

12. Genotipificación y variabilidad genética de especies de *Cryptosporidium* en aislados humanos colombianos, utilizando análisis multilocus de secuencia

Johanna Marcela Urán-Velásquez^{1,2}, Juan Fernando Álzate-Restrepo^{2,3}, Ana Luz Galván-Díaz⁴, Gisela María García-Montoya^{2,3}

Palabras clave: *Cryptosporidium*, Tipificación de secuencias multilocus, Variación genética

Key words: *Cryptosporidium*, Genotyping, Multilocus Sequence Typing, Genetic variation

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp es un protozoo intestinal de importancia en salud pública humana y veterinaria. En humanos puede provocar gastroenteritis y diarrea, especialmente en niños menores de cinco años e individuos inmunocomprometidos. Este apicomplexa está relacionado con brotes de transmisión hídrica, por alimentos o contacto con animales. A la fecha, para el género *Cryptosporidium* se reportan 38 especies y más de 40 genotipos con diferencias intra especie e intra genotipo, evidencia de variabilidad genética, la cual podría estar implicada entre otros aspectos, con virulencia, especificidad y rango de hospedadores para este protozoo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En *Cryptosporidium* la variabilidad genética, ha sido estudiada por el análisis de secuencia del gen gp60 como único marcador. Sin embargo, análisis que incluyen un sólo locus, aportan información limitada e imprecisa para estudios de epidemiología molecular basados en estructura poblacional y dinámica de transmisión. Así pues, la variabilidad genética se explora con mayor resolución usando análisis mul-

¹ Estudiante de maestría, Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia

² Centro Nacional de Secuenciación Genómica, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia.

³ Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

⁴ Grupo de Microbiología Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

Correspondencia: gisela.garcia@udea.edu.co; johanna.uran@udea.edu.co

Financiación: Colciencias, 115-77757608

tilocus de secuencias (MLST), para lo cual en *Cryptosporidium* se emplean marcadores polimórficos con secuencias micro/minisatélites. A la fecha, no se conoce ningún estudio colombiano, que aborde la variabilidad genética con análisis MLST, cuyos resultados permitan inferir aspectos sobre la dinámica de transmisión de *Cryptosporidium* en Colombia.

OBJETIVO

Clasificar taxonómica y filogenéticamente 28 aislados humanos colombianos de *Cryptosporidium* spp, e implementar análisis multilocus de secuencias para evaluar la variabilidad intra e inter-genotipos de los mismos.

METODOLOGÍA

Estudio descriptivo, que incluye aislados de *Cryptosporidium* procedentes de 20 niños de Antioquia y Santander, y ocho de individuos VIH+ de Antioquia. La clasificación taxonómica se realizó amplificando y analizando la secuencia parcial del gen 18S rRNA; los subgenotipos se definieron con base en el análisis de la secuencia parcial de gp60. Los análisis MLST que incluyeron siete marcadores micro/minisatélites (CP47, ML2, MS5, MS9, MSC6-7, TP14, gp60), se basaron en análisis individuales y de secuencias concatenadas, para identificar los diferentes haplotipos y establecer los genotipos multilocus (MLG). Las relaciones filogenéticas para 18S rRNA, gp60 y MLST, se establecieron con MEGA7. Para evaluar algunos aspectos de estructura genética, se emplearán los softwares DNAsp y Network.

RESULTADOS PRELIMINARES

Se identificaron cinco especies de *Cryptosporidium*: *C.hominis* 16/28, *C.parvum* 8/28, *C.meleagridis* 1/28, *C.felis* 2/28 y *C.suis* 1/28. Comparando los resultados de los niños de Antioquia y Santander, se encontró mayor frecuencia de *C.hominis* en Antioquia 9/10 y de *C.parvum* en Santander 5/10; además se identificaron 11 subgenotipos entre las especies *hominis* y *parvum*, usando sólo gp60. En los análisis MLST, se incluyeron 22 aislados (*C.hominis* 14/22 y *C.parvum* 8/22), para los cuales se logró la amplificación de 6/7 de los marcadores. En los análisis individuales, se observó un comportamiento polimórfico de todos los marcadores, el número de haplotipos por marcador fue mayor en *C. hominis* con un rango entre las muestras de 4 a 10, comparado con *C. parvum*

con rango de 3 a 7. Para *C. hominis* fue MS5 y CP47 los marcadores con mayor poliformo de secuencia y CP47 para *C. parvum*. Los análisis de secuencia concatenadas, mostraron para *C. hominis* 13MLG y 8MLG para *C. parvum*, comparativamente con lo encontrado sólo para gp60 (seis y cinco subgenotipos respectivamente). Finalmente, en análisis preliminares sobre las variaciones intra-especie, se ha observado que dos aislados de *C. hominis* presentan 100% de identidad en las secuencias concatenadas, y que, aunque en *C. parvum* se observe menor variabilidad individual, todos los aislados de esta especie presentan diferentes MLG.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PRELIMINARES

Las diferencias en frecuencia de las especies encontradas, podría indicar la ruta de transmisión (antropónica o zoonótica) para cada región. Los análisis MLST, arrojan mayor variabilidad genética inter e intra-especie cuando se compara con lo obtenido con gp60 como único marcador, resultados que están de acuerdo con lo reportado por otros autores, y aunque no se desestima el uso de gp60, se muestra la obligatoriedad de analizar múltiples locus para evaluar la variabilidad genética.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. Cryptosporidium pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):115-134.
2. Xiao L, Feng Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food Waterborne Parasitol.* 2017;8-9:14-32. Published 2017 Sep 29.
3. Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* 2018;184:1-14.
4. Feng Y, Ryan UM, Xiao L. Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol.* 2018;34(11):997-1011.
5. Gilchrist CA, Cotton JA, Burkey C, Arju T, Gilmartin A, Lin Y, et al. Genetic Diversity of *Cryptosporidium hominis* in a Bangladeshi Community as Revealed by Whole-Genome Sequencing. *J Infect Dis.* 2018;218(2):259-264.
6. Widmer G, Lee Y. Comparison of single- and multilocus genetic diversity in the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(19):6639-6644.
7. Li N, Xiao L, Cama VA, Ortega Y, Gilman RH, Guoet M, et al. Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(10):1573-1582.
8. Wang R, Zhang L, Axén C, Bjorkman C, Jian F, Amer S, et al. *Cryptosporidium parvum* IId family: clonal population and dispersal from Western Asia to other geographical regions. *Sci Rep.* 2014;4:4208. Published 2014 Feb 27.
9. Yadav P, Mirdha BR, Makharia GK, Chaudhry R. Multilocus sequence typing of *Cryptosporidium hominis* from northern India. *Indian J Med Res.* 2017;145(1):102-111.
10. Feng Y, Tiao N, Li N, Hlavsa M, Xiao L. Multilocus sequence typing of an emerging *Cryptosporidium hominis* subtype in the United States. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):524-530.