

Análisis bioinformático y microbiológico para la detección de *Cryptosporidium parvum* en agua sin potabilización en Ciudad Guzmán, Jalisco

Anzaldo Ortega, R.E.¹, Robles Méndez, M. D.², Pliego Sandoval, J. E.¹, Rodríguez Chávez, E. M.¹, Sepúlveda Montes, A.¹, Reyes Nava L. A.¹, Iñiguez Muñoz, L. E.¹

¹Laboratorio de Microbiología. Departamento de Ciencias Básicas para la Salud. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. Avenida Enrique Arreola Silva No. 883, Colón, Colonia Centro, 49000, Cd Guzmán, Jalisco, México. Tel: +52 (341) 575 2222. ²Laboratorio de Microbiología de los Alimentos. Departamento de Ciencias Pecuarias y Agrícolas. Centro Universitario de los Altos. Universidad de Guadalajara. Carretera a Yahualica, Km. 7.5 Tepatitlán de Morelos, Colonia Centro, 47600, Tepatitlán de Morelos, Jalisco. Tel: 01 (378) 782-8033 al 37.

Correo: laura.iniguez@academicos.udg.mx

Palabras clave: Parásito, tinciones, oligonucleótidos, secuencias.

Introducción

Cryptosporidium parvum (*C. parvum*) es un parásito de interés tanto médico como veterinario a nivel mundial. La falta de higiene y sanidad hacen posible su presencia en países en subdesarrollo y desarrollados; con características que vinculan áreas marginadas, las cuales son un foco de infección. De manera específica, daña internándose en las células epiteliales del intestino [1]. Estudios previos, señalan la presencia diversos subtipos de *C. parvum*, así como otros géneros de *Cryptosporidium* en recto, tubo digestivo y heces fecales excretadas de mamíferos, [2].

Por consiguiente, la intervención de técnicas de experimentación de carácter microbiológico y bioinformático con perspectiva molecular, son de apoyo para corroborar la presencia o ausencia de *C. parvum*. Por lo tanto, la importancia de este trabajo se centró en la detección del parásito en agua con procedencia de heces de este municipio (Zapotlán el Grande) puesto que de manera particular *C. parvum* es resistente al cloro [3]. El objetivo de esta investigación fue evaluar la presencia o ausencia de *Cryptosporidium parvum* por métodos microbiológicos en muestras de agua contaminada con *Escherichia coli* y el diseño bioinformático de oligonucleótidos que permita la detección molecular del parásito a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

Metodología

El presente trabajo es de tipo correlacional descriptivo con medidas repetidas. Para llevar a cabo la recolección de las muestras de agua (pozos y grifos), se procedió de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1- 2002 en la cual se incluyen aspectos para manejo, preservación y transporte de muestras [4]. Se tomaron muestras de 1 L de agua de cuatro puntos de la laguna de Zapotlán y de cuatro pozos sin tratamiento de potabilización cercanos a laguna, las muestras de agua se colocaron en frascos estériles con su debido rotulo y se filtraron con un papel filtro Whatman 40. El análisis microbiológico de las muestras de agua, se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del Centro Universitario del Sur (CUSur) de la Universidad de Guadalajara. Para determinar la presencia o ausencia de parásitos intestinales en agua, se procedió con la tinción de Ziehl-Neelsen (compuesta por azul de metileno alcalino Loëffler), tinción ácido-resistente con verde de malaquita, tinción de Gram y tinciones simples de safranina, azul de metileno, cristal violeta y Tween 20 antes de visualizar al microscopio [5]. Por otra parte, la elección de secuencias nucleótídicas homologas se realizó en National Center for Biotechnology Information (NCBI) con apoyo de Basic Local Alignment Search Tool (PSI-BLAST), de las 20 secuencias seleccionadas se generó el alineamiento múltiple en Clustal Omega. En seguimiento, las regiones de interés fueron visualizadas en Box Shade Server. Adicionalmente, el constructo de árbol filogenético se utilizó el programa MEGAx, que proporcionó funciones básicas para la edición, alineación, manipulación, análisis de proteínas y de secuencias nucleicas. Finalmente, para el diseño de oligonucleótidos, fue indispensable utilizar SnapGene y Primer BLAST, cumpliendo con las características para posterior PCR.

Resultados

En un trabajo previo de autoría propia se identificaron organismos bioindicadores y patógenos; para especímenes de pozos y de laguna, donde se encontró alta prevalencia de coliformes fecales y de *Escherichia coli* (*E. coli*) los cuales indican contaminación fecal reciente [6]. Es por ello que se decidió realizar la búsqueda microbiológica de *Cryptosporidium* en los mismos puntos donde se detectó la presencia de *E. coli*, se llevaron a cabo las tinciones simples y compuestas sobre esas muestras de agua. Al visualizarlas al microscopio no fue posible determinar la presencia de *C. parvum* con ninguna de las técnicas de tinción utilizadas, ya a que no presentaba la morfología típica para dicho parásito (véase Figura 1). De izquierda a derecha parte superior; de la muestra uno a la cuatro con procedencia de pozos a una visualización de 40x. Misma dirección en la parte inferior; de muestra 1 a 4 de la laguna visto a 100x.

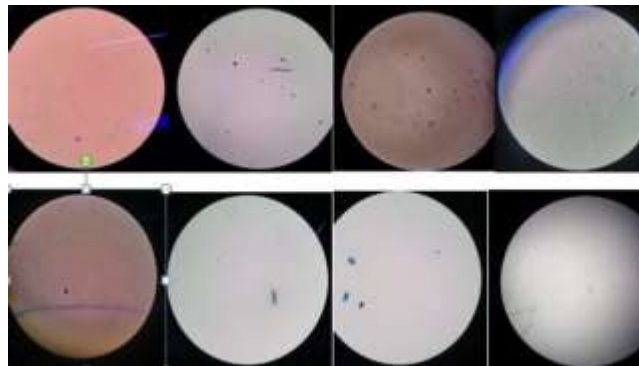


Figura 1. Observaciones en la que se descarta la presencia del parásito

Con base al resultado anterior se decidió llevar a cabo el análisis bioinformático para el diseño de oligonucleótidos que permitan la detección del parásito vía molecular. Con ayuda de la herramienta PSI-BLAST y tomando una proteína de referencia de *C. parvum* (XP_627480-CpIow), se seleccionaron un total de 20 secuencias homólogas. los parámetros que se tomaron en cuenta fueron una cobertura de 100 al 77%, una identidad de 64 a 100% y el valor de expectación de 0 a 8e-179. La Figura 2 muestra un fragmento del alineamiento generado por Box Shade, en dicho fragmento se muestran con flechas verdes la posición de los Forward y con flechas de color rojo los Reverse que podrán ser utilizados tanto en PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés) convencional como en PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR). Los guiones nos muestran gaps, en sombreado las regiones conservadas entre cada aminoácido alineado, los que no se encuentran sombreados son aminoácidos diferentes al resto de las secuencias presentadas.

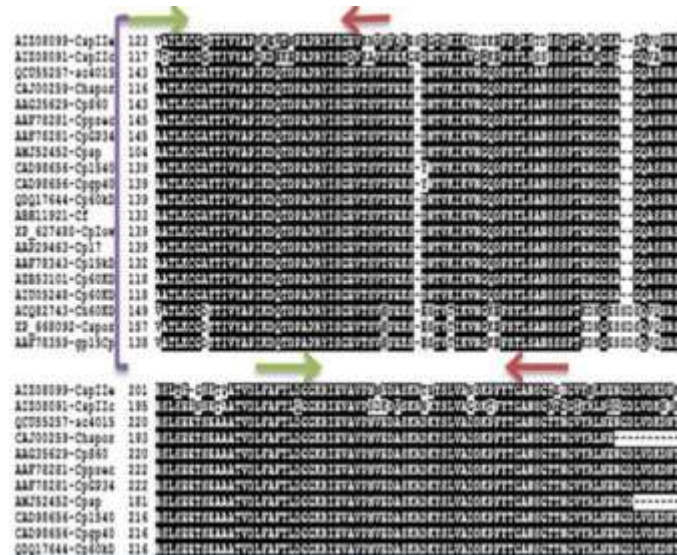


Figura 2. Fragmento de box shade para la familia de *Cryptosporidium*.

Centrados en el diseño de oligonucleótidos altamente específicos para su uso en PCR, interrogando todos los datos genómicos disponibles públicamente para especies de *Cryptosporidium* para ADN de múltiples copias, e identificando la glicoproteína de 60 kilodaltones de *Cryptosporidium parvum lowa II* como el candidato clave con el mayor potencial para lograr una alta sensibilidad analítica. Como solo una secuencia de *C. parvum* de longitud completa (número de acceso QDQ17644.1) está disponible para *C. parvum* en GenBank, se utilizó un enfoque bioinformático para identificar secuencias homólogas en otros conjuntos de datos sobre *Cryptosporidium*, así como secuencias nucleótidicas similares en otros microorganismos, y se creó una alineación a partir de la cual se diseñaron oligonucleótidos que se aprecian en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de iniciadores para amplificar segmentos de interés para PCR

Iniciador	Secuencia	Tm (°C)	%GC	Inicia	Termina	Tamaño
QDQ17644F1	TACCCAGCTGCGACAT TGA	59	55	408	427	20
QDQ17644R1	TTGGTGCGGGATCTGTT TGG	59	55	468	487	20
QDQ17644F2	AGTGGCTGTACCAAACG TCGA	59	52	729	749	21
QDQ17644R2	GCTGTTTGCGCCGGTA TAGA	59	55	800	819	20

Tm: Temperatura *melting* o de disociación, GC: Guanina y Citosina, otros valores en pares de bases.

Los iniciadores diseñados permitirán identificar molecularmente el patógeno considerando otras especies del mismo género basados en el microorganismo *Cryptosporidium parvum lowa II* y sus homólogos sobre una región específica conservada dentro de cada uno de ellos, en los que coincide el alineamiento.

Las secuencias aminoácidas utilizadas para realizar el alineamiento múltiple fueron introducidas en el programa MEGA para generar el árbol filogenético como se muestra en la Figura 3. Se observa la divergencia evolutiva (en la figura de abajo hacia arriba, representa ancestros comunes de los más antiguos a los más recientes) de cada género-especie dentro de la familia de *C. parvum* de la proteína analizada. Específicamente, el análisis filogenético de los datos de secuencia se realizó mediante el método de Unión de vecinos. La longitud de las ramas representa el tiempo de divergencia entre los diferentes organismos analizados o la historia evolutiva.

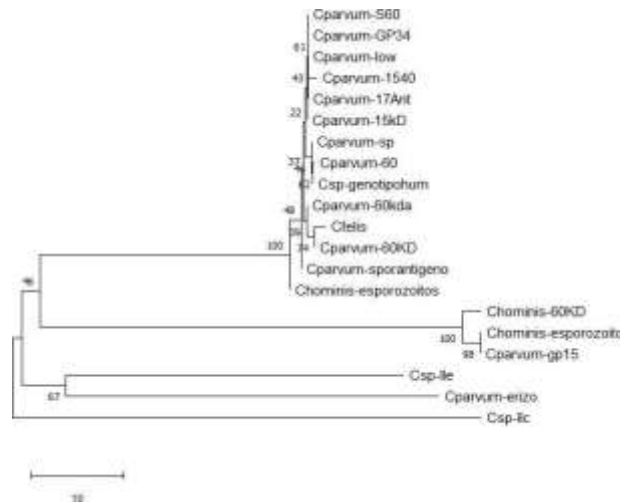


Figura 3. Generación del árbol filogenético en MEGA

Se puede constatar que el análisis filogenético permite la caracterización genética, la clasificación de especies y de genotipos [2]. Por otra parte, al realizar el alineamiento de las secuencias disponibles del organismo, se estima la divergencia en las secuencias proteicas, así mismo, del análisis genómico comparativo de las regiones de interés con características fenotípicas y aberraciones genéticas [7].

Finalmente, investigaciones previas, sugieren que los subtipos de *Cryptosporidium* contienen pequeñas repeticiones con dominios de serina que son encontrados en humanos y otros genomas identificados con la secuencia de análisis del gen de la glicoproteína de 60 kilodaltones de *Cryptosporidium parvum* [1,2], fue corroborado en el presente trabajo lo anterior se puede retribuir en la Figura 4 enmarcadas con la letra

■.



Figura 4. Dominios de serina observados con ayuda del Box Shade

Conclusiones

Las tinciones microbiológicas no fueron suficientes para la detección microbiológica de *C. parvum*, debido a que es necesario adquirir equipo y reactivos especializados para examinar los ooquistes y determinar su presencia. Sin embargo, a través del alineamiento múltiple se logró constatar los dominios ricos en serina encontrados en humanos y otros genomas identificados con la secuencia de análisis del gen de la glicoproteína de 60 kilodaltones de *Cryptosporidium parvum lowa II* establecido en otras investigaciones. Se seleccionaron dos regiones de la proteína para el diseño de dos iniciadores con características adecuadas, con los cuales es posible obtener dos amplicones de 80 y 90 pares de bases, respectivamente para la identificación del parásito *C. parvum*. La región seleccionada para el diseño de los iniciadores es altamente conservada con el resto de las secuencias aminoácidas del género de *Cryptosporidium*; por lo tanto, los iniciadores diseñados en el presente trabajo podrían amplificar específicamente fragmentos del genoma de *Cryptosporidium* para su identificación molecular por PCR.

Referencias

- [1] Tandel, J., English, E. D., Sateriale, A., Gullicksrud, J. A., Beiting, D. P., Sullivan, M. C., Pinkston, B., & Striepen, B. (02 de septiembre de 2019). Life cycle progression and sexual development of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Nature Microbiology* [online], Vol. 4. Art. # 12. 2226-2236. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0539-x>. Consultado: 29 de septiembre de 2019.
- [2] Feng, Y., Gong, X., Zhu, K., Li, N., Yu, Z., Guo, Y., Weng, Y., Kváč, M., Feng, Y., & Xiao, L. (17 de enero de 2019). Prevalence and genotypic identification of *Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in pre-weaned dairy calves in Guangdong, China. *Parasites and Vectors* [online], Vol. 12. Art. # 1. 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3310-5>. Consultado: 04 de octubre de 2019.
- [3] Thivierge, K., Iqbal, A., Dixon, B., Dion, R., Levesque, B., Cantin, P., Cédilotte, L., Ndao, M., Proulx, J. F., & Yansouni, C. P. (08 de abril de 2016). *Cryptosporidium hominis* Is a Newly Recognized Pathogen in the Arctic Region of Nunavik, Canada: Molecular Characterization of an Outbreak. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [online], Vol. 10. Art. # 4. 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004534>. Consultado: 20 de agosto de 2019.
- [4] Secretaría de Salud et al. (12 de julio de 2005). Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. procedimientos sanitarios para el muestreo. *Diario Oficial de la federación* [online]. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html>. Consultado: 22 de diciembre de 2020.
- [5] Pérez-Cordón, G., Rosales, M. J., Valdez, R. A., Vargas-Vásquez, F., y Cordova O. (13 de febrero de 2008). Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [online], Vol. 25. Art. # 1. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000100018. Consultado: 10 de septiembre de 2019.
- [6] Potgieter, N., Karambwe, S., Mudau, L. S., Barnard, T., & Traore, A. (06 de junio de 2019). Human enteric pathogens in eight rivers used as rural household drinking water sources in the northern region of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online], Vol. 17. Art. # 6. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062079>. Consultado: 22 de enero de 2021.
- [7] Lichtmannsperger, K., Hinney, B., Joachim, A., & Wittek, T. (12 de julio de 2019). Molecular characterization of *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* from calves with diarrhoea in Austria and evaluation of point-of-care tests. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* [online], Vol. 66. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101333>. Consultado: 09 de septiembre de 2019.
- [8] Li, J., Shi, K., Sun, F., Li, T., Wang, R., Zhang, S., Jian, F., Ning, C., & Zhang, L. (09 de agosto de 2019). Identification of human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*, *Cyclospora cayetanensis*, and *Cryptosporidium parvum* on the surfaces of vegetables and fruits in Henan, China. *International Journal of Food Microbiology* [online], Vol. 307. Art. # 16. 108292. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108292>. Consultado: 22 de diciembre de 2019.