



Prevalencia de la criptosporidiosis en seres humanos y terneros, y detección molecular del *Cryptosporidium parvum*

Abdurrahman Ekici^{1*} ; Hasan Yılmaz¹ ; Yunus Emre Beyhan¹ 

¹Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Van, Turkey.

*Correspondence: abdurrahman2400@gmail.com

Recibido: October 2021; Aceptado: Diciembre 2021; Publicado: Mayo 2022.

RESUMEN

Objetivo. El objetivo de este estudio fue investigar la prevalencia de especies de *Cryptosporidium* en humanos y terneros en la provincia de Van, Turquía. **Materiales y métodos.** Se incluyeron en el estudio un total de 150 pacientes, incluidos 50 pacientes en hemodiálisis, 40 pacientes inmunosuprimidos con diarrea, 30 pacientes con diarrea solamente y 30 pacientes inmunocompetentes. Se recolectaron muestras de heces rectales de un total de 50 terneros alojados en establos y granjas en 10 aldeas centrales de Van, Turquía. **Resultados.** Se detectó *Cryptosporidium parvum* en el 17.3% de las 150 muestras de heces tomadas de seres humanos. *C. parvum* se observó en el 20% de los 50 pacientes en hemodiálisis, el 32.5% de los 40 pacientes inmunosuprimidos con diarrea y el 10% de los 30 pacientes con diarrea solamente, mientras que no hubo *Cryptosporidium* spp. detectado en los pacientes inmunocompetentes. *C. parvum* se observó en sólo el 6% de los 30 terneros diarreicos. **Conclusiones.** Claramente se entendió que la Criptosporidiosis fue detectada en una alta tasa en las muestras de los pacientes inmunosuprimidos sin y con síntomas de diarrea, y que además la especie activa que causó la enfermedad fue el agente etiológico *Cryptosporidium parvum*. Por lo tanto, estos dos grupos de pacientes deben ser evaluados en lo que a términos de Criptosporidiosis se refiere.

Palabras clave: *Cryptosporidium parvum*; PCR; prevalencia (Fuente: CAB).

ABSTRACT

Objective. To investigate of the prevalence of *Cryptosporidium* species in humans and calves in the province of Van, Turkey. **Materials and methods.** Included in this research were 150 patients, comprising 50 hemodialysis patients, 40 immunosuppressed patients with diarrhea, 30 patients with diarrhea only, and 30 immunocompetent patients. Collected were stool rectal samples from 50 calves that were housed in stables and farms in 10 central villages of Van, Turkey. **Results.** *Cryptosporidium parvum* was detected in 17.3% of the 150 human stool samples. *C. parvum* was

Como citar (Vancouver).

Ekici A, Yılmaz H, Beyhan YE. Prevalencia de la criptosporidiosis en seres humanos y terneros, y detección molecular del *Cryptosporidium parvum*. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(2):e2447. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2447>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

observed in 20% of the 50 samples from the hemodialysis patients, 32.5% of the 40 samples from the immunosuppressed patients with diarrhea, and 10% of the 30 samples from patients with diarrhea only, whereas no *Cryptosporidium* spp. was detected in the samples from the immunocompetent patients. *C. parvum* was observed in only 6% of the samples from the diarrheic 30 calves. **Conclusions.** It was clearly understood that cryptosporidiosis was detected at a high rate in the samples from the immunosuppressed patients and those who were immunosuppressed with diarrhea, and that the active and effective species that causes cryptosporidiosis in the Van region is *C. parvum*. Hence, these patient groups should be evaluated in terms of cryptosporidiosis.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*; PCR; prevalence (Source CAB).

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias se conciben como unas de las enfermedades de la salud más significativas a nivel mundial y se observan con mayor frecuencia en aquellos países en vías de desarrollo. Este tipo de infecciones son más peligrosas en los adolescentes y pacientes inmunocomprometidos (1).

Algunos parásitos intestinales, que no son patógenos, no producen ningún síntoma o causan diarrea leve en personas con un sistema inmunológico sano y pueden desarrollarse con mayor gravedad en pacientes con un sistema inmunológico suprimido y provocar diarreas letales. Entre los parásitos intestinales más comunes que pueden causar este tipo de diarreas en estos grupos de pacientes se encuentran las especies del género *Cryptosporidium*. Las especies del género *Cryptosporidium* viven en las microvellosidades del estómago y en las células epiteliales de la mucosa intestinal. Muestran una ubicación intracelular extracitoplásmica y proporcionan energía y nutrición a la célula. El *Cryptosporidium parvum* no cuenta con huéspedes intermediarios en su ciclo de vida. *Cryptosporidium* se transmite por vía oral o a través de las heces. Los mecanismos de transmisión incluyen el contacto directo con una persona infectada (de persona a persona) o de un animal a una persona, así como a través del consumo de alimentos y bebidas contaminados. Esta parasitosis afecta a todo el sistema digestivo, siendo la zona del yeyuno la más afectada. Además del sistema digestivo, también afecta al sistema respiratorio y a los conductos biliares. En la criptosporidiosis, se produce atrofia de las vellosidades, aumento en el tamaño de las criptas e infiltrado de células mononucleares de la propia lámina. Debido al daño inflamatorio en el intestino delgado, la absorción se ve afectada y, con el aumento de la secreción, se produce diarrea y retraso del crecimiento (1,2,3,4).

Para diagnosticar la criptosporidiosis, se utiliza una muestra de heces como material de estudio. La criptosporidiosis se diagnostica mediante un examen microscópico de las heces teñidas, métodos fluorescentes, pruebas basadas en la detección de antígenos y métodos moleculares (5). El diagnóstico se realizó a partir de la coloración que adquieren los ooquistes tras el método de tinción ácido-resistente modificada. En todo examen microscópico de tinción tradicional, la necesidad de contar con personal experimentado y la baja sensibilidad del método son desventajas importantes. La microscopía de inmunofluorescencia se utiliza como la técnica establecida y reconocida por los laboratorios de referencia de Estados Unidos y Europa. Los métodos moleculares se aplican en aquellos laboratorios con una infraestructura apropiada debido a la alta sensibilidad y especificidad que revisten los estudios y que permiten, a su vez, la separación de las especies (1,5).

El diagnóstico de las infecciones producidas por las especies del género *Cryptosporidium*, por lo general, se ha basado en varios métodos de análisis que determinan la presencia del parásito en las muestras de heces y de bilis. También, se utilizan para el diagnóstico otros métodos como la endoscopía, la biopsia de mucosa, el aspirado y cultivo del intestino delgado o el lavado broncoalveolar. Sin embargo, el uso de estas técnicas por sí solas a veces es insuficiente para encontrar con precisión el agente (1,5).

Dado que las muestras fecales de casos clínicos generalmente contienen una gran cantidad de quistes y material antigénico del parásito, incluso los métodos con una sensibilidad baja pueden arrojar resultados positivos. Por el contrario, al analizar muestras con un número bajo de quistes, como pueden ser las necesarias para una investigación epidemiológica, el uso de un método inicial de cribado, confirmado luego por un método confirmatorio cuidadoso tal como la inmunofluorescencia o las vistas

moleculares pueden aumentar la calidad del diagnóstico. A tal fin, se ha indicado que la tinción inmunofluorescente de quistes con anticuerpo monoclonal anti- *Cryptosporidium* conjugado con isotiocianato de fluoresceína es particularmente específica (96–100%) y sensible (98.5–100%). Por otro lado, el antígeno fecal de *Cryptosporidium* puede detectarse fácilmente en las muestras de heces aún antes de que los ooquistes comiencen a excretarse. Existen múltiples estudios de laboratorio que usan pruebas ELISA e inmunocromatográficas con diferentes especificidades de antígenos fecales y la especificidad y sensibilidad informadas son entre 97 y 100%. Otra ventaja de estos ensayos de detección de antígeno fecal es que se pueden utilizar para analizar un gran número de muestras de forma rápida y rentable. Sin embargo, para estudios epidemiológicos más detallados, estas pruebas no son adecuadas porque no proporcionan ningún resultado confiable (6).

Se han realizado diferentes estudios sobre las especies del género *Cryptosporidium* tanto en seres humanos como en terneros en la provincia de Van, Turquía. En un estudio llevado a cabo en niños, se encontró una tasa de especies de *Cryptosporidium* de 4.9% (7). En otro estudio realizado en niños con diarrea, se encontró una tasa de especies de *Cryptosporidium* de 28% (8). En un estudio con trabajadores de la industria alimenticia asintomáticos, el nivel de incidencia de *Cryptosporidium* fue de 1.3% (9). *Cryptosporidium* spp. se encontró en 1.1% de los trabajadores, 13.2% de las ovejas sacrificadas, 10.7% de las cabras, y 8.1% del ganado de trabajo de la municipalidad de Van (10). En otro estudio realizado en terneros, se halló *Cryptosporidium* en el 37.2% de los animales que no padecían diarrea y en el 43.9% de los animales con diarrea (11).

El objetivo del presente estudio fue investigar la prevalencia de criptosporidiosis en muestras de heces recolectadas en seres humanos y en terneros en la provincia de Van (Turquía) utilizando el método de tinción ácido-resistente modificado, pruebas inmunocromatográficas y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR). Además, se tuvo como objetivo comparar los métodos y registrar las características de las muestras que dieron positivo al test de *Cryptosporidium* mediante la técnica de PCR-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras. Este estudio se llevó cabo entre junio de 2016 y febrero de 2017 en el Laboratorio del Departamento de Investigación de Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad Van Yüzüncü Yıl. Se tomaron muestras de heces en humanos y terneros. Formaron parte del estudio unas 200 muestras de heces en total, de las cuales 150 eran muestras de humanos (de ellas, 50 eran de pacientes con insuficiencia renal crónica, 40 de pacientes inmunosuprimidos con diarrea, 30 de pacientes con solo diarrea y 30 de pacientes inmunocompetentes) y 50 eran muestras de terneros (30 de terneros con diarrea y 20 de terneros sin diarrea). En el caso de los terneros, las muestras de materia fecal se extrajeron directamente del recto del animal. Los antecedentes epidemiológicos y los hallazgos clínicos de los pacientes se obtuvieron a partir del sistema de automatización del hospital.

En este estudio, se utilizaron el método de tinción ácido-resistente modificado, pruebas inmunocromatográficas, el método de PCR anidado y RFLP (12,13).

Extracción y purificación de ADN genómico

El ADN necesario para los métodos moleculares que se utilizarán en el estudio se obtuvo mediante un kit de extracción (GeneMATRIX stool DNA purification kit, Polonia). En esta etapa, los ooquistes se agitaron con vórtex cada cinco minutos y se incubaron a 95 °C durante 30 minutos en un calentador de bloque seco. A continuación, se realizó la extracción de ADN de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

PCR anidado. BCOWPF: En la primera etapa del método de PCR anidado se utilizaron 5'-ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCCTC-3' y BCOWPR: 5'-CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAA CCC-3'. Para la segunda etapa del procedimiento de PCR, se amplificó la región deseada usando los cebadores Cry-15: 5'-GTAGATAATGGAAGAGATTGTG-3' y Cry-9: 5'-GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG-3', los cuales amplificaron la región de 553 pb (13). El protocolo de PCR se creó utilizando la mezcla maestra ya preparada Solis Biodyne 5X Firepol (12.5 mM de MgCl₂). La mezcla de reacción se preparó a una concentración final de 20 µL para el primer conjunto de cebadores y 30 µL para el segundo conjunto de cebadores. Los cebadores se diluyeron luego a 10 nM con agua destilada estéril. La mezcla de reacción se preparó en

el primer procedimiento de PCR con 12 µL de H₂O, 4 µL de mezcla maestra firepol 5X, 1 µL de cebador directo y cebador reverso, y 2 µL de ADN. Para la segunda etapa del procedimiento de PCR, se prepararon 20 µL de H₂O, 6 µL de mezcla maestra firepol 5X y 1.5 µL de cebador directo y cebador reverso. El ciclo térmico de la PCR fue de 95°C durante cuatro minutos y de 95°C durante 33 segundos y, luego, 18 ciclos a 58°C durante 45 segundos, a 72°C durante 45 segundos, a 72°C durante 10 minutos y a 4°C ∞. En el segundo de los procedimientos, solo se utilizó una temperatura de unión primaria de 45°C durante 33 ciclos.

Para el análisis de la secuencia bidireccional de la región del gen que codifica para la proteína de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP), se enviaron las muestras a un laboratorio comercial. Los resultados del análisis de secuencia obtenidos se verificaron utilizando el programa informático SnapGene 4.1 (GSL Biotech LLC, San Diego, CA, EE.UU.). Los datos de secuencia obtenidos se ingresaron en los lugares pertinentes de GenBank.

Los productos de PCR que resultaron positivos mediante el método de PCR anidado se sometieron a corte enzimático para la detección de especies de *Cryptosporidium*. Se empleó la enzima de restricción *RsaI* para la digestión rápida del ADN (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). El procedimiento se modificó combinando 16.8 µL de H₂O, 2.5 µL de solución tampón, 0.7 µL de enzima *RsaI* y 10 µL de ADN y el volumen total se ajustó a 30 µL. La mezcla preparada se incubó a 37°C durante 30 minutos. Las muestras que habían sido sometidas a PCR-RFLP se desarrollaron entonces en gel de agarosa (2%).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica No Intervencionista de la Universidad Van Yuzuncu Yil (21.09.2017/ Resolución N.º: 2017/09) y el Comité de Ética Local de Experimentos con Animales (29.12.2016/ Resolución N.º: 2016/12). Esta investigación fue apoyada por la Dirección de Proyectos de Investigación Científica de la Universidad Yüzüncü Yil, ya que el proyecto tiene el número "TDK-2017-5796".

Análisis estadísticos. En la evaluación estadística, la incidencia de la enfermedad se expresó en números y porcentajes según las variables categóricas relevantes. El cálculo de la relación entre dichas variables categóricas

se realizó con la prueba chi-cuadrado (χ^2). La prueba Z de comparación de proporciones se utilizó en la determinación de la media muestral. Se aceptó un $p < 0.05$ como indicación de significancia estadística y se utilizó también para los cálculos estadísticos el programa MINITAB (Minitab Inc., State College, PA, EE. UU.).

RESULTADOS

En este estudio, se detectó la presencia de *C. parvum* en 10 (20%) de las muestras de 50 pacientes sometidos a hemodiálisis, en 13 (32.5%) de las 40 muestras de pacientes inmunosuprimidos con diarrea y en tan solo 3 (10%) de las 30 muestras de pacientes con diarrea. En las muestras de *pacientes inmunocompetentes*, no se registraron especies de *Cryptosporidium*. Por lo tanto, *C. parvum* se detectó en 26 (17.3%) de las 150 muestras fecales de seres humanos analizadas. Si bien se observaron parásitos en 3 (10%) de las 30 muestras de heces provenientes de terneros con diarrea, en las 20 muestras de los terneros sin diarrea no se encontraron parásitos y solo en 3 (6%) del total de 50 muestras tomadas de los terneros, se detectó la presencia de *C. parvum*.

Al realizar una comparación de los resultados obtenidos mediante la prueba inmunocromatográfica y los métodos de tinción ácido-resistente modificados con aquellos obtenidos mediante el método de PCR anidado, se determinó que existía una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p < 0.05$, Tabla 1).

Tabla 1. Tasas de incidencia de las especies de *Cryptosporidium* según los métodos de diagnóstico.

Método	TARM	PI (%)	PCR Anidado	Total
TARM	-	21	21	200
PI	21	-	29	200
PCR Anidado	21	29	-	200

TARM: Tinción ácido-resistente modificada; PI(%): Prueba inmunocromatográfica;

Las muestras que resultaron positivas con el método de tinción ácido-resistente modificado también presentaron resultado positivo en la prueba inmunocromatográfica y en el método de PCR anidado. Sin embargo, 8 muestras que resultaron negativas con el

método de tinción ácido resistente modificado arrojaron resultados positivos con los otros dos métodos. En este estudio, a través del método de tinción ácido-resistente modificado, se encontró una sensibilidad del 72.4% y una especificidad del 100%. Se observó que la prueba inmunocromatográfica, que da resultados mucho más prácticos y rápidos, y que funciona bajo el principio de detección de antígenos en las heces, mostró una sensibilidad y especificidad del 100%, valores más altos en comparación con el método de tinción ácido-resistente modificado. Estos mismos resultados se obtuvieron con el método de PCR anidado.

En este estudio, se encontraron relaciones significativas entre las especies de *Cryptosporidium* y los siguientes síntomas: dolor abdominal ($p=0.0001$), náuseas ($p=0.0001$), vómitos ($p=0.0001$), debilidad corporal ($p=0.0001$) y anorexia ($p=0.0001$) en individuos infectados con criptosporidiosis ($p=0.001$) y, en la evaluación estadística, también se encontraron relaciones significativas entre esta enfermedad y estos síntomas por separado (Tabla 2). También, se evaluó la prevalencia de *Cryptosporidium* según el lugar de residencia de los individuos (Tabla 3, Figura 1).

Tabla 2. Relación entre la prevalencia de las especies de *Cryptosporidium* y algunos síntomas clínicos.

Signos y síntomas clínicos	Especies de <i>Cryptosporidium</i>		Total	Valor p
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Vómitos	13 (65)	7 (35)	20	0.0001
	13 (10)	117 (90)	130	
Náuseas	15 (55.6)	12 (44.4)	27	0.0001
	11 (8.9)	112 (91.1)	123	
Debilidad corporal	17 (65.4)	9 (34.6)	26	0.0001
	9 (7.3)	115 (92.7)	124	
Anorexia	10 (41.7)	14 (58.3)	24	0.001
	16 (12.7)	110 (87.3)	126	
Dolor abdominal	16 (66.7)	8 (33.3)	24	0.0001
	10 (7.9)	116 (92.1)	126	
Mucosidad	17 (73.9)	6 (26.1)	23	0.0001
	9 (7.1)	118 (92.9)	127	

No se encontraron resultados estadísticamente significativos entre criptosporidiosis y género, retraso del crecimiento, estreñimiento, presencia de otros parásitos, fiebre, leucocitos o edad.

Tabla 3. Evaluación de la prevalencia de especies de *Cryptosporidium* según el lugar de residencia de los individuos.

Lugar de residencia	Especies de <i>Cryptosporidium</i>		Total	Valor p
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Campo	9 (45)	11 (55)	20	0.0001
Centro de la ciudad	17 (13.1)	113 (86.9)	130	
Total	26 (17.3)	124 (82.7)	150	

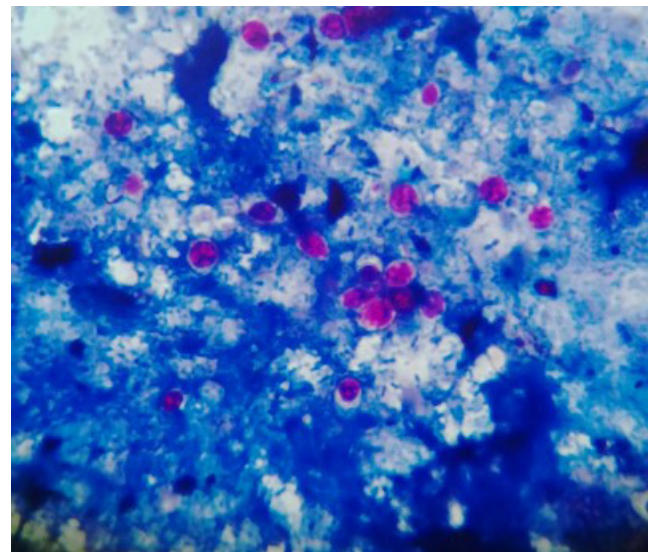


Figura 1. *Cryptosporidium* detectado en muestra fecal de un paciente (X1000).

En 65 (43.3%) de las muestras de heces humanas analizadas, se encontró la presencia de una o más especies de parásitos. En 26 (17.3%) de las muestras analizadas, se encontró la especie *Cryptosporidium*; en 21 (14%), la especie *B. hominis*; en 12 de las muestras (8%), la especie *G. intestinalis*; en 4 de las muestras (2.7%), la especie *C. cayetanensis* y en las 2 muestras restantes (1.3%), la especie *C. mesnili*. El análisis microscópico de las preparaciones teñidas utilizando el método de tinción ácido-resistente modificado- mostró la presencia de ooquistes en diez zonas diferentes, evaluados como ooquistes de baja densidad (+), 2–10 como ooquistes de densidad media (++) , 11–25 como ooquistes de alta densidad (+++) y >25 ooquistes como de muy alta densidad (++++) (12). De los 21 pacientes que se determinó que eran positivos en términos parasitológicos usando el método de tinción

ácido-resistente modificado, 10 (47.6%) tenían ooquistes de alta densidad; 6 (28.6%), ooquistes de densidad media y 5 (23.8%), ooquistes de baja densidad. Además, también se encontró que 9 (42.9%) pacientes con altas concentraciones de ooquistes presentaban síntomas de inmunosupresión y diarrea.

Hallazgos de los métodos de PCR-RFLP y PCR anidado para el gen de la proteína de pared de ooquistes de especies de *Cryptosporidium*.

En el estudio, la región del gen COWP del ADN genómico obtenido de las muestras de heces se amplificó mediante el método de PCR anidado y también se amplificó la región de 553 pb (Figura 2A). El segundo conjunto de productos de PCR obtenidos se sometió a electroforesis en gel a 90 V durante 45 minutos y se observó la amplificación de las muestras.

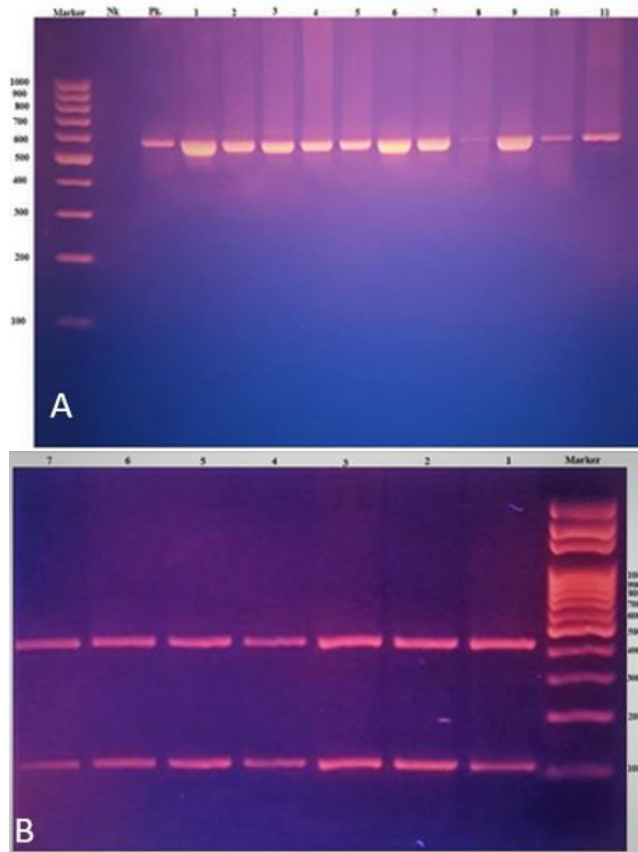


Figura 2. A. Especies de *Cryptosporidium* Amplificación del gen COWP alojado en la región de 553 pb utilizando el método de PCR anidado en gel de agarosa [marcador (escalera de ADN de 100 pb) Nk: control negativo, Pk: control positivo, muestras positivas: 1–11]. **B.** Bandas formas como resultado de la detección de especies de *Cryptosporidium* en electroforesis usando el método PCR-RFLP y el marcador enzimático *RsaI* (escalera de 100 bp); *C. parvum*: 1–7.

Las muestras positivas se determinaron utilizando el método de PCR anidado. Las muestras se enviaron a un laboratorio de análisis de secuencias de ADN y se sometieron a análisis de secuenciación bidireccional. Los resultados del análisis de secuencia se encontraron en la base de datos www.ncbi.nlm.nih.gov y se detectó que todas las muestras positivas estaban infectadas con *C. parvum*. Se agregaron a esta base de datos las secuencias de ADN de las siguientes muestras, a saber: MG255781, MG255782, MG255783, MG255784, MG255785, MG255786, MG255787, MG255788, MG255789, MG255790, MG255791, MG255792, MG255793, MG255794, MG255795, MG255796, MG255797, MG255798, MG255799, MG255800, MG255801, MG255802, MG255803, MG255804, MG255805, MG255806, MG255807, MG255808 y MG255809. Se dieron los nombres de las tres especies en las que se detectaron múltiples diferencias de nucleótidos en la región del gen COWP estudiada: VANH6, VANH9 y VANH10.

Al aplicar el método PCR-RFLP con la enzima *RsaI* después de utilizar el método de PCR anidado, se formaron bandas en las regiones 34, 106 y 410 pb para *C. parvum* y en las regiones 34, 106, 125 y 285 pb para *C. hominis* (13). Utilizando fotos de gel de agarosa, se encontró que estas muestras eran positivas para *C. parvum*.

DISCUSIÓN

En los numerosos estudios que se han llevado a cabo sobre criptosporidiosis hasta la fecha, se observó que la especie más infecciosa encontrada en los seres humanos y en los animales vertebrados era *C. parvum* (1). Además, se encontraron ooquistes de especies de *Cryptosporidium* a una tasa de entre 1.8 y 46.8% (14,15,16,17).

En nuestro estudio, se encontraron especies de *Cryptosporidium* en 26 (17.3%) de las 150 muestras de heces humanas analizadas, lo que resultó superior a los resultados obtenidos en otros estudios realizados en Turquía (16,18). El bajo nivel socioeconómico de la región de Van, la infraestructura insuficiente en la que viven, la falta de atención a la higiene personal y las extendidas tareas rurales de ganadería a la que se dedican son algunas de las causas por las que la tasa es mayor allí en comparación con otras regiones. El hecho de que la especie encontrada en todas las muestras de seres humanos sometidas a estudio correspondiera a *C. parvum* sustentó esta opinión. Por otro lado,

en el presente documento dejamos en claro que creemos que se obtendrían resultados altos similares si se usaran los métodos utilizados en el estudio en muchas regiones de Turquía donde la cría de ganado está muy desarrollada.

La criptosporidiosis puede causar diarrea letal en pacientes inmunocomprometidos, diarrea en niños, pérdida grave de líquidos, desequilibrio electrolítico e incluso insuficiencia circulatoria en casos avanzados (19). Las especies de *Cryptosporidium*, que son protozoos oportunistas, suelen, por lo general, ser asintomáticas en los pacientes inmunocomprometidos y, en ocasiones, causan una diarrea limitada. Sin embargo, puede causar diarreas mortales con un curso mucho más grave, especialmente en grupos de pacientes inmunosuprimidos, pacientes con SIDA o cáncer, pacientes en diálisis o pacientes cuyo sistema inmunológico está suprimido por cualquier motivo (20). En nuestra investigación, se evaluaron los síntomas clínicos como náuseas ($p=0.0001$), vómitos ($p=0.0001$), dolor abdominal ($p=0.0001$), malestares ($p=0.0001$), mucosidad ($p=0.0001$) y anorexia ($p=0.001$) en relación con la criptosporidiosis. Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los diferentes síntomas. Se concluyó que las especies de *Cryptosporidium*, un protozoo oportunista, deberían evaluarse en términos de criptosporidiosis, especialmente en los pacientes con inmunosupresión y diarrea.

Los métodos de microscopía utilizados para investigar las especies de *Cryptosporidium* en materia fecal son de baja sensibilidad y requieren de personal experimentado y de tiempo. Además, se necesitan diferentes métodos de tinción para detectar a *Cryptosporidium* y a algunos otros parásitos que no pueden detectarse por examen directo. En el presente estudio, se detectaron 21 casos de especies de *Cryptosporidium* en un conjunto de 200 muestras de heces de seres humanos y terneros utilizando el método de tinción ácido-resistente modificado, y 8 casos que no pudieron detectarse con este método se sometieron a las pruebas inmunocromatográficas, las que mostraron que pueden existir casos en los que el método de tinción utilizado no ha funcionado.

Se encontró que 9 (42.9%) de los pacientes inmunosuprimidos con diarrea presentaban ooquistes de alta densidad tras examinar diez campos microscópicos. Se creía que las especies de *Cryptosporidium*, que por otro lado es un

protozoo oportunista, deberían tenerse en cuenta en especial en los pacientes inmunosuprimidos, y en caso de observar diarrea en este grupo de pacientes, se los debería evaluar en términos de criptosporidiosis.

Todas las muestras de este estudio que resultaron positivas para especies de *Cryptosporidium* utilizando el método de tinción ácido-resistente modificado, también arrojaron resultados positivos al usar las pruebas inmunocromatográficas. No obstante, ocho muestras que resultaron positivas con el método de prueba inmunocromatográfica no lo fueron con el método de tinción ácido-resistente modificado. Aunque el costo del método de prueba inmunocromatográfica, que busca antígenos específicos en las muestras fecales, es más alto que el del método de tinción ácido-resistente modificado, se concluyó que sería el método más preferido porque permite aplicarse con más sencillez que otros métodos de diagnóstico. Al mismo tiempo, se pudo comprobar que los resultados obtenidos con la prueba de casete de la marca Biotek Certest Crypto (España), que es un kit de diagnóstico rápido, eran exactamente iguales a los del método de PCR anidado. Se observó que las muestras con resultados positivos bajos usando la prueba inmunocromatográfica también mostraron bandas silenciosas cuando se analizaron mediante un gel de agarosa después del método de PCR anidado. Se determinó que el método de prueba inmunocromatográfica usado arrojó resultados rápidos, no requirió personal experimentado y su confiabilidad fue alta. La criptosporidiosis puede causar diarrea mortal en pacientes inmunocomprometidos y también producir diarrea en los niños, pérdida grave de líquidos, desequilibrio electrolítico e incluso insuficiencia circulatoria en los casos avanzados. Dado que esta enfermedad intestinal no se puede diagnosticar utilizando solo exámenes clínicos de los pacientes, en general se realizan tratamientos ineficaces y de larga duración. Por este motivo, se administrarán medicamentos innecesarios a los pacientes y sus afecciones se agravarán, ya que los pacientes no pueden ser tratados debido a que el tratamiento es incorrecto. Asimismo, la economía del país se ve perjudicada por este consumo innecesario e ineficaz de medicamentos. Por esta razón, se entiende mejor la importancia de utilizar pruebas de diagnóstico rápido en todos los hospitales cuando se intenta proteger la salud del paciente y sin dañar el sistema económico nacional.

La extracción de ADN es el primer paso de los estudios moleculares. Dado que las heces tienen una estructura que contiene muchos tipos de organismos, estos pueden afectar directamente la pureza y la calidad del ADN en la extracción. La solidez del estudio está directamente relacionada

con la calidad de extracción del ADN y la pureza del ADN que se obtiene. El modo en que se acondicionen y almacenen las heces, los kits que se utilizarán en el proceso de extracción, las características del agente buscado y el método de extracción por lisis aplicado son factores que inciden directamente en el éxito de la extracción de ADN. La pared de los ooquistes intacta en algunos parásitos, como en las especies de *Cryptosporidium*, afecta negativamente el éxito de la extracción de ADN (10). Si bien no se presentan demasiados inconvenientes cuando la extracción de ADN se realiza con otros parásitos, cuando se intenta la extracción de ADN a partir de las especies de *Cryptosporidium* utilizando el mismo método, el proceso puede fallar. Por esta razón, los investigadores que trabajan con especies de *Cryptosporidium* pueden necesitar llevar a cabo algunos procedimientos para debilitar la pared de los ooquistes o realizar diferentes modificaciones en el procedimiento del kit antes de comenzar con la extracción del ADN (11). Aquí, el ADN de las especies de *Cryptosporidium* no se pudo obtener como resultado del proceso de incubación realizado calentando a 95°C durante 30 minutos las muestras de heces que se habían mantenido previamente a -20°C durante un cierto período de tiempo. Sin embargo, al recibir en el laboratorio muestras de heces recién tomadas, estas se sometieron al mismo proceso de incubación y se obtuvo el ADN de todas las muestras con éxito. No se pudo obtener ADN cuando las muestras de heces frescas, de las que se obtuvo el ADN de las especies de *Cryptosporidium*, se sometieron a una temperatura de -20°C y, luego, se repitió el proceso de extracción de la misma manera. Es muy importante para los investigadores que vayan a extraer el ADN de las especies de *Cryptosporidium* considerar estos temas en términos de costo, mano de obra y ahorro de tiempo.

Cryptosporidium tiene muchas especies y se torna difícil separarlas entre sí sin utilizar métodos moleculares. Aunque se han realizado muchos estudios para determinar las especies de *Cryptosporidium* que se encuentran en los seres humanos alrededor del mundo, las investigaciones que utilizan métodos moleculares en Turquía siguen siendo escasas y se necesitan estudios más completos (12,13).

En un estudio realizado en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Dokuz Eylül en Turquía, se detectó que el 4.8% de las 21 especies de *Cryptosporidium* encontradas fueron *C. meleagridis* y el 95,2 %, *C. Parvum* (12). Además, en un estudio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Erciyes, se detectó, mediante el método de PCR anidado, que el *Cryptosporidium* encontrado en un paciente con trasplante renal pertenecía a la especie *C. parvum* (13). En la investigación que se presenta en este documento, se evaluaron 29 muestras positivas con el método PCR-RFLP y se concluyó que el agente causante era, en todos los casos, *C. parvum*. Por otro lado, estas muestras se enviaron a un laboratorio de análisis de secuencias de ADN en donde se realizó un análisis de secuenciación y se confirmó que se trataba de *C. parvum*. La presencia de estas especies específicas, como el *C. parvum*, fue similar a la de muchos estudios realizados en Turquía. Sin embargo, dado que no se han realizado muchos estudios sobre tipificación de las especies de *Cryptosporidium* en Turquía, no es posible brindar demasiada información sobre otras especies que hayan infectado a los seres humanos. Para que los datos que se brindan resulten más precisos y detallados, se deben realizar muchos estudios sobre la tipificación de las especies de *Cryptosporidium* en lugares que presentan diferentes características geográficas.

Como resultado, la criptosporidiosis adquiere mayor importancia en pacientes de bajo nivel socioeconómico, con infraestructura inadecuada, atención insuficiente a la higiene personal y dedicados a la ganadería, especialmente en aquellos pacientes con deficiencia del sistema inmunológico y que padecen diarrea, como en la región de Van. Se concluyó que los estudios sobre la tipificación de las especies de *Cryptosporidium* en Turquía son limitados y que debería aumentar la investigación en esta área.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses con la publicación de este manuscrito.

REFERENCIAS

1. Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd ed. London: CRC press; 2008.
2. 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; 47:711-721. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.08.001>

3. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*. 2010; 124:80-89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>
4. Ryan U, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 2014; 141:1667-1685. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001085>
5. Ryan U, Papparini A, Oskam CC. New technologies for detection of enteric parasites. *Trends Parasitol*. 2017; 33(7):532-546. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.03.005>
6. Mirhashemi ME, Zintl A, Grant T, Lucy FE, Mulcahy G, De Waal T. Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental parasitology*. 2015; 151:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.018>
7. Yilmaz H, Cengiz ZT, Çiçek M. Investigation of cryptosporidiosis by enzyme-linked immunosorbent assay and microscopy in children with diarrhea. *Saudi Medical Journal*. 2008; 29(4):526. <https://smj.org.sa/content/29/4/526>
8. Ekici A, Ünlü A, Halidi AG, Aydemir S, Yilmaz H. Determination Of The Occurrence Frequency Of *Cryptosporidium* Sp. In Children Brought To The Hospital With The Complaint Of Diarrhea Using Different Methods. *Applied Ecology And Environmental Research*. 2021; 19(4):2905-2913. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1904_29052913
9. Körkoca H, Yasar G, Atas AD, Kurtoglu Mg, Ekici K, Berktaş M. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic food workers. *Turkish Journal of Parasitology*. 2013; 37(4):241. <https://doi:10.5152/tpd.2013.2981>
10. Çiçek M, Körkoca H, Gül A. Investigation of *Cryptosporidium* sp. in workers of the Van municipality slaughterhouse and in slaughtered. *Animals*. 2008; 32(1):8-11. <https://www.turkiyeparazitolog.org/archives/archive-detail/article-preview/van-belediye-mezbahasnda-alan-iilerde-ve-kesimi-ya/22898>
11. Ayan A, Kilinc OO, Yuksek N, Basbugan Y. Detection of *Cryptosporidium* spp. in calves through nested Pcr And Kinyoun's Acid-Fast Methods In Van, Turkey. *IJEES*. 2020; 10(2):271-276. <https://doi.org/10.31407/ijeess10.205>
12. Korkmaz M, Ok Ü. *Parazitolojide laboratuvar*. Turkish Parasitology Association. İzmir, Turkey; 2011.
13. Sadek GS. Use of nested PCR-RFLP for genotyping of *Cryptosporidium* parasites isolated from calves and children suffering from diarrhea. *Parasitol United J*. 2014; 7(2):129-137. <https://doi.org/10.4103/1687-7942.149568>
14. Akdemir C. Investigation of cryptosporidiosis by serologic and microscopic method and examination of tap water samples for oocysts. *Turkiye Parazitol Derg*. 2013; 37:9-12. <https://doi.org/10.5152/tpd.2013.03>
15. Yousry Hawash LS, Dorgham A, Mohammed S. Prevalence of *Cryptosporidium*-associated diarrhea in a high altitude-community of Saudi Arabia detected by conventional and molecular methods. *Korean J Parasitol*. 2014; 52(5):479-485. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.5.479>
16. Karaman Ü, Daldal N, Özer A, Engiyurt Ö, Ertürk Ö. Incidence of *Cryptosporidium* spp. in the human population of Malatya in Turkey. *Acta Medica*. 2015; 31:263-269. <http://abakus.inonu.edu.tr/xmlui/handle/123456789/15700>
17. Nassar S, Oyekale T, Oluremi A. Prevalence of *Cryptosporidium* infection and related risk factors in children in Awo and Iragberi, Nigeria. *J Immunoassay Immunochem*. 2017; 38(1):2-9. <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1178652>
18. Karli A, Metin A, Ergen S, Simsir H, Köse G. The incidence of *Cryptosporidium* infection in children with diarrhea. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*. 2013; 7(3):92-96. <https://doi.org/10.5152/ced.2013.27>
19. Saksirisampant W, Prownebon J, Saksirisampant P, Mungthin M, Siripatanapipong S, Leelayoova S. Intestinal parasitic infections: prevalences in HIV/AIDS patients in a Thai AIDS-care centre. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2009; 103(7):573-81. <https://10.9775/kvfd.2010.2140>
20. Börekçi G, Otağ F, Emekdaş G. Mersin'de bir gecekondu mahallesinde yaşayan ailelerde *Cryptosporidium* prevalansı. *Journal of Infection*. 2005, 19(1):39-34. http://infeksiyon.dergisi.org/summary_en.php?id=105