

**LITERATURE REVIEW**

## **Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* GP60 subtypes worldwide**

### **Caracterización molecular de los subtipos de la GP60 de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* alrededor del mundo**

Catalina Avendaño V<sup>1\*</sup> Esp, Alejandro Amaya M<sup>1</sup> Esp.

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Facultad Ciencias Pecuarias. Calle 222 No.55 – 37. Bogotá – Colombia. \*Correspondence: [cavendano@udca.edu.co](mailto:cavendano@udca.edu.co)

Received: July 2016; Accepted: April 2017.

#### **ABSTRACT**

*Cryptosporidium* is a zoonotic parasite very important in animal health as well as in public health. It is because this is one of the main causes of diarrhea in children, calves, lambs and other variety of youth mammals in a lot of countries. The globalization has enabled the exchange of biological material in different regions worldwide, encouraging the spread of diseases and exposure to these biological agents to different environmental conditions, inducing adaptation through genetic changes. Based in the polymorphism of the gene for GP60, this review intended to present the distribution of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in humans and calves worldwide. The subtype that affects cattle more frequently corresponds to IIaA15G2R; while the subtype most frequently isolated from human samples is IaA19G2.

**Keywords:** Cryptosporidiosis, molecular epidemiology, public health (Source: MeSH).

#### **RESUMEN**

*Cryptosporidium* es un parásito zoonótico muy importante en salud animal así como en salud pública. Esto se debe a que el parásito se constituye en una de las principales causas de diarrea en niños, terneros, corderos y una gran variedad de mamíferos jóvenes en una gran cantidad de países. Debido a que la globalización ha permitido el intercambio de material biológico en diferentes regiones alrededor del mundo, se ha favorecido la propagación de enfermedades y se han expuesto a los agentes biológicos a diferentes condiciones ambientales, induciendo así la adaptación a través de cambios genéticos. Con base en el polimorfismo del gen GP60, esta revisión pretende presentar la distribución de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* en humanos y terneros alrededor del mundo. El subtipo que afecta con mayor frecuencia al ganado vacuno corresponde a IIaA15G2R1; en tanto que el subtipo aislado con mayor frecuencia a partir de las muestras humanas es IaA19G2.

**Palabras clave:** Criptosporidiosis, epidemiología molecular, salud pública (Fuente: MeSH).

## INTRODUCTION

*Cryptosporidium* spp. is a ubiquitous protozoan that infects humans and a large variety of vertebrate animals around the world with significant implications for public health. The impact of this parasite on public health can be found in the high morbidity possible in children and immunocompromised people. In addition, *Cryptosporidium* spp. causes economic losses due to increases in the rates of morbidity and mortality in animals, and due to negative effects on the development of young animals. The route of infection is fecal-oral, nevertheless, the ingestion of oocysts can occur in several ways such as through person-to-person contact, contact with household pets, farm animals or ingestion of contaminated food, drinking water or water contacted during recreation (1).

Cryptosporidiosis is a significant cause of death in calves, potentially producing economic losses for the farms of some countries, however this has still not been assessed. The most pathogenic species of *Cryptosporidium* is *Cryptosporidium parvum*, it is a result of the ability of *C. parvum* sporozoites to invade the intestinal epithelium, after excystation from the oocyst, producing shortening and destruction of the villi, reducing their absorptive capacity, and leading to negative effects on productive processes in the host, such as growth. *C. parvum* transmission is characterized by a low infectious dose. Following infection, clinical cases appear between 7 and 30 days after the birth of a calf as acute diarrhea, depression, anorexia, abdominal pain and death as a result of dehydration and cardiovascular failure (2).

Studies of the parasite at the morphological and phenotypic levels are unable to establish taxonomic differences (3); therefore epidemiological studies of the parasite, making use of molecular tools, have been carried out in the past two decades, generating information about the species, its genotypes and its subtypes (4) facilitating an understanding of its epidemiology, taxonomy and evolutionary genetics.

### Molecular diagnostic

So long as the morphology of the oocysts does not permit differentiation between the species of *Cryptosporidium* spp., microscopic identification presents problems for the determination of the species that affects humans or animals and the role of these species in the disease or in its transmission. Furthermore, the majority of infections are subclinical and recognition requires more sensitive methods like the polymerase

## INTRODUCCIÓN

*Cryptosporidium* spp. es un protozoo ubicuo que infecta humanos y una gran variedad de animales vertebrados alrededor del mundo, con una implicación importante en salud pública. Entre las implicaciones en salud pública se encuentra la alta morbilidad que puede ocasionar este parásito en niños y personas inmunocomprometidas, que junto con las pérdidas económicas generadas por aumento en las tasas de mortalidad, morbilidad y efecto negativo en el crecimiento de animales jóvenes. La vía de infección es fecal-oral, sin embargo, la ingestión de ooquistes puede ocurrir de varias maneras como por ejemplo a través del contacto de persona a persona, contacto con animales de compañía y animales de granja o ingestión de alimento contaminado, agua de bebida y aguas recreacionales (1).

La criptosporidiosis es responsable de una importante fatalidad en terneros, pudiendo producir pérdidas económicas en las fincas en varios países; sin embargo, estas aún no han sido tasadas. La especie de *Cryptosporidium* más patógena es *Cryptosporidium parvum*; esto se debe a que los esporozoitos invaden el epitelio intestinal luego de la exquistación del ooquiste produciendo acortamiento y destrucción de las vellosidades, lo que disminuye la capacidad de absorción, afectando parámetros productivos como el crecimiento. Además de su baja dosis infectante, luego de la cual, los casos clínicos aparecerán entre los 7 y 30 días de edad del ternero, pudiéndose observar desde diarrea acuosa, depresión, anorexia y dolor abdominal hasta la muerte por la deshidratación y la falla cardiovascular (2).

Los estudios a nivel morfológico y fenotípico del parásito no permiten establecer diferencias taxonómicas (3); por lo tanto, en las últimas dos décadas se han realizado estudios epidemiológicos haciendo uso de herramientas moleculares, generando como resultado el conocimiento de especies, genotipos y subtipos del parásito (4) facilitando el entendimiento de la epidemiología, taxonomía y genética evolutiva.

### Diagnóstico molecular

Dado que, la morfología de los ooquistes no permite diferenciar entre las especies de *Cryptosporidium* spp., la identificación microscópica resulta problemática para la determinación de las especies que afectan a humanos o animales y el papel de las especies en la enfermedad o en la transmisión. Además, la mayoría de las infecciones son subclínicas y para su reconocimiento se recomienda realizar métodos más sensibles como la reacción en

chain reaction (PCR), the current method of choice for diagnosis of the disease. Thus the identification and evaluation of the prevalence of different species of *Cryptosporidium* has been achieved using molecular tests (5). For this reason, molecular tools have become the key to identification of species (6) and are recognized as essential for the determination of the taxonomy of *Cryptosporidium*. These tools underlie the ability to understand the biology, epidemiology and relationship to health, identifying the various species of *Cryptosporidium* and their populations as genotypes that have not been recognized as distinct species (1). The advances in the techniques of molecular biology have significantly improved the diagnosis of cryptosporidiosis, as well as the genetic characterization of species of *Cryptosporidium* (7).

For the categorization of species, genotypes or subtypes of *Cryptosporidium*, PCR based techniques are used, employing primers for the selective amplification of one or more genetic loci (markers) followed by an enzymatic cleavage or sequencing (7). PCR has permitted the identification and subtyping of *Cryptosporidium* spp., facilitating identification of the routes of transmission between animals and humans (8). This technique also has deepened investigations in the field of molecular epidemiology of the parasite, facilitating the phylogenetic reconstruction and evolutionary analysis of it, specifically identifying genotypes and species, and others with a wide range of possibilities (9).

In general, for the determination of species, regions of low or moderate variability have been used. Approaches to species determination have been described based on differences encountered in the sequences of the small subunit of rRNA, the gene for actin and the heat shock protein, and in the identification of subtypes of glycoprotein GP60 (4). The direct sequencing of DNA continues to be the best approach for the detection of variations or genetic polymorphisms. Included among the genes of low variability used in these studies are, for example, the gene for the small subunit of rRNA (18S rDNA,) the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) the 70KDa heat shock protein (HSP-70) or the gene for actin. Within the regions of moderate variability, the genes for  $\beta$ -tubulin, TRAP (C1, C2 and C4) or the intergenic regions ITS-1 and ITS-2 have been used. These genes are used as well in taxonomic studies such as diagnostics or epidemiology; however these regions uniquely identify the species and some genotypes (10). For example, the small subunit of ribosomal RNA (SSUrRNA) is used to genotype *Cryptosporidium* in human and animal tests and in tests of water.

cadena de la polimerasa (PCR), método de elección al momento del diagnóstico de la enfermedad; por lo tanto, la identificación y evaluación de la prevalencia de las diferentes especies de *Cryptosporidium* spp. han sido realizada a través de pruebas moleculares (5). Por esta razón, las herramientas moleculares se han convertido en la clave para la identificación de especies (6) y son reconocidas como esenciales para determinar la taxonomía de *Cryptosporidium*, favoreciendo el entendimiento de la biología, epidemiología y salud relacionando la importancia de varias especies de *Cryptosporidium* y aquellas poblaciones conocidas como genotipos que no han sido reconocidos como especie (1). Los avances en las técnicas de biología molecular han mejorado significativamente el diagnóstico de la criptosporidiosis, así como la caracterización genética de las especies de *Cryptosporidium* (7).

Para la categorización de las especies, genotipos y subgenotipos de *Cryptosporidium* se han empleado técnicas basadas en PCR, empleando primers para la amplificación selectiva de uno o más loci genéticos (marcadores), seguido de una hidrólisis enzimática o una secuenciación (7). La PCR ha permitido la identificación y subtipificación de *Cryptosporidium* spp., facilitando la identificación de las vías de transmisión entre animales y humanos (8). Esta técnica, también ha permitido ahondar en el campo de la epidemiología molecular del parásito facilitando la reconstrucción filogenética y el análisis evolutivo del mismo, identificando genotipos y especies con especificidad y otras con amplia gama de hospedadores (9).

De forma general, para la determinación de la especie, se han utilizado regiones de baja o moderada variabilidad. Con base en las diferencias encontradas en las secuencias de la subunidad pequeña de ARNr, gen de la actina, la proteína de choque térmico y en la identificación de subgenotipos la glicoproteína GP60 han sido descritos diferentes genotipos de *Cryptosporidium* (4). Lo que hace que la secuenciación directa de ADN sigue siendo el enfoque más adecuado para la detección de estas variaciones o polimorfismos genéticos; entre los genes de baja variabilidad se encuentran aquellos que codifican como, por ejemplo, el gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (ADNr 18S), la proteína de la pared del ooquiste (COWP), la proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP-70) o el gen de la actina. Entre las regiones de variabilidad moderada se han utilizado los genes de la  $\beta$ -tubulina, genes TRAP (C1, C2 y C4) o las regiones intergénicas ITS-1 e ITS-2. Estas regiones se utilizan tanto en estudios de taxonomía como diagnóstico o epidemiología; sin embargo, estas regiones únicamente identifican la especie y algunos genotipos (10). Para la identificación de

This is due to a natural multicopy gene and the presence of semiconserved and hypervariable regions that facilitate the design of type-specific primers (11).

The analysis of the GP60 gene is frequently used in the subtyping of *Cryptosporidium* because of the heterogeneity of the sequence and its relevance to the biology of the parasite (11). Therefore, in the identification of genotypes, subtypes or lineages, highly polymorphic regions are used (6), like the GP60 gene and mini or microsatellite regions like ML1 and ML2 (12).

Making use of nested PCR, sequence analysis of the gene for GP60 has found that its sequence is similar to a microsatellite, having repeats of a serine codon (TCA, TCG or TCT) at the extreme 5' terminus of the gene (6,11), finding a high degree of polymorphism in the sequence isolates from *C. hominis*, *C. parvum*, and *C. meleagridis* permitted determination of the genotype and the subtype. A Roman numeral and small case letter identify the subtype. Both represent the genotype of *Cryptosporidium* spp. For example, Ia and Ib are subtypes of *C. hominis*, while IIa and IIb are subtypes that correspond to *C. parvum* (13). Various groups of subtypes have been identified in these two species: 7 groups of subtypes in *C. hominis* (Ia-Ig), 6 groups of subtypes in *C. meleagridis* and 11 subtypes of families in *C. parvum* (IIa-III) (4); the subtypes of the families IIa and IIb have been recognized as zoonotics (14). Within each group of subtype, various subgenotypes exist principally based on the number of trinucleotide serine repeats (4). The name of the GP60 subtypes begins with the subtype of the designated family (Ia, Ib, Id, Ie, If, etc for *C. hominis*, and IIa, IIb, IIc, IIId, etc for *C. parvum*) followed by the number of repetitions of TCA (represented by the letter A), TCG (represented by the letter G) or TCT (represented by the letter T). In the subtype of the family of *C. parvum* IIa, there are a few genotypes that possess two copies of the sequence ACATCA just before the trinucleotide repeat. These genotypes are represented as "R2" (R1 represents many subtypes) (11). For example, the subtype IIaA15G2R1 is a subtype of *C. parvum* (IIa) with 15 repeats of TCA (A) 2 TCG repeats (G) and one ACATCA (13). In humans, as well as, in farms animals, specially in cattle the subtype of the most prevalent family corresponds to the family IIa, specifically IIaA15G2R1 (11).

Due to the need in epidemiology and public health to characterize the populations and subtypes within the distinct species of the genera *Cryptosporidium*, the analysis of various hypervariables loci are frequently used (MLT,

genotipos, subtipos o linajes, se utilizan regiones más variables, como por ejemplo, la subunidad pequeña del RNA ribososomal (SSUrRNA) que es usada para genotipificar *Cryptosporidium* a partir de muestras humanas, animales y aguas. Esto se debe a una multicopia natural del gen y la presencia de regiones semiconservadas y regiones hipervariables, que facilitan el diseño de primers género específicos (11).

El análisis de la secuencia del gen GP60 es ampliamente usado en la subtipificación de *Cryptosporidium* debido a la heterogeneidad de la secuencia y la relevancia en la biología del parásito (11). Por esto, en la identificación de genotipos, subtipos o linajes, se utilizan regiones altamente polimórficas (6), como el gen de la GP60 y regiones mini o microsatélites como ML1 y ML2 (12).

Haciendo uso de una PCR anidada, se ha realizado análisis de la secuencia del gen de la GP60, se ha encontrado que esta presenta una secuencia similar a la de un microsatélite, ya que tiene repeticiones del codón serina (TCA, TCG o TCT) en el extremo 5' terminal del gen (6,11), encontrando alto grado de polimorfismo en la secuencia en aislados de *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*, permitiendo determinar el subtipo y el genotipo. El subtipo es identificado por un número romano y una letra minúscula, ambos representan el genotipo de *Cryptosporidium* spp. Por ejemplo Ia y Ib son subtipos de *C. hominis*; en tanto que, IIa y IIb son subtipos que corresponden a *C. parvum* (13). Varios grupos de subtipos han sido identificados en estas dos especies: 7 grupos de subtipos en *C. hominis* (Ia-Ig), 6 grupos de subtipos en *C. meleagridis* y 11 subtipos de familias en *C. parvum* (IIa - III) (4); los subtipos de las familias IIa y IIb han sido reconocidos como zoonóticos (14). Dentro de cada grupo de subtipo, existe varios subgenotipos basados principalmente en el número de trinucleótidos de serina repetidos (4). El nombre de los subtipos GP60 comienzan con el subtipo de familia designado (Ia, Ib, Id, Ie, If, etc para *C. hominis*, y IIa, IIb, IIc, IIId, etc. para *C. parvum*) seguido por el número de repeticiones de TCA (representado por la letra A), TCG (representado por la letra G), o TCT (representado por la letra R). En el subtipo de la familia de *C. parvum* IIa, son pocos los genotipos que poseen dos copias de las secuencias ACATCA justo antes de que el trinucleótido se repita, el cual está representado por "R2" (R1 para muchos subtipos) (11). Por ejemplo, el subtipo IIaA15G2R1 es un subtipo de *C. parvum* (IIa) con 15 repeticiones TCA (A) 2 TCG repetidas (G) y un ACATCA (13). En humanos; así como, en animales de granja, especialmente en ganado

multilocus typing) that increase the precision of the genotyping. In this way, a few patterns of MLT are created depending on the genotype combinations for each loci analyzed. These studies can be performed by detection of differences in length of the amplified fragments (MLFT) on agarose gels, or by sequencing (MLST), permitting the use of markers with single nucleotide polymorphisms (SNPs) (12). Satellites are characterized by allelic variability, and are used to explore the genetic structure of a population such as in the analysis of lineage and in the construction of a genetic map. Micro and minisatellites have been frequently used in work with other parasites such as *Plasmodium* spp. and *Trypanosoma* spp. With the information generated, it has been possible to increase the knowledge of, or to understand the epidemiology of the genetic structure in the population of these parasites (10). Similar markers also have been important tools in the understanding of the structure of the population of *C. parvum* (15), and have been successfully used to study the population dynamics of *Cryptosporidium*, evaluating their routes of transmission and their zoonotic potential. In a recent review it was shown that to study the existing variation between *C. parvum* and *C. hominis* using multilocus analysis, 55 markers in various combinations have been used over different platforms (16). The markers most used are 5B12, CP47, GP60, hsp70, ML1, ML2, MS5-Mallon, MS9-Mallon, MSB, MSC 6-7 and TP14 (17).

Thanks to tools that permit us to obtain biological and genetic data, some genotypes have been recognized as unique and different, taking the name and the status of species. For example, the canine genotype has begun to be called *C. canis*; the porcine genotype *C. suis*; the bovine genotype *C. bovis*; and the deer-like genotype *C. ryanae* (1). Furthermore, the specific diagnosis of cryptosporidiosis through molecular tests allows precision in the identification and characterization of species of *Cryptosporidium*, a central condition for the control of this disease and the comprehension of the complexities of its epidemiology (10).

### **Molecular epidemiology**

The tools of molecular biology have not only helped to resolve the taxonomy of *Cryptosporidium*, but also have made a valuable contribution in understanding the range of hosts of different species and genotypes (18). Additionally the molecular characterization of the circulating parasites can permit the evaluation of the distribution and zoonotic potential of species and

vacuno, el subtipo de familia más prevalente corresponde a la familia IIa, específicamente, IIaA15G2R1 (11).

Por otro lado, y debido a la necesidad en epidemiología y salud pública de caracterizar las poblaciones y subgenotipos dentro de las distintas especies del género *Cryptosporidium*, se está utilizando con frecuencia el análisis de varios loci hipervariables (MLT, multilocus typing) que aumentan la precisión del subgenotipado. De este modo, se crean unos patrones de MLT dependiendo de las combinaciones de genotipo para cada loci analizado. Estos estudios se pueden realizar por detección de diferencias de longitud de los fragmentos amplificados (MLFT) en gel de agarosa o por secuenciación (MLST), permitiendo el uso de marcadores con SNP (single nucleotide polymorphism) (12). Los satélites se caracterizan por variabilidad alélica, y son empleados para explorar la estructura genética de una población así como el análisis de linaje y el mapeo genético. Los micro y minisatélites han sido ampliamente usados para el trabajo de otros parásitos tales como *Plasmodium* spp. y *Trypanosoma* spp.; con la información generada, se ha logrado incrementar o entender la epidemiología de la estructura genética de la población de estos parásitos (10); marcadores similares, también han sido herramientas importantes en el entendimiento de la estructura de la población de *C. parvum* (15), y han sido usados exitosamente para estudiar la dinámica poblacional de *Cryptosporidium*, evaluando las rutas de transmisión y su potencial zoonótico. Una revisión reciente, reveló que para investigar la variación existente entre *C. parvum* y *C. hominis* mediante el análisis multilocus, se han usado 55 marcadores en varias combinaciones sobre diferentes plataformas (16). Los marcadores más usados son 5B12, CP47, GP60, hsp70, ML1, ML2, MS5-Mallon, MS9-Mallon, MSB, MSC 6-7 y TP14 (17).

Gracias a estas herramientas que permiten obtener datos biológicos y genéticos, algunos genotipos comienzan a ser reconocidos como únicos y diferentes, recibiendo el nombre y el estatus de especie. Por ejemplo, el genotipo canino se comenzó a ser llamado *C. canis*; el genotipo porcino *Cryptosporidium suis*; el genotipo bovino *C. bovis* y el genotipo deer-like *C. ryanae* (1). Además, el diagnóstico específico de la criptosporidiosis a través de pruebas moleculares, permite tener precisión en la identificación y caracterización de especies de *Cryptosporidium*, condición central para el control de esta enfermedad y la comprensión de las complejidades de su epidemiología (10).

subtypes as well as their routes of transmission to humans and animals under different epidemiological situations (2).

At the start of the HIV/AIDS pandemic the reports of pathogenic opportunists focused attention on cryptosporidiosis in humans. A summary of the literature at that time found reports of 159 cases of cryptosporidiosis in immunocompetent patients and 71 cases in immunocompromised patients. In 26 cases a clear association was established between the bovine infection and humans, however the transmission from animals to humans was not confirmed in any of the 71 cases of immunodeficient patients. Additionally, the dissemination from person to person had been reported. The reports of urban transmission without evidence of zoonotic transmission provided support for the hypothesis of Casemore and Jackson, which indicated that the infection in humans was not necessarily zoonotic, leading to the recognition of two independent cycles of transmission. The molecular studies then have provided evidence that these two routes of infection for human were related through two genotypes - the "human genotype" transmitted from human to human and the "bovine genotype" transmitted from animals to humans with the bovine sources as principle reservoirs (1).

The investigations at the epidemiological level required techniques with a greater power of discrimination, that could differentiate an intraspecific level (19). The implementation of subtyping with the GP60 gene has permitted the identification of geographic and temporal differences in the transmission of *Cryptosporidium* spp., and a better appreciation of the implication of the parasite in public health (4).

In a review including databases from Elsevier, Scielo, PubMed, SpringerLink and Wiley Library, the reports related to subtyping based on GP60 of the parasite in 29 countries, 28 cities that reported 163 subtypes of *C. parvum*. Concordant with the report by Couto et al. (14) and Feng et al (20), it was found that around the world the family of *C. parvum* that appeared with the greatest frequency is IIa (41/163), followed by the family II d (17/163), two families that have been recognized for their zoonotic implications. The subtype reported with the greatest frequency and that as well is present on every continent, with the exception of Oceania, is IIaA15G2R1 (18/28), followed by IIaA16G1R1 and IIaA18G2R1 which have been reported in 9 of 28 (Table 1, Figure1).

In 18 of 29 countries, 6 families and 67 subgenotypes of *C. hominis* were reported. With relation to this species, the most frequent found

## Epidemiología molecular

Las herramientas de biología molecular no sólo han ayudado a resolver la taxonomía de *Cryptosporidium*, sino que han hecho un contribución valiosa para el entendimiento de los rangos de hospedadores de las diferentes especies y genotipos (18). Adicionalmente, la caracterización molecular de los parásitos circulantes puede permitir la evaluación de la distribución y potencial zoonótico de especies y subtipos, así como, sus rutas de transmisión en humanos y animales bajo diferentes situaciones epidemiológicas (2).

Al inicio de la pandemia del VIH - SIDA, las descripciones de patógenos oportunistas centraron la atención en la criptosporidiosis en los humanos. Un resumen de la literatura de ese tiempo, encontró reportes de 159 casos de criptosporidiosis en pacientes inmunocompetentes y 71 casos en pacientes inmunodeficientes. En 26 casos se estableció una clara asociación entre la infección bovina y humana; sin embargo, la transmisión de animales a humanos no fue confirmada en ninguno de los 71 casos de los pacientes inmunodeficientes. Adicionalmente, la diseminación de persona a persona ha sido documentada, los reportes de transmisión urbana sin evidencia de transmisión zoonótica proveen un soporte para la hipótesis de Casemore y Jackson en la cual indican que la infección en humanos no necesariamente fue zoonótica, conduciendo al reconocimiento de dos ciclos de transmisión independientes. Los estudios moleculares, entonces, han provisto evidencia de que estas dos rutas de infección para los humanos estuvieron relacionadas con dos genotipos - el "genotipo humano" transmitido de humano a humano y el "genotipo bovino" transmitido de animales a humanos, con los bovinos como principales reservorios (1).

Las investigaciones a nivel epidemiológico requieren técnicas más discriminatorias, que puedan diferenciar a nivel intraespecífico (19). La implementación de la sutipificación con el gen de la GP60, ha permitido la identificación de diferencias geográficas y temporales en la transmisión de *Cryptosporidium* spp., y una mejor apreciación de la implicación del parásito en la salud pública (4).

Al realizar una revisión en las bases de datos Elsevier, Scielo, PubMed, SpringerLink y Wiley Library, se encontraron reportes relacionados con la subtipificación basada en la GP60 del parásito en 29 países, reportando 163 subtipos de *C. parvum*. En concordancia con lo reportado por Couto et al. (14) y Feng et al (20), se encontró que alrededor del mundo la familia de *C. parvum* que se presenta con mayor frecuencia es la IIa (41/163), seguida por la familia II d (17/163), dos familias que han sido

in the articles consulted were family Ib (28/89), followed by the family Ia (24/89), the subtype IbA10G2 being most frequently reported in the countries (9/18), followed by the subtype IbA9G3 (Table 2, Figure 1).

**Evolutionary genetics**

*Cryptosporidium* spp. belongs to the phylum Apicomplexa, class Sporozoa, subclase Coccidia, order Eucoccidiida, suborder Eimeriina, family Cryptosporidiidae (4).

In 2003 the complete genome of *C. parvum* as well as *C. hominis* was published in CryptoDB®

reconocidas por su implicación zoonótica. El subtipo reportado con mayor frecuencia y que además está presente en todos los continentes, con excepción de Oceanía, es IIaA15G2R1 (18/28), seguido por IIaA16G1R1 y IIaA18G2R1 los cuales han sido reportados en 9 de los 28 (Tabla 1, Figura 1).

En 18 de los 29 países, reportaron *C. hominis* con una presencia de 6 familias, 67 subgenotipos. En relación con esta especie, la familia que es reportada con mayor frecuencia en los artículos consultados es la familia Ib (28/89), seguida por la familia Ia (24/89); siendo el subtipo IbA10G2 el más frecuentemente reportado en los países (9/18), seguido por el subtipo IbA9G3 (Tabla 2, Figura 1).

**Table 1:** Families and subtypes of *C. parvum* reported in cattle and humans.

Country	Family	Subtype	Host	Reference
Germany	IIa	IIaA15G2R1*	Cattle	(25)
		IIaA14G2R1		
		IIaA17G2R1		
	IIa	IIaA18G2R1	Cattle	(25)
		IIaA21G0R1		
		IIaA22G1R1		
	IIa	IIaA16G1R1	Cattle	(26)
		IIaA22G1		
		IIaA21G1R1		
Argentina	IIa	IIaA17G1R1	Cattle	(2)
		IIaA18G1R1		
		IIaA20G1R1*		
	IIa	IIaA21G1R1	Cattle	(24)
		IIaA22G1R1		
		IIaA23G1R1		
	IIa	IIaA18G1R1	Cattle	(27)
		IIaA20G1R1*		
		IIaA21G1R1		
Australia	IIa	IIaA22G1R1	Human	(27)
		IIaA23G1R1		
		IIaA16G1R1		
	IIc	IIaA19G1R1	Human	(27)
		IIaA15G2R1		
		IIaA17G2R1		
	IIa	IIaA18G3R1*	Human	(27)
		IIaA19G2R1		
		IIaA19G3R1		
	IIa	IIcA5G3a	Human	(27)
		IIa15G2R1		
		IIaA18G3R1		
Brazil	IIa	IIaA17G2R1*	Cattle	(28)
		IIaA18G3R1		
		IIaA20G3R1		
	IIa	IIaA20G2R1	Cattle	(14)
		IIaA20G2R2		
		IIaA19G2R1		
	IIa	IIaA19G2R2	Cattle	(14)
		IIaA18G1R1		
		IIaA18G2R2		
	IIa	IIaA16G3R2	Cattle	(14)
		IIaA14G2R2		
		IIaA15G2R1*		
Egypt	IIa	IIaA15G1R1	Cattle	(29)
		IIaA15G2R1		
		IIaA15G2R1		
	IIa	IIaA15G1R1	Human & Cattle.	(8)
		IIaA15G2R1		
		IIaA15G2R1		
	IIa	IIaA15G2R1*	Human & Cattle.	(8,29)
		IIaA13G1R1		
		IIaA15G1R1		
Spain	IIa	IIaA16G2R1	Cattle	(12,30)
		IIaA16G3R1		
		IIaA17G2R1		
	IIa	IIaA16G3R1	Cattle	(12,30)
		IIaA17G2R1		
		IIaA18G3R1		

	Iia	IiaA19G3R1 IiaA15G2R1* IiaA13G1R1	Cattle Cattle Cattle	(30)
	Iic	IicA5G3R2	Human	(12)
	Iid	IidA22G2R1 IidA23G1	Human & Cattle	(12)
	Iia	IiaA15G2R1*	Bovine	(31,32)
United States	Iia	IiaA15G2R2 IiaA11G2R1 IiaA17G2R1 IiaA18G2R1 IiaA19G2R1	Cattle	(32)
Ethiopia	Iia	IiaA15G2R1* IiaA16G2R1 IiaA16G1R1	Human	(33)
France	Iia	IiaA15G2R1* IiaA18G1R1*	Cattle	(34)
Hungary	Iia	IiaA16G1R1* IiaA17G1R1 IiaA18G1R1	Cattle	(35)
	Iid	IidA22G1 IidA19G1	Cattle	(35)
	Iia	IiaA15G2R1* IiaA13G2R2 IiaA14G2R1a IiaA14G2R1b	Cattle	(31)
India	Iic	IicA5G3*	Human	(6)
	Iid	IidA14G1 IidA15G1	Human	(6)
	Iie	IieA7G1	Human	(6)
England and Wales	Iia	IiaA16G3R1 IiaA14G2R1 IiaA19G1R1 IiaA18G1R1	Cattle	(19)
	Iia	IiaA20G3R1 IiaA19G3R1 IiaA15G2R1 IiaA17G1R1	Cattle	(36)
	Iia	IiaA15G2R1* IIAA16G3R1	Human & Cattle	(37)
Iran	Iid	IidA15G1 IidA18G1 IidA20G1a IidA21G1a IidA26G1	Human & Cattle	(37)
Ireland	Iia	IiaA18G3R1* IiaA15G2R1* IiaA17G2R1 IiaA19G4R1 IiaA20G3R1 IiaA19G3R1 IiaA17G3R1 IiaA20G5R1 IiaA18G2R1 IiaA20G2R1	Cattle	(38)
Jamaica	Iic	IicA5G3d	Human	(39)
Japan	Iia	IiaA15G2R1*	Cattle	(40)
	Iia	IiaA15G1R1 IiaA20G3R1	Human	(41)
	Iic	IicA5G3a	Human	(41)
Jordan	Iid	IidA14G1 IidA20G1* IidA24G1 IidA29G1	Human	(41)
	Iia	IiaA15G1R1 IiaA15G2R1	Human	(3)
Kuwait	Iic	IicA5G3a	Human	(3)
	Iid	IidA20G1* IidA18G1	Human	(3)
	Iif	IifA6	Human	(3)
Malasya	Iid	IidA15G2R1	Human	(42)
Mexico	Iia	IiaA15G2R1 IiaA16G1R1	Human	(43)
Nigeria	Iic	IicA5G3h	Human	(44)
	Iie	IieA10G1	Human	(45)



	Iia	IiaA15G2R1* IiaA17G1R1	Human & Cattle.	(9)
	Iid	IidA15G1 IidA16G1 IidA18G1	Human	(9)
Netherlands		IiaA16G3R1 IiaA13G2R1 IiaA14G2R1 IiaA17G2R1 IiaA18G4R1 IiaA18R1 IiaA19G2R1		
	Iia	IiaA11G2R1 IiaA16G1R1 IiaA19G1R1 IiaA18G1R1 IiaA16G2R1 IiaA18G3R1 IiaA21G3R1 IiaA12G2R1	Cattle	(9)
	Iij	IijA24R2	Cattle	(9)
Peru		IicA5G3a* IicA5G3b IicA5G3c	Human	(46)
	Iia	IiaA15G2R1* IiaA16G2R1	Human & Cattle	(47)
	Iib	IibA14	Human	(47)
Portugal	Iic	IicA5G3	Human	(47)
	Iid	IidA17G1 IidA19G1 IidA21G1 IidA22G1	Human & Cattle Human Human Human	(47)
Czech Republic		IiaA15G2R1* IiaA16G1R1 IiaA22G1R1 IiaA15G1R1 IiaA18G1R1		
	Iia		Cattle	(48)
Romania	Iia	IiaA15G2R1* IiaA16G1R1	Cattle	(49)
Switzerland	Iia	IiaA18G3R1	Human	(27)
	Iid	IidA22G1	Human	(27)
	Iia	IiaA16G1R1* IiaA18G1R1 IiaA20G1R1	Cattle	(50)
United States of Serbia and Montenegro	Iid	IidA18G1b	Cattle	(50)
	Iij	IijA16R2 IijA17R2	Cattle	(50)

\*Subtype of *C. parvum* found in the highest frequency in the study.

demonstrating a high degree of similarity ranging between 95 y 97%. The genome of *Cryptosporidium parvum* is about 9 million base pairs in 8 chromosomes (17).

The organisms belonging to the phylum Apicomplexa, like the majority of the protists, diverged relatively early in the eukaryotic lineage and have many biological characteristics that are not shared with the principle models of eukaryotic systems (intracellular parasitism for example, or the possession of secondary plastids). Several large-scale sequencing efforts have drastically increased the number of genes known from the Apicomplexa. However, assigning biological function to many of these genes continues to be a major challenge. The generation of loss-of-function

## Genética evolutiva

*Cryptosporidium* spp. pertenece al phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidiida, suborden Eimeriina, familia *Cryptosporidiidae* (4).

En 2003 el genoma completo de *C. parvum* así como de *C. hominis* fue publicado en CryptoDB®, con una alta similitud que oscila entre el 95 y 97%. El genoma de *Cryptosporidium parvum* tiene un tamaño de aproximadamente 9 millones de pb y 8 cromosomas (17).

Los organismos pertenecientes al phylum Apicomplexa, al igual que la mayoría de los protistas, se separaron relativamente temprano en el linaje eucariota y tienen muchas características



Jamaica	Ib	IbA10G2*	(39)
	Ie	IeA12G3T3	(39)
Jordan	Ib	IbA6G3	(41)
		IbA9G3	
		IbA10G2 IbA20G2	
Kuwait	Ib	IdA21	(41)
		IdA24*	
		IbA9G3 IbA10G2	
Malasya	Ib	IdA14	(3)
		IdA11G3T3	
		IaA14R1	
		IbA10G2R2	
Mexico	Ib	IdA15R2	(42)
		IeA11G2T3R1	
		IfA11G1R2	
		IaA15R3 IaA14R3*	
Nigeria	Ib	IbA10G2	(43)
		IdA17	
		IeA11G3T3*	
Netherlands	Ia	IaA14R3	(44)(45)
		IaA16R3	
		IaA24R3	
		IaA25R3	
		IaA23R3	
		IaA25R3	
Perú	Ib	IbA13G3	(44)
		IeA11T3G3	
		IbA10G2*	
		IdA17	
		IdA14	
		IcA5G3R2	
Portugal	Ia	IaA11R4	(46)
		IaA12R4	
		IaA13R4	
		IaA13R7	
		IaA14R6	
		IaA15R3	
Switzerland	Ib	IbA10G2*	(46)
		IdA10	
		IdA15	
		IdA20	
		IeA11G3T3	
		IaA19R3	
United Kingdom	Ib	IbA10G2*	(47)
		IdA15	
		IeA11G3T3	
		IfA14G1	
		IbA10G2	
		IdA15G1	
Switzerland	Ib	IbA10G2	(27)
		IbA9G3	
		IbA12G3T3 IbA10G2	

\*Subtype of *C. hominis* found in the highest frequency in the study.

mutants is greatly facilitated by the fact that the parasites have a haploid genome over the majority of their life cycles (21).

Similar to other parasites in the phylum Apicomplexa, the life cycle of *Cryptosporidium* spp. has a sexual phase during which recombination between genetically different strains facilitated not only the evolution and appearance of subtypes but also the adaptation of *Cryptosporidium* spp. (5) and generation of genetic variation between different populations in agreement with the ecological demands and epidemiological conditions of a region (22).

The species of *C. parvum* that infect humans and some animals could undergo meiotic recombination between different lineages. This could play an important role in the evolution of virulent subtypes (5). Genetic recombination appears to be associated with the high frequency of polymorphism in the gene for GP60. For this, standardized association indices have been used, measured between alleles, which is zero in panmictic populations and with positive values in non-panmictic populations, alternating these behaviors due to the presence of different genotypes and their subsequent recombination generating impact on the genetic equilibrium (22). Markers like the actin gene, heat shock gene and the small ribosomal subunit have been used for phylogenetic investigations and the construction of the current classification (10) however the comparison has been criticized for the lack of a system of genotypic standardization (22).

Recent studies have suggested that the telomeric/subtelomeric regions are highly polymorphic and could carry putative virulence factors. When a locus shows extraordinary levels of genetic differentiation in the population, compared with other loci, it could be interpreted as evidence of positive selection (23). The identification of the grade of intraspecies variation using multilocus methods depends on three factors: the characteristics of the sampling, the types of techniques and the structure of the local population of the parasite (17). Cacciò et al (22) analyzed different geographic zones evaluating the relation between those zones and GP60 polymorphisms. This study produced no evidence consistent with geographic isolation and the presence of mutations (22). However Del Coco et al (24) found an association between subtypes and the location, possibly indicating a geographic segregation, concluding that it was necessary

biológicas que no son compartidas por los modelos principales de sistemas eucarióticos (por ejemplo, el parasitismo intracelular o la posesión de los plastidios secundarios). Varios esfuerzos de secuenciación a gran escala han aumentado drásticamente el número de genes conocidos de los apicomplexa. Sin embargo, la asignación de las funciones biológicas de muchos de estos genes sigue siendo un gran desafío. La generación de mutantes con pérdida de la función, se ve facilitada en gran medida debido a que los parásitos mantienen un genoma haploide sobre la mayor parte de su ciclo de vida (21).

Al igual que en otros parásitos del phylum Apicomplexa, el ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. tiene una fase sexual durante la cual puede ocurrir recombinación entre cepas genéticamente diferentes, facilitando no solamente la evolución y aparición de subtipos sino la adaptación de *Cryptosporidium* spp. (5) y generando la variación genética entre diferentes poblaciones de acuerdo con las exigencias ecológicas y condiciones epidemiológicas de una región (22).

Las especies de *C. parvum* que infectan humanos y algunos animales pueden realizar recombinación meiótica entre diferentes linajes, lo que puede jugar un papel importante en la evolución de los subtipos virulentos (5). La recombinación genética parece estar asociada con la alta frecuencia de polimorfismo en el gen de la GP60. Para esto, se han usado índices estandarizados de asociación, medida entre alelos, la cual es cero en poblaciones panmíticas y con valores positivos para poblaciones no panmíticas, alterándose estos comportamientos por la presencia de diferentes genotipos y su posterior recombinación generando impacto sobre el equilibrio génico (22). Marcadores como el gen de la actina, proteína de choque térmico y la subunidad ribosomal pequeña han sido usados para investigaciones filogenéticas y la construcción de la clasificación actual (10), sin embargo, la comparación informativa ha sido amenazada por la falta de un esquema de genotipo estandarizado (22).

Recientes estudios han sugerido que las regiones teloméricas/subteloméricas son altamente polimórficas y pueden llevar factores de virulencias putativos. Cuando un locus muestra niveles extraordinarios de diferenciación genética de la población, comparado con otros loci, puede ser interpretado como evidencia de selección positiva (23). La identificación del grado de variación intraespecies usando métodos multilocus, depende de tres factores: las características del muestreo, el tipo de técnicas y la estructura de la población del

to do more studies to evaluate the degree of association of subtypes and pathogenicity, including the postulate that more genes may be associated with this condition, suggesting the evaluation of the relationship between different geographical situations where *Cryptosporidium* spp. is present (24).

### Conclusion

Molecular diagnosis of the parasite allows the design of strategies to avoid contamination of the environment, human and animal populations of the studied region. This type of diagnosis can be the most successful tool in the preventive management of cryptosporidiosis.

The phylogenetic studies allow to know the distribution, zoonotic potential and the genetic variation of *Cryptosporidium* species and subtypes. The variations among the different subtypes of the GP60 gene often occur as a consequence of synonymous or silent mutations in the microsatellite region, where they do not affect the coding capacity of the codon for serine. These mutations must be the end result of a purifying process of negative, positive, or neutral selection and may or may not be related to the virulence of the parasite.

Geographic area and its specific environmental conditions could affect the genetic composition of parasite, acting as an inductor agent of mutations and differentiating subtypes worldwide.

### Conflict of interest

The authors of this paper declare no conflict of interest that may jeopardize its validity.

parásito locales (17). Cacciò et al (22) analizaron diferentes zonas geográficas evaluando la relación entre estas y el polimorfismo de la GP60, este estudio no mostró evidencia consistente entre el aislamiento geográfico y presencia de mutaciones (22). Sin embargo, Del Coco et al (24) encontraron asociación entre subtipos y la ubicación, indicando posiblemente una segregación geográfica, concluyendo que eran necesarios más estudios que evaluaran el grado de asociación de subtipos y patogenicidad, incluso la postulación de más genes que puedan estar asociados con esa condición, sugiriendo la evaluación de la relación entre diferentes situaciones geográficas en donde el *Cryptosporidium* spp. esté presente (24).

### Conclusiones

El diagnóstico molecular del parásito, permite diseñar estrategias para evitar la contaminación del medio ambiente, las poblaciones humanas y animales de la región estudiada. Este tipo de diagnósticos puede ser la herramienta más acertada en el manejo preventivo de la criptosporidiosis.

Los estudios filogenéticos permiten conocer la distribución, el potencial zoonótico y la variación genética de especies y subtipos. Las variaciones entre los diferentes subgenotipos del gen de la proteína GP60, suelen producirse como consecuencia de mutaciones sinónimas o silenciosas en la región microsatélite, en donde éstas no afectan la codificación del codón para serina. Estas mutaciones, pueden deberse al sometimiento de una selección negativa, purificante, positiva o neutral y podrían o no estar relacionadas con la virulencia del parásito.

El área geográfica y sus condiciones ambientales específicas posiblemente pueden influir en la composición genética del parásito, actuando como un agente inductor de mutaciones y diferenciando los subtipos alrededor del mundo.

### Conflicto de intereses

Los autores del presente escrito declaran que no hay conflicto de intereses que pongan en riesgo la validez.

## REFERENCES

1. Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2010;124(1):90-7.
2. Tomazic ML, Maidana J, Dominguez M, Uriarte EL, Galarza R, Garro C, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Vet Parasitol* 2013;198(3-4):382-6.
3. Sulaiman I, Hira P, Zhou L, Al-ali FM, Al-shelahi FA, Shweiki HM, et al. Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in Children in Kuwait. *Society* 2005;43(6):2805-9.
4. Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet Parasitol* 2009;165(3-4):187-99.
5. Rzeżutka A, Kaupke A. Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* species isolated from cattle in Poland. *Vet Parasitol* 2013;196(3-4):301-6.
6. Sharma P, Sharma A, Sehgal R, Malla N, Khurana S. International Journal of Infectious Diseases Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *Int J Infect Dis* 2013;17(8):e601-5.
7. 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.
8. Helmy YA, Krücken J, Nöckler K, Samson-himmelstjerna G Von, Zessin K. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Vet Parasitol* 2013;193(1-3):15-24.
9. Wielinga PR, de Vries A, van der Goot TH, Mank T, Mars MH, Kortbeek LM, et al. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int J Parasitol* 2008;38(7):809-17.
10. Jex AR, Smith H, Monis P, Campbell B, Gasser R. *Cryptosporidium*--biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnol Adv* 2008;26(4):304-17.
11. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* 2010;124(1):80-9.
12. Navarro-i-Martinez L, Del Águila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29(2):135-43.
13. Kváč M, McEvoy J, Loudová M, Stenger B, Sak B, Květoňová D, et al. Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *Int J Parasitol* 2013;43(10):805-17.
14. Couto MCM Do, Lima MDF, Bomfim TCB Do. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Trop* 2014;130(1-2):117-22.
15. Mallon ME, MacLeod A, Wastling JM, Smith H, Tait A. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infect Genet Evol* 2003;3(3):207-18.
16. Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol* 2013;29(5):237-51.
17. Robinson G, Chalmers RM. Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Exp Parasitol* 2012;132(2):200-15.
18. Thompson R, Palmer C, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J* 2008;177(1):18-25.
19. Brook E, Anthony Hart C, French NP, Christley RM. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Vet J* 2009;179(3):378-82.
20. Feng Y, Torres E, Li N, Wang L, Bowman D, Xiao L. Population genetic characterisation of dominant *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA15G2R1. *Int J Parasitol* 2013;43(14):1141-7.

21. Striepen B, White MW, Li C, Guerini MN, Malik S-B, Logsdon JM, et al. Genetic complementation in apicomplexan parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(9):6304–9.
22. Cacciò SM, de Waele V, Widmer G. Geographical segregation of *Cryptosporidium parvum* multilocus genotypes in Europe. *Infect Genet Evol* 2015;31(April):245–9.
23. Li N, Xiao L, Cama V, Ortega Y, Gilman RH, Guo M, et al. Genetic recombination and *Cryptosporidium hominis* virulent subtype IbA10G2. *Emerg Infect Dis* 2013 Oct;19(10):1573–82.
24. Del Coco VF, Córdoba M, Bilbao G, de Almeida Castro AP, Basualdo J a, Fayer R, et al. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Res Vet Sci* 2014;96(2):311–4.
25. Broglia A, Reckinger S, Cacciò SM, Nöckler K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet Parasitol* 2008;154(1–2):8–13.
26. Del Coco VF, Córdoba M, Basualdo J. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol* 2008;158(1–2):31–5.
27. O'Brien E, McInnes L, Ryan U. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Exp Parasitol* 2008;118(1):118–21.
28. Ng JSY, Pingault N, Gibbs R, Koehler A, Ryan U. Experimental Parasitology Molecular characterisation of *Cryptosporidium* outbreaks in Western and South Australia. *Exp Parasitol* 2010;125(4):325–8.
29. Amer S, Zidan S, Adamu H, Ye J, Roellig D, Xiao L, et al. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Exp Parasitol* 2013;135(3):518–23.
30. Díaz P, Quílez J, Chalmers RM, Panadero R, López C, Sánchez-Acedo C, et al. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology* 2010;137(8):1187–93.
31. Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, et al. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet Parasitol* 2007;144(1–2):1–9.
32. Xiao L, Zhou L, Santin M, Yang W, Fayer R. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitol Res* 2007;100(4):701–6.
33. Adamu H, Petros B, Hailu A, Petry F. Acta Tropica Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ethiopia. *Acta Trop* 2010;115(1–2):77–83.
34. Rieux A, Paraud C, Pors I, Chartier C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. *Vet Parasitol* 2014;202(3–4):171–9.
35. Plutzer J, Karanis P. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet Parasitol* 2007;146(3–4):357–62.
36. Chalmers RM, Ferguson C, Cacciò S, Gasser RB, Abs EL-Osta YG, Heijnen L, et al. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int J Parasitol* 2005;35(4):397–410.
37. Nazemalhosseini-Mojarad E, Haghighi A, Taghipour N, Keshavarz A, Mohebi SR, Zali MR, et al. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Vet Parasitol* 2011;179(1–3):250–2.
38. Thompson HP, Dooley JSG, Kenny J, McCoy M, Lowery CJ, Moore JE, et al. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol Res* 2007;100(3):619–24.
39. Gatei W, Barrett D, Lindo JF, Eldemire-shearer D. Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. *Emerg Infect Dis* 2008;14(5):841–3.
40. Ichikawa-Seki M, Aita J, Masatani T, Suzuki M, Nitta Y, Tamayose G, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two different Japanese prefectures, Okinawa and Hokkaido. *Parasitol Int* 2014;64(2):161–6.
41. Hijjawi N, Ng J, Yang R, Atoum MFM, Ryan U. Experimental Parasitology Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Exp Parasitol* 2010;125(2):161–4.

42. Lim YAL, Iqbal A, Surin J, Sim BLH, Jex AR, Nolan MJ, et al. Infection , Genetics and Evolution First genetic classification of *Cryptosporidium* and *Giardia* from HIV / AIDS patients in Malaysia. "Infection, Genet Evol 2011;11(5):968-74.
43. Valenzuela O, González-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, Durazo M, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. PLoS One 2014;9(4):e96128.
44. Akinbo FO, Okaka CE, Omoregie R, Dearen T, Leon ET, Xiao L. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp . in HIV-infected Persons in Benin City , Edo State , Nigeria. FOOYIN J Heal Sci 2010;2(3-4):85-9.
45. Maikai B V, Umoh JU, Lawal I a, Kudi AC, Ejembi CL, Xiao L. Molecular characterizations of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* in humans in Kaduna State, Nigeria. Exp Parasitol 2012;131(4):452-6.
46. Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, et al. *Cryptosporidium* Species and Subtypes and Clinical. Emerg Infect Dis. 2008;14(10):1567-74.
47. Alves M, Xiao L, Antunes F. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. Parasitol Res 2006;99(3):287-92.
48. Kváč M, Hromadová N, Květoňová D, Rost M, Sak B. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. Vet Parasitol 2011;177(3-4):378-82.
49. Imre K, Lobo LM, Matos O, Popescu C, Genchi C, Dărăbuș G. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections? Vet Parasitol 2011;181(2-4):321-4.
50. Misic Z, Abe N. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. Parasitology 2007;134(Pt 3):351-8.
51. Wang R, Zhang X, Zhu H, Zhang L, Feng Y, Jian F, et al. Experimental Parasitology Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp . and *Giardia duodenalis* in humans in Henan , China. Exp Parasitol 2011;127(1):42-5.