi:10.1086/519842
- Cevallos, A. M., Zhang, X., Waldor, M. K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., . . . 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., Campbell, B. M., Crouch, N., Charlett, A., & Davies, A. P. (2011). Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven Cryptosporidium assays used in the UK. *J Med Microbiol*, *60*(Pt 11), 1598-1604. doi:10.1099/jmm.0.034181-0
- Chalmers, R. M., & Davies, A. P. (2010). Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol*, *124*(1), 138-146. doi:10.1016/j.exppara.2009.02.003
- Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Sterling, C. R., Wang, C., Jakubowski, W., & Dupont, H. L. (1999). Infectivity of Cryptosporidium parvum in healthy adults with pre-existing anti-C. parvum serum immunoglobulin G. *Am J Trop Med Hyg*, *60*(1), 157-164. doi:10.4269/ajtmh.1999.60.157
- Chatterjee, A., Banerjee, S., Steffen, M., O'Connor, R. M., Ward, H. D., Robbins, P. W., & Samuelson, J. (2010). Evidence for mucin-like glycoproteins that tether sporozoites of Cryptosporidium parvum to the inner surface of the oocyst wall. *Eukaryot Cell*, *9*(1), 84-96. doi:10.1128/EC.00288-09
- Checkley, W., White, A. C., Jaganath, D., Arrowood, M. J., Chalmers, R. M., Chen, X. M., . . . Houpt, E. R. (2015). A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and

- vaccine targets for cryptosporidium. *Lancet Infect Dis*, 15(1), 85-94. doi:10.1016/S1473-3099(14)70772-8
- Chen, X. M., Splinter, P. L., O'Hara, S. P., & LaRusso, N. F. (2007). A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem*, 282(39), 28929-28938. doi:10.1074/jbc.M702633200
- Clemente, C. M., Caramori, C. A., Padula, P., & Rodrigues, M. A. (2000). Gastric cryptosporidiosis as a clue for the diagnosis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Arq Gastroenterol*, 37(3), 180-182.
- Codices, V., Martins, C., Novo, C., Pinho, M., de Sousa, B., Lopes, A., . . . Matos, O. (2013). Cell phenotypic change due to *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent mice. *Acta Parasitol*, 58(1), 70-79. doi:10.2478/s11686-013-0113-2
- Collaborators, G. M. a. C. o. D. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388(10053), 1459-1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1
- Corso, P. S., Kramer, M. H., Blair, K. A., Addiss, D. 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. doi:10.3201/eid0904.020417
- Del Coco, V. F., Córdoba, M. A., Bilbao, G., de Almeida Castro, A. P., Basualdo, J. A., Fayer, R., & Santín, M. (2014). *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Res Vet Sci*, 96(2), 311-314. doi:10.1016/j.rvsc.2013.12.010
- Diaz, P., Hadfield, S. J., Quilez, J., Soilan, M., Lopez, C., Panadero, R., . . . Chalmers, R. M. (2012). Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in north west Spain. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 188-195. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.039
- DuPont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med*, 332(13), 855-859. doi:10.1056/NEJM199503303321304
- Elwin, K., Chalmers, R. M., Hadfield, S. J., Hughes, S., Hesketh, L. M., Rothburn, M. M., . . . Hunter, P. R. (2007). Serological responses to *Cryptosporidium* in human populations living in areas reporting high and low incidences of symptomatic cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Infect*, 13(12), 1179-1185. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01823.x
- Fereig, R. M., Abdelbaky, H. H., Ihara, F., & Nishikawa, Y. (2018). Development and evaluation of the first immunochromatographic test that can detect specific antibodies against *Cryptosporidium parvum*. *Acta Trop*, 185, 349-356. doi:10.1016/j.actatropica.2018.06.019
- Frost, F. J., Tollestrup, K., Craun, G. F., Fairley, C. K., Sinclair, M. I., & Kunde, T. R. (2005). Protective immunity associated with a strong serological response to a *Cryptosporidium*-specific antigen group, in HIV-infected individuals. *J Infect Dis*, 192(4), 618-621. doi:10.1086/431681
- Idris, N. S., Dwipoerwantoro, P. G., Kurniawan, A., & Said, M. (2010). Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *J Infect Dev Ctries*, 4(5), 309-317.

- Jenkins, M., Kerr, D., Fayer, R., & Wall, R. (1995). Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen. *Vaccine*, *13*(17), 1658-1664. doi:10.1016/0264-410x(95)00121-g
- Jian, F., Qi, M., He, X., Wang, R., Zhang, S., Dong, H., & Zhang, L. (2014). Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in dogs in Henan Province, China. *BMC Vet Res*, *10*, 26. doi:10.1186/1746-6148-10-26
- Khan, W. A., Rogers, K. A., Karim, M. M., Ahmed, S., Hibberd, P. L., Calderwood, S. B., . . . Ward, H. D. (2004). Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. *Am J Trop Med Hyg*, *71*(4), 412-419.
- Kirkpatrick, B. D., Huston, C. D., Wagner, D., Noel, F., Rouzier, P., Pape, J. W., . . . Sears, C. L. (2006). Serum mannose-binding lectin deficiency is associated with cryptosporidiosis in young Haitian children. *Clin Infect Dis*, *43*(3), 289-294. doi:10.1086/505396
- Kváč, M., Saková, K., Květoňová, D., Kicia, M., Wesołowska, M., McEvoy, J., & Sak, B. (2014). Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in an immunocompetent man. *J Clin Microbiol*, *52*(1), 347-349. doi:10.1128/JCM.02456-13
- Lantier, L., Lacroix-Lamandé, S., Potiron, L., Metton, C., Drouet, F., Guesdon, W., . . . Laurent, F. (2013). Intestinal CD103+ dendritic cells are key players in the innate immune control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *PLoS Pathog*, *9*(12), e1003801. doi:10.1371/journal.ppat.1003801
- Laurent, F., & Lacroix-Lamandé, S. (2017). Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*, *47*(12), 711-721. doi:10.1016/j.ijpara.2017.08.001
- Leach, C. T., Koo, F. C., Kuhls, T. L., Hilsenbeck, S. G., & Jenson, H. B. (2000). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in children along the Texas-Mexico border and associated risk factors. *Am J Trop Med Hyg*, *62*(5), 656-661. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.656
- Li, N., Xiao, L., Cama, V. A., Ortega, Y., Gilman, R. H., Guo, M., & Feng, Y. (2013). Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerg Infect Dis*, *19*(10), 1573-1582. doi:10.3201/eid1910.121361
- Lucca, P., De Gaspari, E. N., Bozzoli, L. M., Funada, 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 Sao Paulo*, *51*(6), 341-343. doi:10.1590/s0036-46652009000600006
- Ludington, J. G., & Ward, H. D. (2015). Systemic and Mucosal Immune Responses to *Cryptosporidium*-Vaccine Development. *Curr Trop Med Rep*, *2*(3), 171-180.
- Mead, J. R. (2014). Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. *Hum Vaccin Immunother*, *10*(6), 1505-1513. doi:10.4161/hv.28485
- Mi, R., Wang, X., Huang, Y., Zhou, P., Liu, Y., Chen, Y., . . . Chen, Z. (2014). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in goats across four provincial level areas in China. *PLoS One*, *9*(10), e111164. doi:10.1371/journal.pone.0111164
- Moss, D. M., Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., DuPont, H. L., Arrowood, M. J., Hightower, A. W., & Lammie, P. J. (1998). The antibody response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infection in humans. *J Infect Dis*, *178*(3), 827-833. doi:10.1086/515377

- Neira-Otero, P., Muñoz-Saldías, N., Sanchez-Moreno, M., & Rosales-Lombardo, M. J. (2005). Molecular characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in Chile. *Parasitol Res*, *97*(1), 63-67. doi:10.1007/s00436-005-1391-x
- 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*. *Gastroenterology*, *70*(4), 592-598.
- O'Connor, R. M., Wanyiri, 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. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.010
- Pantenburg, B., Castellanos-Gonzalez, A., Dann, S. M., Connelly, R. L., Lewis, D. E., Ward, H. D., & White, A. C. (2010). Human CD8(+) T cells clear *Cryptosporidium parvum* from infected intestinal epithelial cells. *Am J Trop Med Hyg*, *82*(4), 600-607. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0590
- Peng, M. M., Meshnick, S. R., Cunliffe, N. A., Thindwa, B. D., Hart, C. A., Broadhead, R. L., & Xiao, L. (2003). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *J Eukaryot Microbiol*, *50 Suppl*, 557-559.
- Pereira, M. D., Atwill, E. R., Barbosa, A. P., Silva, S. A., & García-Zapata, M. T. (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. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.787
- Perryman, L. E., Jasmer, D. P., Riggs, M. W., Bohnet, S. G., McGuire, T. C., & Arrowood, M. J. (1996). A cloned gene of *Cryptosporidium parvum* encodes neutralization-sensitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol*, *80*(2), 137-147. doi:10.1016/0166-6851(96)02681-3
- Preidis, G. A., Wang, H. C., Lewis, D. E., Castellanos-Gonzalez, A., Rogers, K. A., Graviss, E. A., . . . White, A. C. (2007). Seropositive human subjects produce interferon gamma after stimulation with recombinant *Cryptosporidium hominis* gp15. *Am J Trop Med Hyg*, *77*(3), 583-585.
- Priest, J. W., Bern, C., Xiao, L., Roberts, J. M., Kwon, J. P., Lescano, A. G., . . . Lammie, P. J. (2006). Longitudinal analysis of cryptosporidium species-specific immunoglobulin G antibody responses in Peruvian children. *Clin Vaccine Immunol*, *13*(1), 123-131. doi:10.1128/CVI.13.1.123-131.2006
- Priest, J. W., Kwon, J. P., Moss, D. M., Roberts, J. M., Arrowood, M. J., Dworkin, M. S., . . . Lammie, P. J. (1999). Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J Clin Microbiol*, *37*(5), 1385-1392.
- Rani, H., Gupta, V., Gulati, N., & Chander, J. (2009). Cryptosporidial oocysts in gastric aspirate of an infant. *Indian J Med Microbiol*, *27*(2), 172-174. doi:10.4103/0255-0857.49441
- 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. doi:10.1016/j.ijpara.2015.03.005
- Riggs, M. W. (2002). Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes Infect*, *4*(10), 1067-1080.

- Robinson, G., & Chalmers, R. M. (2012). Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp Parasitol*, *132*(2), 200-215. doi:10.1016/j.exppara.2012.06.016
- Ryan, U., Fayer, R., & Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, *141*(13), 1667-1685. doi:10.1017/S0031182014001085
- Ryan, U., Papparini, A., Monis, P., & Hijjawi, N. (2016). It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Res*, *105*, 305-313. doi:10.1016/j.watres.2016.09.013
- Sagodira, S., lochmann, S., Mevelec, M. N., Dimier-Poisson, I., & Bout, D. (1999). Nasal immunization of mice with *Cryptosporidium parvum* DNA induces systemic and intestinal immune responses. *Parasite Immunol*, *21*(10), 507-516. doi:10.1046/j.1365-3024.1999.00247.x
- Sharma, P., Sharma, A., Sehgal, R., Malla, N., & Khurana, S. (2013). Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *International Journal of Infectious Diseases*, *17*(8), E601-E605. doi:10.1016/j.ijid.2012.12.003
- Shi, K., Jian, F., Lv, C., Ning, C., Zhang, L., Ren, X., . . . 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. doi:10.1128/JCM.00819-10
- Stensvold, C. R., Beser, J., Axén, C., & Lebbad, M. (2014). High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *J Clin Microbiol*, *52*(7), 2311-2319. doi:10.1128/JCM.00598-14
- 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., . . . Xiao, L. (2005). Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol*, *43*(6), 2805-2809. doi:10.1128/JCM.43.6.2805-2809.2005
- Tyzzer, E. E. (1910). An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *J Med Res*, *23*(3), 487-510.483.
- Tzipori, S., & Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect*, *4*(10), 1047-1058.
- Ungar, B. L., Soave, R., Fayer, R., & Nash, T. E. (1986). Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J Infect Dis*, *153*(3), 570-578. doi:10.1093/infdis/153.3.570
- Valenzuela, O., González-Díaz, M., Garibay-Escobar, A., Burgara-Estrella, A., Cano, M., Durazo, M., . . . Xiao, L. (2014). Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. *PLoS One*, *9*(4), e96128. doi:10.1371/journal.pone.0096128
- Waldron, L. S., Dimeski, B., Beggs, P. J., Ferrari, B. C., & Power, M. L. (2011). Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Appl Environ Microbiol*, *77*(21), 7757-7765. doi:10.1128/AEM.00615-11

- Wanyiri, J. W., Kanyi, H., Maina, S., Wang, D. E., Steen, A., Ngugi, P., . . . Ward, H. D. (2014). Cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients in Kenya: clinical features, epidemiology, molecular characterization and antibody responses. *Am J Trop Med Hyg*, *91*(2), 319-328. doi:10.4269/ajtmh.13-0254
- Wehkamp, J., Schaubert, J., & Stange, E. F. (2007). Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol*, *23*(1), 32-38. doi:10.1097/MOG.0b013e32801182c2
- Widmer, G. (2009). Meta-analysis of a polymorphic surface glycoprotein of the parasitic protozoa *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Epidemiol Infect*, *137*(12), 1800-1808. doi:10.1017/S0950268809990215
- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*, *124*(1), 80-89. doi:10.1016/j.exppara.2009.03.018
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., & Upton, S. J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*, *17*(1), 72-97.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L. S., Alves, J. M., Serrano, M. G., . . . Buck, G. A. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, *431*(7012), 1107-1112. doi:10.1038/nature02977
- Zhao, G. H., Fang, Y. Q., Ryan, U., Guo, Y. X., Wu, F., Du, S. Z., . . . Lin, Q. (2016). Dynamics of Th17 associating cytokines in *Cryptosporidium parvum*-infected mice. *Parasitol Res*, *115*(2), 879-887. doi:10.1007/s00436-015-4831-2
- Zintl, A., Ezzaty-Mirashemi, M., Chalmers, R. M., Elwin, K., Mulcahy, G., Lucy, F. E., & de Waal, T. (2011). Longitudinal and spatial distribution of GP60 subtypes in human cryptosporidiosis cases in Ireland. *Epidemiology and Infection*, *139*(12), 1945-1955. doi:10.1017/s0950268810002992

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**)

TCTAGAGTAATAGTTAGAGTAGATATTATTCAGAACAACGTCTAAAGTAAAAATGCATACGTA
ATCAGTTACCCAAAATATTAAAAAAACGAAAAGTCGCAATTTAGTGCTTAGGAGCTTAGAC
CTTTTTTTCCCATTCAGAACAATCCACTGCACTCAGAAATTAATCAATCAAAAAAC
CTTGATTAGAGGGATAGTAATAAATGCATTCGCCTCGTCAAATGCTGGCACGAATTACTC
GGTATTCGGAAAAAAAAAATCACCTTTAGTGCTATTGGAATAGAAAATCTAATTAACCACAT
TTCAAAAAAATAAGAACGATGATAACTTTGGAGTTAATATCTCATTTTCGTAGGCTTGAGT
GCTCAACAACAATTATACATTAGAATAAAAAATAAAGAACATGTAAAAGAACCAATATTTGTG
CATTATACGATTGAGATATAATTTTATGTCTTAAATAAATTAACCTTTTCGCGCAAAAAAATTGA
AAAAAAATTTTGTATTACGTTCTATAAAATAAAAAAGTGGTTTTTCGAATTCAATACAAAGAA
TAGGACTCAATATAAAGTCAACCTTGAAATTAATTAATATAAATTTTAAAGAGTAGACTCGT
ACGTATGAAATGCTTATCGTCTTCACATGCATGCAAAAATACGTGGACTGGGTGTATCCACA
TAAAAAGCAATTAACCACATTTTACCCACACATCTGTAGCGTCGTCAAGTAAAAATTGATAA
CAAATTTTATACATTCGGCTCGACCCTTCTATAGGTGATAATTAGTCAGTCTTTAATAAGTA
GGCAACTAAGGACAAAGGAAGATGAGATTGTGCTCATTATCGTATTACTCTCCGTT**ATAGT**
CTCCGCTGTATTCTCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGAACTTTAAAGGATGTTCTGTT
GAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATC

ATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAAGCTGGAGAAGACGCAGAAGG
CAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGT
GAAGACGATGGCCAACTAGTGCTGCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGCG
CAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGG
TTCGGAGAAGGTACCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCAC
CTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCTGTAACC
TTTAAAAGAGTGATAATACAGTTAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTTCAGCACTCTCTC
TGCTAATTCAAGTAGTCCAAGTAAAATGGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCA
AGAAGATCACTCTCAGAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTTA
CCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAG
AGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGCGGCACT
ACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAAGGACAACACAGTTC
TTTTGAAGGATGCTGGTTCCTCTGC TTTTGGACTC AGATACATCGTTCCTTCC GTTTTTGCA
ATCTTTGCAGCCTTATTCGTGTTGTAATTTTTTTCAATTAATTTTAAAAGTTTAAGAGTTTT
AAGAGTAATTGCAATGGAAATCTTTCGTGCGAATTCGCATTAAGGGTTTTGTTTATTACATTG
AATCAGGACGCCAGTTTTTACAATGCTGAAGAATAATTAATTTTAAATTTCCAGAATTTTCCC
ACGGGTTCCGCAGGTTTTTTTTCGTATGAATGAGTTGATTATCGTAAACTTATAAGCAAATA
GAGTAAGCAATTTGGCGAGACAATTCGAAGGATTACTTAGAAGATTATTTGGCTACTTAGTT
TGCCTTGCGTGATGAAGATTTTAATGTTTGAGCTAGATCGAGTGAGGATTAATAACAGAAAA
GACTAATTTTTTATTTAAGCGAGCTTGAAATTTTTTCTAAGTTTCATTTTTTTGTGGGTTGTG
AATTTTTTCTCATGTACCAATGGCGTACAATGGAAAGGCGTGAGGTGGTGTGTCCGAAAAGA
AGTCTCCGCGGTTGACAGGAATGAGTCCCATAGTGCCAGCTTGAAGAGGATGAAGGCCA
TTCCAAGGAGTGAGTATAGGCAATATACCACTTTTTGGATGTTGAACGGCTTTCTTGCTGCG
CGCTCGATTTCAAGAAAGTTCTTGTTTGCTTGATTAATATCTTTACTGCATTAACGAGAGCA
TAGCTAACGACAAGTATGCTGAAAATCCGGCGTTATTACCGCTCATATATAGCATGAAAAA
CGTCATACCCATGGTTTTAAGTGGCAGATGAGCAATGCTCCATGCCTTCTTATCAAATTGC
AAGCTTCGGAGGCATTTTGGTTTGTGATTTCTGCGTTTTCAATCGCACATACTGTTGGG
CCTTGGTGTTTTTATTCTGGGTTTAGCGTCGAGTTACTTGCGCAGTGAAGTTAGTATTGCT
ACTACTTGAGTTGCGGTCTTGCTTTGTACGATCGCAAGGACTTGATCCTATAAGTACTCGTT
TATCAGGACTTTTATTAATTTTTTTTTCGATAGTTTTTGGATTTATTACCCATGCGTCGTACCT
GCTCCCAAGATTGATCTTGTGTCGTTTTGAGTGTCTCTTCTTGCTCATTTTTCTCATTCT
TTGGTTTGCAGTCATTTTTGAGACTTGGGAATGCTTCTTCTTGTCGGGTAAATTTTGGAG
CGGGAATCTTGGGGGGTGAGTGGTTACATTAATCTGTCGCAAATAGTTTTCTAAATGATATA
ATTTGTATAAGTTTTGACTCAAATACCAATTAGAATATTCAAGATCATTAATAATAATTGA
GTCTCTATATGCAT

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

C. hominis

> *Cryptosporidium hominis* IbA12G3R2

TTCTCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGCACCTTGaAAGATGTTTCTGTTGAGAGCTCATCATCATCA
TCATCATCGTCATCATCATCGTCATCATCGTCAACAACAACCCCCGCACCAGCTCCAAAGAAGGCAAG
AGAAGCAGATGGCGGAGAAGAAAAGAACAATGAAGAAAGCCAAACTCCCGCTAGTCCTGGAAGTGGT
GGGGTGAGTGAAGGACAAGATACTCAAGGTGGCTCCAAAGGAGACGCTGAGGAAGGCACTGAAGAC
AATGAACAAGCCGATGAGAGTGCTACCCAACCTTCTACCCCAGGTCAAGGCTCCGTTAAAACCGAATC
CACAGAACTACTCCAAAGGAGAAGTGCGGTACTTCATTTGTTATGTGGTTTCGGACAGGGTGTTCAG
TCGCAACTTTGAAGTGCGGTGACTATACTATGGTCTATGCACCAGAAAAGGACAAAACAGATCCCGCA
CCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACAACCGTAACCTTTGATAAACAAGAGAGTACAGTTACAATCAAG
GTTAATAATGTAGAGTTCGGCACTCTCTACTAGCTCAAGTAAACCAACTGAAAATAAAGGTGAGTCT
AGCGATCAGGTTGGGTCAAGATCAAGAAGATCACTCACAGAGGAAACTAGTGAAACTGCAACCGTCA
TTTGTTCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAGTGACGAAGATGTATC
CAAGAGAAACAAGTACAGTTTGGTTGCAAACGATAAGACTTTCTATACCGGCGCAAATAGCGGTAATA
CCGACGGTATCTACAGGTTGAATGATAATGGAGACtGGTgGaCaAGaACAaAACGTTCTTTTGAAGGA
TGCTGTTTCTCTGC

> *Cryptosporidium hominis* IaA15G1R1

TCAGCCCCGGCCGTTCCACTCAGAGGCACCTTGaAGGATGTTTCTGTTGAGGGATCATCATCATCATC
ATCATCATCATCATCATCATCATCAACATCGACCGTCGCACCAGCTCCAAAGAAAGAAAGAAC
TGTAGAGGGCGGCACGGAAGGAAAGAACGAAGAAAGCAGTCCAGGTTCTGAAGAACAAGACGGTGG
TAAGGAAGACGGTGGTAAGGAAAACGGTGAAGGAGACACAGTAGACGGGGAACAAACCGGGAGTGG
TTCTCAAGTTACTCCATCTGGAAGTGCCGGCACAGCTACCGAGTCCACAGCAACTACTACTCCAAAGG
AAGAATGTGGTACTTCATTTGTCATGTGGTTCGAGAAAGGCACCCCGTTGCGACCTTGAAGTGTGGT
GATTACACTATCGTCTATGCACCTATAAAGATCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAA
GTTACATCTGTATCCTTTGAAAAGAGTGAAAAGTACAGTTACAATCAAGGTTAATGGTAAAGAGTTCAAGC
ACTCTCTCTGCTAACTCAAGTAGTCCAACATAAGATAACGGTGAATCTAGTGACAGTCAGGTTCAATCA
AGATCAAGAAGATCACTCGCAGAGGAGAATGGTGAACAGTTGCAACAGTTGATTTGTTTGCCTTTACT
CTTGATGGTGGTAGAAGAATTGAAGTGGCTGTGCCAAAGGACGAAAATGCAGACAAAAGAAGCGAGT
ACAGTTTGGTTGCAGACGATAAGCCTTTCTATACCGGCGCAAACAGTGGCATACCAATGGTGTCTAC
AAATTGGATGAGAATgGAACTTGGTtGaCaAGGaCAACaAAGTTCTCTTGAAGATGCTGGTTCCTC

> *Cryptosporidium hominis* IaA11G3T3

TCAGCCCCAGCCGTCCCAcTCAGAGGCACCTTGAAGGATGTTTCTGTTGAGGGCTCATCATCATCTTC
ATCATCGTCTTCATCTTCATCATCATCATCGTCAACAACCCCAGCACCAGCTTCAAAGAAGGTAAG
AGAAGCAGAAGGCAGTGAAGAAAAGGACAGCGAAGAAAAGGACAGTGAAGAAAAGGGCAGTGAAGAA
GGTAGCCAAACTCCCGCTAGTCCTGGAGGTGGAGGGGTGAGTGAAGGAGATACTCAAGGTGACTCTA

AAGGAGACGGAGTTAGTTCAGATGAGAACCAAAGTCAAGGTGGGACGCTACTCCCGGATCTAGCAC
CCAAACTCAAGCTACTGAAAAAGAACCCGGATCTTCAGAAGCTACTCCAAAGGAAGAGTGCGGTACTT
CATTGTGAATGTGGTTCGGACAGGGTGTCCAGTTGTAACCTTTGAAGTGTGGTGGTTATACTATGGTCT
ATGCACCAGAAAATGGCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTAAAGTTTCAACCGTAGACT
TTGAAAAACAAGATAGTACAGTTAAAATCAAGGTTAATGGTGTGGAGTTCAGCACTCTCTACTAGCT
CAAGTAATCCAAGTAAAAATAGCGGATCTGAGAGCCAGGCTCAATCAAGATCAAGAAGATCACTCGCA
GAGGATGGTACTGAGACTGCTGCAACCGTCGATTTGATTGCCTTACCCTTCAAGGTGGTAAAAAAT
CGAAGTCGCTGTGCCAAGTGACGAAGATGTATCCAAGAGAAAACAAGTACAGTTTGGTTGCAGGCGATA
AGACTTTCTATACCGGCGCAAATAGCGGTAATACCGACGGTATCTACAGGTTGAATGATGATGGAGACT
TGgTGgACAAGAACAcaACGTTCTTTGAAGGATGCTGgTTCCTCTGC

C. parvum

> *Cryptosporidium parvum* IIaA15G2R1

TGTiGaGGGcTcaTCATCGTcAtcGTCaTCATcATCATCATCATcATCATcATCATCAACATCAACCGTC
GCaCCagCaAATAAGGCaAaGAaCTgGAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCT
TCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAGGAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAACTAGTGTgCTTCCCAACC
CACTACTCCaGCTCAAAGTGAAGGCGCAACTaCcGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCG
GCACiTCATTTGAATGTGGTTCGGAGAAGGTACCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTACT
ATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAAACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCT
GTAACCTTTgAAAAGAGTGATAATACAGTTAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTCT
GcTAATTCAAGTAGTCCAAGTAAAAATGGCGGATcTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCA
CTCTCAGAGGAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTACCCTTGATGGTGGTAA
AAGAAiTGAAGTGGCTGTACCAaACGTGGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCaGA
CGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTtGAATGAGAACGg
AGACiTGgtTgATaAgGaCAACaCaAgTTCTTTTGAAGGATGCTGGTTC

> *Cryptosporidium parvum* IIcA5G3

TTTCCGcTGTATTcTCAGCCCCAGCCGTTCCACTCAGAGGCACCTTAAAGGATGTTTCTGTTGAGAGCT
CATCGTCATCATCGTCATCGTCAACAACAACCCCGCACCCAGCTCCAAAGAAGGTAAGAGAAAGCGAA
GAAGGGAAGAAGTGAAGATAGTCAAACCTCCCGCTAGTCCCTGGAAGTATTCTCAGGATAGCTCTAA
AGGAGACGAAGCTGTAGATGGAGCCGCTTCCGGATCTAGTACCCCAACTCAAGCTGCTGAAAAGGAG
CCCGAAAACCTCAGAATCTACTCCAAAGGAAGAATGTGGTACTTCATTTATAATGTGGTTCGGAGAAGGT
ACTCCAGCCACAACCTTTGAAGTGCAGTGGCTACACTATCGTCTATGCACCAGAAAAGGATAATAAAGA
ACCCGCACCAAGATACATCTCTGGTGTGTTAAGGCTGTAACCTTTGAAAAGGGAGAAGATAATACAG
TAAAATCAAGGTTGATGGTAAGGAGTTCAGTACTCTCTCTTCTAGCTCAAGCAGTCCAAGTAAAAATA
ACGGATCTACGGGCCAGGTTGCATCAAGATCAAGAAGATCGCTCTCAGAGGAAAATAGTAAAAGTACTGCT
GCAACCGTCGATTTGTTTGCCTTACCCTTGATGGTGGCCGAAGAATTGAAGTTGCTGTACCCAGCGT
CGAAGATGCAACCAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCaacCGGtaAGCCtttCtatACCGGcGCaAaCAG
cGGCACTacCAAtGgTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGAC

Anexo 3. 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