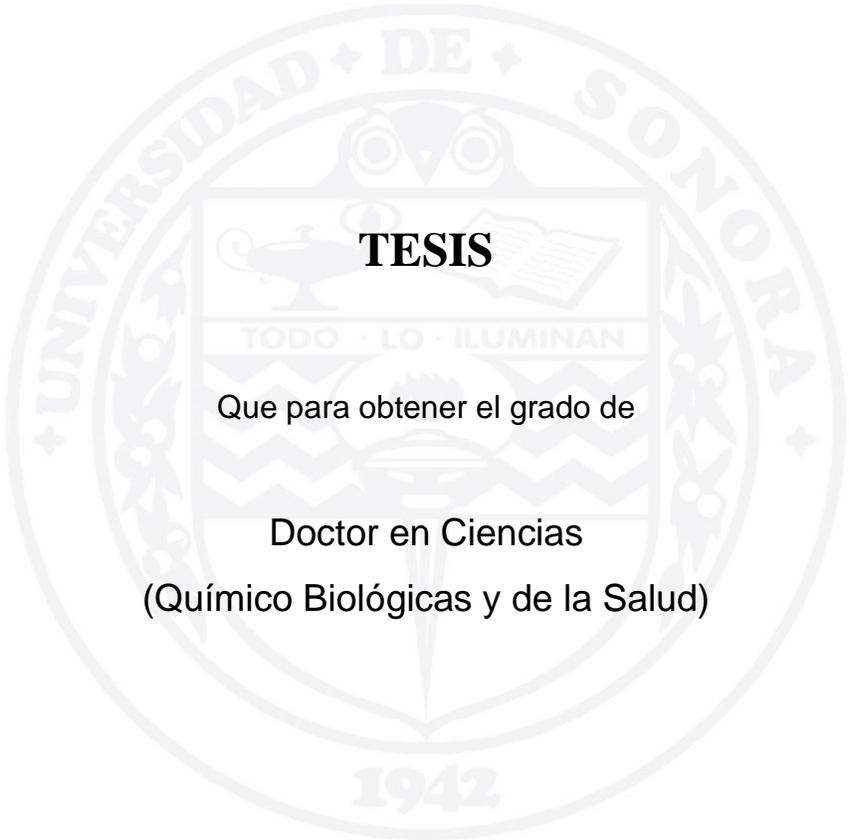


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de
Cryptosporidium spp. en pacientes que acuden a hospitales de
Hermosillo



TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta

Mariana de Jesús González Díaz

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2018

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

FORMATO DE APROBACIÓN

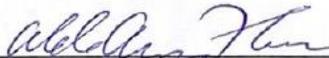
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Mariana de Jesús González Díaz, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.



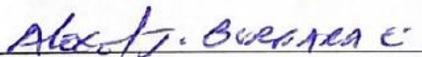
Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Director Académico



Dra. Adriana Garibay Escobar
Secretario



Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Sinodal



Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella
Sinodal

Dr. Lihua Xiao
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias a Él todo es posible. Gracias por tanto amor inmerecido.

Agradezco a mi familia, a mis padres y hermanos por el apoyo que me han brindado y porque siempre me han impulsado a conseguir mis metas, a mi esposo por toda su paciencia y comprensión, su amor y apoyo infinito, ¡te amo! ♥

Agradezco a la Universidad de Sonora y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas quienes me han acogido en mis años de estudio.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar el proyecto y por otorgarme la beca como parte del Doctorado en Ciencias (Químico Biológicas y de la Salud).

Un agradecimiento especial a la Dra. Olivia Valenzuela como mi directora de tesis, agradezco su paciencia, consejos y tolerancia en la realización de este trabajo, gracias por impulsarme en momentos difíciles.

Al Dr. Jesús Hernández, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., quien me brindó el espacio para poder realizar parte de esta investigación.

A mis sinodales: Dra. Adriana Garibay Escobar, Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores, Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella y Dr. Lihua Xiao quienes han seguido de cerca el desarrollo de esta tesis.

A todos y cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, gracias por compartir momentos especiales durante estos años, en verdad guardo recuerdos buenos con ustedes. Mucho éxito en sus experimentos!!

DEDICATORIA

Este trabajo está enteramente dedicado con mucho amor a mi preciosa familia, a mi esposo Juan Antonio, a mi bebé Eduardo, a mis padres, a mis hermanos: Daniela, Angélica y Sergio, a mí cuñada Cecilia y a mi sobrino César Daniel, cuyo amor incondicional y apoyo siempre me alientan a cumplir mis sueños. Soy tan afortunada de tenerlos. ¡Los amo con todo el corazón!

El trabajo de investigación titulado “**Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de *Cryptosporidium* spp. en pacientes que acuden a hospitales de Hermosillo**” se realizó en el laboratorio de Investigación de Productos Naturales y en el laboratorio de Tecnología en Alimentos del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, así también, en el laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., bajo la dirección de la Dra. Olivia Valenzuela, con el apoyo de la beca y el financiamiento por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT/Fondo Sectorial de Investigación para la Educación: 258454), para el desarrollo de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
OBJETIVOS	xv
Objetivo General	xv
Objetivos Particulares	xv
RESUMEN	xvi
INTRODUCCIÓN	1
El Parásito: <i>Cryptosporidium</i> spp.	2
Taxonomía	4
Ciclo de Vida	4
Transmisión, Manifestaciones Clínicas y Tratamiento	7
Epidemiología	11
Diagnóstico de la Criptosporidiosis	13
Microscopía	14
Inmunodiagnóstico	16
Diagnóstico Molecular	18
Prevención	19
Respuesta Inmune Humana a la Infección por <i>Cryptosporidium</i>	20
Inmunidad Innata	20
Inmunidad Específica	25
Proteínas Recombinantes	27
Sistemas de Expresión	28
Proceso de Purificación	30
Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados	31
Etiqueta de poli-Histidinas	31

MATERIALES Y MÉTODOS	33
Identificación del Genotipo Infeccionante de <i>Cryptosporidium</i> spp.	33
Sujetos de Estudio y Tamaño de Muestra	33
Criterios de Inclusión	33
Criterios de Exclusión	33
Tratamiento de Muestras de Sangre	34
Tratamiento de las Muestras de Hece	34
Extracción del ADN	34
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
PCR primaria	34
PCR anidada	35
Secuenciación	36
Generación de Proteínas Recombinantes	36
Detección de Ooquistes de <i>C. parvum</i>	36
Aislamiento de ADN y Amplificación del Gen <i>GP15</i> y <i>GP40</i>	36
Clonación y Expresión de la Proteína Recombinante rCpGP15, rChGP40 y rCpGP40 en <i>E. coli</i>	37
Western Blot	41
Purificación de Proteínas	41
ELISA	42
Análisis Estadístico	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Sujetos de Estudio y Tamaño de Muestra	44
Identificación del Genotipo Infeccionante de <i>Cryptosporidium</i> spp.	44
Generación de Proteínas Recombinantes	47
Determinación de Anticuerpos anti- <i>Cryptosporidium</i>	61
IgG Sérica anti-rCpgp15	61
IgG Sérica anti-rCpgp40	63
IgG Sérica anti-rChgp40	63

IgG Sérica anti-rCpgp15, anti-rCpgp40 y anti-rChgp40	63
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	89
Artículo “ <i>Cryptosporidium canis</i> in Two Mexican Toddlers”	89
Artículo “Clinical Manifestations of Cryptosporidiosis and Identification of a New <i>Cryptosporidium</i> Subtype in Patients From Sonora, Mexico”	91

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Especies y genotipos de <i>Cryptosporidium</i> reportados en humanos.	3
II	Tratamiento de la criptosporidiosis.	10
III	Métodos diagnósticos para <i>Cryptosporidium</i> .	15
IV	Iniciadores diseñados para la producción de las proteínas recombinantes de 15 y 40 kDa del gen <i>GP60</i> .	38
V	Distribución de casos y controles por hospital de origen.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotomicrografía electrónica de barrido del epitelio de colon infectado con ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp.	6
2	Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	8
3	Diagnóstico microscópico de <i>Cryptosporidium</i> mediante la tinción de Kinyoun.	17
4	Producción y liberación de moléculas efectoras derivadas de células epiteliales.	23
5	Secuencia nucleotídica de la proteína S60 de <i>Cryptosporidium parvum</i> .	39
6	Mapa del vector pET100-TOPO.	40
7	Productos de PCR del gen GP40 y GP15 de <i>C. parvum</i> (aislado S38) y <i>C. hominis</i> (aislado S37).	48
8	Productos de PCR del gen GP60 y GP15 de <i>Cryptosporidium hominis</i> .	49
9	Alineación de secuencias múltiples por CLUSTALW de la región del gen de la glicoproteína S16 de NCBI (Genbank: AF203016) y el gen gp15 generado en este estudio.	50
10	Placas de agar LB-AMP mostrando colonias de <i>E. coli</i> Rosetta 2 transformadas con la construcción del vector pET100-CpGP15.	51
11	Detección de clones recombinantes.	52
12	Inducción de la expresión de la proteína recombinante rCpgp15.	54
13	Sobreexpresión de las proteínas recombinantes rChgp40 y rCpgp40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS.	55
14	Detección de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes rChgp40 y rCpgp40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS por Western blot.	56
15	Inmunodetección de la proteína recombinante rCpgp15 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS.	57
16	Inmunodetección de la proteína recombinante rCpgp40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS.	58

17	Inmunodetección de la proteína recombinante rChgp40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS.	59
18	Niveles séricos de anticuerpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> entre los casos infectados y controles no infectados del estudio utilizando las proteínas recombinantes rCpgp15, rCpgp40 y rChgp40.	62
19	Niveles séricos de anticuerpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> entre los controles no infectados del estudio utilizando las proteínas recombinantes rCpgp15, rCpgp40 y rChgp40.	64
20	Niveles séricos de anticuerpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> entre los genotipos infectantes (<i>C. parvum</i> y <i>C. hominis</i>) y las proteínas recombinantes rCpgp15, rCpgp40 y rChgp40 de los casos de criptosporidiosis del estudio.	65

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
DC	Célula dendrítica (por sus siglas en inglés)
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CMDICH	Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez”
col	Colaboradores
COWP	Proteína de la pared del ooquiste de <i>Cryptosporidium</i>
CSL	Ligando tipo circunsporozoíto
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad Óptica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Gramos
g	Gravedades
GP15	Gen codificante para la gp15
gp15	Glicoproteína de 15 kDa
GP40	Gen codificante para la gp40
gp40	Glicoproteína de 40 kDa
GP60	Gen codificante para la gp60
gp60	Glicoproteína de 60 kDa
GRO α	Oncogén relacionado con el crecimiento alfa
HIES	Hospital Infantil del Estado de Sonora
hrs	Horas
HSP	Proteína de choque térmico

IFN- β	Interferón beta
IFN- γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
JNK	Proteínas quinasas SAPK activadas por estrés
Kb	Kilopares de bases
kDa	Kilodaltons
LB	Luria B (caldo de crecimiento)
M	Masculino
M	Concentración Molar
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
min	Minuto
MIP-2 α	Proteína inflamatoria macrofágica-2 α
mL	Mililitro
μ l	Microlitro
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
NaOH	Hidróxido de Sodio
NK	Célula asesina natural (por sus siglas en inglés)
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLR	Receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud

pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log [H^+]$
PR	Proteína recombinante
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido Ribonucleico (ARN)
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril sulfato de sodio
seg	Segundos
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSU rRNA	Subunidad menor del ARN ribosomal
Taq	<i>Thermiis acuaticus</i>
TBE	Trís-Borato-EDTA
TE	Tris-Cl-EDTA.
TGI	Tracto gastrointestinal
TLR	Receptor tipo Toll
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAP	Proteína adhesiva relacionadas con las trombospondinas
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar molecularmente el genotipo infectante de *Cryptosporidium* en pacientes sintomáticos y asintomáticos, así como analizar su respuesta humoral a proteínas recombinantes gp40 y gp15.

Objetivos Particulares

- Determinar el genotipo de *Cryptosporidium* spp. infectante en pacientes sintomáticos y asintomáticos.
- Obtener cuatro proteínas recombinantes (rCpgp15, rChgp15, rCpgp40, rChgp40) a partir de la secuencia prototipo del gen *GP60* de *C. parvum* (Cp) y *C. hominis* (Ch).
- Analizar la respuesta humoral (IgG) a las proteínas recombinantes de los pacientes incluidos en el estudio.

RESUMEN

Cryptosporidium es un parásito protozoario cosmopolita que afecta a humanos y animales; es considerado un patógeno emergente que produce diarrea de moderada a grave en los niños y en personas con inmunodeficiencia, en individuos inmunocompetentes, además, causa náuseas, vómitos, pérdida de apetito, pérdida de peso y fiebre. Las glicoproteínas gp15 y gp40 se localizan en la superficie de los estadios invasivos del parásito, ocasionando que estas glicoproteínas se adhieran e invadan las células diana del hospedero; ambas glicoproteínas son productos de escisión proteolítica de una proteína precursora de 60 kDa que se expresa en estadios intracelulares del parásito. El objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente el genotipo infectante de *Cryptosporidium* en pacientes sintomáticos y asintomáticos, así como analizar su respuesta humoral a proteínas recombinantes (PRs) gp40 y gp15. Para ello, se realizó un estudio de casos y controles. Se determinó el genotipo infectante para 39 casos de criptosporidiosis, siendo *C. parvum* el que se identificó en mayor frecuencia, seguido de *C. hominis* y *C. canis*. A partir de las heces de dos casos se amplificaron los genes *GP15* y *GP40* de *C. parvum* y *C. hominis*, dichos genes codifican para las glicoproteínas gp15 y gp40 respectivamente. Después se realizó la clonación de cada gen amplificado (Cpgp15, Cpgp40 y Chgp40) utilizando el vector TOPO pET100. La sobreexpresión de las PRs se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. El análisis SDS-PAGE y Western blot mostraron que las PRs generaron polipéptidos con pesos moleculares de aproximadamente 18 kDa (Cpgp15) y 37 kDa (Cpgp40 y Chgp40). La cuantificación de niveles séricos de IgG anti-*Cryptosporidium* mostró un mayor reconocimiento entre la PR rChgp40 y el grupo control ($p=0.029$).

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias, representan un grave problema a nivel mundial (Smith y col., 2007). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las “Enfermedades Tropicales Desatendidas” (NTD: Neglected Tropical Diseases) como aquellas que han sufrido una falta de atención por parte de los organismos y autoridades de Salud Pública; a tal punto, que más de mil millones de personas (una sexta parte de la población mundial), se ve afectada por una o más de ellas, y más de 500 000 personas mueren cada año en todo el mundo por estas causas (Gray y col., 2009; Molyneux y col., 2009). Estas NTD involucran un amplio grupo de patologías entre las que se encuentran las llamadas enfermedades transmitidas por agua y alimentos, entre las cuales está la criptosporidiosis.

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por especies del género *Cryptosporidium*, ha sido reportada en más de 40 países en seis continentes, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos (Dillingham y col., 2002); constituye uno de los mayores problemas de Salud Pública en el mundo (Fayer y col., 2000; Morgan, U. M. y col., 2000; Cacciò y col., 2005); generalmente se diagnostica mediante técnicas de tinción en frotis fecales, dirigidas a detectar ooquistes. Además de ser laboriosas y lentas, estas técnicas requieren altos niveles de experiencia para interpretar los resultados y tienen poca sensibilidad. También se utilizan ensayos inmunológicos comerciales (ensayo de anticuerpos fluorescentes directos e inmunoensayos ligados a enzimas de captura de antígeno) y métodos moleculares, y en general muestran mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas de tinción (Jex e Gasser, 2009).

Aunque se utilizan varios marcadores genéticos para la identificación específica de *Cryptosporidium*, el locus más utilizado para el subtipo en los estudios de epidemiología molecular es el gen *GP60*, que codifica la glicoproteína gp60. Este gen es de gran importancia en epidemiología molecular debido a sus diversas regiones de altas tasas polimórficas (Strong y col., 2000). *C. hominis* tiene seis subtipos del gen *GP60*, y el subtipo Ib es la forma dominante y más ampliamente distribuida (Jex e Gasser, 2010;

Fournet y col., 2013). Además de ser un marcador molecular prominente, el gen *GP60* tiene un significado funcional porque la glicoproteína gp60 está asociada con la adhesión del parásito a la célula hospedadora (Cevallos y col., 2000; O'connor y col., 2007). Por esta razón, la infección con *Cryptosporidium* se asocia con el desarrollo de una respuesta de anticuerpos IgG en suero dominada por los antígenos de superficie de 27 kDa y 17 kDa del parásito (Priest y col., 1999). Los anticuerpos contra los antígenos de 27 kDa y 17 kDa pueden servir como marcadores útiles para infecciones pasadas en estudios poblacionales de los factores de riesgo asociados con la infección por *Cryptosporidium*. Una forma recombinante de los antígenos de 15 kDa y 40 kDa sería útil tanto en estudios epidemiológicos como en estudios de la respuesta humoral en la inmunidad.

El Parásito: *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium es un patógeno importante tanto en animales como en humanos, siendo reconocido como un problema de zoonosis (Burnet y col., 2014; Squire e Ryan, 2017); es considerado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos) como un patógeno infeccioso emergente (Guerrant, 1997). Este parásito puede transmitirse por contacto directo entre seres humanos y animales, o por contaminación de los alimentos, aunque la mayoría de los brotes de criptosporidiosis en humanos están asociados con agua potable o de recreo como piscinas o parques acuáticos (Ali y col., 2005; Abd El-Salam, 2012). Actualmente, se han reconocido más de 30 especies de *Cryptosporidium* con base en sus características morfológicas, biológicas y moleculares (Ryan y col., 2014), los seres humanos son susceptibles a una amplia gama de especies y genotipos de *Cryptosporidium* spp (Tabla I), siendo *C. hominis* y *C. parvum* los responsables de la mayoría de las infecciones. (Insulander y col., 2013; Rossle y col., 2013; Ryan y col., 2014). Entre todas las especies identificadas, *C. hominis* infecta exclusivamente humanos (Xiao, Fayer, y col., 2004); mientras que *C. parvum* puede infectar a los seres humanos y animales, por lo que ha sido considerado como una especie de zoonosis (Xiao, Alderisio, y col., 2000).

Tabla I. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* reportados en humanos.

Especie	Hospedero	Referencia
<i>C. hominis</i>	Humano	(Morgan-Ryan y col., 2002)
<i>C. parvum</i>	Bovino, humano	(Gomez-Bautista y col., 2000)
<i>C. andersoni</i>	Bovino	(Lindsay y col., 2000)
<i>C. muris</i>	Roedor	(Pavlasek e Ryan, 2007)
<i>C. suis</i>	Cerdo	(Ryan y col., 2004)
<i>C. felis</i>	Gato	(Morgan, U. y col., 2000)
<i>C. canis</i>	Perro	(Fayer y col., 2001)
<i>C. meleagridis</i>	Pavo, humano, aves	(Xiao y col., 2001)
<i>C. bovis</i>	Bovino, oveja	(Fayer y col., 2005)
<i>C. xiaoi</i>	Oveja, cabra	(Fayer e Santín, 2009)
<i>C. fayeri</i>	Canguro	(Ryan y col., 2008)
<i>C. ubiquitum</i>	Bovino	(Fayer y col., 2010)
<i>C. cuniculus</i>	Conejo	(Robinson e Chalmers, 2010)
<i>C. tyzzeri</i>	Ratón	(Ren y col., 2012)
<i>C. viatorum</i>	Humano	(Elwin y col., 2012)
<i>C. scrofarum</i>	Cerdo	(Kváč y col., 2013)
<i>C. erinacei</i>	Erizo y caballo	(Kváč y col., 2014)
Genotipo chipmunk I	Ardilla	(Jiang y col., 2005)
Genotipo skunk	Roedor	(Xiao y col., 2002)
Genotipo de visón	Vison americano	(Wang y col., 2008)
Genotipo del caballo	Caballo salvaje	(Ryan y col., 2003)

Fuente: (Ryan y col., 2018)

C. canis, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. andersoni*, *C. muris* y *C. suis* también han sido aislados de los seres humanos (Xiao y col., 2001; Xiao, Ryan, y col., 2004; Fayer y col., 2010; González-Díaz y col., 2016).

Taxonomía

Cryptosporidium pertenece al phylum *Apicomplexa*, clase *Coccidia*, orden *Eucoccidiorida*, familia *Cryptosporidiidae*. El phylum *Apicomplexa* está conformado por numerosos géneros de parásitos eucariotas patógenos de los seres humanos (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, e *Isospora*) (Rossle y col., 2013). Una característica del phylum *Apicomplexa* es la presencia de un conjunto de organelos en la zona apical como roptrías, micronemas, gránulos densos, microtúbulos y mitocondrias, sólo visibles por microscopía electrónica; estos organelos le confieren al parásito la capacidad de invadir las células y multiplicarse como parásitos intracelulares. Las roptrías, micronemas y gránulos densos contienen una mezcla compleja de proteínas que son secretadas, ya sea en el extremo apical del zoíto o dentro de la célula. Esas proteínas cumplen funciones de adhesión, unión específica a la célula hospedera, locomoción y formación de la vacuola parasitófora (Smith, 2007). A pesar de las similitudes en sus ciclos de vida, varias características distinguen al género *Cryptosporidium* del resto de los coccidios: relativa especificidad de hospedador, capacidad de autoinfección endógena, localización intracelular y extracitoplasmática en la célula hospedadora, y resistencia a la terapéutica antiparasitaria (Smith y col., 2007).

Ciclo de Vida

Cryptosporidium tiene un ciclo de vida complejo, que tiene lugar dentro de la célula epitelial intestinal y se completa en un solo hospedero (O'hara e Chen, 2011; Bouzid y col., 2013). El ciclo evolutivo es monoxeno y similar al de otros coccidios entéricos, con las fases de merogonia, gametogonia y esporogonia. El sitio primario de infección de *C. parvum* y *C. hominis* es el intestino delgado. En animales y humanos con

inmunodeficiencias graves, este parásito también ha sido encontrado en sitios extraintestinales como vías biliares, hígado, vesícula biliar, páncreas y pulmones (Chen e Larusso, 2002). Otras especies como *C. muris*, *C. andersoni* y *C. serpentis* se alojan en la mucosa gástrica, mientras que *C. baileyi* afecta al aparato respiratorio (Tyzzer, 1910; Dillingham y col., 2002; Sponseller y col., 2014; Kváč y col., 2016; Bercier y col., 2017).

La única forma infectiva y de diagnóstico es el ooquiste, siendo estos cuerpos esféricos de 4 a 6 μm de diámetro. Una vez ingeridos los ooquistes por el hospedador susceptible se produce el desenquistamiento, es decir, la apertura de la pared del ooquiste a lo largo de una línea de sutura; esto permite que los cuatro esporozoítos sean liberados para producir la invasión (Figura 1) (Fayer, 2004). Los esporozoítos liberados son móviles e invaden activamente la célula hospedadora. El extremo anterior de cada esporozoíto se adhiere a través del ligando tipo circunsporozoíto (CSL) a un receptor presente en las microvellosidades intestinales (O'hara e Chen, 2011). Del extremo anterior del parásito surge una vacuola que se fusiona con la membrana de la célula para formar una interfase hospedador-parásito.

El parásito queda contenido en una vacuola denominada parasitófora, de ubicación intracelular, pero extracitoplasmática; allí el parásito crece y sufre una reproducción asexual o fisión múltiple (merogonia) y origina el meronte I, con 8 merozoítos en su interior; luego de la ruptura del meronte I, los merozoítos liberados ingresan en una nueva célula epitelial y desarrollan en su interior un meronte I (con 8 merozoítos) o II (con 4 merozoítos). Esto se debe a que algunos merozoítos I son capaces de reciclarse indefinidamente con la producción continua de merontes I. Los merozoítos liberados por el meronte II, parasitan nuevas células y se diferencian en macrogameto (femenino) y microgameto (masculino). El macrogameto evoluciona a macrogameto inmóvil femenina uninucleada y permanece en el interior del enterocito (Leitch e He, 2012; Bouzid y col., 2013).

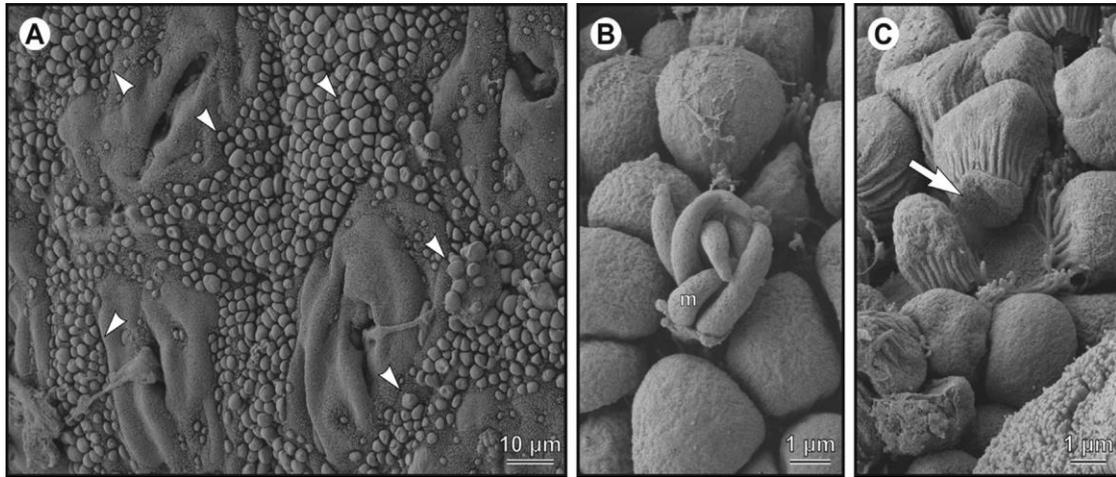


Figura 1. Fotomicrografía electrónica de barrido del epitelio de colon infectado con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Ratón de laboratorio (*Rattus norvegicus*) infectado con 5000 ooquistes de *Cryptosporidium* spp., sacrificado 15 días después de la infección. (A) Epitelio de colon cubierto por estadios de *Cryptosporidium* spp. (punta de flecha). (B) Sacos parasitofóricos rotos que liberan merozoitos tipo I (m). (C) Sitio de la interacción del saco parasitofórico con la célula hospedero (flecha). Escala incluida en cada figura.

Fuente: (Kváč y col., 2018)

El microgameto se multiplica por fisión múltiple y origina 16 microgametos móviles que abandonan la célula parasitada en busca del macrogameto. Luego de la fecundación del macrogameto se origina el huevo o cigoto, único estado diploide del ciclo, que resultará en el ooquiste al adquirir la pared quística. Se produce la esporogonia, en la cual el núcleo diploide sufre una meiosis y se forman cuatro células haploides, los esporozoítos, que quedan contenidos dentro del ooquiste. Este se libera finalmente del enterocito y es eliminado al medio ambiente, siendo infeccioso inmediatamente después de su excreción en las heces (Figura 2) (Del Coco y col., 2009). El 20% de los ooquistes producidos sufren una falla en la formación de la pared y se denominan ooquistes de pared fina. Estos liberan los esporozoítos en la luz intestinal y pueden ingresarse en nuevos enterocitos. Así, *C. parvum* y *C. hominis* tienen 2 ciclos autoinfectivos: el reciclado continuo de los merontes tipo I, por un lado, y los esporozoítos derivados de los ooquistes de pared fina, por el otro (Del Coco y col., 2009; Bouzid y col., 2013).

Transmisión, Manifestaciones Clínicas y Tratamiento

La transmisión del parásito ocurre vía fecal-oral, lo cual se facilita por la ingesta de agua o comida contaminada, vía persona-persona (transmisión antroponótica) o transmisión animal a humano (transmisión zoonótica) (Putignani e Menichella, 2010; Bouzid y col., 2013).

El cuadro clínico dependerá de características propias del hospedador, como edad y estado inmunológico, así como también de la especie parasitaria involucrada y la dosis infecciosa (Carey y col., 2004). El signo clínico más común de la criptosporidiosis es la diarrea, presente en el 92% de los casos (Cacciò e Pozio, 2006), aunque han sido informadas infecciones asintomáticas (Fayer y col., 2008). En la mayoría de los casos de criptosporidiosis, la diarrea se acompaña de náuseas, vómitos, dolor abdominal, pérdida de peso y algunas veces fiebre (Idris y col., 2010).

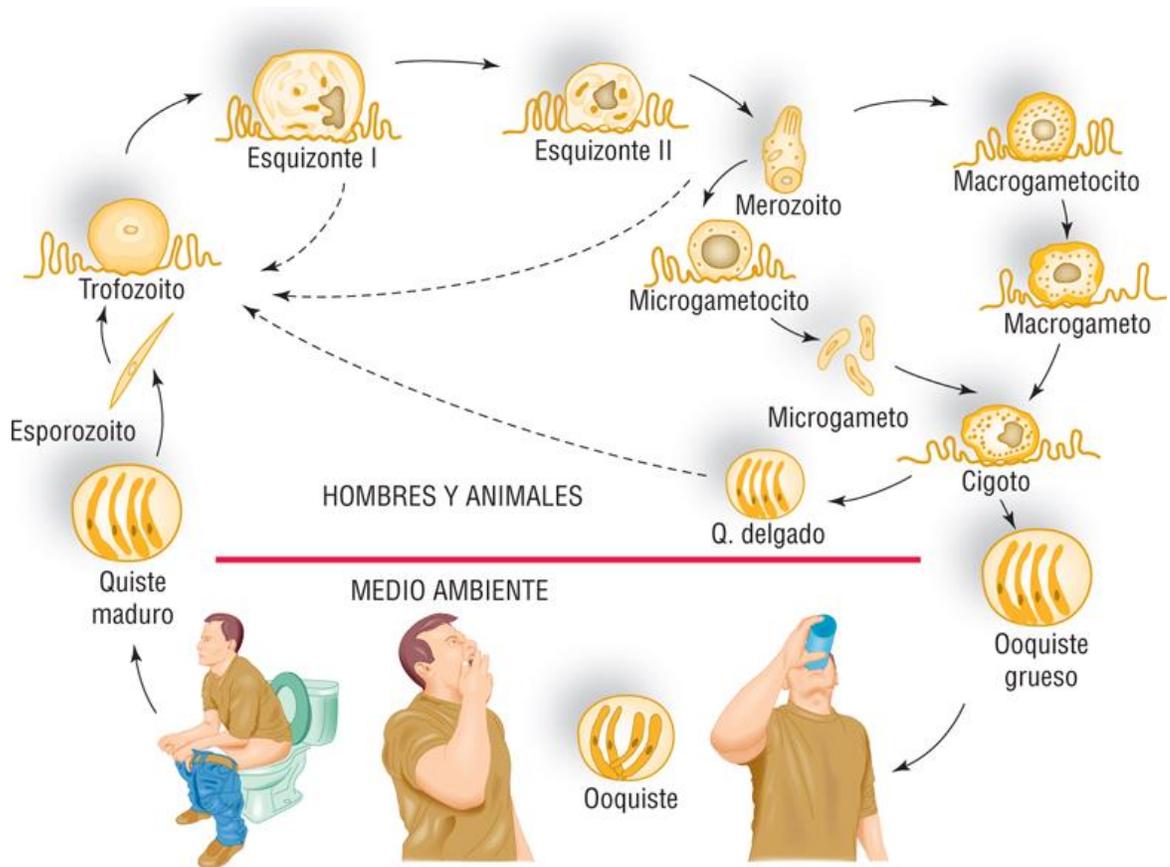


Figura 2. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp.

Fuente: Parasitología médica. 4ta. Edición. www.accessmedicina.com

En la actualidad, las opciones de tratamiento para criptosporidiosis son limitadas, siendo la Nitazoxanida la droga que ha mostrado mayor eficacia en individuos inmunocompetentes (Amadi y col., 2009; Jumani y col., 2018). Se han descrito varios fármacos con actividad contra *Cryptosporidium in vitro*, en modelos animales y en pacientes (Tabla II). La espiramicina, la azitromicina y la inmunoglobulina anti-*Cryptosporidium* bovina no han sido eficaces en ensayos controlados en pacientes con SIDA (Cabada e White, 2010). En individuos inmunosuprimidos el tratamiento suele ser ineficaz (Abubakar y col., 2007; Amadi y col., 2009); en niños infectados con criptosporidiosis el tratamiento ha sido poco evaluado. Aunado a esto, no existe una vacuna para la prevención de la criptosporidiosis (Shirley y col., 2012; Checkley y col., 2015). Los hallazgos de estudios *in vitro* y en animales sugieren que las combinaciones de fármacos podrían tener cierta eficacia (Giacometti y col., 2000). En el tratamiento de pacientes con VIH o SIDA, los médicos deben considerar la terapia sintomática, la optimización de la terapia antirretroviral y, quizás, la inclusión de nitazoxanida o paromomicina (Cabada e White, 2010).

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

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

Tabla II. Tratamiento de la criptosporidiosis.

	Estado	Limitaciones	Referencia
Nitazoxanida	Aprobado para su uso para la criptosporidiosis pero no con la coinfección por VIH.	Eficacia 56–96% en hospederos sanos.	(Rossignol y col., 2006; Amadi y col., 2009)
Paromomicina	Aprobado para su uso para otras indicaciones.	Eficacia limitada en pacientes con SIDA.	(White y col., 1994; Hewitt y col., 2000)
Azitromicina	Aprobado para su uso para otras indicaciones.	No es efectivo en pacientes con SIDA avanzado.	(Cabada e White, 2010)
Rifabutina	Aprobado para su uso para otras indicaciones.	Efectivo en la prevención de la criptosporidiosis en estudios de profilaxis con <i>Mycobacterium avium</i> .	(Cabada e White, 2010)
Inhibidores de la proteasa del VIH	Aprobado para su uso en el tratamiento del VIH.	Asociado a la resolución de la criptosporidiosis en pacientes con SIDA.	(Cabada e White, 2010)

Epidemiología

Los resultados de los estudios epidemiológicos moleculares han permitido una mejor apreciación de la importancia en salud pública de las especies y genotipos de *Cryptosporidium* en varios animales (Shrivastava y col., 2017). *C. hominis* y *C. parvum* son los agentes que mayormente causan criptosporidiosis en individuos tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos, pero su prevalencia varía en diferentes regiones del mundo (Abrahamsen y col., 2004; Ryan y col., 2014; Shrivastava y col., 2017). También se ha informado que otras especies, como *C. felis*, *C. muris* y *C. meleagridis*, causan infección humana (Snelling y col., 2007).

La criptosporidiosis es endémica en los países en desarrollo; las personas más propensas son los portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En 1976, *C. parvum* se asoció con un caso de gastroenteritis infantil, siendo hasta la década de los 80's que junto con el surgimiento de la epidemia del SIDA se le reconoce como un patógeno oportunista, incorporándolo al grupo de parásitos emergentes (Nime y col., 1976); con este surgimiento, la enfermedad adquirió verdadera importancia a partir del verano de 1993, cuando se produjo el brote epidémico en Milwaukee, EE.UU, el más importante a nivel mundial, que afectó a más de 403 000 personas; desde entonces, los casos de criptosporidiosis han sido informados en más de 40 países (Fayer, 2004). La prevalencia de la infección por *Cryptosporidium* en países subdesarrollados como Brasil, Venezuela, Indonesia, Tailandia, Sudáfrica, Ghana, India y Bangladesh entre los niños con diarrea varía del 3% al 13%; en contraste, en países desarrollados del mundo como Gran Bretaña, Estados Unidos, Canadá, Australia y Dinamarca, en los cuales representa del 1-4% de la diarrea infantil (Vanathy y col., 2017). En México, se tienen pocos estudios sobre *Cryptosporidium* afectando a humanos, sin embargo, se ha identificado la presencia de tres especies de este parásito en infantes, *C. parvum*, *C. hominis* y *C. canis*; siendo la especie de *C. parvum* la más prevalente (Valenzuela y col., 2014; González-Díaz y col., 2016; Urrea-Quezada y col., 2017).

Cryptosporidium causa deficiencias nutricionales con una morbilidad y mortalidad significativas, especialmente en niños e individuos inmunodeficientes (Mak, 2004). El principal mecanismo de defensa contra la criptosporidiosis se debe a las respuestas inmunitarias mediadas por células, dado que el sistema inmunológico de los niños no está bien desarrollado, son muy propensos a la infección. La causa predisponente del estado inmunocomprometido en los niños es la desnutrición y algunas de las infecciones infantiles, como el sarampión. En la India, hay algunos estudios que informaron sobre *Cryptosporidium* spp. en niños con diarrea (entre 1.1% y 18.9%) (Ajjampur, Sankaran, y col., 2008), y en niños asintomáticos (0% a 3%) (Reinthalder y col., 1989). También hay estudios que informaron hasta un 9.8% de positividad en niños asintomáticos (con un 13.1% de positividad en niños sintomáticos) (Kaur e Diwan, 1991).

La criptosporidiosis es una de las infecciones comunes entre las personas infectadas por el VIH con un recuento de linfocitos T CD4 positivos menor a 200 células/mm³ (Adamu y col., 2014); causa una infección potencialmente mortal que afecta el tracto gastrointestinal y los sitios extraintestinales, como el tracto hepatobiliar, el páncreas y las vías respiratorias (Shrivastava y col., 2017). África es el primer continente en tener un número significativo de casos de VIH en el mundo con una prevalencia de criptosporidiosis que varía del 3.8% al 73.6% (Tumwine y col., 2005). Asia es el segundo continente en el aumento del número de casos de VIH (aproximadamente 4.7 millones de casos) después de África. Existen algunos informes de casos de la India, con una prevalencia que oscila entre el 4.7% y el 56.5% (Iqbal y col., 2012). En el sudeste asiático, Tailandia tiene una tasa de prevalencia del 8.8% al 34.4%, mientras que Nepal tiene el 10.7% y Camboya del 45%. Malasia tiene una tasa de prevalencia del 3% al 23%, Irán e Indonesia del 52.5%.

Los primeros estudios sugirieron que el parásito se encuentra en el 1% de las heces de hospederos que son inmunocompetentes en los países de ingresos altos y en el 5-10% de las heces de los hospederos en entornos de bajos recursos (Guerrant y col., 2011). Los resultados de estudios recientes con PCR y detección de antígenos sugieren que los estudios anteriores subestimaron la frecuencia de la infección, identificando a

Cryptosporidium en el 15 a 25% de los niños con diarrea (Ajjampur, Rajendran, y col., 2008; Mor e Tzipori, 2008; Guerrant y col., 2011). La criptosporidiosis se asocia con una mayor duración de la diarrea y una mayor morbilidad y mortalidad infantil que otras causas (Khan y col., 2004; Sarkar y col., 2014), y se asocia particularmente con diarrea prolongada (7–14 días) y diarrea persistente (≥ 14 días) (Lima y col., 2000; Moore y col., 2010).

Los resultados de los estudios de cohortes han demostrado consistentemente que la edad más joven se asoció con un alto riesgo de infección. Por ejemplo, en un estudio multicéntrico de niños menores de 5 años en la India (Ajjampur y col., 2010), 75% de los casos fueron en niños menores de 2 años. Muchos estudios sugieren que la infección por *Cryptosporidium* está asociada con la desnutrición y los déficits de crecimiento en los niños (Checkley y col., 1998; Mondal y col., 2012; Shirley y col., 2012; Squire e Ryan, 2017). El estudio multicéntrico entérico global (GEMS) que buscó evaluar las causas, la carga, los síndromes clínicos y los resultados adversos de la diarrea moderada a grave en niños en siete sitios en África y el sur de Asia, identificó el *Cryptosporidium* como uno de los cuatro principales contribuyentes a enfermedades diarreicas de moderadas a graves durante los primeros 2 años de vida en todos los sitios (Kotloff y col., 2013). *Cryptosporidium* solo fue superado por el *Rotavirus* como causa de diarrea moderada a grave en niños menores de 2 años. En una visita de seguimiento 2 a 3 meses después de la inscripción, la criptosporidiosis se asoció con un riesgo 2 a 3 veces mayor de mortalidad entre los niños de 12 a 23 meses con diarrea moderada a grave que en los controles sin diarrea (Kotloff y col., 2013; Checkley y col., 2015).

Diagnóstico de la Criptosporidiosis

Los registros de criptosporidiosis se encuentran subestimados, debido a la carencia de conocimientos y recursos para llevar a cabo el diagnóstico etiológico de manera adecuada, aunado a la falta de sospecha de éste parásito como agente causal de la gastroenteritis aguda. En Estados Unidos, se estima que solo se diagnostica y reporta el 1% de los casos

de criptosporidiosis (Khurana e Chaudhary, 2018). Las muestras de heces son las que se examinan con más frecuencia para evidenciar la presencia de ooquistes; sin embargo, hay reportes en los que se han utilizado, biopsias o tejido sobre todo en pacientes inmunocomprometidos en los que se ha descrito la criptosporidiosis extraintestinal (Shrivastava y col., 2017).

El diagnóstico etiológico de la criptosporidiosis se basa en la identificación del parásito mediante microscopía (de luz y fluorescencia), empleando diversas técnicas como la tinción de Kinyoun (Ziehl Neelsen modificada) (Morgan y col., 1998), inmunocromatografía, tinciones fluorescentes (Latif e Jakubek, 2008; Chalmers, Campbell, y col., 2011), PCR (Calderaro y col., 2011), entre otras (Tabla III); además se cuenta con técnicas inmunológicas, ya sea para la detección de antígenos y de anticuerpos; las cuales presentan una buena sensibilidad y especificidad (93% a 100%); sin embargo, el diagnóstico molecular proporciona una mayor sensibilidad y especificidad, sobre todo cuando se emplea más de un marcador molecular, además que permite diferenciar las especies y subtipos de familias (Xiao, 2010).

Mientras que las pruebas de detección de antígenos son útiles para el diagnóstico de infección aguda, las pruebas de detección de anticuerpos se emplean principalmente para estudios seroepidemiológicos (Chalmers, Campbell, y col., 2011).

Microscopía

El diagnóstico de rutina de la criptosporidiosis en la mayoría de los países se ha basado en la detección microscópica de ooquistes después de la tinción del frotis fecal; la utilización de métodos de concentración de materia fecal aumenta la sensibilidad del diagnóstico microscópico (Del Coco y col., 2009).

Tabla III. Métodos diagnósticos para *Cryptosporidium*.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Microscopía	Baja tecnología Ampliamente disponible.	Baja sensibilidad (aprox. 70–80% con tinción ácida modificada). Requiere tinciones especiales y técnicos expertos	(Arrowood, 2002; Chalmers, Campbell, y col., 2011)
Detección de antígeno	Buena sensibilidad (70–100%). Varios kits disponibles comercialmente en inmunoensayo enzimático, ensayo de inmunofluorescencia y formatos de prueba de inmunocromatografía.	Costoso para la configuración de los países de escasos recursos.	(Kaushik y col., 2008) (Chalmers, Campbell, y col., 2011)
PCR	Excelente sensibilidad (100%) y especificidad (100%). Puede especiar, subtipo y cuantificar. Adecuado para multiplexación para objetivos de enteropatógenos adicionales	Instrumentación costosa. Técnicamente exigente, requiere técnicos de laboratorio capacitados para la extracción y amplificación de ADN.	(Kaushik y col., 2008; Chalmers, Campbell, y col., 2011); (Morgan y col., 1998) (Calderaro y col., 2011)
Métodos serológicos	Útil para fines de vigilancia y discriminación de infecciones históricas, recientes y repetitivas.	Uso exclusivo en laboratorios de investigación.	(Chalmers, Campbell, y col., 2011)

El método de Kinyoun es eficiente y confiable para el diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* (Figura 3); sin embargo, a pesar de ser un procedimiento fácil y de bajo costo, no se puede distinguir entre especies y genotipos de *Cryptosporidium* (Morgan y col., 1997); además presenta una baja sensibilidad (37–84%) y una alta especificidad (99–100%) (Kaushik y col., 2008; Chalmers, Campbell, y col., 2011; Ruecker y col., 2011).

Inmunodiagnóstico

Se han desarrollado métodos inmunológicos basados en la detección de antígenos que utilizan anticuerpos para detectar ooquistes. Los kits basados en la inmunofluorescencia, utilizan un anticuerpo monoclonal con isotiocianato de fluoresceína conjugado anti-*Cryptosporidium* que reconoce epítomos de la superficie del ooquiste de *Cryptosporidium* (Chalmers, Smith, y col., 2011); sin embargo, este tipo de métodos es caro y necesita equipo especializado como microscopio de fluorescencia. Se han informado de respuestas de anticuerpos séricos al antígeno gp15/15-17-kDa en niños con criptosporidiosis en países en desarrollo después de brotes de criptosporidiosis (Jagai y col., 2009; Muchiri y col., 2009; Sarkar y col., 2013) y en adultos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana en países desarrollados (Mor y col., 2010); sin embargo, todos estos estudios utilizaron un antígeno nativo parcialmente purificado de *C. parvum* de 17 kDa o antígeno lisado de *C. parvum* en ELISA o inmunotransferencias. También se ha utilizado a la glicoproteína gp15 recombinante de *C. parvum* y *C. hominis* como antígeno en los ELISA (Allison y col., 2011). Entre los niños en Bangladesh, el anticuerpo IgA para gp15 no fue específico de la especie y se asoció con una menor duración de la enfermedad. (Allison y col., 2011).

-

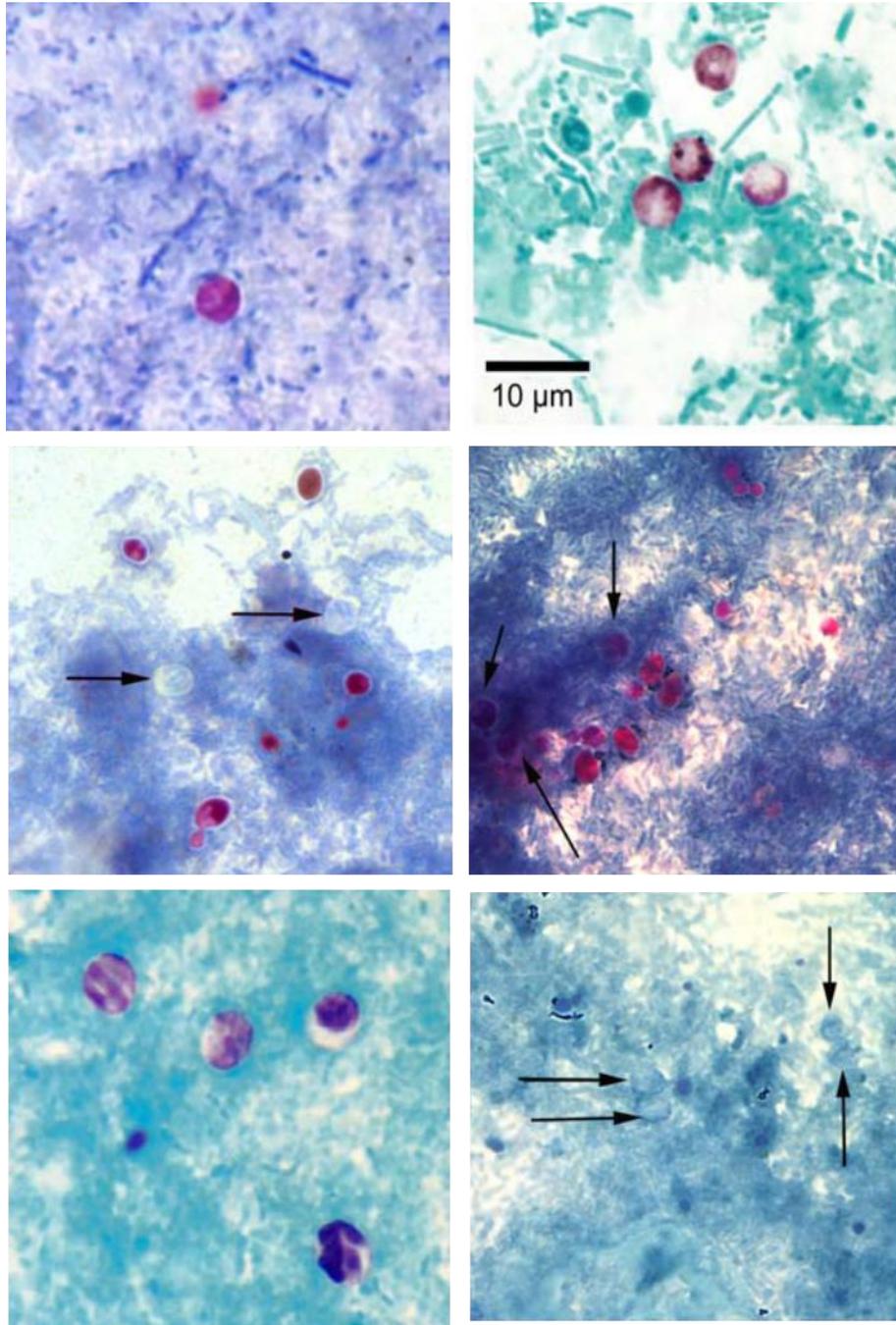


Figura 3. Diagnóstico microscópico de *Cryptosporidium* mediante la tinción de Kinyoun.

Fuente: Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Los ensayos serológicos para *Cryptosporidium* son importantes para los estudios epidemiológicos porque las respuestas de anticuerpos específicas se desarrollan después de una infección sintomática y asintomática (Bouzid y col., 2013; Checkley y col., 2015; Squire e Ryan, 2017). Mientras que las respuestas de IgA son generalmente de corta duración, las respuestas de IgG pueden persistir durante varios meses (Bartelt y col., 2013; Bartelt y col., 2016). El anticuerpo contra Cp23 parece correlacionarse con una infección distante, mientras que las respuestas a Cp17 (también llamadas gp15) sugieren una infección reciente, y las respuestas a P2 se asocian con una infección repetida (Priest y col., 2006). Estos ensayos, adaptados a una plataforma de serodiagnóstico basada en Luminex, se pueden realizar con sangre en papel filtro (Lammie y col., 2012), o con fluido oral (Griffin y col., 2011).

Diagnóstico Molecular

Los métodos basados en PCR se han convertido en herramientas esenciales para la correcta identificación de *Cryptosporidium* spp. tanto en hospederos humanos como en animales, dadas las limitaciones en la detección específica de este protozoo mediante técnicas microscópicas. Los métodos moleculares se utilizaron inicialmente para la diferenciación de especies de *Cryptosporidium* mediante el uso de marcadores genéticos que tienen una variación de secuencia interespecífica/intraespecífica relativamente baja, proporcionando la base para la clasificación actual de los miembros dentro del género (Jex y col., 2008).

La introducción de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporciona un diagnóstico específico a nivel de especie con alta sensibilidad. La PCR permite el examen rápido, repetible y de alta precisión, con la capacidad de analizar un gran número de muestras (Fayer y col., 2000; Xiao, Morgan, y col., 2000). Una variedad de *loci* de genes se utilizan en el diagnóstico *Cryptosporidium*, incluyendo la pequeña subunidad del rRNA (también conocido como 18S ARNr) (Xiao y col., 1999; Valenzuela y col., 2014; González-Díaz y col., 2016), la proteína de choque térmico (gen *HSP70*)

(Sulaiman y col., 2000), el gen de la proteína de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP) (Patel y col., 1999; Valenzuela y col., 2014), la glicoproteína GP60 (Xiao, 2010; Valenzuela y col., 2014; Urrea-Quezada y col., 2017), el gen para la proteína adhesiva relacionada a tromboespondina de *Cryptosporidium*-1 (TRAP-C1) (Spano y col., 1998) y el gen de la actina (Sulaiman y col., 2002).

Sin lugar a dudas, los marcadores moleculares están en la vanguardia en los estudios de *Cryptosporidium* spp. El gen *SSU rRNA* ha sido el marcador genético utilizado con mayor frecuencia para la identificación del parásito *Cryptosporidium* (Šlapeta, 2013). Una herramienta de uso común de PCR-RFLP utiliza la amplificación de un fragmento hipervariable de 830 pb del gen ribosomal y el uso de las enzimas de restricción *SspI* y *VspI* para la genotipificación. El uso generalizado del gen *SSU rRNA* en la genotipificación de *Cryptosporidium* se debe principalmente a la naturaleza multicopia del gen y la presencia de las regiones semiconservadas e hipervariables, que facilitan el diseño de cebadores específicos para el género (Xiao y col., 2009; Valenzuela y col., 2014). Estas herramientas son cada vez más utilizadas en los estudios epidemiológicos de la criptosporidiosis en las zonas endémicas, lo que ha mejorado significativamente la comprensión de la transmisión de la criptosporidiosis en humanos y animales (Xiao, 2010).

Prevención

Las medidas profilácticas son de gran importancia en el control de la criptosporidiosis. Debido a que la transmisión se produce principalmente a través del contacto directo y el consumo de agua contaminada, las medidas generales de higiene y el tratamiento del agua de consumo constituyen las principales medidas de prevención (Del Cocco y col., 2009). La eliminación de este microorganismo de las aguas constituye un desafío permanente para las plantas de tratamiento, aún en países con tecnología avanzada (Dillingham y col., 2002).

Por otro lado, para las personas inmunocomprometidas, las mejores medidas de profilaxis son las buenas prácticas de higiene, evitar la recreación en albercas públicas, evitar el consumo de aguas superficiales no potabilizadas y evitar el contacto con heces de animales. En hospitales, laboratorios y centros de atención de la salud debería minimizarse el contacto con fuentes de infección; esto implica el aislamiento de personas infectadas, el manejo cuidadoso de todo material biológico peligroso, la correcta gestión y disposición de residuos biológicos (Del Coco y col., 2009; Rossle y col., 2013).

Respuesta Inmune Humana a la Infección por *Cryptosporidium*

Durante la infección por *Cryptosporidium*, las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas desempeñan un papel crítico en la eliminación del parásito (Del Coco y col., 2009). La mayor parte de la información sobre las interacciones hospedero-patógeno y las respuestas inmunes a este parásito protozoario provienen de estudios con modelos de ratones infectados con *Cryptosporidium* (Rossle y col., 2013). La respuesta inmune es lo que define la característica fisiopatológica presentada en cada paciente con criptosporidiosis; por lo que conocer los diversos procesos y actores que intervienen en la misma, permitirá generar estrategias de prevención, tratamiento y vacunación. Evidencia de estudios *in vitro* e *in vivo* indican que tanto la inmunidad innata como la adaptativa participan en la resolución y la resistencia a la criptosporidiosis; esto debido a que *Cryptosporidium* puede sobrevivir a la respuesta inmune innata montada por el hospedero durante las primeras etapas de la infección (Wilhelm e Yarovinsky, 2014; Olsen y col., 2015).

Inmunidad Innata

En la inmunidad innata participan principalmente células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DCs), macrófagos, quimiocinas/citosinas/interleucinas (IL), receptores tipo Toll (TLR), péptidos antimicrobianos (β -defensinas), radicales de oxígeno y nitrógeno

(NO) (Chassin e Hornef, 2011); los cuales constituye un sensor primario en la detección del parásito.

Las células epiteliales son células centinelas en la mucosa del tracto gastrointestinal, equipadas con varios mecanismos de defensa para combatir patógenos, como la inducción de apoptosis y producción de péptidos antimicrobianos y quimiocinas para el reclutamiento de células inmunes al sitio de la infección. Las células epiteliales expresan una variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de patógenos, en la superficie celular y en endosoma cuentan con receptores tipo Toll (TLR) y, receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLR). Esos PRR pueden reconocer patógenos o patrones moleculares asociados a patogenicidad (PAMPs) (Laurent e Lacroix-Lamandé, 2017).

Los enterocitos conforman mayormente el epitelio intestinal y éstos son las células blanco de los estadios invasivos del parásito (zoítos) (Chen e Larusso, 2000); desempeñan un doble papel en la protección de la superficie de la mucosa ayudando a mantener la homeostasis y promoviendo la inflamación después de la lesión de la mucosa (Santaolalla e Abreu, 2012).

Los enterocitos poseen TLRs, particularmente TLR2 y TLR4 (Hug y col., 2018), los cuales reconocen diversos ligandos asociados a la patogenicidad de diversos microorganismos, entre los cuales se encuentra *Cryptosporidium* (Yang y col., 2015). También poseen receptores de reconocimiento de nucleótidos tipo NOD (NLR) que también reconocen al parásito; así como las moléculas MHC I y MHC II que participan en la presentación de antígenos. Los enterocitos son una fuente de IL-18 (quimioatrayente de neutrófilos), cuya producción se aumenta en la infección, las que a su vez estimulan la expresión de moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1) en el epitelio intestinal, lo que facilita el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección (Barragan y col., 2005).

El interferón gamma (IFN- γ) estimula a los macrófagos para que produzcan óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y así se activa la cascada de proteínas quinasas SAPK activadas por estrés (JNK), lo que culmina en la activación de la cascada apoptótica,

resultando la muerte celular (Leitch e He, 2012). Recientemente se demostró que la producción de NO por los enterocitos es dependiente del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Figura 4) (Zhou y col., 2014).

Los esporozoítos de *Cryptosporidium* es el primer estadio que se adhiere a los enterocitos mediante las proteínas de superficie que conforman el complejo apical (gp900, gp60, p23, TRAP-C1, TSP2-12, CP47, CPs-500, CSI, CpMuc4, CpMuc5, CPMIC1 y lectina p30-Gal/GalNAc) (Bhat y col., 2007; Bouzid y col., 2013), las cuales son reconocidas principalmente por TLR2 y TLR4 (Costa y col., 2011).

La unión del parásito a los enterocitos induce la activación de los TLRs, lo que desencadena la transducción de señales (MyD88) que permite la migración hacia el núcleo del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Fayer, 2004), lo que genera la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-2, IL-4, IFN- γ , IFN- β , TNF- α) (McDonald y col., 2013), las cuales estimulan la producción de factores solubles que incrementan la secreción de iones de cloro y moléculas de agua, y disminuyen la absorción de iones de sodio resultando en diarrea osmótica (Vanathy y col., 2017). El interferón beta (IFN- β) juega un papel importante en la inmunidad innata activando los macrófagos para que produzcan NO que a su vez activa la vía de señalización del estrés (JNK) (Vanathy y col., 2017).

Los enterocitos no solo proporcionan la primera y rápida defensa contra la infección por *Cryptosporidium*, sino que también moviliza células efectoras inmunes (linfocitos, macrófagos, neutrófilos) al sitio de la infección para activar la inmunidad adaptativa (O'hara e Chen, 2011). El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IFN- γ , y la IL-2 son importantes para la resistencia y eliminación de la infección de *C. parvum* (Coutinho y col., 2008; Costa y col., 2011). En estudios previos mostraron que ratones malnutridos destetados tuvieron una mayor susceptibilidad a la infección en comparación con los animales control; lo cual se relacionó con la expresión intestinal agotada de TLR2 y TLR4, pero no de TLR9 (Costa y col., 2011).

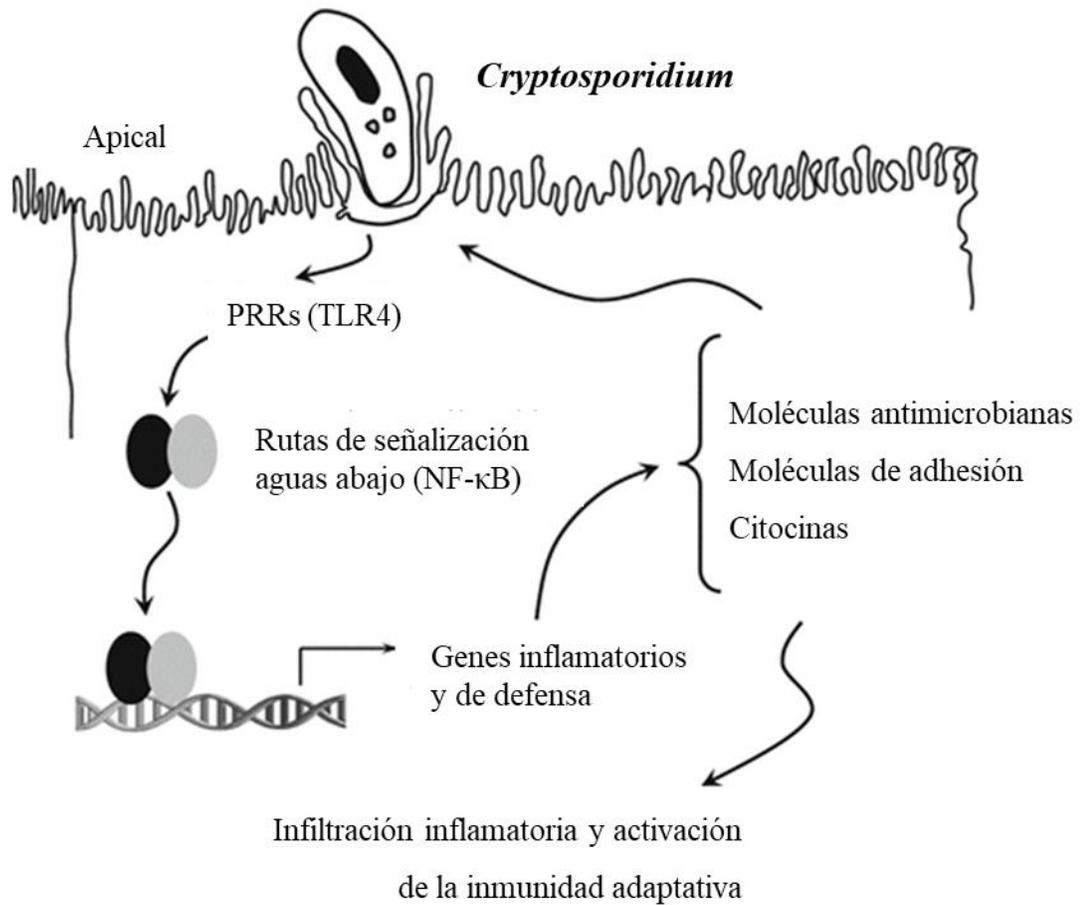


Figura 4. Producción y liberación de moléculas efectoras derivadas de células epiteliales. Esencial para la activación de la inmunidad anti-*Cryptosporidium* de la mucosa.

Fuente: (Zhou y col., 2014)

Las células epiteliales intestinales y las células epiteliales del conducto biliar (llamadas colangiocitos), responden diferente a la infección por *Cryptosporidium*; lo cual se podría explicar debido a que la exposición persistente de la microbiota en los enterocitos favorece la regulación (homeostasis) de la señalización de TLR, lo cual evita una respuesta inflamatoria crónica en el intestino, a diferencia de lo que sucede en conductos biliares (Pinto y col., 2018). En estudios recientes se ha relacionado la desnutrición con la disbiosis y el impacto de la misma en estos pacientes (Leung y col., 2018). El NF- κ B está involucrado en la expresión de la enzima iNOS, presente en las células de la superficie y del subepitelio intestinal y encargada de la producción de NO. Dicha sustancia, de conocida actividad citotóxica, afecta la viabilidad de los esporozoítos de *Cryptosporidium in vitro* (Gookin y col., 2006). El NF- κ B promueve la expresión de moléculas proinflamatorias tales como prostaglandinas (PG), lo que estimula la producción de mucina y participa en la regulación de la respuesta celular T (O'hara e Chen, 2011). La β 2 defensina, una sustancia que ayuda a proteger al epitelio intestinal ante la invasión, también se ve aumentada en este contexto, a diferencia de su homónima α 1 defensina (Del Coco y col., 2009). Durante el curso de la infección se producen las siguientes moléculas: IL-8, oncogén relacionado con el crecimiento alfa (GRO α), quimiocina ligando 5 (CCL5), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y proteína inflamatoria macrofágica-2 α (MIP-2 α). Estas sustancias presentan función quimiotáctica. Diferentes tipos celulares (linfocitos T, NK, DC, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos) serán atraídos hacia el sitio de infección según interacciones específicas entre dichas moléculas y sus receptores (Perera y col., 2012). Las células que son reclutadas hacia el intestino en mayor cantidad son linfocitos, macrófagos y neutrófilos, aunque estos últimos no tendrían una función muy relevante en el control de *Cryptosporidium* spp. (Choudhry y col., 2008).

En cuanto al complemento, la lectina unida a manosa (MBL) y el componente C4 se unen a la superficie del esporozoíto y bloquean la adherencia del parásito a las células epiteliales y activan el complemento (Mcdonald y col., 2013; Checkley y col., 2015).

Las células NK, activadas por células dendríticas y macrófagos, presentan actividad antimicrobiana mediante la lisis por citotoxicidad que desencadenan sobre las células infectadas y la producción de citocinas proinflamatorias que estimulan mecanismos antimicrobianos de otras células en el sitio de infección (McDonald y col., 2013). Una citocina clave producida por las células NK para el control de infecciones intracelulares es el IFN- γ , este es un mediador crítico de las respuestas innatas y adquiridas frente a la infección por *Cryptosporidium* (Riggs, 2002; Lean y col., 2006; McDonald y col., 2013). Algunos estudios recientes sugieren que el IFN- γ , inducido por el TNF α actúa directamente estimulando al enterocito a generar resistencia contra la infección (Deng y col., 2004).

Inmunidad Específica

Tanto la inmunidad humoral como la celular son importantes en el control de la criptosporidiosis; sin embargo, la inmunidad celular es fundamental en la mucosa intestinal. El control inmunológico de la infección depende de la inmunidad Th1 (IFN- γ , células T α/β y T γ/δ fundamentalmente células T CD4⁺). Las CD8⁺ parecen ser irrelevantes en el control de la infección (McDonald, 2000; McDonald y col., 2004; Ehigiator y col., 2007).

La inmunidad adaptativa se da principalmente por las respuestas de las células T y B, anticuerpos y citocinas (Borad e Ward, 2010). Las células Th1 actúan contra los parásitos intracelulares al producir IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-12 y TNF, y las células Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, y la IL-10), las cuales ayudan en la eliminación del parásito (Trinchieri, 2007) y las células Th17 (IL-23) participan en la inmunidad anti-*Cryptosporidium* (Zhao y col., 2014). La susceptibilidad o resistencia a la infección por *C. parvum* depende de delicado equilibrio entre la producción de citocinas Th1 necesarias para controlar el crecimiento del parásito y las citocinas Th2 limitan la patología. La IL-18 parece estar involucrada en la regulación de las respuestas Th1/Th2 en la infección por *C. parvum*.

Personas con un recuento de CD4 muy bajo, tienen más gravedad de la infección que con un recuento de CD4 mayor a 200 células/mm³ (Leitch e He, 2012).

Individuos infectados por *Cryptosporidium* montan una respuesta Th2 mediada por anticuerpos específicos para el parásito. Se han detectado IgG, IgM, IgA e IgE en suero y mucosa de humanos y animales infectados y convalecientes (Chen e Larusso, 2002). En pacientes con SIDA con criptosporidiosis crónica se han detectado altos niveles de anticuerpos. La IgA en la mucosa puede ayudar la respuesta inmune celular mediante el recubrimiento de las superficies de las etapas infectivas y prevenir la adhesión a las células epiteliales; sin embargo, diversos estudios han demostrado que ratones con depleción de células B pudieron resolver la infección por *Cryptosporidium*. Sin embargo, la IgA secretoria colaboraría en el control de la infección bloqueando la entrada de los estadios luminales del parásito (Laurent y col., 1999).

La respuesta de anticuerpos después de la infección por *Cryptosporidium*, alcanza un máximo dentro de 3 a 9 semanas y desaparece hasta la línea basal de 5-6 meses (Groves y col., 1994; Ajjampur y col., 2011). La respuesta inmune humoral y celular mediada por el IFN- γ inducida por la gp15 (17 kDa) de *Cryptosporidium* se considera que ofrece protección (Preidis y col., 2007). El papel de la inmunidad humoral en pacientes con SIDA con infección por *Cryptosporidium* es dudoso; sin embargo, se presentan títulos altos de IgG/IgA, así como IgA en mucosa (Leitch e He, 2012). Las células T CD4⁺ son el principal componente de la lámina propia. Constituyen la primera línea celular que desciende en la infección por el VIH (Okhuysen y col., 2002). Es sabido que los pacientes con SIDA, cuyo recuento de células CD4⁺ se encuentra muy disminuido, padecen formas graves e incluso letales de criptosporidiosis (Mcdonald, 2000).

El número de células T aumenta considerablemente con la presencia del parásito en el tracto intestinal. Estas células inducen, a través de la secreción de diversas citocinas proinflamatorias, profundas alteraciones estructurales de la mucosa, tales como atrofia de las vellosidades e hiperplasia críptica. Se ha informado un incremento en el número de linfocitos T y B durante la infección. Las placas de Peyer son sitios clave en el inicio de

la respuesta inmune adaptativa (Jung y col., 2010). Existen células epiteliales especializadas denominadas células M, las cuales transportan antígenos particulados desde la luz intestinal al tejido linfoide, donde serán fagocitados por células dendríticas para ser presentados posteriormente a las células T. Se han detectado *Cryptosporidium* spp. en los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM). Se cree que éstos también son sitios disparadores de la respuesta inmune adaptativa (Mcdonald, 2011).

En la infección por *Cryptosporidium*, la secreción de citocinas (IL-8 e IL-18) por parte de las células epiteliales produce un gran reclutamiento de células T activadas hacia la lámina propia provenientes de las placas de Peyer, vía NLM y a través de la circulación (Mcdonald y col., 2006). Los resultados de un estudio en Bangladesh mostraron que los pacientes con infección tenían mayores títulos de IgG, IgM e IgA en suero anti- Cp23 que los pacientes sanos, y las respuestas nuevamente se conservaron en varios subtipos y se asociaron con una enfermedad más corta (Borad y col., 2012; Checkley y col., 2015).

Proteínas Recombinantes

El ácido desoxiribonucleico (ADN) contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas. El descubrimiento del código genético abrió la posibilidad de obtener péptidos y/o proteínas a gran escala a partir de diversos organismos en los cuales no se producen de manera natural. A las proteínas obtenidas de esta manera se les conoce como proteínas recombinantes. Estas se pueden producir en microorganismos como bacterias, hongos, virus y levaduras, así como en líneas celulares cultivables de insectos, plantas y de mamíferos (Jonasson y col., 2002; Palomares y col., 2004), sistemas de expresión de proteínas “sin células” y también en animales y plantas transgénicas (Farrokhi y col., 2009). La producción de proteínas recombinantes surgió a principios de la década de 1980, con el objetivo de superar las limitaciones impuestas por la extracción de fuentes naturales. Por ejemplo, los primeros productos farmacéuticos comerciales, la insulina humana y la hormona del crecimiento, se produjeron inicialmente utilizando la bacteria *Escherichia coli* como hospedero. Más tarde, la insulina humana se convirtió en el primer

medicamento con licencia creado con técnicas de ingeniería genética en 1982 (Baeshen y col., 2014).

La sobreexpresión de proteínas recombinantes ofrece la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína de interés con características similares a la proteína natural y de manera relativamente fácil y rápida. Esta tecnología cuenta con al menos 35 años y por su aplicación tanto en la industria farmacéutica y alimentaria, como en la investigación científica, se encuentra entre los desarrollos más importantes del siglo XX (Porro y col., 2005). El procedimiento para producir una proteína recombinante consiste en introducir el ADN que codifica para la proteína de interés en un vector de sobreexpresión (plásmidos, virus, cósmidos). El vector contiene un origen de replicación que le permite copiarse dentro de la célula hospedera, una región promotora que permite la producción de la proteína de interés, un sitio de clonación múltiple (SCM), que es una región que con tiene diversos sitios de restricción que permiten la inserción de ADN entre ellos y en algunos casos, genes de resistencia a antibióticos y genes reporteros, que facilitan la selección de las colonias de bacterias que tendrían el vector con la información genética insertada.

Sistemas de Expresión

Se han desarrollado una gran variedad de sistemas de expresión, tanto procariontes como eucariontes para la producción de proteínas recombinantes. Los organismos más utilizados son: bacterias, levaduras, insectos, plantas y células de mamíferos (Basile e Peticca, 2009). En algunos de ellos se utiliza el microorganismo completo (por ejemplo: *E. coli*) y en otros se utilizan células derivadas del organismo (por ejemplo: cultivos vegetales, células de insecto o de mamífero) o bien, se puede implementar la expresión de proteínas libre de células.

Los sistemas más utilizados para la producción de proteínas recombinantes en EUA y Europa son los microorganismos, en un 55% (del cual 39% corresponde a *E. coli*

y un 15% a levaduras) y células de mamífero, específicamente células de ovario de hámster (CHO), con un 35% (Rader, 2008).

La bacteria *E. coli* es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales, por procedimientos relativamente baratos, ya que ha sido muy bien caracterizada desde el punto de vista genético y fisiológico (Ferrer y col., 2009). Algunas ventajas que ofrece son su rápida reproducción, utiliza medios de cultivo relativamente baratos, buen manejo en fermentaciones de alta densidad y fácil escalamiento. Además, ha sido uno de los organismos más utilizados como modelo de estudio, debido a esto se ha sido caracterizado ampliamente y se han desarrollado numerosas herramientas que han facilitado su clonación y expresión genética (Baneyx y Mujacic, 2004).

A pesar de la importancia y al amplio uso de la tecnología de proteínas recombinantes tanto en la industria farmacéutica como en la investigación, aún no se cuenta con una estrategia infalible para la obtención de PR.

Se han analizado una gran cantidad de variables y factores en el proceso de producción (temperatura, pH, oxígeno, cepas hospederas etc.) que se sabe están estrechamente relacionados con el rendimiento e integridad de la proteína recombinante. También se ha evaluado la importancia de la composición del medio de cultivo (concentración, tipo y consumo de nutrientes, etc.) (Holmes y col., 2009), por lo que es necesario establecer experimentalmente las condiciones óptimas para cada proteína recombinante.

Algunos insertos que codifican para proteínas eucariontes contienen codones (codones raros) cuyos tripletes no se presentan naturalmente en *E. coli*, por lo que es necesario modificar la secuencia del inserto para incluir los codones que si se presentan en la bacteria. Una alternativa es usar las cepas de Novagen®, Rosetta™, Rosetta-Blue™ y Rosetta-Gami™, que contiene los tripletes para los codones raros (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Otras líneas celulares, como Origami™ y Origami™B presentan una mutación en los genes *trxB* y *gor* que favorecen la formación de puentes disulfuro en el

citoplasma. Algunos ejemplos de PR producidas en esta bacteria son proteínas para usos industriales, como renina, amilasas, proteasas y celulasas, proteínas terapéuticas, como insulina, hormonas de crecimiento e interferones, entre muchas otras (Lesley y Wilson, 2005). Otras bacterias que también han sido utilizadas como modelo para la producción de PR son: *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis*, pero en menor grado (Morello y col., 2008; Nijland y Kuipers, 2008).

Otro de los organismos utilizados para producir PR son las levaduras. Las más usadas son *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*, en las cuales se han expresado cientos de proteínas diferentes (Cregg y col., 2000; Mattanovich y col., 2004; Porro y col., 2005). Generalmente las levaduras, al igual que las líneas celulares de insectos y mamíferos se utilizan para sobreexpresar proteínas que son tóxicas o que no se pueden plegar correctamente en *E. coli* (Kost y col., 2005; Oker-Blom y Vuento, 2003). Además, estos sistemas pueden realizar modificaciones post-traduccionales, excretar la PR al medio de cultivo y también se obtienen rendimientos mayores al 50% (Gräslund y col., 2008).

Proceso de Purificación

La selección del tipo y los pasos del proceso de purificación dependen directamente de la clonación, el hospedero de expresión y la localización intra o extracelular de la proteína de interés, con el resultado final de obtener la proteína deseada con la pureza y la actividad biológica requerida y todo esto dentro de costos aceptables.

Una vez elegido el sistema de expresión, se debe evaluar el proceso de purificación con el que se va a trabajar. Este paso es crítico porque es el punto que representa mayores costos en la producción de proteínas recombinantes (Basile e Peticca, 2009).

Los métodos de separación de moléculas biológicas están basados en la diferencia de la carga, tamaño y afinidad. Con base en estas características se han desarrollado seis estrategias de purificación principales: precipitación diferencial, filtración de membrana,

filtración en gel, intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrofóbicas y cromatografía de afinidad.

Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados

En 1975 Porath, Carlsson, y Olsson introducen la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography ó IMAQ como una nueva tecnología para el fraccionamiento de proteínas (Porath y col., 1975). En la década de 1980 Eugene Sulkowski pasa la IMAC de un papel empírico a una herramienta analítica y en 1989 él mismo concluye que la afinidad de una proteína por un ion metálico inmovilizado incrementa con el número de residuos de histidina accesibles y que la retención varía con el ión metálico empleado (Hemdan y col., 1989).

El principio de este mecanismo se basa en el enlace coordinado de un ion metálico unido covalentemente a un agente quelante, con una proteína que tiene histidinas. La cromatografía de afinidad permite separar moléculas específicas a partir de una mezcla compleja de proteínas presentes en un medio de crecimiento.

Los sistemas de purificación que utilizan etiquetas de afinidad nos dan las ventajas de permitir, en algunos casos, la purificación de una proteína en un solo paso, con un efecto mínimo tanto en la estructura terciaria de la proteína como en su actividad biológica, siendo aplicable a un gran número de proteínas.

Etiqueta de poli-Histidinas

La etiqueta de poli-histidina es uno de los sistemas de etiquetado de proteínas más usados, estando basado en la afinidad de múltiples histidinas (de 4 a 10) en tándem, con iones metálicos inmovilizados que pueden ser Ni^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} ó Zn^{+2} . Los metales son retenidos por agentes quelantes (es comúnmente usado el ácido nitrotriacético Ni-TA) con grupos reactivos, unidos covalentemente a un soporte sólido. Una etiqueta de histidinas fusionada a la proteína de interés se une a los cationes divalentes del ion (Ni^{+2} , por ejemplo),

inmovilizados en la resina de la columna de afinidad. Las proteínas que no se unen se eluyen y la proteína de interés es recobrada posteriormente por elusión con imidazol o reduciendo el pH. Los residuos de histidina en una secuencia de poli-histidina tienen un pKa de 6 y es protonado cuando el pH es reducido a 4.5-5.3. Bajo estas condiciones la proteína etiquetada no puede unirse a los iones y se disocia de la resina.

La purificación de proteínas con etiqueta de poli-histidinas se ha llevado con éxito a cabo en diversos sistemas de expresión como bacterias (Chen e Hai, 1994), levaduras, células de mamífero (Janknecht e Nordheim, 1992) y células de insecto infectadas con baculovirus (Kuusinen y col., 1995), y en la mayoría de estos trabajos se destaca la purificación de las proteínas recombinantes en uno o muy pocos pasos.

Hasta hoy no ha sido descrita con exactitud la relación entre la reactividad del anticuerpo contra los antígenos recombinantes gp40 y gp15 y el resultado de la infección. Por lo tanto, este estudio es una oportunidad para caracterizar molecularmente el genotipo infectante de *Cryptosporidium* en pacientes sintomáticos y asintomáticos, así como analizar su respuesta humoral a proteínas recombinantes de los antígenos de superficie gp40 y gp15 del parásito en nuestra población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación del Genotipo Infeccionante de *Cryptosporidium* spp.

Sujetos de Estudio y Tamaño de Muestra

Se llevó a cabo un estudio de casos (Ca) y controles (Co). Se incluyeron 39 casos y 47 controles. Para el cálculo del tamaño se aplicó la fórmula de Schlesselman por ser un estudio de casos y controles (Schlesselman, 1982). El muestreo se llevó a cabo en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y en el Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez” (CMDICH), en la ciudad de Hermosillo, Sonora en los cuales el proyecto de investigación fue aprobado por los comités de ética: HIES (13 de enero del 2015) y CMDICH (29 de enero del 2015). El proyecto se registró ante la Secretaría de Salud del Estado de Sonora (registro no. 196).

Criterios de Inclusión

Se incluyeron hombres y mujeres de edad indistinta. Los pacientes interesados en participar firmaron una carta de consentimiento informado. El grupo de “casos” fueron pacientes sintomáticos y asintomáticos con *Cryptosporidium*, este hallazgo determinado por los estudios moleculares (PCR del gen SSU y GP60 y electroforesis) positivos. Los controles eran pacientes no parasitados con *Cryptosporidium* (PCR del gen SSU y GP60 y electroforesis negativo).

Criterios de Exclusión

Se excluyeron del estudio aquellos casos que se encontraban coinfectados con *G. lamblia* y/o *E. histolytica*, diagnosticados mediante estudios coproparasitoscópicos (CPS) y confirmados por PCR. Esto debido a que también estos parásitos pueden generar trastornos gastrointestinales (TGI).

Tratamiento de Muestras de Sangre

El suero se obtuvo a partir de sangre venosa (5 mL) sin anticoagulante, la cual se centrifugó a 2000 *xg* a 25 °C; el suero colectado se almacenó en congelación a -80 °C hasta el momento de su utilización (por paciente se obtuvo en total una muestra de suero).

Tratamiento de las Muestras de Heces

A cada muestra de heces proporcionada por los pacientes se le realizó el estudio coproparasitológico (CPS 3), para determinar la presencia de parásitos intestinales y la tinción de Kinyoun, para identificar los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Para la tinción de Kinyoun se elaboró un frotis delgado de la muestra de heces, se dejó secar y se fijó con calor. Se colocó el portaobjetos en una gradilla para teñir y se fijó con metanol durante 5 seg, se cubrió con fucsina básica al 1% durante 2 min y se lavó con agua. Se decoloró con ácido sulfúrico al 10% y se lavó nuevamente. Se cubrió con verde brillante al 1% durante 30 seg para lograr una coloración de contraste, se lavó con agua y se dejó secar al aire. Se observó al microscopio con aceite de inmersión en el objetivo 100x en busca de ooquistes (Henriksen and Pohlenz 1981).

Extracción del ADN

Se realizó a partir de una alícuota de heces, siguiendo el protocolo del kit QIAamp DNA Stoll Mini Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA). Se determinó la concentración y la calidad del ADN genómico obtenido por espectroscopia de luz ultravioleta (λ 260/280) y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el ADN genómico obtenido se realizaron amplificaciones mediante PCR primaria y PCR anidada de los genes *SSU rRNA* (Xiao y col., 2001) y *GP60* de *Cryptosporidium* spp.

PCR primaria. Se etiquetó un tubo como mezcla de reacción y se añadieron los reactivos por orden: 28.1 μ L de agua, 5.0 μ L de amortiguador 10X, 3.0 μ L de MgCl₂ (25

mM), 2.0 μ L de albúmina sérica bovina (10 mg/mL), 8.0 μ L de dNTP (1.25 mM), 1.3 μ L de iniciador F1 (10 μ M), 1.3 μ L de iniciador R1 (10 μ M) y 0.3 μ L de *Taq* Polimerasa (2.5 U/ μ L). Se multiplicaron todas las cantidades de los reactivos por el total de muestras a amplificar con objeto de que al realizar esta mezcla se tenga la cantidad exacta de los reactivos que conforman la mezcla de reacción y sea la cantidad adecuada para que se pueda llevar a cabo la amplificación. Se colocaron 49 μ L de la mezcla de reacción a cada tubo de PCR y se agregó 1 μ L de ADN extraído de la muestra a cada tubo. Se etiquetaron los tubos controles y los tubos de las muestras, y se colocaron en el termociclador. Se realizaron 35 ciclos de amplificación (94 °C durante 45 seg, 55 °C durante 45 seg, y 72 °C durante 1 min), con una temperatura inicial de 94 °C por 3 min y una extensión final de 72 °C durante 7 min. Los iniciadores que se utilizaron en la amplificación primaria para el gen *SSU rRNA* fueron: iniciador F1 (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') y el iniciador R1 (3'-CCCATTTC CTTCGAAACAGGA-5'), obteniendo un amplicón de 1322 pb (Xiao y col., 1999); para el gen *GP60*: iniciador F1 (5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3') y el iniciador R1 (5'-GGAAGGAACGATGTATCT-3'), obteniendo un amplicón de 933 pb (Alves y col., 2003).

PCR anidada. Se etiquetó un tubo como mezcla de reacción y se añadieron los reactivos por orden: 26.5 μ L de agua, 5.0 μ L de amortiguador 10X, 3.0 μ L de MgCl₂ (25 mM), 8.0 μ L de dNTP (1.25 mM), 2.6 μ L de iniciador F2 (10 μ M), 2.6 μ L de iniciador R2 (10 μ M) y 0.3 μ L de *Taq* Polimerasa (2.5 U/ μ L). Se multiplicaron todos los reactivos por el total de muestras a amplificar. Se añadieron 48 μ L de la mezcla de reacción a cada tubo de PCR y se agregaron 2.0 μ L del producto de la PCR primaria a cada tubo. Se etiquetaron los tubos controles y los tubos de las muestras, y se colocaron en el termociclador. Se emplearon condiciones de PCR estándar, con una desnaturalización de 3 min a 94 °C seguida de 35 ciclos de amplificación (94 °C durante 45 seg, 55 °C durante 45 seg, y 72 °C durante 1 min), finalizando con una elongación de 72°C durante 7 min. Para la PCR anidada, se utilizaron para el gen *SSU rRNA*: el iniciador F2 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGA TAAAG-3') y el iniciador R2 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'), obteniendo un amplicón de 826 a 864 pb

(Xiao y col., 1999); y para el gen *GP60*: el iniciador F2 (5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3') y el iniciador R2 (5'-GCAGAGGAACCAGCATC-3'), obteniendo un amplicón de 899 pb (Alves y col., 2003)|.

Secuenciación

La identificación de los genotipos y subtipos de familias de *Cryptosporidium* se realizó secuenciando los productos de PCR anidado de ambos genes (*SSU rRNA*, y *GP60*), mediante 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, en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Generación de Proteínas Recombinantes

Detección de Ooquistes de *C. parvum* y *C. hominis*

Se tomaron muestras fecales de niños en Hermosillo, Sonora, México. Los ooquistes de *C. parvum* se detectaron mediante el método modificado de Ziehl-Neelsen (ZNM) (Henriksen e Pohlenz, 1981). Los ooquistes se tiñeron de rosa sobre un fondo verde pálido y aparecen como pequeños discos con un diámetro de 4-6 µm, pero el grado y la proporción de la tinción varían con los ooquistes individuales. Se obtuvieron los ooquistes de *C. parvum* del aislado S38 y de *C. hominis* del aislado S37 con criptosporidiosis en Hermosillo, Sonora, previamente caracterizados molecularmente (Urrea-Quezada y col., 2017).

Aislamiento de ADN y Amplificación del Gen *GP15* y *GP40*

Se aisló el ADN genómico de *C. parvum* y *C. hominis* mediante ZR Fecal DNA MiniPrep Extraction Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA) de los aislados seleccionados. El ADN genómico se utilizó como molde en la amplificación de la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) con los cebadores específicos (Tabla IV), a partir de la secuencia nucleotídica consenso (Figura 5) que diseñaron la base en la región sintética de 15 kDa de proteína del gen *gp60/15* y la región de 40 kDa de la proteína del gen *gp60/40* (Alves y col., 2003). La caracterización molecular se realizó mediante el análisis de las secuencias de los productos de PCR para el gen *Gp15* (amplicón de 307 pb) y *Gp40* (amplicón de 532 pb).

Clonación y Expresión de la Proteína Recombinante rCpGP15, rChGP40 y rCpGP40 en *E. coli*

Se seleccionó el ADN genómico del gen *gp15* de *C. parvum* aislado S38 y se clonó en el vector pET100/D-TOPO (Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits, Invitrogen) (Figura 6) de acuerdo con las instrucciones del manual. La construcción (pET100-*Cpgp15*) se verificó por secuenciación para la exactitud, los clones exitosos se purificaron usando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific Inc.). El plásmido así generado (pET100-Cpgp15) se transformó en células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS y luego se cultivó en agar Luria Bertani (LB) que contenía ampicilina. Los clones positivos se selecciona por PCR de colonia en medio sólido usando los cebadores T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y T7 reverso (5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'). El plásmido recombinante se cultivó en medio líquido LB, se incubó a 37 °C y 220 g en una incubadora MAX Q 4000 Benchtop Orbital Shaker (Thermo Fisher Scientific). Se añadieron aproximadamente 5 mL de los clones cultivados durante la noche a 100 mL de caldo LB. Después de que la densidad óptica (OD) alcanzó un valor de 0,6 a una longitud de onda de 600 nm (para obtener la tasa de crecimiento bacteriano), se añadió el promotor de inducción IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración de 1 mM al medio de cultivo, se incubó a 37°C y 220 g durante 16 horas.

Tabla IV. Iniciadores diseñados para la producción de las proteínas recombinantes de 15 y 40 kDa del gen *GP60*

Iniciador	Secuencia	Amplicón
gp15F	5'- <u>CACCCGCGGATCCGAAACCAGTGAAGCTGCTGC</u> -3'	307 bp
gp15R	5'-CGAATAAGGCTGCAAAGATTGC-3'	
gp40F	5'- <u>CACCTTACTCTCCGTTATAGTCTCCGCTG</u> -3'	532 bp
gp40R	5'-TAACTGTATTATCACTCTTTTCG-3'	

ATGAGATTGTCGCTCATTATCGTATTACTCTCCGTTATAGTCTCCGCTGTATTCTCAGCCCCAGCCGTT
CCACTCAGAGGAACTTTAAAGGATGTTCCCTGTTGAGGGCTCATCATCGTCATCGTCATCGTCATCATCAT
CATCATCATCATCATCATCATCATCATCAACATCAACCGTCGCACCAGCAAATAAGGCAAGAAGCTG
GAGAAGACGCAGAAGGCAGTCAAGATTCTAGTGGTACTGAAGCTTCTGGTAGCCAGGGTTCTGAAGAG
GAAGGTAGTGAAGACGATGGCCAAACTAGTGTGCTTCCCAACCCACTACTCCAGCTCAAAGTGAAGGC
GCAACTACCGAAACCATAGAAGCTACTCCAAAAGAAGAATGCGGCACTTCATTTGTAATGTGGTTCGGA
GAAGGTACCCAGCTGCGACATTGAAGTGTGGTGCCTACACTATCGTCTATGCACCTATAAAAGACCAA
ACAGATCCCGCACCAAGATATATCTCTGGTGAAGTTACATCTGTAACCTTTGAAAAGAGTGATAATACA
GTTAAAAATCAAGGTTAACGGTCAGGATTTCAGCACTCTCTGCTAATTCAAGTAGTCCAAGTCAAAAT
GGCGGATCTGCGGGTCAGGCTTCATCAAGATCAAGAAGATCACTCTCAGAGGAAACCAGTGAAGCTGCT
GCAACCGTCGATTTGTTGCCTTTACCCTTGATGGTGGTAAAAGAATTGAAGTGGCTGTACCAAACGTCG
AAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTGGTTGCAGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACA
GCGGCACTACCAATGGTGTCTACAGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAAGGACAACACAGTTC
TTTTGAAGGATGCTGGTTCCTCTGCTTTTGGACTCAGATACATCGTTCCTTCCGTTTTTGCAATCTTTGCA
GCCTTATTCGTGTTGTAA

Figura 5. Secuencia nucleotídica de la proteína S60 de *Cryptosporidium parvum*. Genes de glicoproteína gp40 (negrita y subrayado) y glicoproteína gp15 (subrayado) (Genbank: AF203016).

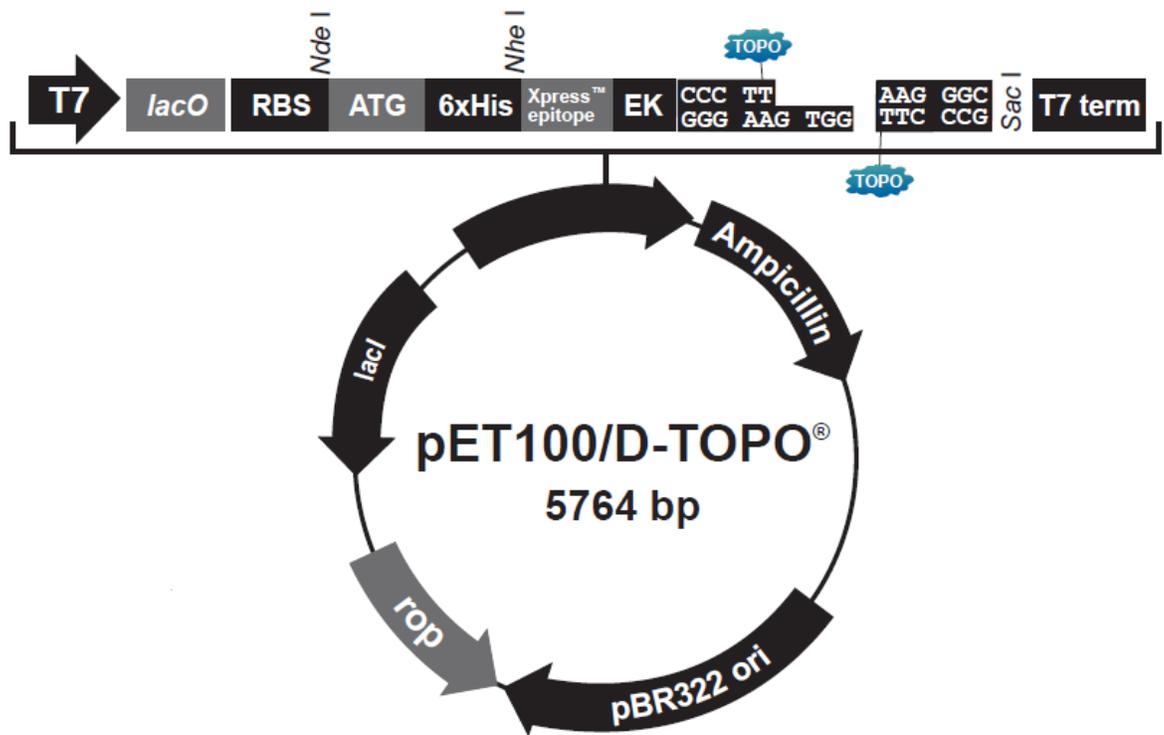


Figura 6. Mapa del vector pET100-TOPO.

Fuente: Manual Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits, Invitrogen.

Las muestras tomadas antes y después de la inducción con IPTG se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones de desnaturalización usando un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™, Bio-Rad Laboratories, Inc.) (Dwr., 2001; Lan Dtb, 2014). Se siguió el mismo procedimiento para el gen *gp40* de *C. parvum* del aislado S38 y el gen *gp40* de *C. hominis* del aislado S37.

Western Blot

Después de la expresión de la proteína recombinante rCpGP15 en *E. coli*, los extractos celulares se transfirieron a un papel de nitrocelulosa usando transferencia de Western blot (Bio-Rad; Mini Protein) y tampón de transferencia. El papel de nitrocelulosa se bloqueó utilizando tampón de fosfato salino (PBS) que contenía 5% de leche (Marca Svelty Total Move, presentación en polvo) durante 16 horas a 4 °C. Después de tres lavados con tampón PBS/Tween 20, la muestra se incubó a 37 °C/200 rpm con el anticuerpo conjugado anti-His (Abcam) en una dilución de 1:2000 por 2 h. Después de tres lavados con tampón PBS/Tween 20, se usó el sustrato de fosfatasa alcalina (SIGMAFAST™ BCIP® / NBT, Sigma-Aldrich Co.) para la detección. Después de la interacción de conjugación del sustrato y la aparición de la banda de proteína en papel de nitrocelulosa, la reacción se detuvo usando agua miliQ.

Purificación de Proteínas

La proteína recombinante CpGP15 se purificó mediante una columna HisTrap™ FF (1 mL) (GE Healthcare Life Sciences) mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los restos celulares obtenidos por centrifugación de 2 L se lavaron con PBS, pH 7,2. El sedimento se resuspendió en tampón A (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, imidazol 40 mM, a pH 7,4). Las células bacterianas se lisaron mediante sonicación discontinua (pulso de 10 seg/15% amplitud/hielo)(Branson Sonifier®). Los restos celulares se aclararon por centrifugación a 11,000 g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se cargó en una columna equilibrada HisTrap de 1 mL conectada a un

purificador AKTA (GE Healthcare). La columna se lavó con 10 mL de tampón B (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, imidazol 500 mM, a pH 7,4) y la proteína se eluyó usando un gradiente de imidazol 500 mM, con una tasa de flujo de 1 mL/min. Las fracciones que contenían la proteína recombinante CpGP15 se combinaron y desalaron utilizando una columna PD-10 (GE Healthcare Life Sciences™). La proteína eluida se desnaturalizó para electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. La concentración de la proteína expresada se determinó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Bradford, 1976; O'connor y col., 2003).

ELISA

Una vez generada la proteína recombinante se consideró para el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) como se describió por el método de Priest (Priest y col., 2005), donde se usó suero humano con proteína recombinante CpGP15. Se usaron las muestras de suero de los pacientes con criptosporidiosis con los diferentes genotipos infectantes: *C. parvum*, *C. hominis* y *C. canis* de pacientes de Hermosillo, previamente identificados por análisis de PCR-RFLP del gen SSU rRNA y secuenciación de ADN del gen gp60 (González-Díaz y col., 2016; Urrea-Quezada y col., 2017). Para llevar a cabo este ensayo se anclaron 0,5 µg de proteína recombinante CpGP15 a los pozos de la placa de ELISA, se incubó a 4 °C por 16 h, con agitación lenta y constante, en cámara húmeda. Después de tres lavados con tampón PBS/Tween 20, se bloqueó con 5% de leche en PBS-Tween 20 y se incubó por 4 h a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron tres lavados con tampón PBS/Tween 20, y se agregó el suero (anticuerpo primario) de los casos y los controles en una dilución 1:100 por 1 h en agitación constante. Después de tres lavados con tampón PBS/Tween 20, se agregó el anticuerpo anti IgG-humana con peroxidasa en una dilución 1:1000 por 1 h a temperatura ambiente. Seguido se agregó el sustrato TMB (tetrametil-bencidina) (Thermo Scientific™) por 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se agregó H₂SO₄ 1M para detener la reacción. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de microplacas para absorbancia (IMARK, BIO-RAD).

Análisis Estadístico

El análisis descriptivo y analítico de las variables incluidas en el estudio se llevó a cabo mediante el Programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 20) y GraphPad Prism.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sujetos de Estudio y Tamaño de Muestra

Se incluyeron 39 casos y 47 controles; los cuales se reclutaron tanto del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y en el Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez” (CMDICH) (Tabla V).

El grupo de casos estuvo conformado por 39 infantes, menores de 10 años (51% del género masculino). El 92% de ellos (36/39) fueron reclutados del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES); 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 y bronquiolitis. El 8% de ellos (3/39) 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, otro por gastroenteritis aguda (GEA) y el último por infección de vías urinarias (IVU).

El grupo control fue conformado por 47 sujetos, el 47% fueron del género femenino. Dieciséis de ellos fueron reclutados del Servicio de Infectología del HIES, contaban de 1 mes a 13 años de edad; todos ellos con diagnóstico de ingreso de diversas infecciones: neumonía (10/16), GEA (3/16), anemia (1/16), candidiasis (1/16) y sepsis (1/16). Treinta y uno de los controles se reclutaron del CMDICH (1-65 años), no se determinó el diagnóstico de ingreso en ninguno de ellos.

Identificación del Genotipo Infeccioso de *Cryptosporidium* spp.

En este estudio se caracterizaron los aislados de pacientes en los cuales se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* por microscopía en muestras de heces teñidas por el método de Kinyoun (Ziehl-Neelsen modificado).

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

	N	Sexo	
Casos	39	F	M
CMDICH	4 (10%)	2 (5%)	2 (5%)
HIES	35 (90%)	17 (44%)	18 (46%)
Controles	47	F	M
CMDICH	32 (68%)	16 (34%)	16 (34%)
HIES	15 (32%)	6 (13%)	9 (19%)

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

Se obtuvieron 39 muestras de heces positivas mediante la tinción de Kinyoun para ooquistes de *Cryptosporidium* spp.; mediante la secuenciación de los productos de la PCR anidada del gen SSU rRNA de *Cryptosporidium* se logró determinar el genotipo/especie infectante para cada caso, siendo *C. parvum* el que se identificó en mayor frecuencia (62%, 24/39), seguido de *C. hominis* (33%, 13/39) y *C. canis* (5%, 2/39). Se incluyeron 2 controles previamente caracterizados como *C. parvum* (Genbank: KY990912) y *C. hominis* (Genbank: KY990911) (Urrea-Quezada y col., 2017).

Cryptosporidium hominis y *C. parvum* son las especies comúnmente identificadas en humanos (Ryan e Power, 2012); sin embargo, la distribución de ambas especies en humanos difiere dependiendo del área geográfica (Agholi y col., 2013). En el Medio Oriente, *C. parvum* es más predominante en humanos (Sokolova y col., 2012; Swierczewski y col., 2012); en otras partes del mundo como en el norte de América y en países en vías de desarrollo, *C. hominis* es más frecuente (Agholi y col., 2013; De La Fé Rodríguez y col., 2013). En México, se reportaron 12 casos de criptosporidiosis en los cuales se identificó con mayor frecuencia a *C. hominis* (10/12); estos casos provenían del centro y del noroeste del país (Valenzuela y col., 2014). En un estudio posterior en el noroeste de México, la proporción de *C. hominis* y *C. parvum* fue diferente, ya que de 32 casos de criptosporidiosis, se identificó en mayor proporción a *C. parvum* (59%) que a *C. hominis* (41%) (Urrea-Quezada y col., 2017). Determinar la distribución de las especies en las diversas áreas geográficas es importante ya que podría relacionarse con las formas de transmisión (zoonótica o antroponótica) (Agholi y col., 2013).

En este estudio, todos los casos de *C. parvum* (n=24) tenían GEA, dónde la diarrea es el síntoma principal, también se refirieron otros síntomas como náuseas, dolor de cabeza, deshidratación y flatulencias; la mayoría de los pacientes en los que se identificó *C. hominis* (n=13) presentaron diarrea, solo 3/13 casos presentaron síntomas no intestinales como conjuntivitis, neumonía y sinusitis. Este hecho difiere un poco a lo reportado por Cama y col., donde *C. hominis* se asoció con síntomas no intestinales y *C. parvum* solo se asoció a diarrea (Cama y col., 2008). Los dos casos identificados de *C. canis* en este estudio fueron de niños de dos años de edad, los cuales presentaban un cuadro

diarreico, dolor abdominal, fiebre y en uno de ellos desnutrición grado II; a diferencia de lo reportado por Cama y cols. en el 2008, sobre un estudio de 109 casos de criptosporidiosis en niños de Perú del 1995-1998, los cuales presentaron diarrea, malestar general, náuseas y vómito; pero en ningún caso se reportó fiebre (Cama y col., 2008). Existen escasos reportes de *C. canis* en humanos; éste parásito ha sido identificado mayormente en perros, zorros, coyotes, lo cual hace pensar que es más probable que el perro sea la fuente de infección (Xiao y col., 2007). Sin embargo, la transmisión de persona a persona de *C. canis* en los seres humanos también ha sido demostrada, lográndose identificar este tipo de transmisión en los pacientes con SIDA (Cama y col., 2006).

Generación de Proteínas Recombinantes

El ADN genómico obtenido a partir de las heces de uno de nuestros casos (aislado S38, el cual resultó con *C. parvum*), se usó como templado de ADN para amplificar mediante PCR a los genes GP60 (890 pb), GP40 (532pb) y GP15 (307 pb) de *C. parvum* (Figura 7). A partir del ADN genómico obtenido de las heces de otro de nuestros casos (aislado S37, el cual resultó con *C. hominis*), se usó como templado de ADN para amplificar mediante PCR a los genes GP60 (890 pb) y GP15 (307 pb) de *C. hominis* (Figura 8). Los productos de la PCR se clonaron en el vector pET100 / D-TOPO, y se analizó la secuencia en cada caso; los resultados se alinearon con la secuencia nucleotídica S60 de *C. parvum* (AF203016) obteniéndose un 100% de similitud (Figura 9) y la GP60 de *C. hominis* (FJ861238).

La construcción pET100-GP15 y pET100-GP40 tanto para *C. parvum* como para *C. hominis* se insertaron en las células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS para la expresión de la proteína de interés. Los clones recombinantes de la cepa de *E. coli* Rosetta 2 transformadas se observan en la Figura 10, los cuales, resultaron del tamaño esperado. Este tamaño corresponde al producto de amplificación del gen insertado en el sitio de clonación del vector de expresión (Figura 11).

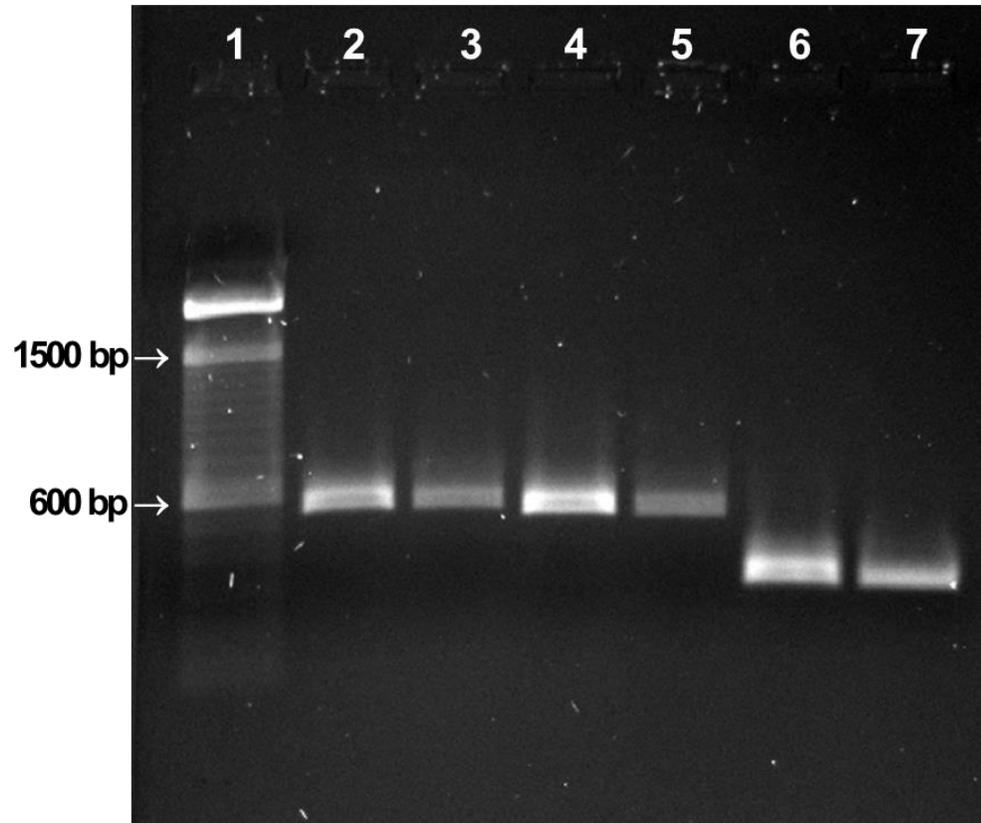


Figura 7. Productos de PCR del gen GP40 y GP15 de *C. parvum* (aislado S38) y *C. hominis* (aislado S37). Carril 1: marcador de pares de bases (100 pb Thermo Fisher Scientific); carril 2: *C. hominis* gen GP40; carril 3: *C. hominis* gen GP40 purificado; carril 4: *C. parvum* gen GP40; carril 5: *C. parvum* gen GP40 purificado; carril 6: *C. parvum* gen GP15; carril 7: *C. parvum* gen GP15 purificado.

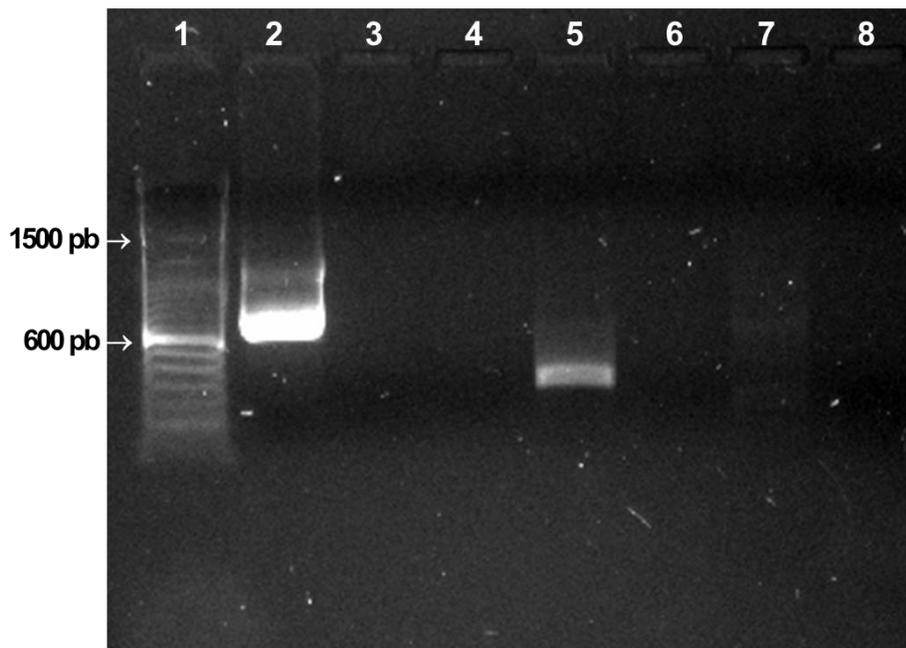


Figura 8. Productos de PCR del gen GP60 y GP15 de *Cryptosporidium hominis*. Carril 1: marcador de pares de bases (100 pb Thermo Fisher Scientific); carril 2: Control positivo de *C. hominis* gen GP60; carril 3-4: muestras sin amplificar; carril 5: amplificación de *C. hominis* gen GP15 (aislado S37); carril 6-7: muestras sin amplificar; carril 8: Control negativo a *C. hominis*.

Query	5	GAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTGCCTTTACCCCTTGATGGTGGTAAA	64
AF203016	1513	GAAACCAGTGAAGCTGCTGCAACCGTCGATTTGTTGCCTTTACCCCTTGATGGTGGTAAA	1572
Query	65	AGAATTGAAGTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTG	124
AF203016	1573	AGAATTGAAGTGGCTGTACCAAACGTCGAAGATGCATCTAAAAGAGACAAGTACAGTTTG	1632
Query	125	GTTGCAGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTAC	184
AF203016	1633	GTTGCAGACGATAAACCTTTCTATACCGGCGCAAACAGCGGCACTACCAATGGTGTCTAC	1692
Query	185	AGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAAGGACAACACAGTTCTTTTGAAGGATGCT	244
AF203016	1693	AGGTTGAATGAGAACGGAGACTTGGTTGATAAGGACAACACAGTTCTTTTGAAGGATGCT	1752
Query	245	GGTTCCTCTGCTTTTGGACTCAGATACATCGTTCCTTCCGTTTTTGCAATCTTTGCAGCC	304
AF203016	1753	GGTTCCTCTGCTTTTGGACTCAGATACATCGTTCCTTCCGTTTTTGCAATCTTTGCAGCC	1812
Query	305	TTATTCG 311	
AF203016	1813	TTATTCG 1819	

Figura 9. Alineación de secuencias múltiples por CLUSTALW de la región del gen de la glicoproteína S16 de NCBI (Genbank: AF203016) y el gen gp15 generado en este estudio.

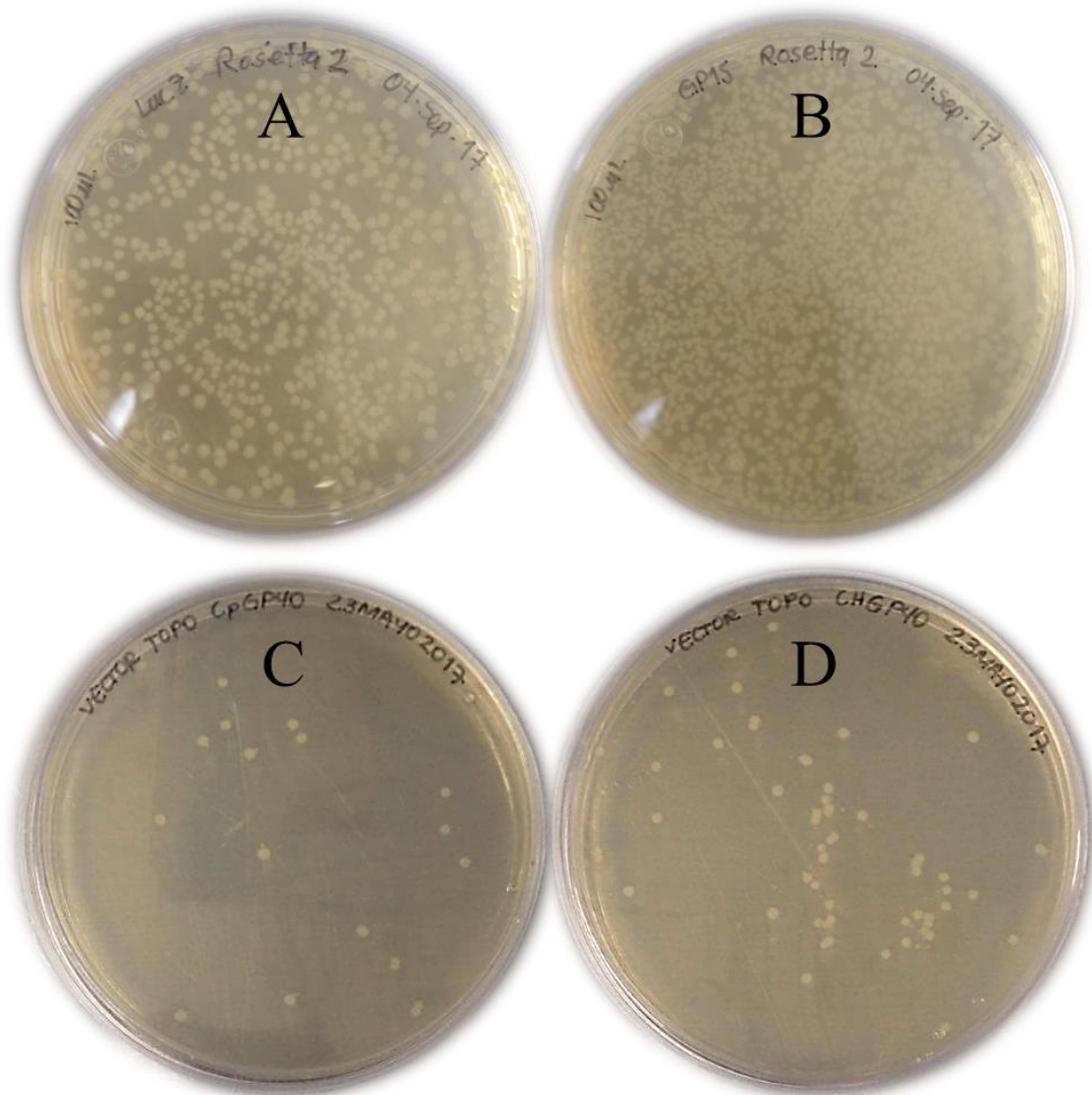


Figura 10. Placas de agar LB-AMP mostrando colonias de *E. coli* Rosetta 2 transformadas con la construcción del vector pET100-CpGP15. A) Control de expresión positivo: colonias de *E. coli* TOP10 con el vector que contiene el gen lacZ; B) Colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el vector pET100-CpGP15; C) Colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el vector pET100-CpGP40; D) Colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el vector pET100-ChGP40.

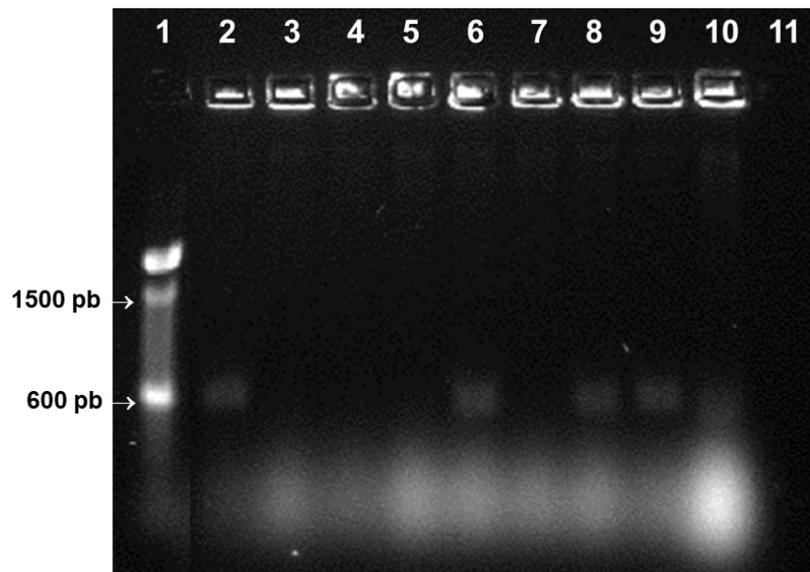


Figura 11. Detección de clones recombinantes. Análisis realizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Carril 1: marcador de pares de bases (100 pb Thermo Fisher Scientific); Carril 2, 6, 8, 9 y 10: Clones recombinantes (C1, C5, C7, C8, C9) de la cepa Rosetta 2; Carril 11: Control negativo.

Posteriormente se realizó la sobreexpresión de la proteína recombinante, y para ello fue necesario probar con diferentes temperaturas, optando por inducir a 25 °C con IPTG para evitar la formación de cuerpos de inclusión (Makrides, 1996); sin embargo, en la fracción insoluble se formaron los cuerpos de inclusión, por lo que elegimos la fracción soluble para continuar con la purificación.

Se esperaba que la expresión de la glicoproteína gp15 (*C. parvum/C. hominis*) resultara de aproximadamente 18 kDa (16 kDa de la proteína Cpgp15 y ~3 kDa del fragmento N-terminal polihistidinas 6xHis); sin embargo, los resultados de SDS-PAGE (Figura 12) y Western blot, mostraron una banda con un peso molecular aproximado de 22 kDa y 18 kDa respectivamente. Priest y col, obtuvieron resultados similares, una glicoproteína con un peso molecular aproximado de 22 kDa para la gp15 de *C. parvum* (Priest y col., 1999; Wang y col., 2009).

Para la expresión de la glicoproteína gp40 (*C. parvum* y *C. hominis*) esperábamos un resultado de aproximadamente 37 kDa (34 kDa de la proteína Cpgp40 y ~3 kDa del fragmento N-terminal polihistidinas 6xHis); tanto los resultados de SDS-PAGE (Figura 13) y Western blot (WB) (Figura 14) mostraron una banda con un peso molecular aproximado de 37 kDa.

El lisado de células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS inducidas que contenían los constructos para cada especie (pET-100/gp15, pET-100/gp40) se purificaron mediante IMAC; en la Figura 15, se muestra la banda de proteína de 18 kDa para *C. parvum* (no se visualizó la banda de gp15 de *C. hominis*). Mediante el análisis de Western blot, se mostró una banda de 37 kDa característica de la glicoproteína de 40 kDa para *C. parvum* (Figura 16) y para *C. hominis* (Figura 17). De las 4 proteínas recombinantes se logró generar 3 de ellas; a las cuales se determinó su concentración mediante el método de Bradford: Cpgp40: 124.8 µg/mL, Chgp40: 34.8 µg/mL, Cpgp15: 390 µg/mL.

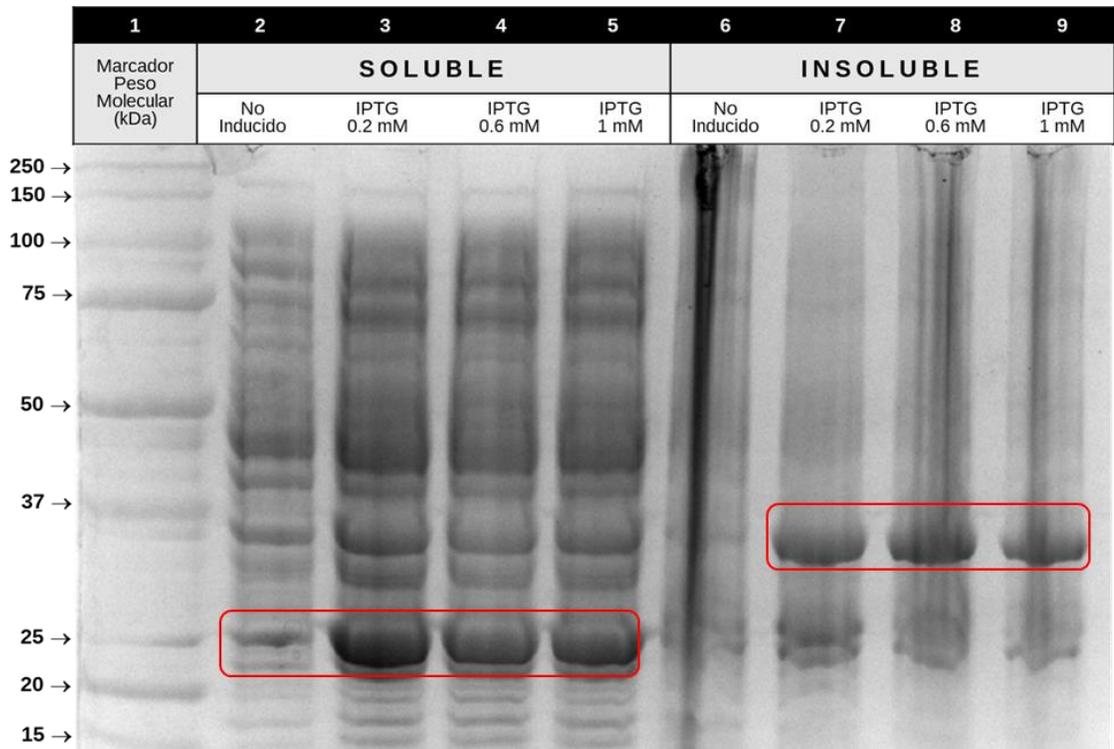


Figura 12. Inducción de la expresión de la proteína recombinante rCpgp15. Gel SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue); Carril 2: muestra soluble sin inducir; Carril 3-5: muestras solubles inducidas a diferentes concentraciones de IPTG (0.2 mM, 6 mM, 1mM), 16 h; Carril 6: muestra insoluble sin inducir; Carril 7-9: muestras insolubles inducidas a diferentes concentraciones de IPTG (0.2 mM, 6 mM, 1mM), 16 h.

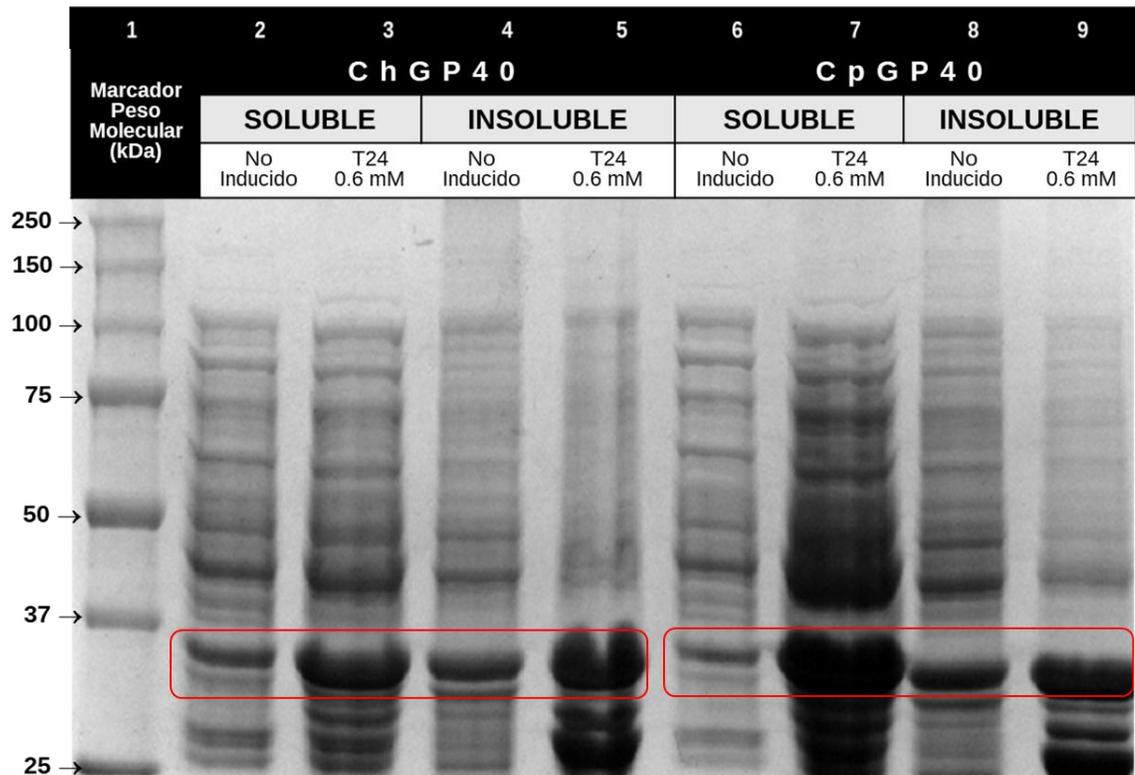


Figura 13. Sobreexpresión de las proteínas recombinantes rChgp40 y rCpgp40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS. Gel SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue); Carril 2: muestra rChgp40 soluble sin inducir; Carril 3: muestra rChgp40 soluble inducida (IPTG 0.6 mM), 24 h; Carril 4: muestra rChgp40 insoluble sin inducir; Carril 5: muestra rChgp40 insoluble inducida (IPTG 0.6 mM), 24 h; Carril 6: muestra rCpgp40 soluble sin inducir; Carril 7: muestra rCpgp40 soluble inducida (IPTG 0.6 mM), 24 h; Carril 8: muestra rCpgp40 insoluble sin inducir; Carril 9: muestra rChgp40 insoluble inducida (IPTG 0.6 mM), 24 h.

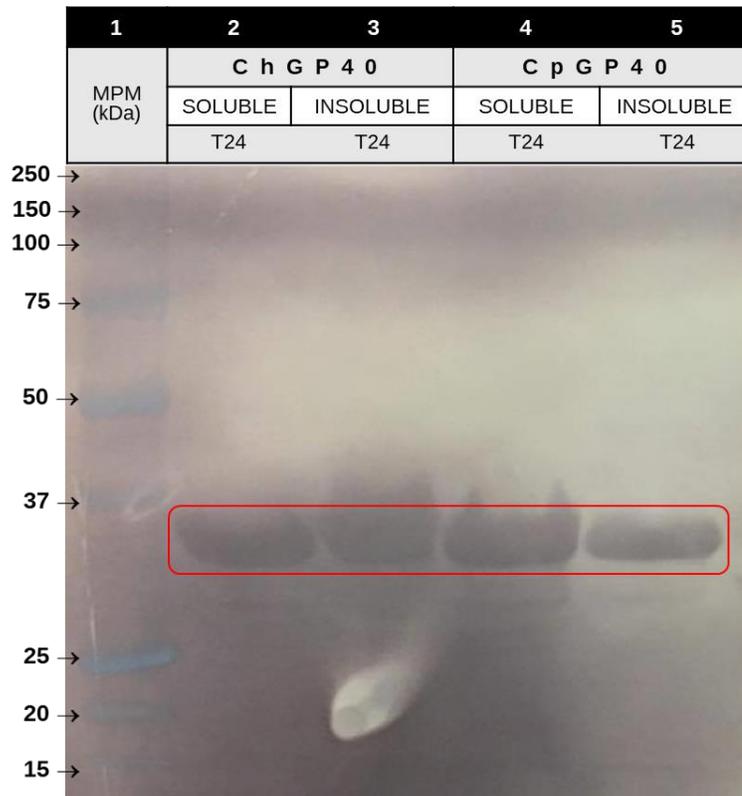


Figura 14. Detección de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes rChgp40 y rCpgp40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS por Western blot. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti 6xHis conjugado acoplados a fosfatasa alcalina. Carril 1: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue).

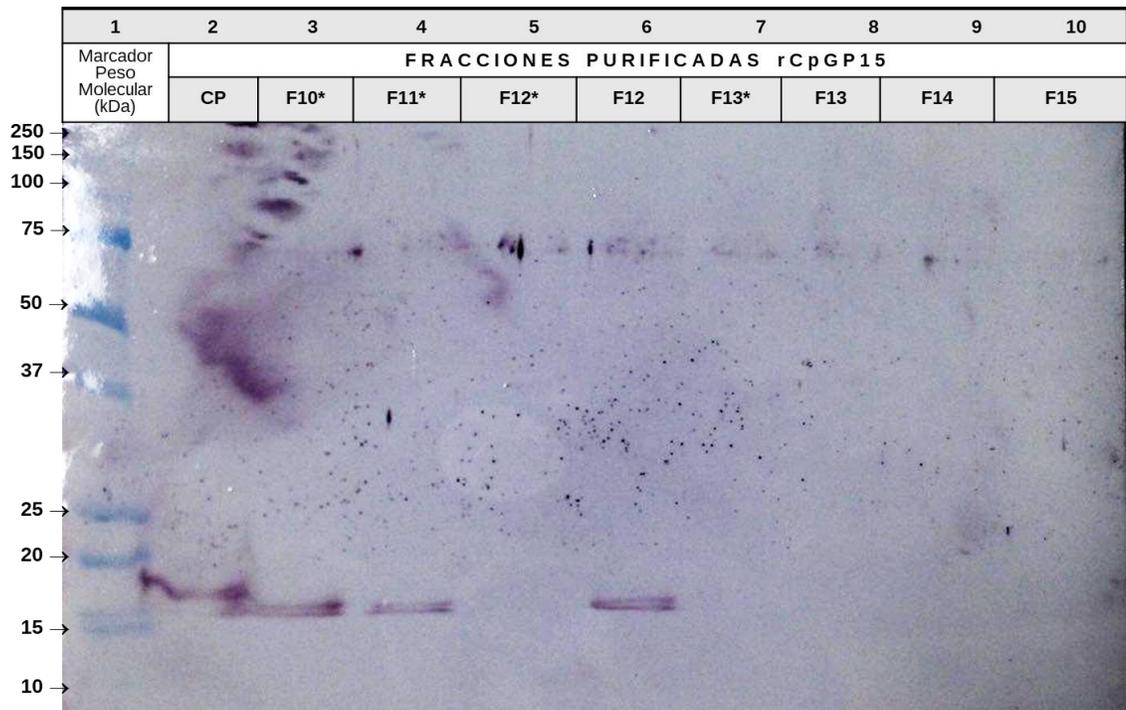


Figura 15. Inmunodetección de la proteína recombinante rCpGP15 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS. Carril 1: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue); Carril 2: control positivo; Carril 3, 4 y 6: fracciones purificadas sobreexpresando la proteína rCpGP15.

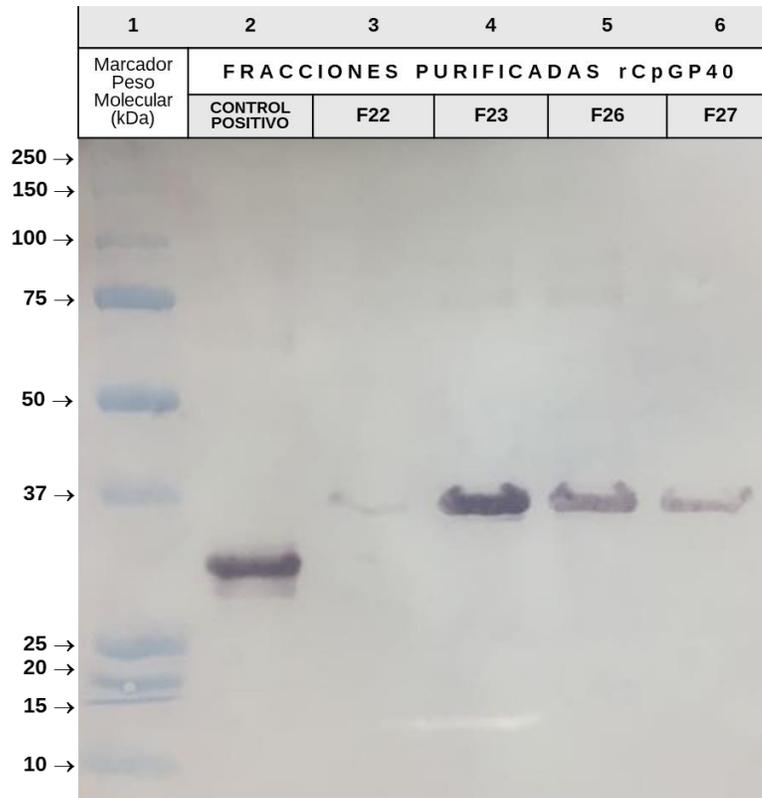


Figura 16. Inmunodetección de la proteína recombinante rCpGP40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS. Carril 1: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue); Carril 2: control positivo; Carril 4, 5 y 6: fracciones purificadas sobreexpresando la proteína rCpGP40.

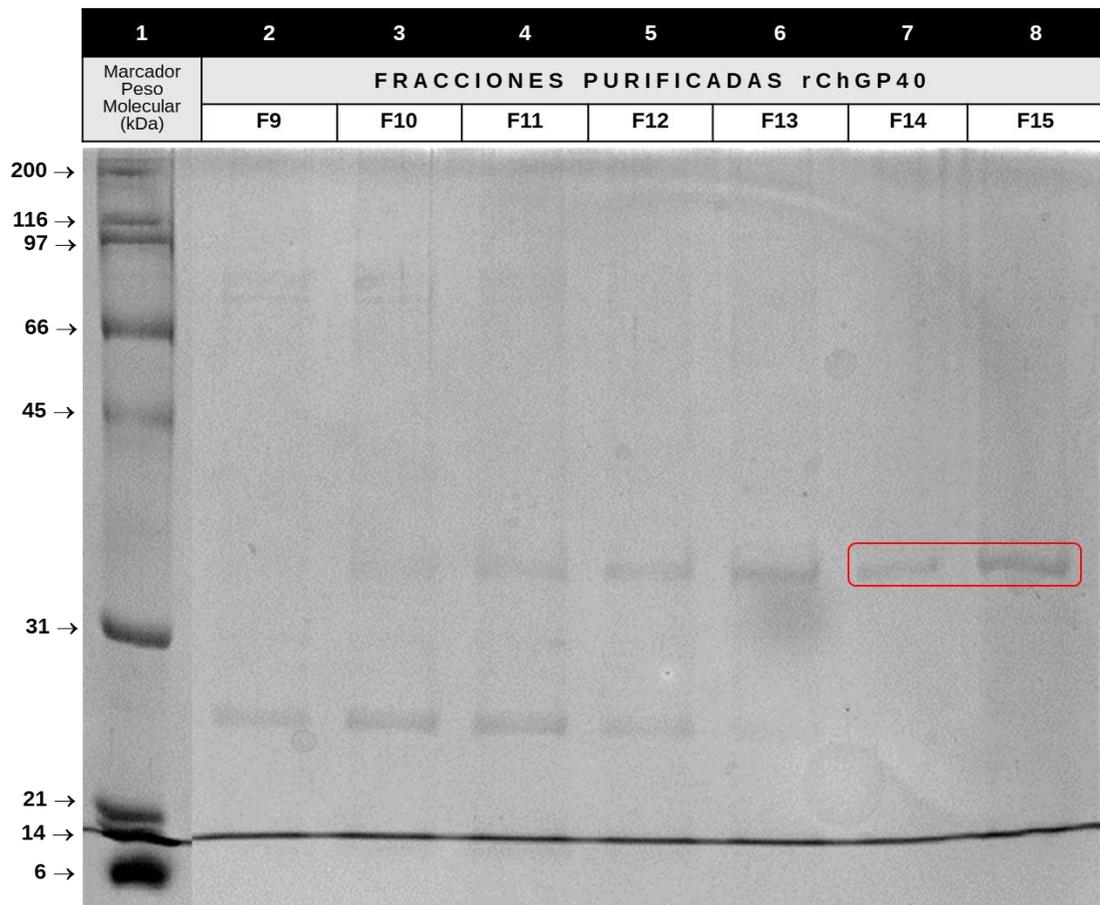


Figura 17. Inmunodetección de la proteína recombinante rChgp40 en la cepa Rosetta 2 (DE3) pLysS. Carril 1: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue); Carril 2: control positivo; Carril 4, 5 y 6: fracciones purificadas sobreexpresando la proteína rChgp40.

Los antígenos de superficie y de la región apical de *Cryptosporidium*, como cp23, gp900, gp15, gp40/15, gp40 y CSL, están involucrados en el proceso de adhesión e invasión del esporozoíto del parásito a las células diana. Este es un paso vital para inducir la infección por este parásito (Liu y col., 2010; Allison y col., 2011). Varios estudios han demostrado que los antígenos parasitarios y las proteínas recombinantes de parásitos inmunogénicos pueden identificarse por anticuerpos de suero humano y de otros animales infectados. Estos antígenos y proteínas se consideran candidatos prometedores para el desarrollo de vacunas y el diagnóstico de infección (Allison y col., 2011). Algunos de ellos son glicoproteínas de mucina, que desempeñan un papel importante en la producción de la respuesta inmune del huésped contra la infección. La mejor glucoproteína de tipo mucina es el antígeno gp40/15 o gp60, que se expresa como un precursor y se puede romper en dos proteínas: gp40 y gp15. Estas proteínas son inmunogénicas y el uso de anticuerpos contra ellas puede controlar la infección y prevenir la infección por *Cryptosporidium*. Estas proteínas pueden detectarse en el suero de pacientes infectados (Cevallos y col., 2000). Algunos estudios han considerado la clonación y expresión de antígenos de *Cryptosporidium*, especialmente el antígeno gp40/15.

Cevallos y col., evaluaron la expresión del gen *gp40/15* en células procariotas (Cevallos y col., 2000) y después de la secuenciación de genes demostraron que tenía 981 pb de longitud. Utilizaron el vector PET-32 LIC/Xa para la clonación de genes y lo transfirieron a *E. coli* AD494. Descubrieron que su peso molecular era de unos 49 kDa. Debido al proceso de glicosilación, el peso molecular de la proteína gp40/15 generada en el parásito fue de aproximadamente 55 a 60 kDa, sin embargo, el peso molecular de las glicoproteínas gp15 y gp40 fue de alrededor de 15 y 45 kDa, respectivamente. Debido a la falta de glicosilación en células procarióticas y un pequeño número de nucleótidos seleccionados, así como al tipo de vector, el peso molecular de la proteína expresada osciló entre 40 y 49 kDa (Cevallos y col., 2000). Strong y col. cree que la gp40/15 tiene aproximadamente 330 aminoácidos con un peso molecular de 34 kDa (Strong, y col., 2000).

Mostraron que el andamiaje principal del antígeno está formado por las proteínas gp15 y gp40, con un peso molecular de 11 y 20 kDa, respectivamente. Sin embargo, estos pesos moleculares son diferentes del peso molecular de las proteínas expresadas en el parásito debido a la gran cantidad de mucina, serina y treonina, así como a la glicosilación en sitios antigénicos que aumentan el peso molecular de la proteína en el ciclo de vida intracelular (Strong y col., 2000).

La diferencia en el peso molecular de la proteína expresada entre nuestro estudio y de Cevallos y col. puede relacionarse con el tipo de vector usado, el número de bases seleccionadas y el tipo de bacteria. Este estudio mostró que los genes *gp15* y *gp40* de *Cryptosporidium* fueron clonados exitosamente en el vector pET100/D- TOPO y las proteínas recombinantes fueron expresadas en la bacteria de *E. coli*.

Determinación de Anticuerpos anti-*Cryptosporidium*

IgG Sérica anti-rCpgp15

Los resultados del análisis inmunoenzimático se presentan en la Figura 18-A, en este análisis la línea de corte del estudio, la cual corresponde a la media de la densidad óptica (DO) de las muestras de los controles negativos (n=5), que resultaron con un menor reconocimiento para todos los antígenos probados (rCpgp15, rCpgp40 y rChgp40) más dos desviaciones estándar fue de 0.226. En esta figura se aprecia una uniformidad en la forma en que se distribuyen los valores de DO del grupo control, aunque el 57% (27/47) de individuos presentaron niveles de DO por arriba de la línea de corte. El 56% (22/39) de los casos están por encima de la línea de corte. Para esta proteína recombinante (rCpgp15) no existió diferencia estadísticamente significativa (U de Mann-Whitney=846.5, $p=0.544$) en el reconocimiento entre casos y controles.

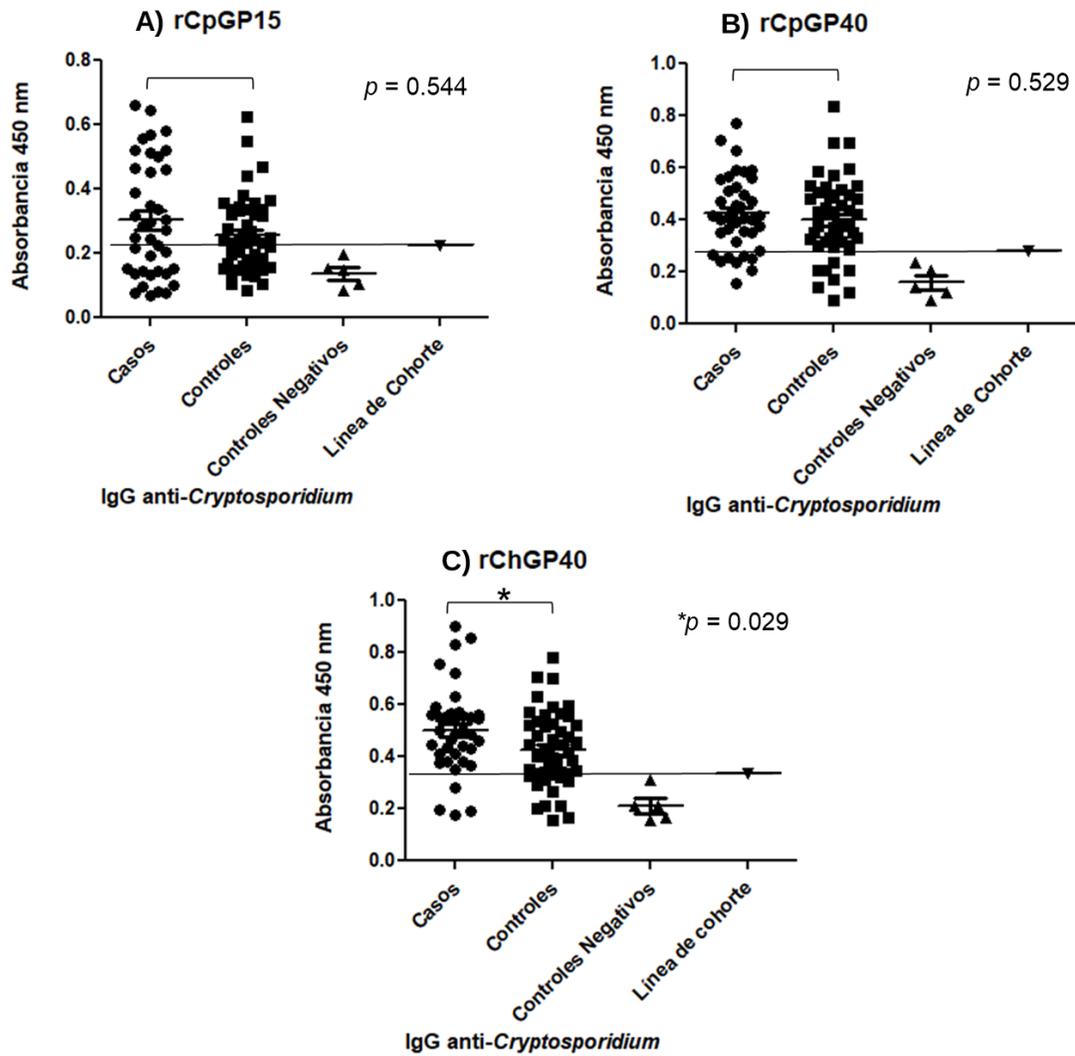


Figura 18. Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*Cryptosporidium* entre los casos infectados y controles no infectados del estudio utilizando las proteínas recombinantes rCpGP15, rCpGP40 y rChGP40. A) rCpGP15 inmunoensayo con línea de cohorte 0.226; B) rCpGP40 inmunoensayo con línea de cohorte 0.279; C) rChGP40 inmunoensayo con línea de cohorte 0.336.

IgG Sérica anti-rCpgp40

Para esta proteína recombinante (rCpgp40) no existió diferencia estadísticamente significativa (U de Mann-Whitney=844, $p=0.529$) en el reconocimiento entre casos y controles; lo cual se aprecia en la Figura 18-B, donde se muestra que un alto porcentaje de casos (79%, 31/39) como controles (83%, 39/47) están por encima de la línea de corte (0.279).

IgG Sérica anti-rChgp40

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18-C, en la cual se aprecia que los pacientes con criptosporidiosis presentaron un mayor reconocimiento (90% 35/39 por arriba de la línea de corte) de la rChgp40, comparados con el grupo control (72%, 34/47); presentando diferencia estadísticamente significativa (U de Mann-Whitney=865, $p=0.029$) en el reconocimiento de la misma.

IgG Sérica anti-rCpgp15, anti-rCpgp40 y anti-rChgp40

Se llevó a cabo el análisis estadístico para conocer si existían diferencias estadísticamente significativas entre las edades de los controles sin criptosporidiosis (Figura 19), este estudio demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Se realizó el análisis U-Mann Whitney para comparar las medias de la densidad óptica (DO) de los casos de criptosporidiosis (especie/genotipo infectante) y las diferentes proteínas recombinantes (rCpgp15, rCpgp40 y rChgp40) (Figura 20), observándose solamente una diferencia estadísticamente significativa para la proteína recombinante rCpgp40 ($p=0.01$), quien puede distinguir entre la especie/genotipo infectante de *C. parvum* y *C. hominis*.

Los resultados de ELISA a una longitud de onda de 450 nm mostraron que las proteínas recombinantes generadas en este estudio fueron identificadas por el suero de los pacientes con criptosporidiosis que tenían anticuerpos contra *C. parvum* o *C. hominis*.

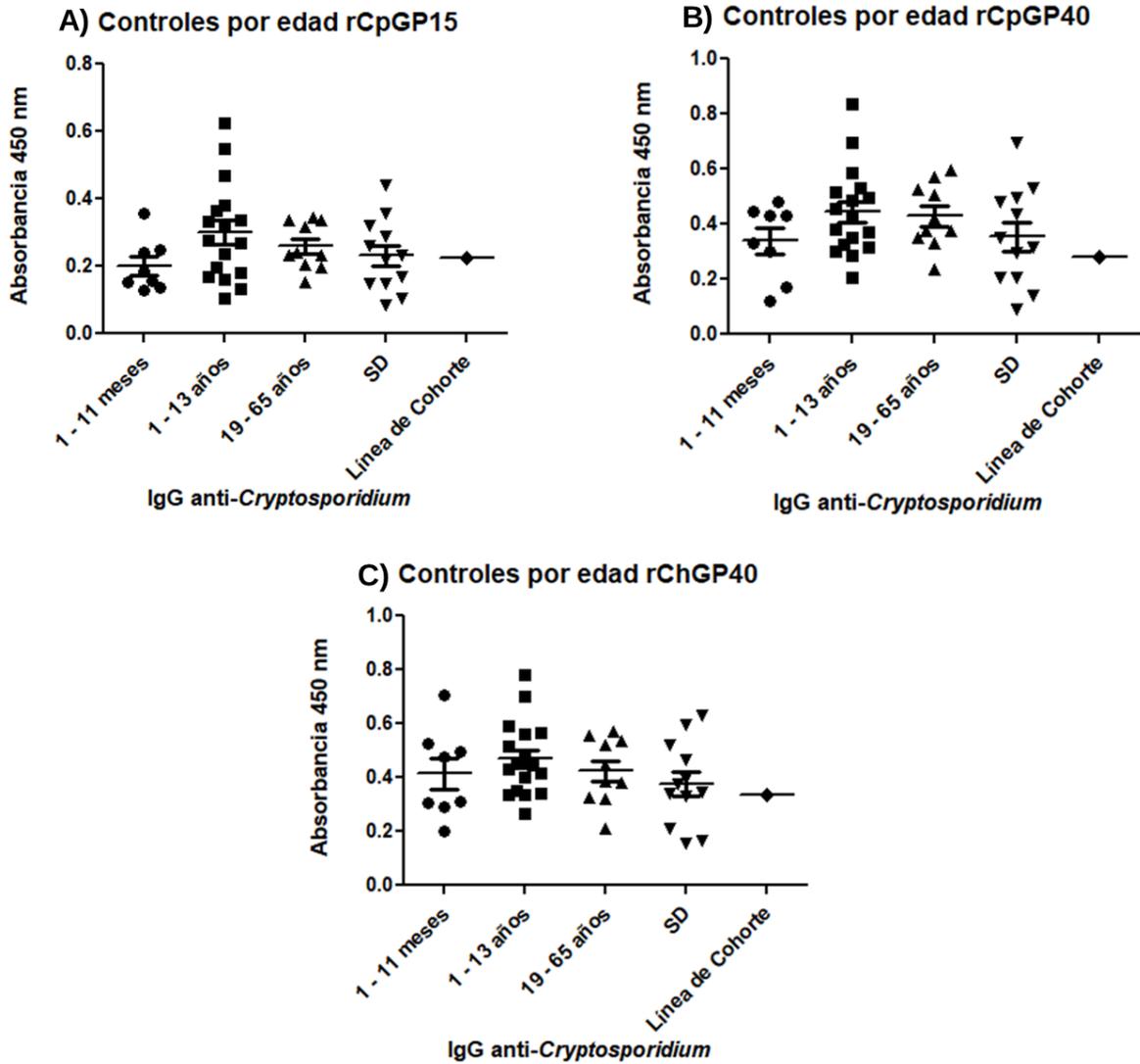


Figura 19. Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*Cryptosporidium* entre los controles no infectados del estudio utilizando las proteínas recombinantes rCpGP15, rCpGP40 y rChGP40.

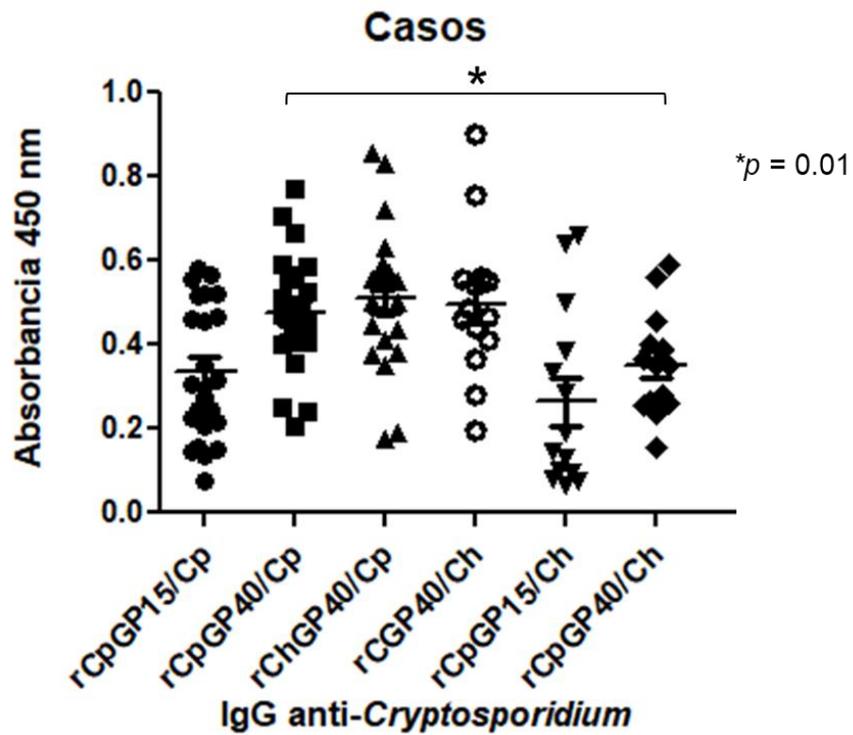


Figura 20. Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-*Cryptosporidium* entre los genotipos infectantes (*C. parvum* y *C. hominis*) y las proteínas recombinantes rCpGP15, rCpGP40 y rChGP40 de los casos de criptosporidiosis del estudio.

El análisis indicó que el suero identificó los epítomos antigénicos de las proteínas recombinantes rCpgp15, rCpgp40 y rChgp40 y que reaccionaron con él; esto puede indicar la inmunogenicidad de la proteína. Este resultado también es consistente con los resultados de otros investigadores basados en las respuestas inmunitarias creadas por el antígeno gp60 (gp40/15) o las glicoproteínas gp40 y gp15 (O'Connor y col., 2003; O'Connor y col., 2007; Borad y col., 2010; Sobati y col., 2017).

Este estudio mostró que los genes *gp15* y *gp40* de *Cryptosporidium* fueron clonados exitosamente en el vector pET100/D-TOPO y que las proteínas recombinantes fueron expresadas en la bacteria de *E. coli*. Por lo tanto, es un paso importante para detectar y combatir a *Cryptosporidium* en el control de infecciones por parásitos.

CONCLUSIONES

La caracterización molecular del genotipo infectante demostró la presencia de *C. parvum*, *C. hominis* y *C. canis* en el noroeste de México.

El diseño del gen CpGP15, ChGP40 y CpGP40, las condiciones de clonación en el vector pET100/D-TOPO y la expresión en sistema de procariota permitió la producción de las proteínas recombinantes rCpGP15, rChGP40 y rCpGP40 de forma soluble.

Se detectaron anticuerpos anti-*Cryptosporidium* contra los sueros humanos de individuos infectados y no infectados, sin embargo, fue posible determinar un aumento estadísticamente significativo de la reactividad para la proteína recombinantes rChGP40 entre los casos y los controles.

Las proteínas recombinantes rCpGP15 y rCpGP40 no fueron reconocidas significativamente por sueros humanos de individuos infectados en comparación con el grupo no infectado en este estudio.

RECOMENDACIONES

Realizar la búsqueda del parásito *Cryptosporidium* en las muestras de materia fecal de los niños y adultos con diarrea o GEA, donde se lleve a cabo la identificación de las especies/genotipos de *Cryptosporidium* por medio de métodos moleculares, para establecer cuáles están implicadas en transmisiones zoonóticas y así llegar a un contexto más claro y amplio, sobre la implicación de este patógeno en problemas tanto de salud pública como de salud animal.

Generar la proteína recombinante rChGP15, modificando las condiciones de expresión en la bacteria *E. coli*, para comparar los resultados de la respuesta humoral (IgG) de los casos y controles de este estudio.

Modificar las condiciones de expresión en el sistema empleado para aumentar la producción soluble de las proteínas recombinantes rCpGP15, rChGP40 y rCpGP40; y evaluar la inmunogenicidad de las proteínas.

Realizar campañas de salud pública para concientizar a la comunidad sobre la importancia de la criptosporidiosis como un problema de implicación zoonótica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Salam MM. Assessment of water quality of some swimming pools: a case study in Alexandria, Egypt. *Environ Monit Assess.* 2012;184(12):7395-406.
- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, y col. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science.* 2004;304(5669):441-5.
- Abubakar I, Aliyu SH, Arumugam C, Usman NK, Hunter PR. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;63(4):387-93.
- Adamu H, Petros B, Zhang G, Kassa H, Amer S, Ye J, y col. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4):e2831.
- Agholi M, Hatam GR, Motazedian MH. Microsporidia and coccidia as causes of persistence diarrhea among liver transplant children: incidence rate and species/genotypes. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(2):185-7.
- Ajjampur SS, Rajendran P, Ramani S, Banerjee I, Monica B, Sankaran P, y col. Closing the diarrhoea diagnostic gap in Indian children by the application of molecular techniques. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 11):1364-8.
- Ajjampur SS, Sankaran P, Kang G. *Cryptosporidium* species in HIV-infected individuals in India: an overview. *Natl Med J India.* 2008;21(4):178-84.
- Ajjampur SS, Liakath FB, Kannan A, Rajendran P, Sarkar R, Moses PD, y col. Multisite study of cryptosporidiosis in children with diarrhea in India. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2075-81.
- Ajjampur SS, Sarkar R, Allison G, Banda K, Kane A, Muliylil J, y col. Serum IgG response to *Cryptosporidium* immunodominant antigen gp15 and polymorphic antigen gp40 in children with cryptosporidiosis in South India. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(4):633-9.

- Ali MB, Ghenghesh KS, Aissa RB, Abuhelfaia A, Dufani M. Etiology of childhood diarrhea in Zliten, Libya. *Saudi Med J*. 2005;26(11):1759-65.
- Allison GM, Rogers KA, Borad A, Ahmed S, Karim MM, Kane AV, y col. 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*. 2011;85(1):97-104.
- Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2744-7.
- Amadi B, Mwiya M, Sianongo S, Payne L, Watuka A, Katubulushi M, y col. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infect Dis*. 2009;9:195.
- Arrowood MJ. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):390-400.
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, y col. Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact*. 2014;13:141.
- Barragan A, Brossier F, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol*. 2005;7(4):561-8.
- Bartelt LA, Sevilleja JE, Barrett LJ, Warren CA, Guerrant RL, Bessong PO, y col. High anti-*Cryptosporidium parvum* IgG seroprevalence in HIV-infected adults in Limpopo, South Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(3):531-4.
- Bartelt LA, Bolick DT, Kolling GL, Roche JK, Zaenker EI, Lara AM, y col. *Cryptosporidium* Priming Is More Effective than Vaccine for Protection against Cryptosporidiosis in a Murine Protein Malnutrition Model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):e0004820.
- Basile G, Peticca M. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*. 2009;43(3):273-8.

- Bercier M, Zoll W, Rosenberg JF, Giglio R, McCoy L, Castleman WL, y col. Gastric Intussusceptions in a Red Corn Snake. *Case Rep Vet Med.* 2017;2017:4270904.
- Bhat N, Joe A, PereiraPerrin M, Ward HD. *Cryptosporidium* p30, a galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin, mediates infection in vitro. *J Biol Chem.* 2007;282(48):34877-87.
- Borad A, Ward H. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol.* 2010;5(3):507-19.
- Borad AJ, Allison GM, Wang D, Ahmed S, Karim MM, Kane AV, y col. Systemic antibody responses to the immunodominant p23 antigen and p23 polymorphisms in children with cryptosporidiosis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(2):214-22.
- Bouzig M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):115-34.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Burnet JB, Penny C, Ogorzaly L, Cauchie HM. Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: implications for monitoring and risk assessment. *Sci Total Environ.* 2014;472:1023-35.
- Cabada MM, White AC. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(5):494-9.
- Cacciò SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 2005;21(9):430-7.
- Cacciò SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006;4(3):429-43.
- Calderaro A, Montecchini S, Gorrini C, Dettori G, Chezzi C. Similar diagnostic performances of antigen detection and nucleic acid detection of *Cryptosporidium* spp. in a low-prevalence setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):72-7.

- Cama V, Gilman RH, Vivar A, Ticona E, Ortega Y, Bern C, y col. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):1025-8.
- Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, y col. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(10):1567-74.
- Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*. 2004;38(4):818-62.
- Cevallos AM, Zhang X, Waldor MK, Jaison S, Zhou X, Tzipori S, y col. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. *Infect Immun*. 2000;68(7):4108-16.
- Chalmers RM, Campbell BM, Crouch N, Charlett A, Davies AP. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J Med Microbiol*. 2011;60(Pt 11):1598-604.
- Chalmers RM, Smith R, Elwin K, Clifton-Hadley FA, Giles M. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004-2006. *Epidemiol Infect*. 2011;139(5):700-12.
- Chassin C, Hornef MW. Between vigilance and tolerance: the immune function of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(22):3619-21.
- Checkley W, Epstein LD, Gilman RH, Black RE, Cabrera L, Sterling CR. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. *Am J Epidemiol*. 1998;148(5):497-506.
- Checkley W, White AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen XM, y col. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(1):85-94.
- Chen BP, Hai T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene*. 1994;139(1):73-5.
- Chen XM, LaRusso NF. Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2000;118(2):368-79.

- Chen XM, LaRusso NF. Cryptosporidiosis and the pathogenesis of AIDS-cholangiopathy. *Semin Liver Dis.* 2002;22(3):277-89.
- Choudhry N, Bajaj-Elliott M, McDonald V. The terminal sialic acid of glycoconjugates on the surface of intestinal epithelial cells activates excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun.* 2008;76(8):3735-41.
- Costa LB, JohnBull EA, Reeves JT, Sevilleja JE, Freire RS, Hoffman PS, y col. *Cryptosporidium*-malnutrition interactions: mucosal disruption, cytokines, and TLR signaling in a weaned murine model. *J Parasitol.* 2011;97(6):1113-20.
- Coutinho BP, Oriá RB, Vieira CM, Sevilleja JE, Warren CA, Maciel JG, y col. *Cryptosporidium* infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. *J Parasitol.* 2008;94(6):1225-32.
- De la Fé Rodríguez PY, Martín LO, Muñoz EC, Imberechts H, Butaye P, Goddeeris BM, y col. Several enteropathogens are circulating in suckling and newly weaned piglets suffering from diarrhea in the province of Villa Clara, Cuba. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(2):435-40.
- Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. [Cryptosporidiosis: an emerging zoonosis]. *Rev Argent Microbiol.* 2009;41(3):185-96.
- Deng M, Rutherford MS, Abrahamsen MS. Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(6):869-84.
- Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect.* 2002;4(10):1059-66.
- DWR. SJ. Molecular cloning: A laboratory manual. . third ed: Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Ehigiator HN, McNair N, Mead JR. *Cryptosporidium parvum*: the contribution of Th1-inducing pathways to the resolution of infection in mice. *Exp Parasitol.* 2007;115(2):107-13.
- Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to

- Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int J Parasitol.* 2012;42(7):675-82.
- Farrokhi N, Hrmova M, Burton RA, Fincher GB. Heterologous and cell free protein expression systems. *Methods Mol Biol.* 2009;513:175-98.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1305-22.
- Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lai AA, Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol.* 2001;87(6):1415-22.
- Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol.* 2004;126(1-2):37-56.
- Fayer R, Santín M, Xiao L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol.* 2005;91(3):624-9.
- Fayer R, Santín M, Trout JM. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol.* 2008;156(3-4):191-8.
- Fayer R, Santín M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol.* 2009;164(2-4):192-200.
- Fayer R, Santín M, Macarasin D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol.* 2010;172(1-2):23-32.
- Fournet N, Deege MP, Urbanus AT, Nichols G, Rosner BM, Chalmers RM, y col. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(2).
- Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Ancarani F, Scalise G. Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(4):453-6.
- Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Tabares E, Lopez-Rodas V, Costas E. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(5):1866-70.

- González-Díaz M, Urrea-Quezada A, Villegas-Gómez I, Durazo M, Garibay-Escobar A, Hernández J, y col. *Cryptosporidium canis* in Two Mexican Toddlers. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(11):1265-6.
- Gookin JL, Chiang S, Allen J, Armstrong MU, Stauffer SH, Finnegan C, y col. NF-kappaB-mediated expression of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(1):G164-74.
- Gray DJ, Forsyth SJ, Li RS, McManus DP, Li Y, Chen H, y col. An innovative database for epidemiological field studies of neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(5):e413.
- Griffin SM, Chen IM, Fout GS, Wade TJ, Egorov AI. Development of a multiplex microsphere immunoassay for the quantitation of salivary antibody responses to selected waterborne pathogens. *J Immunol Methods*. 2011;364(1-2):83-93.
- Groves VJ, Lehmann D, Gilbert GL. Seroepidemiology of cryptosporidiosis in children in Papua New Guinea and Australia. *Epidemiol Infect*. 1994;113(3):491-9.
- Guerrant RL. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg Infect Dis*. 1997;3(1):51-7.
- Guerrant RL, Oria RB, Moore SR, Scharf R, Lima AA. Enteric protozoa and human potential. *Ann Trop Paediatr*. 2011;31(3):201-3.
- Hemdan ES, Zhao YJ, Sulkowski E, Porath J. Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(6):1811-5.
- Henriksen SA, Pohlenz JF. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand*. 1981;22(3-4):594-6.
- Hewitt RG, Yiannoutsos CT, Higgs ES, Carey JT, Geiseler PJ, Soave R, y col. Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trial Group. *Clin Infect Dis*. 2000;31(4):1084-92.

- Hommer V, Eichholz J, Petry F. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(3):359-64.
- Hug H, Mohajeri MH, La Fata G. Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. *Nutrients.* 2018;10(2).
- Idris NS, Dwipoerwantoro PG, Kurniawan A, Said M. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(5):309-17.
- Insulander M, Silverlås C, Lebbad M, Karlsson L, Mattsson JG, Svenungsson B. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiol Infect.* 2013;141(5):1009-20.
- Iqbal A, Lim YA, Surin J, Sim BL. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One.* 2012;7(2):e31139.
- Jagai JS, Castronovo DA, Monchak J, Naumova EN. Seasonality of cryptosporidiosis: A meta-analysis approach. *Environ Res.* 2009;109(4):465-78.
- Janknecht R, Nordheim A. Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. *Gene.* 1992;121(2):321-4.
- Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium*--biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv.* 2008;26(4):304-17.
- Jex AR, Gasser RB. Diagnostic and analytical mutation scanning of *Cryptosporidium*: utility and advantages. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(2):179-85.
- Jex AR, Gasser RB. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of "next generation" technologies--research review. *Biotechnol Adv.* 2010;28(1):17-26.

- Jiang J, Alderisio KA, Xiao L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4446-54.
- Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem.* 2002;35(Pt 2):91-105.
- Jumani RS, Bessoff K, Love MS, Miller P, Stebbins EE, Teixeira JE, y col. A Novel Piperazine-Based Drug Lead for Cryptosporidiosis from the Medicines for Malaria Venture Open-Access Malaria Box. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(4).
- Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam.* 2010;823710.
- Kaur N, Diwan N. Cryptosporidiosis in north Indian children. *Indian J Med Sci.* 1991;45(6):143-5.
- Kaushik K, Khurana S, Wanchu A, Malla N. Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Acta Trop.* 2008;107(1):1-7.
- Khan WA, Rogers KA, Karim MM, Ahmed S, Hibberd PL, Calderwood SB, y col. 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.* 2004;71(4):412-9.
- Khurana S, Chaudhary P. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Trop Parasitol.* 2018;8(1):2-7.
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, y col. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 2013;382(9888):209-22.
- Kuusinen A, Arvola M, Oker-Blom C, Keinänen K. Purification of recombinant GluR-D glutamate receptor produced in Sf21 insect cells. *Eur J Biochem.* 1995;233(3):720-6.

- Kváč M, Kestřánová M, Pinková M, Květoňová D, Kalinová J, Wagnerová P, y col. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol.* 2013;191(3-4):218-27.
- Kváč M, Hofmannová L, Hlásková L, Květoňová D, Vítovec J, McEvoy J, y col. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet Parasitol.* 2014;201(1-2):9-17.
- Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňková T, Kanděra J, Ježková J, y col. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and Biological Evidence of Cryptic Species within Gastric *Cryptosporidium* of Mammals. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147090.
- Kváč M, Vlnatá G, Ježková J, Horčíčková M, Konečný R, Hlásková L, y col. *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *Eur J Protistol.* 2018;63:96-104.
- Lammie PJ, Moss DM, Brook Goodhew E, Hamlin K, Krolewiecki A, West SK, y col. Development of a new platform for neglected tropical disease surveillance. *Int J Parasitol.* 2012;42(9):797-800.
- Lan DTB LT, Van Quyet P, Quang HT, Loc NH, Long PT. Cloning and expression of gene encoding P23 protein from *Cryptosporidium parvum*. *J BioSci Biotech.* 2014.
- Latif BM, Jakubek EB. Determination of the specificities of monoclonal and polyclonal antibodies to Neospora, Toxoplasma and *Cryptosporidium* by fluorescent antibody test (FAT). *Trop Biomed.* 2008;25(3):225-31.
- Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* 1999;1(2):141-8.
- Laurent F, Lacroix-Lamandé S. Innate immune responses play a key role in controlling infection of the intestinal epithelium by *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 2017;47(12):711-21.
- Lean IS, Lacroix-Lamandé S, Laurent F, McDonald V. Role of tumor necrosis factor alpha in development of immunity against *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun.* 2006;74(7):4379-82.

- Leitch GJ, He Q. Cryptosporidiosis-an overview. *J Biomed Res.* 2012;25(1):1-16.
- Leung JM, Graham AL, Knowles SCL. Parasite-Microbiota Interactions With the Vertebrate Gut: Synthesis Through an Ecological Lens. *Front Microbiol.* 2018;9:843.
- Lima AA, Moore SR, Barboza MS, Soares AM, Schleupner MA, Newman RD, y col. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2000;181(5):1643-51.
- Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol.* 2000;47(1):91-5.
- Mak JW. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. *Trop Biomed.* 2004;21(2):39-50.
- Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 1996;60(3):512-38.
- McDonald V. Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol.* 2000;22(12):597-604.
- McDonald SA, O'Grady JE, Bajaj-Elliott M, Notley CA, Alexander J, Brombacher F, y col. Protection against the early acute phase of *Cryptosporidium parvum* infection conferred by interleukin-4-induced expression of T helper 1 cytokines. *J Infect Dis.* 2004;190(5):1019-25.
- McDonald V, Pollok RC, Dhaliwal W, Naik S, Farthing MJ, Bajaj-Elliott M. A potential role for interleukin-18 in inhibition of the development of *Cryptosporidium parvum*. *Clin Exp Immunol.* 2006;145(3):555-62.
- McDonald V. Cryptosporidiosis: host immune responses and the prospects for effective immunotherapies. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(11):1077-86.
- McDonald V, Korbel DS, Barakat FM, Choudhry N, Petry F. Innate immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Parasite Immunol.* 2013;35(2):55-64.

- Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A, Newman RD, Greenwood B, Sachs J. Neglected tropical diseases and the Global Fund. *Lancet*. 2009;373(9660):296-7.
- Mondal D, Minak J, Alam M, Liu Y, Dai J, Korpe P, y col. Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh. *Clin Infect Dis*. 2012;54(2):185-92.
- Moore SR, Lima NL, Soares AM, Oriá RB, Pinkerton RC, Barrett LJ, y col. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1156-64.
- Mor SM, Tzipori S. Cryptosporidiosis in children in Sub-Saharan Africa: a lingering challenge. *Clin Infect Dis*. 2008;47(7):915-21.
- Mor SM, Tumwine JK, Ndeezi G, Srinivasan MG, Kaddu-Mulindwa DH, Tzipori S, y col. Respiratory cryptosporidiosis in HIV-seronegative children in Uganda: potential for respiratory transmission. *Clin Infect Dis*. 2010;50(10):1366-72.
- Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RC. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol*. 1997;83(5):825-30.
- Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RC. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol*. 1998;36(4):995-8.
- Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson RC, Ndiritu W, y col. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1180-3.
- Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RC. Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. *Contrib Microbiol*. 2000;6:116-39.
- Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman I, Fayer R, y col. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *J Eukaryot Microbiol*. 2002;49(6):433-40.

- Muchiri JM, Ascolillo L, Mugambi M, Mutwiri T, Ward HD, Naumova EN, y col. Seasonality of *Cryptosporidium* oocyst detection in surface waters of Meru, Kenya as determined by two isolation methods followed by PCR. *J Water Health*. 2009;7(1):67-75.
- Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 1976;70(4):592-8.
- O'Connor RM, Kim K, Khan F, Ward HD. Expression of Cp40/15 in *Toxoplasma gondii*: a surrogate system for the study of *Cryptosporidium* glycoprotein antigens. *Infect Immun*. 2003;71(10):6027-34.
- O'Connor RM, Wanyiri JW, Cevallos AM, Priest JW, Ward HD. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(1):80-3.
- O'Hara SP, Chen XM. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect*. 2011;13(8-9):721-30.
- Okhuysen PC, Rich SM, Chappell CL, Grimes KA, Widmer G, Feng X, y col. Infectivity of a *Cryptosporidium parvum* isolate of cervine origin for healthy adults and interferon-gamma knockout mice. *J Infect Dis*. 2002;185(9):1320-5.
- Olsen L, Åkesson CP, Storset AK, Lacroix-Lamandé S, Boysen P, Metton C, y col. The early intestinal immune response in experimental neonatal ovine cryptosporidiosis is characterized by an increased frequency of perforin expressing NCR1(+) NK cells and by NCR1(-) CD8(+) cell recruitment. *Vet Res*. 2015;46(1):28.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol*. 2004;267:15-52.
- Patel S, Pedraza-Díaz S, McLaughlin J. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. *Int J Parasitol*. 1999;29(8):1241-7.

- Pavlassek I, Ryan U. The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Vet Parasitol.* 2007;144(3-4):349-52.
- Perera PY, Lichy JH, Waldmann TA, Perera LP. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.* 2012;14(3):247-61.
- Pinto C, Giordano DM, Maroni L, Marzioni M. Role of inflammation and proinflammatory cytokines in cholangiocyte pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(4 Pt B):1270-8.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.* 1975;258(5536):598-9.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D. Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol.* 2005;31(3):245-59.
- Preidis GA, Wang HC, Lewis DE, Castellanos-Gonzalez A, Rogers KA, Graviss EA, y col. Seropositive human subjects produce interferon gamma after stimulation with recombinant *Cryptosporidium hominis* gp15. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(3):583-5.
- Priest JW, Kwon JP, Moss DM, Roberts JM, Arrowood MJ, Dworkin MS, y col. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1385-92.
- Priest JW, Bern C, Roberts JM, Kwon JP, Lescano AG, Checkley W, y col. Changes in serum immunoglobulin G levels as a marker for *Cryptosporidium* sp. infection in Peruvian children. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5298-300.
- Priest JW, Bern C, Xiao L, Roberts JM, Kwon JP, Lescano AG, y col. Longitudinal analysis of *Cryptosporidium* species-specific immunoglobulin G antibody responses in Peruvian children. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(1):123-31.
- Putignani L, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010;2010.
- Reinthal FF, Mascher F, Sixl W, Enayat U, Marth E. Cryptosporidiosis in children in Idukki District in southern India. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1989;7(3-4):89-91.

- Ren X, Zhao J, Zhang L, Ning C, Jian F, Wang R, y col. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol*. 2012;130(3):274-81.
- Riggs MW. Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes Infect*. 2002;4(10):1067-80.
- Robinson G, Chalmers RM. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. *Zoonoses Public Health*. 2010;57(7-8):e1-13.
- Rossignol JF, Kabil SM, el-Gohary Y, Younis AM. Effect of nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by *Cryptosporidium* species. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(3):320-4.
- Rossle, Nurul, Fariza. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. In: Latif, Baha, editors. Malaysia: *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 2013. p. 916-24.
- Ruecker NJ, Hoffman RM, Chalmers RM, Neumann NF. Detection and resolution of *Cryptosporidium* species and species mixtures by genus-specific nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, direct sequencing, and cloning. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(12):3998-4007.
- Ryan U, Xiao L, Read C, Zhou L, Lal AA, Pavlasek I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(7):4302-7.
- Ryan UM, Monis P, Enemark HL, Sulaiman I, Samarasinghe B, Read C, y col. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J Parasitol*. 2004;90(4):769-73.
- Ryan UM, Power M, Xiao L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55(1):22-6.
- Ryan U, Power M. *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology*. 2012;139(13):1673-88.

- Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 2014;141(13):1667-85.
- Ryan U, Hijjawi N, Xiao L. Foodborne cryptosporidiosis. *Int J Parasitol*. 2018;48(1):1-12.
- Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(2):124-9.
- Sarkar R, Ajjampur SS, Prabakaran AD, Geetha JC, Sowmyanarayanan TV, Kane A, y col. Cryptosporidiosis among children in an endemic semiurban community in southern India: does a protected drinking water source decrease infection? *Clin Infect Dis*. 2013;57(3):398-406.
- Sarkar R, Tate JE, Ajjampur SS, Kattula D, John J, Ward HD, y col. Burden of diarrhea, hospitalization and mortality due to cryptosporidial infections in Indian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e3042.
- Schlesselman JJ. Case-Control Studies: Design, Conduct, Analysis New York, *Oxford University Press*.1982. 394 p.
- Shirley DA, Moonah SN, Kotloff KL. Burden of disease from cryptosporidiosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25(5):555-63.
- Shrivastava AK, Kumar S, Smith WA, Sahu PS. Revisiting the global problem of cryptosporidiosis and recommendations. *Trop Parasitol*. 2017;7(1):8-17.
- Šlapeta J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *Int J Parasitol*. 2013;43(12-13):957-70.
- Smith DM. Cryptosporidiosis: still a problem. *AIDS Read*. 2007;17(8):381-2, 8-9.
- Smith HV, Cacciò SM, Cook N, Nichols RA, Tait A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol*. 2007;149(1-2):29-40.
- Sobati H, Jasor-Gharebagh H, Honari H. Expression and Purification of gp40/15 Antigen of *Cryptosporidium parvum* Parasite in *Escherichia coli*: an Innovative Approach in Vaccine Production. *Iran Red Crescent Med J*. 2017 April; 19(4):e43040.

- Sokolova E, Aström J, Pettersson TJ, Bergstedt O, Hermansson M. Estimation of pathogen concentrations in a drinking water source using hydrodynamic modelling and microbial source tracking. *J Water Health*. 2012;10(3):358-70.
- Spano F, Putignani L, Guida S, Crisanti A. *Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp Parasitol*. 1998;90(2):195-8.
- Sponseller JK, Griffiths JK, Tzipori S. The evolution of respiratory Cryptosporidiosis: evidence for transmission by inhalation. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):575-86.
- Squire SA, Ryan U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):195.
- Strong WB, Gut J, Nelson RG. 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*. 2000;68(7):4117-34.
- Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(6):2385-91.
- Sulaiman IM, Lal AA, Xiao L. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J Parasitol*. 2002;88(2):388-94.
- Swierczewski B, Odundo E, Ndonge J, Kirera R, Odhiambo C, Oaks E. Comparison of the Triage Micro Parasite Panel and Microscopy for the Detection of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Stool Samples Collected in Kenya. *J Trop Med*. 2012;2012:564721.
- Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*. 2007;204(2):239-43.
- Tumwine JK, Kekitiinwa A, Bakeera-Kitaka S, Ndeezi G, Downing R, Feng X, et al. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea

- with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(5):921-5.
- Tyzzar EE. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium* Muris (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *J Med Res.* 1910;23(3):487-510.3.
- Urrea-Quezada A, González-Díaz M, Villegas-Gómez I, Durazo M, Hernández J, Xiao L, y col. Clinical Manifestations of Cryptosporidiosis and Identification of a New *Cryptosporidium* Subtype in Patients From Sonora, Mexico. *Pediatr Infect Dis J.* 2017.
- Valenzuela O, González-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, Durazo M, y col. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico. *PLoS One.* 2014;9(4):e96128.
- Vanathy K, Parija SC, Mandal J, Hamide A, Krishnamurthy S. Cryptosporidiosis: A mini review. *Trop Parasitol.* 2017;7(2):72-80.
- Wang R, Zhang L, Feng Y, Ning C, Jian F, Xiao L, y col. Molecular characterization of a new genotype of *Cryptosporidium* from American minks (*Mustela vison*) in China. *Vet Parasitol.* 2008;154(1-2):162-6.
- White AC, Chappell CL, Hayat CS, Kimball KT, Flanigan TP, Goodgame RW. Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial. *J Infect Dis.* 1994;170(2):419-24.
- Wilhelm CL, Yarovinsky F. Apicomplexan infections in the gut. *Parasite Immunol.* 2014;36(9):409-20.
- Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, y col. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3386-91.
- Xiao L, Morgan UM, Fayer R, Thompson RC, Lal AA. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol Today.* 2000;16(7):287-92.
- Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(12):5492-8.

- Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, y col. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis.* 2001;183(3):492-7.
- Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, Zhou L, Atwill ER, Tischler ML, y col. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int J Parasitol.* 2002;32(14):1773-85.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):72-97.
- Xiao L, Ryan UM, Graczyk TK, Limor J, Li L, Kombert M, y col. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):891-9.
- Xiao L, Cama VA, Cabrera L, Ortega Y, Pearson J, Gilman RH. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):2014-6.
- Xiao L, Hlavsa MC, Yoder J, Ewers C, Dearen T, Yang W, y col. Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):3017-20.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.* 2010;124(1):80-9.
- Yang Z, Fu Y, Gong P, Zheng J, Liu L, Yu Y, y col. Bovine TLR2 and TLR4 mediate *Cryptosporidium parvum* recognition in bovine intestinal epithelial cells. *Microb Pathog.* 2015;85:29-34.
- Zhao GH, Cheng WY, Wang W, Jia YQ, Fang YQ, Du SZ, y col. The expression dynamics of IL-17 and Th17 response relative cytokines in the trachea and spleen of chickens after infection with *Cryptosporidium baileyi*. *Parasit Vectors.* 2014;7:212.
- Zhou R, Feng Y, Chen XM. Non-coding RNAs in epithelial immunity to *Cryptosporidium* infection. *Parasitology.* 2014:1-11.

Zintl A, Proctor AF, Read C, Dewaal T, Shanaghy N, Fanning S, y col. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiol Infect.* 2009;137(2):270-7.

CRYPTOSPORIDIUM CANIS IN TWO MEXICAN TODDLERS

Martana González-Díaz, MSc,*
Alejandro Urrea-Quezada, MSc,* Isaac Villegas-Gómez, MSc,*
María Durazo, MSc,† Adriana Garibay-Escobar, PhD,*
Jesús Hernández, DVM, PhD,‡ Lihua Xiao, DVM, PhD,§
and Olivia Valenzuela, PhD*

Abstract: *Cryptosporidium canis* is reported for the first time in 2 toddlers in Northwestern Mexico. The 2 toddlers (33 and 34 months old) were symptomatic at diagnosis, presenting diarrhea and fever, and 1 case presented chronic malnutrition. Both toddlers were HIV-negative. *C. canis* was identified by *SspI* and *VspI* restriction enzyme digestion of the 18S rRNA polymerase chain reaction products and confirmed by sequence analysis.

Key Words: *Cryptosporidium*, genotype, diarrhea, toddlers, children, Mexico

Accepted for publication April 20, 2016.

From the *Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México; †Servicio de Infectología, Hospital Infantil del Estado de Sonora, Hermosillo, Sonora, México; ‡Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo, Sonora, México; and §Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia.

Supported by institutional funds.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Olivia Valenzuela, PhD, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centros Hermosillo, Sonora, México, CP 83000. E-mail: o_valenzuela@guayacan.uson.mx; valenzuela.o@gmail.com.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/INF.0000000000001287

Cryptosporidium is a zoonotic protozoan parasite that infects many animal species. In humans, it can cause acute or chronic diarrhea and even death in immunocompromised patients. Parasite transmission occurs by the fecal-oral route.¹

Recent epidemiologic and molecular studies have shown that dogs and cats are primarily infected with *Cryptosporidium canis* and *Cryptosporidium felis*, respectively, whereas humans are mostly infected with *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. However, other species, including *Cryptosporidium meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium muris*, are sometimes found in humans, especially in developing countries.¹

CASE REPORT

This study was registered in the Secretariat of Health of Sonora State (No. 196) and was approved by the Ethics Committee of the Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) and the Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDICH) (CEI-09-2015). Informed consent was obtained from the patient's parents or guardians.

This study describes 2 cryptosporidiosis cases in 2-year-old toddlers; one was treated at the HIES, and the other was treated at the CMDICH. The first patient (S22) was 33 months old, lived in Caborca, Sonora, Mexico, and received an initial diagnosis of grade II malnutrition and chronic diarrhea. The first symptoms appeared at 8 months of age and included hyporexia. Patient S22 presented with diarrhea 6 months later (14 months old), requiring hospitalization for 3 days, and showed the following characteristics: semiliquid stools mainly occurring immediately postprandial and without mucus and blood, relapses every 15–20 days, and no weight gain. Patient S22 was treated with multivitamins, oral rehydration

solution, ampicillin and amikacin for 2 days. At 33 months of age, patient S22 exhibited diarrhea with watery stools 7 times per day (without mucus and blood), had a fever of 38.5°C and was hospitalized during the study. Laboratory studies for viral (HIV, hepatitis B virus, hepatitis C virus and rotavirus) infections were negative, and other tests such as complete blood count, urinalysis and hepatic analysis were normal. Stool analysis was negative for amoeba.

The second patient (S25) was 34 months old, lived in Hermosillo, Sonora, Mexico, had no initial diagnosis, and was treated at a CMDICH because of diarrhea without mucus and blood. The patient presented with upper abdomen pain, fever and vomiting (4 times). The toddler was treated with for 1 day with butylscopolamine, paracetamol and meclizine with pyridoxine, before cryptosporidiosis diagnosis. After *Cryptosporidium* detection, patient S25 was treated with trimethoprim-sulfamethoxazole (144 mg) each 12 hours for 5 days, paracetamol, and aluminum hydroxide plus dimethicone.

One stool sample from each patient was sent to the Parasitology Laboratory of the Department of Chemical and Biological Sciences at the Universidad de Sonora for examination for *Cryptosporidium* spp. using Kinyoun staining.² The diagnosis of cryptosporidiosis was done when toddlers were 33 and 34 months old, respectively.

DNA extraction from stool samples was performed with a ZR Fecal DNA MiniPrep Extraction Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA), and the DNA was stored at -20°C. Nested polymerase chain reaction (PCR) analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* was performed as described,³ producing a 826- to 864-bp amplicon (Fig. 1). Positive controls of *C. parvum* and *C. hominis* from patients in Mexico were included in each PCR analysis. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the secondary PCR products with enzymes *SspI* and *VspI* was performed to identify *Cryptosporidium* species.³ Figure 1 shows the *SspI* RFLP products from samples S22 and S25, together with those from the *C. parvum* (108, 254 and 449 bp) and *C. hominis* (111, 254 and 449 bp) controls. The bands from samples S22 and S25 were ~100, 250 and 420 bp, matching the typical banding pattern of *C. canis*.⁴ Figure 1 shows the *VspI* RFLP products from samples S22 and S25, together with those from the *C. parvum* (104 and 628 bp) and *C. hominis* (104 and 561 bp) controls. The bands found in samples S22 and S25 were ~100 and 630 bp, matching the typical banding pattern of *C. canis*.⁴ Furthermore, the identification of *C. canis* was confirmed by sequence analysis of the PCR products from the 2 samples, which were deposited in GenBank under accession numbers KT749817 and KT749818. The sequence S22 was identical (100%) and S25 was similar (99%) to AF112576 and AB210854 obtained from dogs.

DISCUSSION

In Mexico, molecular characterizations of cryptosporidiosis cases have identified only *C. parvum* and *C. hominis* in immunocompetent and immunocompromised children.³ This study describes the first finding of *C. canis* in 2 toddlers in Northwestern Mexico. Young age is a risk factor for cryptosporidiosis. *Cryptosporidium* infection is also more severe in malnourished mice.⁵

The 2 cases identified in this study presented with diarrhea, abdominal pain and fever, and 1 toddler presented with grade II malnutrition. Cama et al⁷ reported 109 cryptosporidiosis cases in children from Peru during 1995–1998 who presented with diarrhea, general malaise, nausea and vomiting, but fever was not reported in any case, even in 2 *C. canis* cases.

Clinical Manifestations of Cryptosporidiosis and Identification of a New *Cryptosporidium* Subtype in Patients From Sonora, Mexico

Alejandro Urrea-Quezada, MSc,* Mariana González-Díaz, MSc,* Isaac Villegas-Gómez, MSc,* María Durazo, MSc,† Jesús Hernández, DVM, PhD,‡ Lihua Xiao, DVM, PhD,§ and Olivia Valenzuela, PhD*

Abstract The aim of this study was to identify the clinical manifestations of cryptosporidiosis and the distribution of *Cryptosporidium* spp. and subtypes in children in Sonora, Mexico. Two subtypes of *C. parvum*, including IIAA15G2R1 and IIAA5G3a, and 6 subtypes of *Cryptosporidium hominis*, including IA1A14R3, IA1A15R3, IBA12G3, IDA23, IEA11G3T3, and a new subtype IA1A14R11, were identified. *Cryptosporidium* as an etiologic agent for acute gastroenteritis is discussed.

Key Words: *Cryptosporidium*, molecular characterization, children, acute gastroenteritis, Mexico

Accepted for publication August 17, 2017.

From the *Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, †Servicio de Infectología, Hospital Infantil del Estado de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, Servicio de Pediatría, Centro Médico Dr. Ignacio Chávez, and ‡Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Hermosillo, México; and §Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Disease, Center of Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, CDC, Atlanta, U.S.A.

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (grant number 258454).

The authors have no conflicts of interest to disclose. Address for correspondence: Olivia Valenzuela, PhD, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, México, CP 83000. E-mail: olivia.valenzuela@unison.mx; valenzuela.o@gmail.com Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. DOI: 10.1097/INF.0000000000001762

Cryptosporidium spp. are emerging pathogenic parasites and the second most important cause of diarrhea-associated death in children younger than 5 years globally, only after rotavirus, according to data from the Global Burden Diseases 2015 Study.¹ It is also one of the 4 pathogens responsible of moderate-to-severe diarrhea in developing countries.²

There are significant genetic variations within the genus *Cryptosporidium*, which allow for the characterization of various species/genotypes and subtypes. Restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit (*SSU*) *rRNA* is commonly performed to identify *Cryptosporidium* species/genotypes. DNA sequence analysis of the gene encoding the 60-kDa glycoprotein (*GP60*) is used to identify subtype families and subtypes.³

The distribution of these genotypes and subtypes has been reported to be geographically and host dependent,⁴ with *C. parvum* and *C. hominis* being the primary subtypes identified in human samples.³ In Mexico, few reports have characterized the subtypes of *Cryptosporidium*. Castillo et al⁵ identified *C. parvum* in 67% (85/126) of calves through the amplification of the *SSU rRNA* gene. Furthermore, Valenzuela et al⁶ identified *C. parvum* subtypes (IIAA15G2R1 and IIAA16G1R1) and *C. hominis* subtypes (IAA14R3, IA1A15R3, IBA10G2, IDA17 and IEA11G3T3) in 12 children (< 14 years old) from northwestern and central Mexico.

Acute gastroenteritis (AGE) is defined as decreased consistency of feces (soft or fluid) and increased frequency (≥ 3 in 24 hours) of bowel movements, with or without fever or vomiting.⁷

Cama et al⁸ found that *C. hominis* infection was associated with other symptoms such as nausea, vomiting and general malaise, in addition to diarrhea. In contrast, species such as *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis* and *C. meleagridis* were associated with only diarrhea. However, further studies are needed to substantiate these observations in other epidemiologic settings.⁸

The present study aimed to report clinical findings in patients infected with various *C. parvum* and *C. hominis* subtypes in Mexico and to describe the occurrence of a new *C. hominis* subtype.

METHODS

Statements of Ethics

This study was registered in the Secretaría de Salud del Estado de Sonora (project no. 196) and approved by the Ethics Committee of the Hospital Infantil del Estado de Sonora and the Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CEI-09-2015). Informed consent was also obtained from the parent or guardian of each patient after the objectives of the study were clearly explained. The clinical characteristics of the patients were obtained with prior authorization from the patients' clinical files at each hospital.

Sample Collection

A total of 2077 stool patient samples were analyzed and 32 (18 girls and 14 boys) were positive to *Cryptosporidium* spp. They were 5 months to 8 years of age and mostly had gastrointestinal disorders and reside in urban areas of the state of Sonora. Twenty-seven children attended Hospital Infantil del Estado de Sonora and 5 from Centro Médico Dr. Ignacio Chávez. The samples were sent to the Laboratory of Parasitology of the Departamento de Ciencias Químico Biológicas of the Universidad de Sonora for the microscopic diagnosis and molecular characterization of *Cryptosporidium*. Positive samples were stored at 4°C for further analysis. The inclusion criteria of patients in the study were positive for *Cryptosporidium* by Kinyoun staining, male or female, with or without clinical symptoms of AGE. The cases included in this study occurred during April 2014 to November 2016.

DNA Extraction

DNA extraction was performed with 150 mg of stool sample using the Fecal DNA MiniPrep ZR Removal Kit (Zymo Research Corp, Irvine, CA), according to the manufacturer's recommendations after 5 freeze (−20°C) and thaw (95°C) cycles. The DNA obtained was stored at −20°C until further analysis.

Molecular Characterization of *Cryptosporidium*

The molecular characterization was performed by analyzing the sequences of the nested polymerase chain reaction (PCR) products for the *SSU rRNA* gene (826–864 bp) and the *GP60* gene (880–900 bp).⁶ The PCR products from these 2 genetic loci were purified using PureLink PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc, Carlsbad, CA) and sequenced on an ABI Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The DNA sequences were assembled using Chromas 2.6, and *Cryptosporidium* spp. and subtypes were identified by multiple sequence alignment analyses using Multiple Sequence Alignment (CLUSTALW) and Basic Local Alignment Search Tool. *GP60* sequences of *Cryptosporidium* spp. obtained in this study were deposited in the GenBank under accession no. KY990888–KY990919.

Statistical Analysis

The χ^2 test was used to assess the association ($P \leq 0.05$) between the clinical characteristics in the patients and the infectious genotype using the EpiInfo 7.2. (Centers for Disease Control