



**TESIS DOCTORAL**

**“CRIPTOSPORIDIOSIS EN RUMIANTES  
DOMÉSTICOS DE GALICIA: ANÁLISIS GENOTÍPICO Y  
SUBGENOTÍPICO”**

**María Soilán López**

DEPARTAMENTO DE PATOLOXÍA ANIMAL

FACULTADE DE VETERINARIA

LUGO

2014



D. PABLO DÍEZ BAÑOS, Catedrático del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

DÑA. PATROCINIO MORRONDO PELAYO, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

D. PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ, Profesor Contratado Doctor Interino del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada **“CRIPTOSPORIDIOSIS EN RUMIANTES DOMÉSTICOS DE GALICIA: ANÁLISIS GENOTÍPICO Y SUBGENOTÍPICO”** presentada por Dña. **MARÍA SOILÁN LÓPEZ** para optar al Título de Doctor en Veterinaria,

*Autorizan la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992*

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 1 de septiembre de 2014.



## **FINANCIACIÓN:**

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión de los proyectos de investigación:

**Caracterización de la diversidad de *Cryptosporidium* spp de rumiantes del noroeste peninsular y análisis de su relación con la potencialidad patógena, inmunológica y zoonótica** (AGL2011-25210). Ministerio de Ciencia e Innovación (01/01/2012 - 31/12/2014). Investigador responsable: M<sup>a</sup> Patrocinio Morrondo Pelayo.

**Consolidación e estructuración de unidades de investigación competitivas (GPC)** (2012-PG243). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (17/06/2012-30/11/2014). Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

## **PUBLICACIONES:**

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

### *A.- Artículos de investigación:*

DÍAZ, P., HADFIELD, S.J., QUÍLEZ, J., **SOILÁN, M.**, LÓPEZ, C., PANADERO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P., CHALMERS, R.M. (2012). Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in North West Spain. *Veterinary Parasitology*, 186: 188-195.

### *B. Artículos de divulgación:*

DÍAZ, P.; **SOILÁN, M.**; PATO, F.J.; PÉREZ, A.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.M.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2011). A criptosporidiose en ruminantes como causa de diarrea. *AFRIGA*, 92: 56-62.

### *C. Contribuciones a congresos:*

DÍAZ, P.; HADFIELD, S.J.; QUÍLEZ, J.; **SOILÁN, M.**; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; CHALMERS, R.M. (2011). Assessment of three



methods for microsatellite fragment length analysis in *Cryptosporidium parvum* isolates. *XII Congreso Ibérico de Parasitología*. Zaragoza. 5-8 de julio de 2011.

DÍAZ, P.; HADFIELD, S.J.; QUÍLEZ, J.; **SOILÁN, M.**; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; MORRONDO, P.; CHALMERS, R.M. (2011). Multilocus microsatellite typing of *Cryptosporidium parvum* isolates from diarrhoeic calves and lambs in Galicia (NW Spain). *XII Congreso Ibérico de Parasitología*. Zaragoza. 5-8 de julio de 2011.

DÍAZ, P.; **SOILÁN, M.**; PÉREZ, A.; PATO, F.J.; LÓPEZ, C.; FERNÁNDEZ, G.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (2012). Importancia de *Cryptosporidium* spp en procesos diarreicos en terneros de Galicia. *XVII Congreso Internacional ANEMBE de medicina bovina*, 18-20 de abril. Santander, 2012

DÍAZ, P., QUÍLEZ, J., **SOILÁN, M.**, PRIETO, A., PÉREZ, A., CABANELAS, E., LÓPEZ, C., FERNÁNDEZ, G., PANADERO, R., DÍEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. (2013). Determinación de subtipos zoonóticos de *Cryptosporidium* spp en terneros con diarrea en Galicia. *XVIII Congreso Internacional ANEMBE de medicina bovina*, 24-26 junio, Lleida (España), 2013.

DÍAZ P., **SOILÁN M.**, PRIETO A., PÉREZ A., PANADERO R., FERNÁNDEZ G., MORRONDO P., DÍEZ-BAÑOS P. (2014). *Cryptosporidium* species and subtype analysis from pre-weaned goat kids in North-western Spain. *Joint ISP BAVP EVPC Conference*, 12-13 Junio, Dublín (Irlanda), 2014.



Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de forma directa o indirecta han contribuido a la realización del presente trabajo y de manera muy especial:

A mis directores, sin la ayuda de los cuales este trabajo no hubiera sido posible. A la Catedrática Profa. Dra. M<sup>a</sup> Patrocinio Morrondo Pelayo, por su preocupación y su apoyo durante todo este tiempo. Al Catedrático Prof. Dr. Pablo Díez Baños por su dedicación e interés en la redacción de este trabajo y por permitirme formar parte de un equipo excepcional. Al Prof. Dr. Pablo Díaz Fernández por confiar en mí desde un principio, enseñándome el fascinante mundo de los “cryptos”, creyendo en mis capacidades incluso más que yo misma y por ser más que un director un gran amigo.

A la Profa. Dra. Rosario Panadero por resolver las dudas surgidas sobre Parasitología al trabajar en el campo a lo largo de estos años. Al Prof. Dr. Ceferino Manuel López Sánchez por hacerme partícipe de su particular lucha contra el innombrable sistema operativo.

A la Profa. Dra. Rita Sánchez-Andrade Fernández, al Prof. Dr. Adolfo Paz Silva, Profa. Dra. María Sol Arias y al Dr. José Luís Suárez García de Paredes por su apoyo y por iniciarme en el mundo de los ELISAs hace ya unos cuantos años.

A la Catedrática Prof. Dra. Caridad Sánchez Acedo y al Prof. Dr. Joaquín Quílez de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, por ser nuestros maestros en la caracterización molecular de *Cryptosporidium*; gracias a su ayuda, colaboración y consejos, este trabajo ha podido salir a la luz.

A la Dra. Rachel Chalmers y al resto de investigadores del UK *Cryptosporidium* Reference Unit (Guy Robinson, Stephen Hadfield y Kristin Elwin) por su ayuda en la realización del segundo estudio de este trabajo.

A las chicas (Eva, Ana y Esther) y chicos (Pablo Béjar, Alberto y Jose) del Departamento, gracias por su simpatía y compañerismo.

A todos los compañeros veterinarios que han participado en la toma de muestras, por su ayuda desinteresada, en especial a Diego Fariñas, Enrique Gayol, Ana González, Miguel Viña, Ana Jamardo, Lucas Rigueira, Miguel Pico, Manuel Pérez y Samuel Pereira.

A mis amigos de Chantada, Antonio, Luisa, Chus, Pepe y en especial a Ana, mi amiga y compañera de trabajo en la ADS, por hacer más llevadera la rutina diaria.



A los de Lugo, Carolina y Manuel, Álvaro y Marta con sus peques, Eva, Carmen, Diego y Pablo, por estar siempre cerca de mí y por los buenos ratos que me han hecho pasar acompañados de una caña.

A las de Coruña, Laura y María Llamazares, por ser las amigas de toda la vida.

A Pilar, por ser mi compañera de viajes desde nuestro paso por los mataderos escoceses.

A Ñampa y al pequeñín que está en camino, por acompañarme en todo momento. A Solete, por todas las horas que pasamos juntos delante del ordenador.

A mis padres, a mi hermano Jua, a Ana y a mis sobris, Diego y Juan, por estar ahí siempre que los he necesitado, este trabajo está dedicado de manera especial a ellos.





<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Ciclo biológico.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Epidemiología .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> en rumiantes sin destetar en España .....	13
2.2.2. Factores que influyen en la presentación de la criptosporidiosis .....	14
<b>2.3. Patogenia y signos clínicos en rumiantes domésticos .....</b>	<b>16</b>
<b>2.4. Técnicas de diagnóstico.....</b>	<b>18</b>
2.4.1. Técnicas microscópicas .....	19
2.4.1.1. Examen histológico .....	19
2.4.1.1. Examen microscópico.....	19
2.4.2. Técnicas inmunológicas .....	23
2.4.2.1. Técnicas inmunológicas directas .....	23
2.4.2.2. Técnicas inmunológicas indirectas .....	25
2.4.3. Técnicas moleculares .....	25
2.4.3.1. Análisis genotípico .....	27
2.4.3.2. Análisis subtípico.....	28
<b>2.5. Epidemiología molecular .....</b>	<b>34</b>
2.5.1. Ganado bovino .....	34
2.5.2. Pequeños rumiantes .....	37
<b>2.6. Aspectos zoonóticos .....</b>	<b>42</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. ESTUDIO 1. Presencia y caracterización molecular de aislados de <i>Cryptosporidium</i> en rumiantes domésticos de Galicia.....</b>	<b>47</b>
3.1.1. Características generales de la zona de estudio.....	47
3.1.2. Localización de las explotaciones de rumiantes domésticos y obtención de las muestras .....	48
3.1.3. Análisis parasitológicos .....	49
3.1.3.1. Técnicas microscópicas para la detección de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> .....	50
3.1.3.2. Técnicas moleculares.....	52
<b>3.2. ESTUDIO 2. Análisis de la variabilidad genética de <i>C. parvum</i> en terneros y corderos de Galicia mediante análisis multilocus (ML1, ML2 y gp60).....</b>	<b>56</b>
3.2.1. Análisis del tamaño de los fragmentos de los microsatélites ML1 y ML2 .....	56
3.2.2. Tipado multilocus y análisis de la variabilidad genética de <i>C. parvum</i> .....	59
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1. Estudio microscópico.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2. Estudio molecular .....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Análisis genotípico.....	66
4.2.2. Análisis subgenotípico .....	75
<b>4.3. Análisis de la variabilidad genética de <i>C. parvum</i> en terneros y corderos de Galicia mediante análisis multilocus (ML1, ML2 y gp60) .....</b>	<b>88</b>
4.3.1. Análisis de las regiones ML1 y ML2 mediante secuenciación, electroforesis capilar y geles de alta resolución .....	88
4.3.2. Subtipado multilocus de aislados de <i>C. parvum</i> procedentes de terneros y corderos mediante la combinación del análisis de fragmentos de las regiones ML1 y ML2 y secuenciación de la gp60 .....	93
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>6. RESUMEN.....</b>	<b>105</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>115</b>





# **1. INTRODUCCIÓN**



*Cryptosporidium* es un protozoo parásito, de distribución cosmopolita, que afecta fundamentalmente al tracto gastrointestinal de un amplio abanico de hospedadores vertebrados, incluido el ser humano (Xiao y Feng, 2008). Este género integra múltiples formas genéticamente diferentes, incluyendo especies/genotipos bien adaptados a un hospedador tipo y otras que afectan a un espectro más amplio de hospedadores como, por ejemplo, *Cryptosporidium parvum*, que actualmente está considerado un importante agente zoonótico (Xiao y Ryan, 2008).

Las infecciones por *Cryptosporidium* tienen una gran importancia en los rumiantes domésticos; de hecho, los estudios epidemiológicos longitudinales muestran prevalencias acumuladas del 100%, siendo también notable la presencia del parásito en los rebaños. La alta morbilidad observada en los rumiantes se debe a que se presentan manifestaciones clínicas tras la ingestión de un escaso número de ooquistes, y además, los animales excretan al medio un elevado número de ooquistes que son muy resistentes. Aunque los rumiantes se pueden infectar por varias especies del protozoo, la especie que se identifica con mayor frecuencia en los brotes de diarrea neonatal es *C. parvum* (Santín y Trout, 2008), sobre todo durante las épocas de paridera.

La criptosporidiosis es más frecuente en animales muy jóvenes y se caracteriza, fundamentalmente, por diarrea, debilidad y anorexia. En los rumiantes domésticos causa importantes pérdidas directas debido a la elevada mortalidad que produce, además, de otras mermas indirectas (menor ganancia de peso, menor resistencia a otras enfermedades, etc.). En España las diarreas neonatales de los rumiantes son un problema especialmente grave y frecuente, con prevalencias que oscilan entre el 50-60% (Matos-Fernández *et al.*, 1993; Muñoz *et al.*, 1996; De la Fuente *et al.*, 1998, 1999; Quílez *et al.*, 2008a, b), siendo *Cryptosporidium* uno de los principales agentes etiológicos identificados, junto con otros patógenos bacterianos y víricos.

Para la detección de ooquistes en las heces, tradicionalmente se han empleado técnicas microscópicas (Heine, Ziehl-Neelsen modificado, auramina, Kinyoun, etc), aunque en la mayoría de los casos, el tamaño de los ooquistes, su forma o las características de la tinción no permiten identificar las especies de *Cryptosporidium*. En la última década se han desarrollado diversas técnicas basadas en biología molecular que son más complejas pero que tienen mayor sensibilidad y especificidad que las microscópicas. La aplicación de estas técnicas a los estudios epidemiológicos sobre las infecciones por *Cryptosporidium* han permitido determinar qué especies están implicadas en la transmisión de los animales y las personas y, al mismo tiempo, han contribuido a esclarecer diversos aspectos epidemiológicos.

Las técnicas moleculares (SSU rRNA, COWP, HSP70, actina, etc.) se utilizaron en un principio para la diferenciación de especies/genotipos de este protozoo; siendo en la

actualidad las técnicas basadas en el estudio del gen que codifica para la SSU rRNA las más empleadas para el genotipado de *Cryptosporidium*. La aplicación de estos métodos moleculares ha revelado por ejemplo que, en España, uno de los principales patógenos de los rumiantes domésticos, *C. parvum*, es la especie más importante tanto en terneros como en corderos y cabritos (Quílez *et al.*, 2008a, b). En ganado vacuno, estudios recientes de biología molecular sugieren la existencia de una relación entre la edad y la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium*, de manera que los terneros sin destetar están más predispuestos a la infección por *C. parvum*. Además, estos animales constituyen el reservorio más importante de *C. parvum* para humanos (Santín y Trout, 2008) siendo considerada junto a *C. hominis*, las especies más comunes en brotes de criptosporidiosis humana, tanto en personas inmunodeprimidas como inmunocompetentes. En ganado vacuno, los animales de más edad parecen estar parasitados por especies más adaptadas a ellos y con menos capacidad patógena que *C. parvum*; en terneros de 2 a 11 meses, predominan *C. bovis* y *C. ryanae*, mientras que en animales mayores de 1 año es *C. andersoni* la especie más prevalente.

En la epidemiología de la criptosporidiosis humana, la intervención del ganado ovino y caprino, ha sido menos estudiada. Algunos autores afirman que la presencia de *C. parvum* en los ovinos es escasa y que predominan otras especies, como *C. ubiquitum* o *C. xiaoi* (Ryan *et al.* 2005; Santín *et al.* 2007; Elwin y Chalmers, 2008; Geurden *et al.* 2008; Wang *et al.*, 2010; Sweeny *et al.*, 2011b; Yang *et al.*, 2014). Por el contrario, en otros estudios, algunos realizados en España, indican que *C. parvum* es una especie prevalente en ovinos y una de las principales responsables de brotes de diarrea en granjas de pequeños rumiantes (Mueller-Doblies *et al.* 2008; Quílez *et al.* 2008b; Paoletti *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Imre *et al.*, 2013). También *C. bovis* y *C. ubiquitum* parasitan frecuentemente a los ovinos, mientras que *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. fayeri* y *C. suis*, junto con otros genotipos, se observan de forma más esporádica. Sin embargo, en el ganado ovino, las técnicas de biología molecular todavía no han permitido determinar una asociación entre las muestras procedentes de los animales de distintas edades y la aparición de especies diferentes de *Cryptosporidium*.

Los estudios acerca de las especies/genotipos de *Cryptosporidium* presentes en el ganado caprino son todavía más escasos, y su papel como fuente de infección para el ser humano es motivo de controversia, principalmente debido a que las pocas determinaciones moleculares se han realizado en un número muy reducido de aislados. *C. parvum* tiene una distribución global, y se ha obtenido, tanto en cabritos con diarrea como asintomáticos, así como en cabras adultas (Morgan *et al.*, 1998; Chalmers *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2003; Hajdušek *et al.*, 2004; Goma *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; O'Brien *et al.* 2008). Además también se han descrito, en un reducido número de cabras, *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. ubiquitum* y *C. xiaoi* (Park *et al.*, 2006; Karanis *et al.*, 2007; Giles *et al.*, 2009; Rieux *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Paraud *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Recientemente, una segunda generación de técnicas moleculares con mayor poder de discriminación, ha permitido el estudio de variaciones intraespecíficas, principalmente en *C. parvum* y *C. hominis* (Xiao y Ryan, 2008). La secuenciación del gen de la glicoproteína de 60 kDa (gp60) es actualmente el método de subtipado más empleado, debido a la heterogeneidad de este gen y a la relevancia que tiene en la biología del parásito. Se ha confirmado la presencia de subtipos de *C. parvum* específicos de humanos y otros específicos de animales, así como subtipos zoonóticos (Cacciò *et al.* 2005). Hasta el momento se han identificado numerosas familias (del IIa al III) dentro de *C. parvum*, procedentes tanto de humanos como de animales, cada una con varios subtipos. Sin embargo, solo las familias IIa y IID se consideran con capacidad zoonótica; la primera es mucho más frecuente y, dentro de ella, el subtipo IIaA15G2R1 se considera a nivel mundial como el predominante en terneros, así como el principal responsable de criptosporidiosis de tipo zoonótico en humanos (Misic y Abe, 2007; Wielinga *et al.* 2008; Xiao y Ryan, 2008; Xiao, 2010). Por otra parte, los subtipos de *C. parvum* que infectan a ovejas y cabras no están bien documentados, aunque algunos estudios indican que los corderos con diarrea frecuentemente están infectados con subtipos pertenecientes a las familias zoonóticas IIa y especialmente IID, lo que demuestra el posible papel de los corderos como fuente de infección para los humanos (Chalmers *et al.* 2005; Quílez *et al.* 2008a).

Tras secuenciar el genoma de *C. parvum* y *C. hominis*, se han identificado regiones micro y minisatélites, así como otras altamente polimórficas, que consisten en repeticiones en tándem de varios nucleótidos, de longitud variable y que se encuentran en el genoma de los organismos eucariotas. Su empleo en análisis multilocus permite incrementar el poder discriminatorio para caracterizar las distintas cepas de las especies de *Cryptosporidium* identificadas, además de constituir una herramienta de enorme utilidad epidemiológica (Jex *et al.*, 2008; Xiao, 2010). La mayoría de los métodos empleados para investigar los polimorfismos de los micro y minisatélites se basan en el análisis del tamaño de los fragmentos obtenidos mediante PCR usando secuenciación (Cacciò *et al.*, 2000, 2001; Huetink *et al.*, 2001; Chalmers *et al.*, 2005; Wielinga *et al.*, 2008), electroforesis capilar (Enemark *et al.*, 2002; Mallon *et al.*, 2003a; Schindler *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2007; Leoni *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2008) o geles de poliacrilamida de alta resolución (Feng *et al.*, 2000; Hourihan *et al.*, 2001; Oura *et al.*, 2003; Tanriverdi and Widmer, 2006; Tanriverdi *et al.*, 2006). La secuenciación es la técnica de referencia (“gold standard”) para determinar el tamaño del alelo y la única que permite la detección de sustituciones de nucleótidos; sin embargo, la electroforesis capilar es más económica y de mayor utilidad para detectar infecciones mixtas, por otra parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución pueden realizarse con equipos habitualmente disponibles en los laboratorios de investigación. No obstante, en *Cryptosporidium* los estudios comparativos acerca del rendimiento y fiabilidad de estas técnicas moleculares son limitados; además, es necesario una determinación segura y reproducible del tamaño del fragmento para poder comparar los datos obtenidos en diferentes laboratorios, ya que

algunos autores han señalado que existen discrepancias respecto al tamaño de los fragmentos obtenidos mediante secuenciación y análisis automático de fragmentos y que, sin embargo, están incluidos en diferentes plataformas (Delmotte *et al.*, 2001; Pasqualotto *et al.*, 2007).

Tomando como base lo expuesto anteriormente, nos planteamos dos estudios, cuyos principales OBJETIVOS son:

### **ESTUDIO 1. Presencia y caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* en rumiantes domésticos de Galicia**

1.1. Conocer la prevalencia de infección por *Cryptosporidium* spp en explotaciones de rumiantes domésticos (vacas, ovejas y cabras) del noroeste de España.

1.2. Identificar las especies/genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* que parasitan a los rumiantes domésticos y determinar su potencial zoonótico.

### **ESTUDIO 2. Análisis de la variabilidad genética de *C. parvum* en terneros y corderos, explotados en Galicia, mediante análisis multilocus (ML1, ML2 y GP60)**

2.1. Comparar la coherencia, tipabilidad, poder discriminatorio, coste, tiempo de análisis y facilidad de uso de tres métodos (secuenciación, electroforesis capilar y electroforesis en geles de alta resolución) para el análisis del tamaño de fragmentos de las regiones microsatélite de *Cryptosporidium* ML1 y ML2.

2.2. Analizar la variabilidad genética de *C. parvum* en terneros y corderos, del noroeste de España, mediante el análisis multilocus del ML1, ML2 y gp60.



## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 2.1. CICLO BIOLÓGICO

*Cryptosporidium* es un protozoo parásito obligado e intracelular que presenta un ciclo biológico monoxeno, siendo necesario un único hospedador para completar la fase sexual y asexual (Smith *et al.*, 2005a; Thompson *et al.*, 2005). Taxonómicamente pertenece al Phylum Apicomplexa, Orden Eimeriidae, Clase Coccidea. Sin embargo, recientes descubrimientos han reabierto el debate sobre su filiación debido a las diferencias observadas en su ciclo biológico y filogenia respecto a otros Eimeriidae, como *Cyclospora*, *Cystoisospora* o *Eimeria* (Barta y Thompson, 2006). Las especies de Apicomplexa se caracterizan, en general, por su especificidad de hospedador, localización de las fases endógenas y morfología. No obstante, recientes estudios genéticos permitieron comprobar que el género *Cryptosporidium* integra múltiples formas genéticamente diferentes que poseen una especificidad de hospedador variable, incluyendo especies/genotipos bien adaptados a su hospedador y otras que afectan a un amplio espectro de mamíferos. Además, las características morfológicas de los ooquistes sólo permiten diferenciar a los más pequeños y semi-esféricos (4-6 mm de diámetro) de los que son más grandes y ovalados (7x5 mm). Por ello, las técnicas de diagnóstico rutinarias y tradicionales, como por ejemplo las microscópicas, no permiten una correcta identificación de las especies del protozoo. Sin embargo, en la última década se han desarrollado numerosas técnicas moleculares que permiten detectar y diferenciar a *Cryptosporidium* spp. hasta nivel de especie/genotipo y subtipo. De este modo, se ha determinado que *Cryptosporidium* es un conjunto fenotípica y genotípicamente heterogéneo de especies y genotipos morfológicamente similares (Xiao *et al.*, 2004). Hasta el momento se han identificado 27 especies de *Cryptosporidium*, que se recogen en la Tabla 2.1. El empleo de estas herramientas para la realización de estudios epidemiológicos en áreas endémicas y epidémicas se ha incrementado de forma notable en los últimos años, lo que ha supuesto nuevos conocimientos de las rutas de transmisión de la criptosporidiosis en humanos y animales.

Los seres humanos y los animales pueden adquirir la infección por *Cryptosporidium* por diferentes rutas, que incluyen el contacto directo con hospedadores infectados o por la ingestión de agua o alimento contaminado. De este modo, un hospedador se infecta cuando ingiere las formas de resistencia del protozoo (ooquistes) esporuladas presentes en los alimentos, agua o el medio ambiente. Una vez en el interior del tracto gastrointestinal, la pared del ooquiste se rompe a través de una línea de sutura localizada en uno de sus polos, liberándose cuatro esporozoítos (Reduker *et al.*, 1985). La exposición a condiciones reductoras, enzimas pancreáticas y/o sales biliares en el intestino delgado favorece el desenquistamiento y la liberación de los esporozoítos (Spano y Crisanti, 2000; Tzipori y Ward, 2002). Sin embargo, en condiciones experimentales se ha demostrado que, al contrario que otros Eimeriidae, los ooquistes pueden desenquistarse espontáneamente en soluciones acuosas tibias, lo que explicaría la capacidad de *Cryptosporidium* para invadir otros tejidos extraintestinales, como la conjuntiva ocular, el tracto respiratorio (Fayer *et al.*,

1990), vesícula biliar, hígado, páncreas, linfonódulos, testículos, ovarios, útero y vagina (Fleta *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 2002).

Tabla 2.1. Especies de *Cryptosporidium* aceptadas actualmente como válidas, tamaño medio de ooquiste y hospedadores.

Especie	Tamaño medio ooquiste (µm)	Hospedador	Referencias
<i>C. andersoni</i>	7,4 x 5,5	Vacuno	Lindsay <i>et al.</i> 2000
<i>C. baileyi</i>	6,2 x 4,6	Gallinas y otras aves	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>C. bovis</i>	4,9 x 4,6	Vacuno	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>C. canis</i>	5,0 x 4,7	Perro	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. cuniculus</i>	5,6 x 5,4	Conejos y humanos	Robinson <i>et al.</i> , 2010
<i>C. erinacei</i>	4,9 x 4,4	Erizos	Kváč <i>et al.</i> , 2014
<i>C. fayeri</i>	4,9 x 4,3	Marsupiales	Ryan <i>et al.</i> , 2008
<i>C. felis</i>	4,6 x 4,0	Gato	Iseki, 1979
<i>C. fragile</i>	6,2 x 5,5	Sapo	Jirků <i>et al.</i> , 2008
<i>C. galli</i>	8,3 x 6,3	Gallinas	Ryan <i>et al.</i> , 2003
<i>C. hominis</i>	4,9 x 5,2	Humanos	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>C. macropodum</i>	5,4 x 4,9	Canguro	Power y Ryan, 2008
<i>C. meleagridis</i>	5,2 x 4,6	Aves, mamíferos	Slavin, 1955
<i>C. molnari</i>	4,7 x 4,5	Besugo	Álvarez-Pellitero y Sitja-Bobadilla, 2002
<i>C. muris</i>	7,0 x 5,0	Roedores	Tyzzzer, 1907
<i>C. parvum</i>	5,0 x 4,5	Humanos, mamíferos	Tyzzzer, 1912
<i>C. ryanae</i>	3,7 x 3,2	Vacuno	Fayer <i>et al.</i> , 2008
<i>C. scophthalmi</i>	4,4 x 3,9	Rodaballo	Álvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004
<i>C. scrofarum</i>	5,2 x 4,8	Suidos	Kváč <i>et al.</i> , 2013
<i>C. serpentis</i>	6,2 x 5,3	Reptiles	Levine, 1980
<i>C. suis</i>	4,6 x 4,2	Suidos	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>C. tyzzzeri</i>	4,6 x 4,2	Ratón	Ren <i>et al.</i> , 2012
<i>C. ubiquitum</i>	5,0 x 4,7	Mamíferos	Fayer <i>et al.</i> , 2010b
<i>C. viatorum</i>	5,4 x 4,7	Humanos	Elwin <i>et al.</i> , 2012
<i>C. varanii</i>	4,8 x 4,7	Reptiles	Koudela y Modry, 1998
<i>C. wrairi</i>	5,4 x 4,6	Cobaya	Vetterling <i>et al.</i> , 1971
<i>C. xiaoi</i>	3,9 x 3,4	Ovino	Fayer y Santín, 2009

Una vez liberados, los esporozoítos móviles alcanzan el borde luminal de los enterocitos (Figura 2.1), invadiéndolos de forma activa tras unirse a receptores específicos situados en la superficie de las células (Wetzel *et al.*, 2005). Posteriormente, el parásito queda contenido en el interior de la denominada vacuola parasitófora. Mediante microscopía electrónica se ha observado que este protozoo se desarrolla en el interior de la célula hospedadora, aunque en un extremo del citoplasma y separado de éste por la membrana de una organela de alimentación o fijación (Barta y Thompson, 2006). La localización intracelular pero extracitoplasmática de la vacuola parasitófora es única entre los coccidios, y podría ser la responsable de la reducida eficacia que presentan los

fármacos que se han ensayado para el control de *Cryptosporidium* (De Graaf *et al.*, 1999a; Cacciò, 2012).

Al mismo tiempo que este proceso de internalización progresa, el esporozoíto adquiere una forma esférica, denominándose trofozoíto. El núcleo del trofozoíto se divide asexualmente (merogonia o esquizogonia), formando un meronte tipo I, que contiene ocho merozoítos de tipo I. Al romper la vacuola parasitófora, éstos se liberan a la luz intestinal e invaden otros enterocitos donde se repite el proceso de esquizogonia, pudiendo formar merontes de tipo I o de tipo II. El núcleo del meronte tipo II sufre dos divisiones y forma cuatro merozoítos tipo II, que invaden otras células hospedadoras para iniciar la fase de reproducción sexual. Así, se desarrollan macrogamontes (femeninos) y microgamontes (masculinos) (Fayer y Ungar, 1986). Tras adherirse y penetrar a través de la membrana de la célula hospedadora y de la membrana del macrogamonte, los microgametocitos liberados de los microgamontes fertilizan a los macrogamontes, que evolucionan a zigotos.

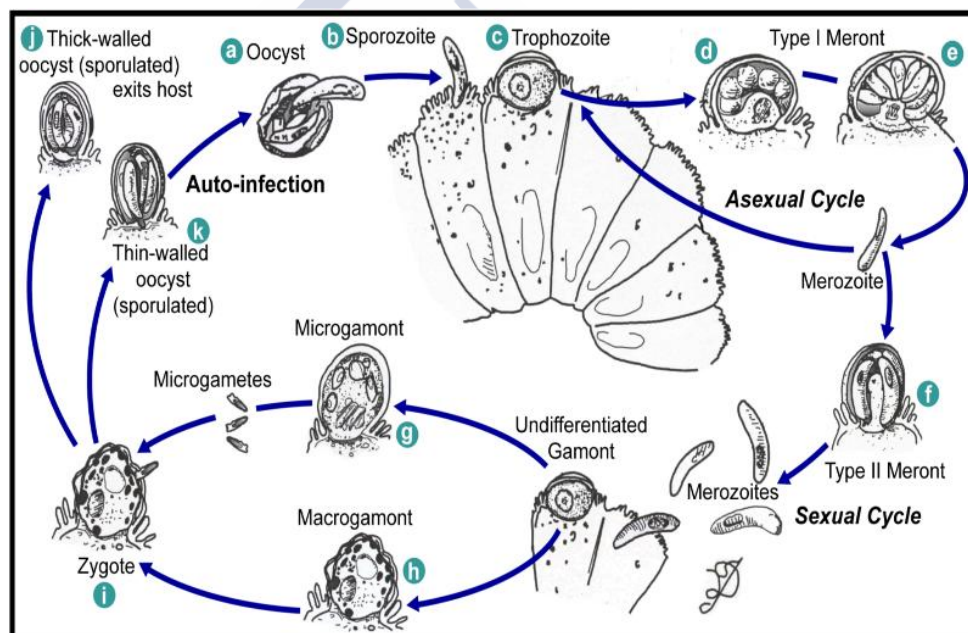


Figura 2.1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* (tomado de Juranek, 2000)

La mayoría de los macrogametos fertilizados se rodean de una pared trilaminar y forman el ooquiste que, por lo general, mide entre 4-6  $\mu\text{m}$  (Harris y Petry, 1999) y está esporulado, presentando cuatro esporozoítos. La mayoría de los ooquistes poseen una pared gruesa y son eliminados al medio con las heces, siendo ya infectantes (O'Donoghue, 1995; Barta y Thompson, 2006). Por el contrario, un pequeño porcentaje de ooquistes, cercano al 20%, desarrollan una única membrana que se rompe con facilidad en la luz intestinal liberando los esporozoítos, lo que facilita la autoinfección. Por lo tanto, en ausencia de una respuesta inmunitaria protectora, este protozoo puede mantenerse en un hospedador sin la necesidad de que éste ingiera nuevos ooquistes de pared gruesa (Current y Reese, 1986).

En varios estudios experimentales se determinó que el periodo de prepatencia para *Cryptosporidium parvum* oscila entre 4 y 22 días en el hombre (DuPont *et al.*, 1995) y entre 2 y 7 días en terneros (Tzipori *et al.*, 1983; Fayer *et al.*, 1998), aunque puede ser mayor dependiendo de la edad del animal y de la dosis infectante (Egyed *et al.*, 2003). Por otro lado, el periodo de patencia en *C. parvum* varía entre 1-13 días en terneros (Fayer *et al.*, 1998) y 1-20 días en el hombre.

## 2.2. EPIDEMIOLOGÍA

Aunque en la década de los setenta *Cryptosporidium* spp. se había identificado en un amplio rango de animales domésticos y en el hombre, era considerado como un patógeno oportunista de reducido impacto sobre la salud animal y pública. Sin embargo, a principios de los ochenta, se demostró que constituía una de las principales causas de brotes de diarrea en rumiantes domésticos, pudiendo provocar el proceso en ausencia de otros enteropatógenos (Tzipori *et al.*, 1980; Angus *et al.*, 1982; Ortega-Mora *et al.*, 1999).

Actualmente, *Cryptosporidium* spp. se reconoce mundialmente como uno de los enteropatógenos implicados frecuentemente en la aparición de procesos diarreicos en rumiantes junto a otros agentes bacterianos, víricos y parasitarios. Se ha demostrado que *Escherichia coli* enterotoxigénicos, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Clostridium* spp, Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* spp, *Eimeria* spp y *Giardia* spp pueden estar asociados a la aparición de brotes de infecciones en rumiantes, tanto de forma aislada como combinados, aunque también se han aislado en animales clínicamente sanos (Muñoz *et al.*, 1996; García *et al.*, 2000; Orden *et al.*, 2002; Oporto *et al.*, 2007; García Meniño, 2013).

Tradicionalmente se ha considerado a rotavirus como el enteropatógeno más prevalente en terneros con diarrea (De Graaf *et al.*, 1999a; De la Fuente *et al.*, 1999). Sin embargo, esta situación parece haber cambiado en las últimas décadas. Estudios recientes han identificado a *Cryptosporidium* como el agente aislado con mayor frecuencia en rumiantes neonatos con diarrea (Snodgrass *et al.* 1986; Martín-Gómez *et al.*, 1995a; Muñoz *et al.*, 1996; De la Fuente *et al.*, 1998; Joachim *et al.* 2003; Silverlås *et al.*, 2010; García Meniño, 2013). Esto puede deberse a un incremento en la incidencia de *Cryptosporidium* en los últimos años (De la Fuente *et al.*, 1999) junto con la reducción del número de casos de diarreas por rotavirus, reflejo de la eficacia de las vacunas frente a este virus que se comenzaron a comercializar para ganado vacuno a finales de la década de los ochenta (De Graaf *et al.*, 1999b).

### 2.2.1. Prevalencia de *Cryptosporidium* en rumiantes sin destetar en España

Diversos estudios realizados en España señalan que *Cryptosporidium* es un parásito muy prevalente en granjas de rumiantes domésticos, donde las prevalencias de infección en animales sin destetar alcanzan porcentajes muy elevados.

Tras la primera denuncia de criptosporidiosis en ganado vacuno en España (Juste *et al.*, 1987), diversos estudios han demostrado la presencia del parásito en un 40,0-66,7% de las granjas, mientras que los porcentajes de infección en terneros oscilan entre el 12,0% y el 58,5% (Matos-Fernández *et al.*, 1993; Castro-Hermida *et al.* 2002a, 2006). Estos porcentajes son más elevados en animales lactantes con diarrea (Tabla 2.2).

Rojo-Vázquez *et al.* (1985) describieron por primera vez en España un brote de criptosporidiosis en corderos con diarrea. Numerosos trabajos han destacado la notable importancia de esta infección en granjas de ganado ovino (46,7%-100%), así como en corderos sin destetar con diarrea (Tabla 2.2). En animales jóvenes muestreados al azar, independientemente de la presencia de signos diarreicos, las prevalencias oscilaron entre el 12,2% y el 59,0% (Clavel *et al.*, 1989; Pilar-Izquierdo *et al.*, 1993; Matos-Fernández *et al.*, 1993, 1994; Martín-Gómez *et al.*, 1995a, 1995b; Muñoz *et al.*, 1996; Causapé *et al.*, 2002).

Tabla 2.2. Prevalencias de infección por *Cryptosporidium* en rumiantes domésticos que presentaban diarrea neonatal en España

	Zona	Prevalencia	Autores
Terneros	Galicia	76%	García Meniño (2013)
	Aragón	64,7%	Quílez <i>et al.</i> (1996a)
	Norte de España	57,8%	Quílez <i>et al.</i> (2008a)
	Centro de España	52,3%	De la Fuente <i>et al.</i> (1998)
	León	35,7%	Martín-Gómez <i>et al.</i> (1995a)
Corderos	Aragón	79,4%	Causapé <i>et al.</i> (2002)
	León	70,8%	Martín-Gómez <i>et al.</i> (1995b)
	Castilla-León	44,8%	Muñoz <i>et al.</i> (1996)
	Castilla-León	40,2%	Pilar-Izquierdo <i>et al.</i> (1993)
Cabritos	Aragón	55,7%	Quílez <i>et al.</i> (2001)
	Castilla-León	41,7%	Muñoz <i>et al.</i> (1996)

Aunque *Cryptosporidium* se ha señalado como el enteropatógeno más común en cabritos con diarrea neonatal (Matos-Fernández *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1996), sin embargo, son escasos los estudios realizados sobre las prevalencias de infección halladas en ganado caprino explotado en España. A excepción del trabajo realizado por Matos-Fernández *et al.* (1994), que señala porcentajes de infección muy elevados (100% granjas y 70% individual), en el resto de los estudios, las prevalencias son mucho más bajas, oscilando entre el 11,0% y el 19,1% de los animales y el 35,5% de las granjas (Matos-

Fernández *et al.*, 1993; Martín-Gómez *et al.*, 1995b; Muñoz *et al.*, 1996; Sainz-Ceballos *et al.*, 2009). Por el contrario, en cabritos con diarrea, los porcentajes de infección fueron mucho más elevados (Tabla 2.2).

### 2.2.1. Factores que influyen en la presentación de la criptosporidiosis

#### Resistencia de los ooquistes

Los elevados porcentajes de infección hallados en los rumiantes domésticos se deben, en gran medida, a tres características de *Cryptosporidium* spp: su baja dosis infectante, la elevada excreción de formas de resistencia en las heces que puede incluso superar los 10 millones de ooquistes por gramo de heces (Fayer *et al.*, 1998; Nydam *et al.*, 2001) y su gran resistencia en el medio. Los ooquistes permanecen infectantes durante 2-6 meses a 4°C, pero sólo resisten 30 minutos a 65°C o 24 horas a -18°C, siendo muy sensibles a la desecación y a la congelación (Ortega-Mora *et al.*, 1999). Asimismo, son muy resistentes a la desinfección química (Quílez *et al.*, 2005); los ooquistes no se muestran afectados por la mayoría de los desinfectantes utilizados en laboratorios o de uso doméstico e industrial, como el hipoclorito sódico al 6% o el etanol al 70% (Weir *et al.*, 2002). Para reducir el poder infectante de los ooquistes de este protozoo, la mayoría de los desinfectantes deberían emplearse durante largos periodos de tiempo a una concentración muy elevada, lo que supondría riesgos de toxicidad, así como un elevado coste (Fayer *et al.*, 1997; Fayer, 2008). Además, la cloración del agua, a las dosis usuales, tiene escaso efecto pues los ooquistes resisten al ozono y a la cloración (Korich *et al.*, 1990; Fayer, 1995). Por el contrario, se ha comprobado que la formalina al 10%, así como los compuestos a base de peróxidos o de amonio eliminan o reducen de manera notable la capacidad infectante de los ooquistes (Pavlasek, 1984; Quílez *et al.*, 2005; Fayer, 2008).

#### Manejo e higiene de las explotaciones

En las explotaciones de rumiantes domésticos suele haber condiciones que favorecen el aumento de la presión de infección y, por lo tanto, de los porcentajes de infección por *Cryptosporidium*, generalmente asociado a una higiene deficiente de las instalaciones y/o un manejo incorrecto de los animales. Debido a que la vía oro-fecal es la principal forma de transmisión de este parásito, el origen más frecuente de infección para un rumiante recién nacido es la contaminación de su entorno por parte de otros animales jóvenes con diarrea ocasionada por *Cryptosporidium*. Por ello, mantener a los rumiantes neonatos en cubículos compartidos con otros animales jóvenes favorece la aparición de brotes de criptosporidiosis (Díaz *et al.*, 2010). Además, diversos estudios han señalado que los suelos fáciles de limpiar (cemento o emparillado), el uso diario de desinfectantes adecuados para la limpieza de las instalaciones y el mantenimiento de la zona de paridera en excelentes condiciones de limpieza, suponen un menor riesgo de adquirir criptosporidiosis (Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Causapé *et al.*, 2002). Por el contrario, la prevalencia de *Cryptosporidium* es superior en animales que se manejan en grupo y donde

el suelo es de tierra o paja (Díaz *et al.*, 2010). Aunque la mayoría de los estudios describen una relación positiva entre el riesgo de infección y el tamaño de la explotación que deriva de la mayor densidad de animales (Garber *et al.*, 1994; Quigley *et al.*, 1994; Mohammed *et al.*, 1999; Causapé *et al.*, 2002), un estudio llevado a cabo en Galicia señaló lo contrario debido a que, en esta zona, los alojamientos y la higiene suelen ser mejores en las explotaciones grandes que en las pequeñas (Castro-Hermida *et al.*, 2002a). La estación también influye en el riesgo de infección por este parásito; en las explotaciones tradicionales de ovino y caprino, la criptosporidiosis se presenta con mayor frecuencia en invierno-primavera, lo que en líneas generales coincide con la época de paridera, donde el elevado número de nacimientos favorece el hacinamiento y el aumento de la presión de infección.

#### Ingesta de calostro

Se ha comprobado que los anticuerpos calostrales no tienen un efecto protector frente a la infección en rumiantes neonatos, aunque reducen la gravedad de los síntomas e incrementan la resistencia de los animales a otros patógenos entéricos. Además, no parece existir ninguna relación entre la presentación clínica de la criptosporidiosis y la alimentación natural o artificial. Sin embargo se observa una mayor mortalidad cuando la alimentación es insuficiente o incorrecta, dado que los animales enfermos requieren mayor cantidad de energía que los sanos para mantener su temperatura corporal.

#### Edad e inmunidad

Aunque en la especie humana el estado inmunitario influye notablemente sobre la evolución de la enfermedad, en los rumiantes domésticos su importancia es difícil de separar de otros factores, como la edad. Se ha comprobado que los animales neonatos son más receptivos a la infección por este protozoo; por ello, los porcentajes de infección más elevados, que muchas veces superan el 50%, se observan en los animales de 1 a 3 semanas de edad, que adquirieron la infección poco después de nacer (Ortega-Mora y Wrigh, 1994; Quílez *et al.*, 1996a; De la Fuente *et al.*, 1999; Causapé *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2002b, 2006; Santín *et al.*, 2004; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2006b). Esta receptividad disminuye con la edad, lo que se traduce en valores de prevalencia mucho más reducidos en los animales adultos, generalmente inferiores al 10% (Causapé *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2005, 2007).

La aplicación de técnicas de biología molecular ha revelado que, en ganado vacuno, la edad está relacionada con la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium*, de manera que los terneros menores de 8 semanas están más predispuestos a la infección por *C. parvum*, responsables en gran medida de la aparición de importantes brotes de diarrea neonatal (Quílez *et al.*, 2008a; Santín *et al.*, 2008). Los animales de más edad parecen estar parasitados por especies más adaptadas al ganado vacuno y menos patógenas que *C. parvum*, por lo que la presencia de sintomatología clínica relacionada con el protozoo no es frecuente en estos animales. En bovinos de 2 a 11 meses, predominan *C. bovis* y *C. ryanae*,

mientras que *C. andersoni* es la especie más importante en vacas de más de 1 año (Fayer *et al.*, 2006, 2007; Santín *et al.*, 2008); estos resultados sugieren que los novillos y animales adultos no poseen gran importancia como reservorios de la infección para los terneros más jóvenes. Por el contrario, los estudios moleculares realizados en ganado ovino y caprino todavía no han permitido determinar una asociación entre la edad de los animales y la presencia de las diferentes especies de *Cryptosporidium*.

### 2.3. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS EN RUMIANTES DOMÉSTICOS

La mayoría de las especies del género *Cryptosporidium* invaden células epiteliales del tracto digestivo, sobre todo del intestino delgado (Tzipori *et al.*, 1983; Heine *et al.*, 1984); el final del yeyuno y en el íleon son las localizaciones más comunes (Heine *et al.*, 1984). El intestino grueso, por el contrario, no se muestra afectado por este protozoo (Tzipori *et al.*, 1983). Sin embargo, otras especies como *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium muris* o *Cryptosporidium serpentis*, parasitan células de las glándulas gástricas (Fayer, 2008).

En otros animales se han identificado especies/genotipos de *Cryptosporidium* que no infectan células del aparato digestivo; *C. baileyi* se ha observado en diversos tejidos del aparato respiratorio de las aves, como los senos paranasales y la tráquea (Current *et al.*, 1986). Del mismo modo, una especie de *Cryptosporidium* todavía no identificada se ha detectado en la superficie de las células epiteliales de los uréteres y de los túbulos colectores del riñón, siendo la responsable de la criptosporidiosis renal de las aves (Gardiner y Imes, 1984; Randall, 1986; Nakamura y Abe, 1988; Trampel *et al.*, 2000).

El desarrollo de las diversas fases del protozoo en la parte apical de los enterocitos provoca la destrucción de los mismos, lo que se traduce en atrofia, fusión y disminución de la longitud de las vellosidades intestinales, quedando la superficie de absorción muy disminuida (Howerth, 1981; Tzipori *et al.*, 1983; Heine *et al.*, 1984). En respuesta a la pérdida de células epiteliales, se produce una hiperplasia compensatoria de las células de las criptas intestinales; sin embargo estas nuevas células son relativamente indiferenciadas, con baja capacidad enzimática y de absorción (Tzipori, 1988). Estos factores provocan una deficiencia en el proceso de absorción (malabsorción), que origina la diarrea.

Al disminuir la capacidad enzimática de la mucosa intestinal, se reduce la capacidad de digestión (mala digestión). La actividad de la  $\beta$ -galactoperoxidasa o lactasa, presente en las microvellosidades de los enterocitos maduros, disminuye; de este modo la lactosa permanece en la luz intestinal, dando lugar a fermentaciones anormales y a productos oncóticamente activos que arrastran agua hacia el lumen, agravando la diarrea y causando deshidratación.

El proceso inflamatorio que provoca el parásito a nivel intestinal, caracterizado por un aumento de los linfocitos intraepiteliales totales y de los porcentajes de linfocitos T CD4+ y CD8+, produce una alteración de la permeabilidad celular, lo que también repercute sobre las funciones de absorción y digestión. Dentro de los mecanismos patógenos del protozoo también se discute la liberación por parte de *Cryptosporidium* de una toxina de acción semejante a la toxina del cólera, con un posible efecto secretor (Guarino *et al.*, 1994; Tzipori y Ward, 2002)

Los signos clínicos dependen sobre todo de la edad del hospedador y de su estado inmunitario, así como de la especie/genotipo del parásito y su virulencia, determinada genéticamente. *Cryptosporidium parvum* es la especie más patógena y frecuente en terneros, aunque la mayoría de las infecciones se producen en animales menores de 8 semanas de vida (Santín *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006, 2007; Langkjær *et al.*, 2007). Por el contrario, *C. bovis* y *C. ryanae* son especies más adaptadas al ganado vacuno, por lo que no causan sintomatología clínica, siendo más comunes en animales jóvenes destetados (Santín *et al.*, 2008). Estudios recientes en corderos y cabritos lactantes sugieren que *C. parvum* es la especie más prevalente en estos animales (Quílez *et al.*, 2008b; Yang *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Imre *et al.*, 2013), aunque otras especies intestinales, como *C. ubiquitum* o *C. xiaoi* también podrían jugar un papel importante en la aparición de brotes de diarrea neonatal (Wang *et al.*, 2010; Sweeny *et al.*, 2011). En todos los casos se ha señalado que la infección concomitante con otros enteropatógenos parece agravar el cuadro clínico (Santín, 2013), aunque es necesaria su demostración de forma experimental (Chalmers y Katzer, 2013).

Las infecciones por criptosporidios intestinales que afectan a rumiantes domésticos son más frecuentes en animales jóvenes, especialmente de 1 a 3 semanas de vida (Huetink *et al.*, 2001; Nydam *et al.*, 2001; Causapé *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Santín *et al.*, 2004; Misic *et al.*, 2006) y se caracterizan por la aparición de una diarrea profusa de color amarillento y consistencia acuosa que se presenta de forma aguda, asociada a una elevada excreción de ooquistes que puede superar los  $10^7$  ooquistes por gramo de heces (Snodgrass *et al.*, 1984; Koudela y Jiri, 1997; Ortega-Mora *et al.*, 1994; Tzipori *et al.*, 1982; Anderson, 1982; Angus *et al.*, 1982; Fayer *et al.*, 1998). Se ha demostrado que un solo ternero puede eliminar hasta  $10^{10}$  ooquistes en el curso de una infección (Nydam *et al.*, 2001; Fayer, 2004). En terneros se ha comprobado que la diarrea puede aparecer muy pronto, a los 3 días post-infección, con una media de aproximadamente 8 días (3-14 días), con un período de patencia de 12 días (Castro-Hermida *et al.*, 2002b). En pequeños rumiantes se ha observado que la diarrea puede durar sobre 3-5 días en los casos leves de la enfermedad, y 1-2 semanas en casos más graves. El periodo de prepatencia oscila entre 2 y 7 días en corderos (Tzipori y Campbell, 1981), mientras que en cabritos es de aproximadamente 4 días (Koudela y Jiri, 1997). De todos modos, este periodo puede aumentar con la disminución de la dosis infectante (Blewett *et al.*, 1993) o con el incremento de la edad del animal (Ortega-Mora *et al.*, 1994).

Otros signos clínicos que pueden mostrar los rumiantes con criptosporidiosis son depresión, debilidad, postración, anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso y fiebre (Howerth, 1981; Tzipori *et al.*, 1983). Si las condiciones medioambientales son adversas y el manejo de la explotación no es bueno, se pueden producir brotes con elevada mortalidad, asociada principalmente a la deshidratación. En la necropsia puede observarse atrofia de la grasa mesentérica e infartación de los ganglios regionales abdominales (Tzipori *et al.*, 1983). El intestino delgado presenta un cuadro de enteritis congestiva, con la mucosa hiperémica pero no hemorrágica. El contenido intestinal es, con frecuencia, amarillento, acuoso y con restos de leche sin digerir; también se pueden apreciar acúmulos de gas en ciego y colon (Sanford y Josephson, 1982; Heine *et al.*, 1984).

*C. andersoni* infecta las glándulas gástricas del abomaso (Anderson, 1987, 1990) y, aunque se ha identificado en terneros mayores de 4 semanas de vida, es más frecuente en ganado vacuno mayor de un año (Olson *et al.*, 1997; Santín *et al.*, 2004; Kváč *et al.*, 2006; Fayer *et al.*, 2007). Cursa de forma más crónica que *C. parvum* y los animales infectados no presentan diarrea, excretando un menor número de ooquistes en heces (Kváč y Vitovec, 2003). Desde el punto de vista histopatológico, se ha comprobado que la infección por *C. andersoni* causa hiperplasia, hipertrofia y metaplasia del epitelio glandular del abomaso (Kváč y Vitovec, 2003). En vacas lecheras, Esteban y Anderson (1995) observaron una eliminación continua de ooquistes de *C. andersoni* durante un año; aunque estos animales no mostraron signos clínicos de la infección, se comprobó que producían significativamente menos leche que las no infectadas.

#### 2.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Los signos clínicos que muestra un animal con criptosporidiosis son, por lo general, muy similares a los observados en otras gastroenteritis, tanto de origen infeccioso como debidas a otras causas. Por ello, aunque los datos epidemiológicos y la sintomatología clínica permitan sospechar de la infección por *Cryptosporidium*, se requiere técnicas de diagnóstico que confirmen su presencia. Teniendo en cuenta los porcentajes de infección anteriormente citados (ver capítulo 2.2.1), debería sospecharse de la presencia de *Cryptosporidium* en todos los casos de diarreas neonatales en rumiantes.

En un brote de diarrea neonatal en una granja de rumiantes, posee gran interés conseguir de forma rápida un correcto diagnóstico etiológico, lo que permitirá instaurar las medidas de tratamiento, control y prevención más adecuadas en cada caso. Se han descrito una gran variedad de métodos para la detección de *Cryptosporidium* spp., entre los que se incluyen técnicas microscópicas, inmunológicas y moleculares. Las primeras permiten identificar el parásito en tejidos o heces y son, por lo general, rápidas y baratas (Potters y Van Esbroeck, 2010). Las técnicas inmunológicas y moleculares son más complejas y

suponen un mayor coste aunque, generalmente, ofrecen mejores valores de sensibilidad y especificidad (Siddons *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1998).

### 2.4.1. Técnicas microscópicas

#### 2.4.1.1. Examen histológico

Hasta principios de la década de los 80, el diagnóstico etiológico de la criptosporidiosis se basaba en el estudio de cortes histológicos de muestras de tejido intestinal obtenidas mediante biopsia o necropsia, con objeto de localizar los estadios endógenos del parásito en el borde apical de los enterocitos. Actualmente la microscopía óptica y/o electrónica es útil en el estudio de los aspectos histopatológicos y cambios de la estructura celular asociados a la infección, aunque no se emplean en el diagnóstico rutinario de la enfermedad debido a su carácter invasivo, al coste humano y material y a su escasa sensibilidad.

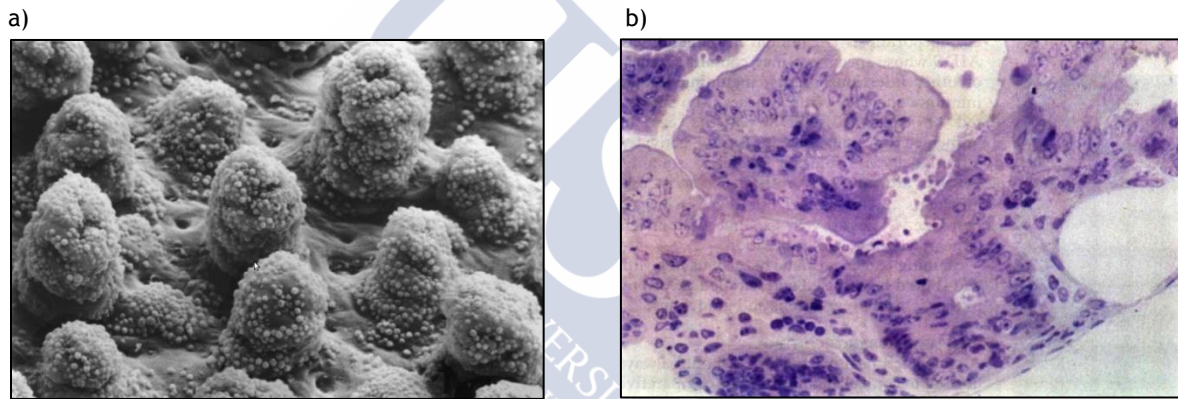


Figura 2.2. Fases endógenas de *Cryptosporidium* en la superficie del intestino delgado. a) microscopio electrónico de barrido (Vitovec y Koudela, 1988), b) microscopio óptico (Casemore, 1991).

En cualquier caso, las muestras tisulares que se examinen deben fijarse, tan pronto como sea posible, para evitar la autólisis de las células epiteliales. Al examinar microscópicamente cortes de intestino teñidos con hematoxilina/eosina, las fases evolutivas del parásito aparecen como pequeños cuerpos basófilos esféricos (de 2 a 5  $\mu\text{m}$ ) en el borde apical de la mucosa (Lamps, 2009), aunque por su tamaño pueden pasar inadvertidas. Sin embargo, para observar las características ultraestructurales y su localización dentro de la vacuola parasitófora es necesario recurrir al microscopio electrónico (O'Donoghue, 1995).

#### 2.4.1.2. Examen microscópico

Estos métodos se basan en la detección de las formas de resistencia del parásito en las heces del hospedador, constituyendo técnicas de elección al ser rápidas, baratas y poseer una buena sensibilidad. Las muestras de heces pueden observarse en fresco o bien conservarse en formol tamponado al 10% o en acetato sódico/ácido acético/formalina

(SAF) (Mtambo *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 1993). Además, la viabilidad de los ooquistes y su capacidad infectante puede preservarse con conservantes como el dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) al 2'5% o almacenados a 4°C. En aquellos casos donde se sospeche de otras infecciones parasitarias, se recomienda la toma de varias muestras fecales con y sin conservantes (García, 2007).

### Concentración de ooquistes

Como durante el curso de la infección aguda el animal elimina un número muy elevado de ooquistes, generalmente, no es preciso concentrar previamente las formas parasitarias, que se identifican directamente a partir de extensiones de heces; de todos modos, hay que considerar que la excreción de ooquistes puede variar a lo largo del período de patencia. Por el contrario, los animales con infecciones subclínicas eliminan un reducido número de ooquistes, por lo que podría ser necesario analizar más de una muestra de heces para confirmar un resultado negativo (Crawford y Vermund, 1988); en estos casos también podría emplearse material previamente concentrado con el fin de separar los ooquistes de los detritus fecales y aumentar la sensibilidad (García *et al.*, 1983).

Para concentrar los ooquistes del protozoo se pueden emplear métodos de flotación con soluciones de densidad variable como la de cloruro sódico saturado, sulfato magnésico, sulfato de zinc o sacarosa de Sheather. Estas técnicas permiten obtener muestras con un menor contenido de detritus fecales, aunque pueden perderse algunos ooquistes con baja densidad (Chalmers y Katzer, 2013). También se han utilizado técnicas de sedimentación difásica que se pueden realizar con formol-éter, formol-acetato de etilo y agua destilada-acetato de etilo (Current y García, 1991; O'Donoghue, 1995), que son especialmente útiles para procesar heces que presenten un elevado porcentaje de grasa. Algunos autores no aprecian diferencias significativas de sensibilidad entre los distintos métodos de concentración (Anderson, 1983; Villacorta, 1989); por el contrario, otros autores (Casemore *et al.*, 1985; Mtambo *et al.*, 1992; Fayer *et al.*, 2000) señalan que la flotación en sacarosa de Sheather y la sedimentación con formol-éter son más sensibles.

La separación inmunomagnética (immunomagnetic separation, IMS) es un método inmunológico de gran utilidad para recuperar ooquistes en muestras que presentan un reducido número de formas parasitarias, como paso previo al empleo de técnicas moleculares (Smith, 2008). Se basa en el empleo de perlas magnéticas cuya superficie se encuentra recubierta de anticuerpos monoclonales que reconocen determinadas proteínas de la pared del ooquiste del protozoo; de esta manera, las partículas magnéticas se unen a los ooquistes, que se pueden separar del resto de la muestra mediante la acción de un imán. Posteriormente, las partículas magnéticas pueden eliminarse mediante la adición de una solución ácida, obteniendo los ooquistes purificados (Campbell y Smith, 1997). Sin embargo, este método no se suele emplear en el laboratorio de forma rutinaria por ser una técnica laboriosa y cara.

### Técnicas de tinción de *Cryptosporidium* en extensiones de heces

Se han descrito numerosas técnicas para la identificación de ooquistes de este protozoo en las heces, con valores de sensibilidad muy diversos. Entre las más empleadas se encuentran la tinción con carbolfucsina o tinción negativa de Heine, la tinción Ziehl-Neelsen modificada y la tinción con auramina.

La **tinción negativa de Heine** (Heine, 1982) se basa en la utilización de fucsina básica fenicada que tiñe los detritus fecales, destacando los ooquistes refringentes no coloreados (Figura 2.3). Destaca por su rapidez, sencillez y bajo coste, por lo que se considera un buen método para realizar un cribado inicial, sobre todo en estudios epidemiológicos preliminares (Villacorta, 1989; García-Meniño, 2013). También muestra una buena concordancia con otras técnicas más sensibles. García-Meniño *et al.*, (2013) comprobaron que, en heces procedentes de terneros con diarrea, los resultados obtenidos con la técnica de Heine mostraban una buena concordancia con los observados con la tinción de auramina ( $\kappa= 0,707$ ) y ELISA directo ( $\kappa= 0,705$ ). Por el contrario, en muestras de animales sin diarrea, la concordancia era moderada.

La tinción negativa presenta también algunos inconvenientes: las preparaciones no son permanentes y deben examinarse en los primeros 15 minutos tras su realización, pues posteriormente los ooquistes son más difíciles de identificar (Heine, 1982; Potters y Van Esbroeck, 2010). Además, los ooquistes pueden confundirse con levaduras u otros artefactos presentes en la materia fecal. Con el fin de evitar estas confusiones se han descrito técnicas diferenciales que tiñen la pared y el contenido del parásito.

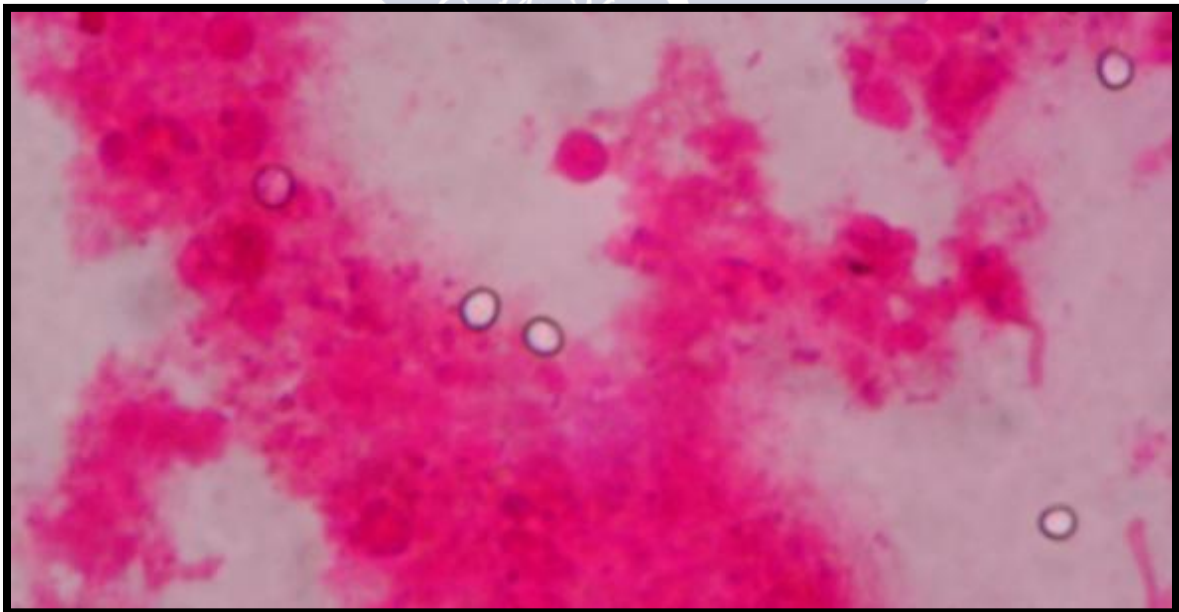


Figura 2.3. Tinción negativa de Heine. Los ooquistes, refringentes, quedan sin teñir.

Los métodos usados para teñir organismos ácido-alcohol resistentes comenzaron a utilizarse en la identificación de *Cryptosporidium* tras el descubrimiento de que la pared de los ooquistes del parásito resiste la decoloración con alcohol-ácido. La tinción **Ziehl-Neelsen** (Henriksen y Pohlenz, 1981) es una tinción permanente que permite detectar ooquistes del protozoo, que se observan de color rojo brillante sobre un fondo verde-azulado (Figura 2.4). Este método fue modificado posteriormente, convirtiéndose en la técnica más utilizada para la tinción de ooquistes en muestras de heces (Casemore, 1991), y hace unos años se consideraba como la técnica “gold-standard”.

Entre sus inconvenientes destaca su largo tiempo de ejecución, puesto que se tarda unos 30-45 minutos (Mtambo *et al.*, 1992; Chartier *et al.*, 2002). Diferenciar los ooquistes de *Cryptosporidium* de otros objetos esféricos de tamaño similar puede revestir cierta dificultad para una persona poco entrenada, sobre todo en muestras que presentan un reducido número de ooquistes (Smith, 2008). Se debe considerar que algunas levaduras y restos fecales pueden adquirir una coloración rojo pálido, pudiendo dar lugar a confusión. Además, cuando se sobrepasa el tiempo óptimo de decoloración, los ooquistes pueden aparecer poco teñidos, dando lugar al diagnóstico de falsos negativos; por ello algunos autores recomiendan utilizar tinciones que incorporan safranina, tales como la técnica de Köster modificada (safranina y potasa/verde malaquita) o la de Baxby (safranina/azul de metileno) que tiñe los ooquistes de un rosa anaranjado (Villacorta, 1989).

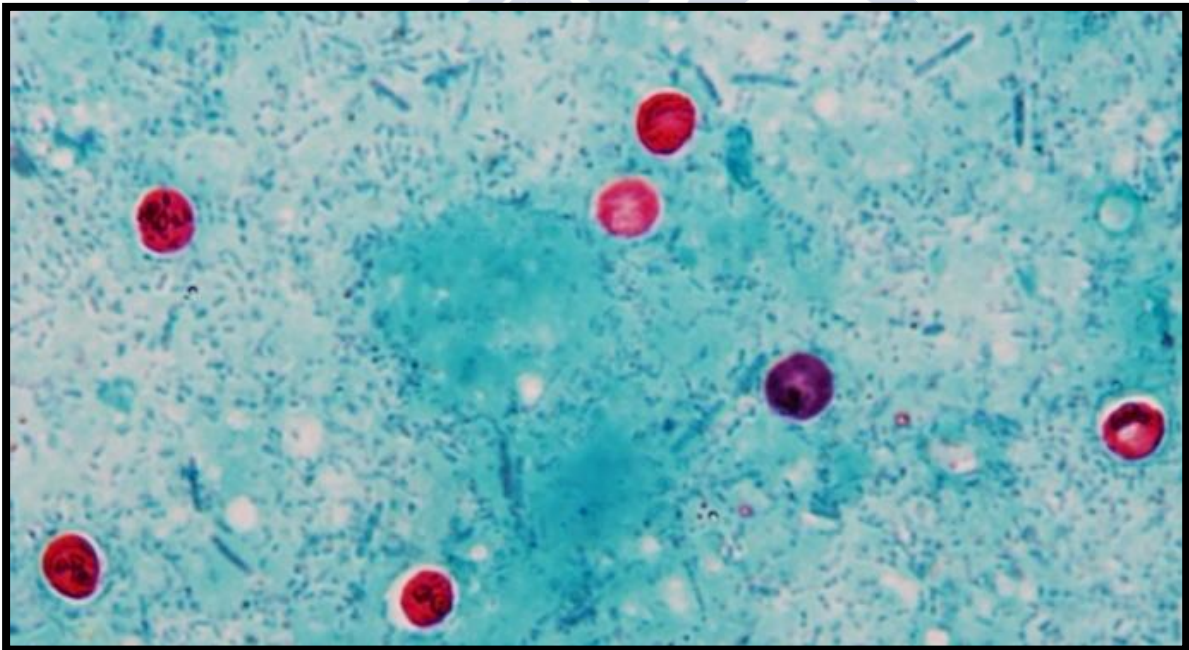


Figura 2.4. Tinción Ziehl-Neelsen modificada. Los ooquistes se observan de color rojo sobre el fondo verde-azulado.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del diagnóstico, se han descrito técnicas basadas en la captación de un fluorocromo por parte de *Cryptosporidium*; para ello se utiliza una solución fenólica de auramina, que tiñe tanto la pared externa del ooquiste como las

estructuras internas. Existen varias variantes, como la tinción con **auramina**/rodamina (García *et al.*, 1987), auramina/fucsina fenicada (Casemore *et al.*, 1985), naranja de acridina (García *et al.*, 1983), mepracina (Ungureanu y Dontu, 1992) o permanganato potásico (Fleck y Moody, 1988). Es una técnica relativamente fácil, rápida y barata; además, la identificación de los ooquistes es menos subjetiva y permite la observación de la muestra empleando un menor aumento (x 200); su mayor inconveniente reside en la necesidad de poseer un microscopio de fluorescencia (Chalmers y Katzer, 2013).

## 2.4.2. Técnicas inmunológicas

### 2.4.2.1. Técnicas inmunológicas directas

La búsqueda de métodos rápidos y con elevados valores de rendimiento diagnóstico ha favorecido el desarrollo de técnicas que, basándose en la reacción antígeno-anticuerpo, permiten identificar ooquistes tanto en heces (Sterling y Arrowood, 1986; Stibbs y Ongerth, 1986; García *et al.*, 1987; McLaughlin *et al.*, 1987; Arrowood y Sterling, 1989) como en muestras ambientales (Ongerth y Stibbs, 1987; Smith y Grimason, 2003). Con el fin de evitar las reacciones cruzadas, estas técnicas emplean anticuerpos monoclonales específicos frente a *Cryptosporidium* (Rusnak *et al.*, 1989; Anusz *et al.*, 1990; García *et al.*, 1992).

Las técnicas de **inmunofluorescencia** ofrecen valores de sensibilidad y especificidad superiores a los métodos de tinción convencionales, sobre todo en muestras que presentan pocos ooquistes y muchos detritus fecales (Crawford y Vermund, 1988; Arrowood y Sterling, 1989; Grigoriev *et al.*, 1994; Clavel *et al.*, 1996; Quílez *et al.*, 1996b). Existen varios kits comerciales disponibles en el mercado; cada uno de ellos utiliza un determinado anticuerpo monoclonal que reconoce ciertos antígenos de la superficie del ooquiste (Smith y Ronald, 2001). Por ello, la intensidad de la fluorescencia puede variar dependiendo del anticuerpo monoclonal del kit comercial que se emplee, así como del aislado de *Cryptosporidium* presente. La mayoría de los anticuerpos monoclonales se han desarrollado frente a epítomos presentes en ooquistes de *C. parvum*; como la expresión de un determinado epítomo puede variar dentro del género *Cryptosporidium*, es muy probable que los ooquistes de diferentes especies y genotipos, así como de determinados subtipos, puedan mostrar una fluorescencia menos intensa. Agnamey, *et al.* (2011) señalaron que *C. felis* no se detectaba bien con esta técnica, mientras que Graczyk *et al.* (1999) demostraron que con un kit comercial (Merifluor, Meridian Bioscience Inc., EE.UU.) los ooquistes de *C. varanii* mostraban una fluorescencia muy débil.

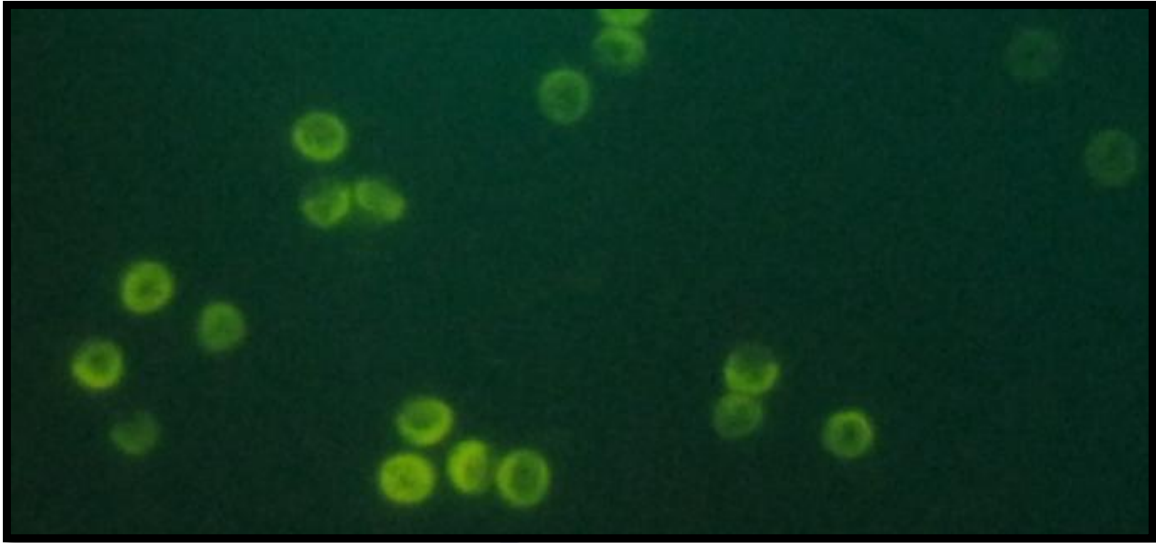


Figura 2.5. Inmunofluorescencia directa. Ooquistes teñidos con Crypto-cel ®

Posteriormente se han empleado técnicas **inmunoenzimáticas** con anticuerpos monoclonales que detectan coproantígenos (Anusz *et al.*, 1990; Robert *et al.*, 1990; Siddons *et al.*, 1992). Destacan dos tipos de métodos: el ELISA sándwich y la inmunocromatografía.

Durante la última década, el diagnóstico de la criptosporidiosis, sobre todo en humanos, se ha orientado a la utilización del ELISA directo, aunque este método no permite la identificación de las especies del protozoo (Chalmers y Katzer, 2013). En comparación con las técnicas microscópicas, la detección de coproantígenos mediante ELISA es más fácil de realizar y no requiere de técnicos experimentados para la realización de los análisis (Smith, 2008). Algunos autores han señalado que esta técnica posee una menor sensibilidad que las basadas en la inmunofluorescencia (Anusz *et al.*, 1990; You *et al.*, 1996), mientras que otros (Kehl *et al.*, 1995; Graczyk *et al.*, 1996) indican que la sensibilidad es similar con ambos métodos. Sin embargo, según Smith (2008) la especificidad del ELISA directo es muy elevada (98-100%).

La inmunocromatografía es una técnica muy sencilla, rápida y cualitativa, ya que las reacciones positivas se observan como una banda de color en una localización específica del kit. Este método se puede emplear para realizar análisis en el campo, lo que permite instaurar rápidamente las medidas de tratamiento y control más adecuadas. Como en el caso del ELISA, la especificidad es elevada y cercana al 100%. En comparación a las técnicas microscópicas, algunos autores han observado mejores cifras de sensibilidad (Chan *et al.*, 2000), mientras que otros autores (Johnston *et al.*, 2003; Weitzel *et al.* 2006) citan porcentajes más bajos. Chalmers y Katzer (2013) señalan que la sensibilidad de la inmunocromatografía es inferior a la del ELISA directo.

#### 2.4.2.1. Técnicas inmunológicas indirectas

Las técnicas de detección de anticuerpos en suero (ELISA, inmunofluorescencia indirecta, Western-blotting, etc.) pueden utilizarse como un método diagnóstico alternativo debido a que, en la mayoría de los individuos, la excreción de ooquistes y antígenos del protozoo en heces es intermitente. De este modo, estas técnicas son útiles para determinar la exposición a *Cryptosporidium* y detectar portadores asintomáticos que eliminan ooquistes de forma intermitente. Además, permiten identificar infecciones recientes, observándose una seroconversión que se manifiesta aproximadamente a las dos semanas post-infección (p.i.). Diversos autores (Tzipori y Campbell, 1981; Hill *et al.*, 1990) han señalado que, en corderos, la respuesta inmunitaria frente al protozoo se detecta a los 7-14 días p.i., mientras que en terneros los anticuerpos aparecen entre los 6 y los 21 días p.i. (Tzipori y Campbell, 1981; Williams y Burden, 1987; Harp *et al.*, 1990; Whitmire y Harp, 1991).

Sin embargo, estas técnicas no son adecuadas para diagnosticar infecciones activas, debido a que los anticuerpos específicos no aparecen hasta que la eliminación de ooquistes en heces ha finalizado (Koch *et al.*, 1985; Sterling y Arrowood, 1986; Casemore, 1987; Current y Snyder, 1988; Mead *et al.*, 1988; Hill, 1990). Otra de las limitaciones de estos métodos serológicos es su baja especificidad. La existencia de antígenos comunes entre *Cryptosporidium* y *Eimeria* da lugar a falsos positivos debido a la presencia de reacciones cruzadas (Ortega-Mora *et al.*, 1992; Lorenzo-Lorenzo *et al.*, 1993). Del mismo modo, la existencia de anticuerpos calostrales de origen materno en el recién nacido puede dificultar la detección de anticuerpos desarrollados por el propio individuo (Mann *et al.*, 1987; Ortega-Mora, 1993).

#### 2.4.3. Técnicas moleculares

Uno de los mayores problemas que tienen los investigadores que utilizan técnicas microscópicas radica en la ausencia de características morfológicas que diferencien los ooquistes de *Cryptosporidium*, por lo que es prácticamente imposible identificar correctamente las diferentes especies de este protozoo. Recientemente se han desarrollado numerosas técnicas basadas en la biología molecular que permiten detectar y diferenciar *Cryptosporidium* spp. hasta genotipo/especie y subgenotipo (Xiao y Ryan, 2004; Caccio, 2005; Xiao, 2010). Las técnicas moleculares poseen mayor sensibilidad y especificidad que las microscópicas y las serológicas (Figura 2.6), y se emplean cada vez con más frecuencia en estudios sobre criptosporidiosis, lo que ha supuesto un notable avance en campos como la taxonomía, epidemiología (presentación geográfica y estacional, factores de riesgo, etc) y en la transmisión del parásito tanto en humanos como en animales (Peng *et al.*, 1997; McLauchlin *et al.*, 2000; Plutzer, y Karanis; 2009; Xiao, 2010).

La mayoría de estas técnicas moleculares se basan en la amplificación de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Desde el primer ensayo

de PCR, para el diagnóstico de *Cryptosporidium* en muestras de heces (Laxer *et al.*, 1991), se han desarrollado diversas modificaciones de la técnica para detectar el parásito tanto en muestras procedentes de individuos infectados como del medio, incluyendo muestras de agua y alimentos (Egyed *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006). Para la detección y diferenciación de *Cryptosporidium* se han desarrollado distintas técnicas de amplificación de secuencias de ADN, destacando, entre otras, la PCR simple, semianidada y anidada, el análisis de polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD-PCR), la transcripción inversa (RT-PCR) y la PCR a tiempo real (qPCR); para realizar el genotipado y subtipado, posteriormente se realizan otros estudios, como el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de polimorfismo de conformaciones monocatenarias (SSCP) y secuenciación (Egyed *et al.*, 2003).

Sensibilidad	Especificidad	Experiencia	Rapidez	Coste
<ul style="list-style-type: none"> <li>• IFAT, PCR</li> <li>• TID, AP</li> <li>• IC, MT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IFAT, PCR</li> <li>• TID, AP</li> <li>• IC, MT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MT</li> <li>• IFAT, PCR, TID, AP</li> <li>• IC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IC, TID</li> <li>• IFAT, PCR, AP</li> <li>• MT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TID, IC</li> <li>• PCR</li> <li>• IFAT</li> <li>• MT</li> <li>• AP</li> </ul>

**Figura 2.6. Características de las diferentes técnicas de diagnóstico, clasificadas de mayor a menor.**  
 IFAT: inmunofluorescencia directa, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, TID: técnicas inmunoenzimáticas directas, AP: microscopía de fluorescencia, IC: inmunocromatografía, MT: microscopía de tinciones de heces.

Cabe destacar la importancia de la elección de los marcadores genéticos utilizados ya que definen la secuencia de ADN a amplificar (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3. Técnicas empleadas para la amplificación de los principales genes utilizados en el análisis genotípico y subtipo de *Cryptosporidium***

Diana de amplificación	Tipo de técnica	Aplicación
18S rDNA	PCR, PCR anidada, secuenciación, PCR-RFLP, qPCR, microarray	Genotipado
Hsp70	PCR, PCR anidada, secuenciación, PCR-RFLP, qPCR, microarray	Genotipado
COWP	PCR, PCR anidada, secuenciación, PCR-RFLP, microarray	Genotipado
Actina	PCR, PCR anidada, secuenciación	Genotipado
$\beta$ -Tubulina	PCR, PCR anidada, secuenciación, PCR-RFLP	Genotipado
gp60	PCR, PCR anidada, secuenciación	Subtipado
Microsatélites	PCR, PCR anidada, secuenciación, tipado por tamaño de fragmentos	Subtipado
Minisatélites	PCR, PCR anidada, secuenciación, tipado por tamaño de fragmentos	Subtipado
ARNd extracromosómico	Transcriptasa inversa, PCR, secuenciación, ensayo de movilidad heteroduplex	Subtipado

De esta manera, para la detección de especies se requiere el análisis de regiones alta o moderadamente conservadas como genes estructurales, constitutivos o que codifican para la subunidad ribosómica 18S (sSU rRNA). Por el contrario, para estudios de subtipado se requieren técnicas que sean más discriminatorias, basadas en el estudio de regiones con mayor variabilidad como microsatélites y/o minisatélites, y que permiten identificar aislados individuales o líneas clonales (Cacciò *et al.*, 2005).

Smith (2008) señaló que las técnicas y marcadores moleculares empleados para genotipar y subtipar muestras procedentes de humanos y de animales deberían utilizarse también en el estudio de muestras medioambientales, lo que sería particularmente útil en la búsqueda de la fuente de infección en brotes de criptosporidiosis.

#### 2.4.3.1. Análisis genotípico

Para alcanzar una correcta identificación de genotipo/especie es necesaria la aplicación de técnicas moleculares, la mayoría basadas en la amplificación por PCR de regiones alta o moderadamente conservadas, que faciliten el diseño de cebadores específicos para *Cryptosporidium*. Entre los genes de baja variabilidad más utilizados se encuentran aquellos que codifican para el gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (18S rRNA) (Xiao *et al.*, 1999a), la proteína de la pared del ooquiste (COWP) (Pedraza-Díaz *et al.*, 2001; Feltus *et al.*, 2006; Goncalves *et al.*, 2006; Nichols *et al.*, 2006; Soba *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2006), la proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP-70) o el gen que codifica la actina (Sulaiman *et al.*, 2000, 2002).

No obstante, se debe tener cuidado al elegir los cebadores, ya que las secuencias conservadas para *Cryptosporidium* spp pueden ser similares a las presentes en otros organismos eucariotas, lo que conduciría a una baja especificidad de la técnica (Awad-el-Kariem *et al.*, 1994; Leng *et al.*, 1996; Kimbell *et al.*, 1999).

Actualmente, la mayoría de los métodos para la detección y genotipado de *Cryptosporidium* en muestras procedentes de humanos, animales o del medio ambiente se basan en el gen SSU rRNA debido a la presencia de regiones semiconservadas intercaladas con otras hipervariables, y a que existen 5 copias del gen en el genoma del parásito. Xiao (2010) comprobó que en el 86% de todos los artículos que versaban sobre el análisis genotípico de *Cryptosporidium*, publicados entre 2007 y 2009, estudiaban el gen que codifica para la subunidad ribosómica 18S (SSU rRNA). En concreto, la mayoría de ellos empleaban una PCR-RFLP que amplifica un fragmento de este gen, de aproximadamente 830 pb, utilizando posteriormente las endonucleasas SspI y VspI para realizar el genotipado mediante el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (Xiao *et al.*, 1999a, 2001a). Aunque las técnicas moleculares que se basaban en el estudio de otros

genes fueron muy utilizadas hace unos años, actualmente su empleo para el genotipado de *Cryptosporidium* se ha reducido notablemente (Xiao, 2010).

Al contrario de las técnicas de PCR basadas en el estudio de otros genes, las que se basan en el gen de la SSU rRNA pueden detectar especies de *Cryptosporidium* genéticamente distantes de *C. parvum* y *C. hominis* pero que, a pesar de todo pueden infectar a humanos, tales como *C. canis*, *C. felis*, *C. muris* y *C. suis* (Jiang y Xiao 2003). Sin embargo, una de las desventajas del estudio molecular del gen de la SSU rRNA es la existencia de pequeñas diferencias entre las copias de este gen, lo cual puede provocar variaciones en la RFLP para ciertas especies o genotipos de *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 1999b; Gibbons-Matthews y Prescott, 2003).

Se debe tener en cuenta que todas las técnicas de PCR empleadas para la identificación de un amplio rango de especies/genotipos de *Cryptosporidium* detectan únicamente el genotipo dominante presente en la muestra. Esto es debido a la amplificación exponencial inherente a la PCR y a que es necesaria una gran cantidad de producto de la PCR para poder detectarla en un gel de agarosa. Las infecciones mixtas con varios genotipos de *Cryptosporidium* y las poblaciones minoritarias de especies o genotipos son difíciles de diagnosticar con estos métodos (Reed *et al.*, 2002). Por el contrario, aquellas técnicas que únicamente permiten identificar *C. hominis*, *C. parvum* y otras especies/genotipos relacionados con ellos no permiten detectar otros aislados divergentes (Smith, 2008). Por ello, los resultados de un estudio epidemiológico sobre *Cryptosporidium* realizado con técnicas moleculares pueden verse notablemente alterados dependiendo del tipo de herramienta molecular empleada.

Con objeto de obtener datos más precisos, Cacciò *et al.* (2005) señalan que el análisis genotípico debería llevarse a cabo en al menos dos locus; uno de ellos debería ser el SSU rRNA, y si fuera posible, el otro debería permitir tanto un análisis genotípico como subtípico.

#### 2.4.3.2. Análisis subtípico

Aunque los métodos moleculares se orientaron inicialmente hacia la diferenciación de especies de *Cryptosporidium*, posteriormente una segunda generación de técnicas, que utilizan regiones altamente polimórficas como dianas genéticas, ha permitido estudiar la variación intraespecie, sobre todo dentro de *C. parvum* y *C. hominis* (Xiao y Ryan, 2008). La identificación de varias de estas regiones ha sido posible gracias a la secuenciación completa del genoma de *C. parvum* y *C. hominis* (Abrahamsen *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Entre ellas cabe citar el gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (gp60) (Strong *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2001; Leav *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003b), los microsátélites y minisátélites (Aiello *et al.*, 1999; Caccio *et al.*, 2000, 2001; Feng *et al.*, 2000; Sulaiman *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2003a; Mallon *et al.*, 2003a; Widmer

*et al.*, 2004; Tanriverdi *et al.*, 2006; Tanriverdi y Widmer, 2006; Gatei *et al.*, 2007), ARN bicatenario (ARNds) (Xiao *et al.*, 2001b; Leoni *et al.*, 2003a, 2003b, 2006b) y espaciadores internos transcritos (ITS-2) del rRNA (Gasser *et al.*, 2003, 2004; Chalmers *et al.*, 2005; Schindler *et al.*, 2005). Estos marcadores ofrecen una buena discriminación a nivel intra-especie, permitiendo su empleo, tanto por separado como conjuntamente, para llevar a cabo investigaciones epidemiológicas (Cacciò *et al.*, 2005).

En la actualidad, la secuenciación del gen de la glicoproteína de 60 kDa (gp60, antiguamente denominado gp40 o gp15) es el método de subtipado utilizado con más frecuencia debido a la heterogeneidad de este gen y al importante papel que juega en la biología del parásito (Glberman *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003b, 2006b; Peng *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003; Chalmers *et al.*, 2005; Sulaiman *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2006; Bjorkman y Mattsson, 2006; Feltus *et al.*, 2006; Gatei *et al.*, 2007; Muthusamy *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007). Aunque este marcador se empleaba tradicionalmente en el subtipado de *C. hominis*, *C. parvum* y otras especies afines, estudios recientes han permitido caracterizar este gen en especies genéticamente distantes, como *C. ubiquitum* (Li *et al.*, 2014). A diferencia de otras regiones empleadas en el análisis subtípico y consideradas no funcionales, la glicoproteína de 60 kDa se localiza en la superficie de la región apical de las fases infectantes del parásito y, además, en las personas se relaciona con la neutralización de las respuestas inmunológicas (O'Connor *et al.*, 2007). Por ello, el subtipo gp60 podría aportar información acerca de la patogenicidad del aislado. En este sentido, un reciente estudio realizado en terneros en Suecia ha demostrado que, en muestras diarreicas, los subtipos de la familia IIa se aíslan con mayor frecuencia que los de la familia IId (Silverlås *et al.*, 2013).

El gen de la gp60 es similar a una secuencia microsatélite pues presenta repeticiones en tándem de los trinucleótidos TCA/TCG/TCT en el extremo 5' del gen, que codifican para la serina. Además de las variaciones en el número de repeticiones de estos trinucleótidos, existen importantes diferencias en las regiones no repetitivas del gen, que han permitido clasificar los diferentes subtipos de *C. parvum* y *C. hominis* dentro de familias alélicas (Sulaiman *et al.*, 2005). Si se conoce la familia subtípica presente es posible identificar ciertas características biológicas del parásito y relacionarlas con las presentaciones clínicas (Cama *et al.*, 2007). Algunas de las familias alélicas más frecuentes se recogen en la Tabla 2.4.

La nomenclatura de los subtipos de *C. hominis* y *C. parvum* obtenidos mediante el estudio del gen gp60 se compone, en primer lugar, de la familia alélica. Las de *C. hominis* se designan Ia, Ib, Ic, Id, etc., mientras que las de *C. parvum* son IIa, IIb, IIc, IId, etc. A continuación se añade el número de repeticiones de cada uno de los trinucleótidos de la secuencia repetitiva (Sulaiman *et al.*, 2005). El número de repeticiones de TCA se representan por la letra A, el de TCG por la letra G y el de TCT por la letra T. Dentro de la

familia IIa, algunos aislados presentan la secuencia ACATCA a continuación de las repeticiones de nucleótidos, y se representa por R seguida del número de copias. De esta manera, el subtipo IIaA15G2R1 nos indica que el aislado pertenece a la familia alélica IIa de *C. parvum*, y su secuencia repetitiva tiene 15 repeticiones de TCA, dos repeticiones de TCG y 1 repetición de ACATCA en la región microsatélite del gen gp60. Además, dentro de la familia Ia de *C. hominis*, los subtipos pueden identificarse también por la presencia de una secuencia repetitiva de 13-15 pb, que se representa también por la letra R, próxima a la región microsatélite. Por el contrario, dentro de la familia IIc no existen variaciones en el número de repeticiones de trinucleótidos (todos son IIcA5G3), aunque presentan una secuencia polimórfica en el extremo 3' del gen. Los subtipos de esta familia se diferencian mediante las letras que se añaden final del nombre (IIcA5G3a, IIcA5G3b, etc.).

**Tabla 2.4. Principales familias de subtipos gp60 y secuencias representativas**

Especie	Familia subtípica	Repetición dominante	Otras repeticiones (R)	Nº Acceso GenBank
<b><i>C. hominis</i></b>				
	Ia	TCA	AA/GGACGGTGGTAAGG	AF164502 (IaA23R4)
	Ib	TCA, TCG, TCT	-	AY262031 (IbA10G2), DQ665688 (IbA9G3)
	Id	TCA, TCG	-	DQ665692 (IdA16)
	Ie	TCA, TCG, TCT	-	AY738184 (IeA11G3T3)
	If	TCA, TCG	-	AF440638 (IfA19G1)
	Ig	TCA	-	EF208067 (IgA24)
<b><i>C. parvum</i></b>				
	IIa	TCA, TCG	ACATCA	AY262034 (IIaA15G2R1), DQ192501 (IIaA15G2R2)
	IIb	TCA	-	AF402285 (IIbA14)
	IIc	TCA, TCG	-	AF164491 (IIcA5G3a), AF164501 (IIcA5G3b), EU095267 (IIcA5G3c), AF440636 (IIcA5G3d)
	IIId	TCA, TCG	-	AY738194 (IIIdA18G1)
	IIe	TCA, TCG	-	AY382675 (IIeA12G1)
	IIIf	TCA	-	AY738188 (IIIfA6)
	IIIg	TCA	-	AY873780 (IIIgA9)
	IIHh	TCA, TCG	-	AY873781 (IIHhA7G4)
	IIi	TCA	-	AY873782 (IIiA10)
	IIk	TCA	-	AB237137 (IIkA14)
	IIl	TCA	-	AM937006 (IIlA18)

Los análisis subtípicos basados en la gp60 han determinado la existencia de subtipos específicos de humanos y de animales, así como de otros que presentan potencial zoonótico, dentro de *C. parvum*. De esta manera, las familias IIa y IIId de *C. parvum* se han identificado tanto en hombres como en rumiantes, y son responsables de brotes zoonóticos de criptosporidiosis. En áreas donde los subtipos IIa y IIId están presentes, el primero suele afectar a ganado vacuno, mientras que el segundo es más común en pequeños rumiantes

(Quílez *et al.*, 2008a, b). Por el contrario, la familia IIC de *C. parvum*, hasta la fecha sólo se ha detectado en humanos (Alves *et al.*, 2003b; Xiao y Feng, 2008).

Tabla 2.5. Características de los marcadores empleados en el tipado multilocus de *C. hominis* y *C. parvum* (Robinson y Chalmers, 2012)

Marcador	Cromosoma	Gen relacionado, región, función	Secuencia repetitiva	Rango de tamaño de fragmentos (pb)
ML1	3	Proteína?	GAG	218-250
ML2	6	Gen MIC1	AG	175-237
5B12	2	Similar a la proteasa ubiquitin específica	AT	134-155 165-171
gp60	6	Glicoproteína 60 kDa	TC(A/G/T) y SNPs	800-850 273-456
hsp70	2	Proteína de shock térmico de 70 kDa	GG(C/T)GG(T/A)ATGCCA + SNPs	1030-1100 312-400
MS9-Mallon	5	Proteína?	TGGATC	303-534 110-248
TP14	8	Proteína?	CAA	234-342 179-241
MS5-Mallon	8	Proteína de baja complejidad	CCTCCCTCAGCTCCTCCG ACTGCA	181-502
MS12	3	Similar a proteína de unión a factor de crecimiento transformante beta	CCAACAACCACTTCTACAA CTGGAAAT	544-665
MM5	6	Proteína con MATH	TC(T/C)	260
MM18	8	Proteína de baja complejidad	(C/G)C(A/G)G(G/A)A	290
MM19	8	Large protein with 2 MYB domains plus low complexity	Repetición GA y Q en el extremo-C	299
MSA	1	helicasa con cromodominio de unión a ADN	CATTCTCAGGTTTAGGCT	100-252
MSB	1	Factor de transcripción E2F	CTATCT	165-345
MSC	2	No codificante	TGAGGAGTGAGAGGAGG AA	147-238
MSD	3	mRNA translation inhibitor SKI2 SFII helicasa	N/S	275-295
MSE	4	Proteína de baja complejidad	TCAAGA	166-306
MSF	5	Péptido señal	TCCTTCCTGAGC	124-200
MSG	6	Proteína con péptido señal?	GTAGTAGTG	175-334
MSI	2	Proteína?	GCAGGA	168-240
MSK	3	Proteína con péptido señal?	AGGTGGAGGTGGACCAAC	124-232
1887	7	No codificante	GA	150-194
CP492	6	Péptido señal	CCA	227-251
cp47	6	Proteína de 47 kDa	TAA, TGA/TAG	350-522

Tabla 2.5. (Continuación)

Marcador	Cromosoma	Gen relacionado, región, función	Secuencia repetitiva	Rango de tamaño de fragmentos (pb)
cp56	6	Proteína transmembrana de 56 kDa	SNPs solo	660-785
dzhrgp	6	Glicoproteína rica en hidroxiprolina	Mini- and microsatellite N/S	C. parvum 496-499 C. hominis 574-610
msc6-7	6	Antígeno constituido por repeticiones de serina	TGATGATGAT(G)GAACC(T) + SNPs	455-564
Mucin1	6	Proteína parecida a la mucina	Minisatelite de 63 pb	650-900
rpgr	6	Regulador GTPasa retinitis pigmentosa?	GGAGATAAG(T)AAT(A)GAAGAT(G) e inserción/delección de AGAGGGGGATAAAAAAGA	358-391
Chrom3T	3	Proteína?	SNPs solo	480-680
MS1-Aiello	2	No codificante	AT, TA y AT	370
MS2	8	No codificante	AAT	124
MS3	6	Serina/treonina proteín kinasa	AAT	118
MS4	8	No codificante	A	202
MS5-Aiello	2	No codificante	AAT	127
MS6	8	No codificante	T	175
MS7	8	Trehalose-6-fosfato sintasa	TAG	163
MS8	8	No codificante	AT	154
MS9-Aiello	6	No codificante	T	149
1G09	6	No codificante	T	104
1F07	5	No codificante	TA	189
7E1C	3	No codificante	TA	79
9B10	4	No codificante	TTA	101
2G04	4	No codificante	TA	135
6B03	5	No codificante	TA	141
5D11	6	No codificante	T	128
CP193	8	Fosfatidilinositol glicano	TAA	105
12C07+	N/Se	N/Se	TA y A	197
4E12	5	No codificante	TA	141
9C09	2 y 7	No codificante	TA	140 y 138
6F11	1	No codificante	A	82
CP273	4	No codificante	TA	157
polyt	7	Proteína de politreonina	SNPs y delección de 3 pb	315-318
SSU	1, 2, 7 y 8	SSU rRNA	SNPs solo	~825
trap-c2	6	Proteína adhesiva relacionada con la trombospondina	SNP	

Los microsatélites (MS) y minisatélites (MN) (Tabla 2.5) se pueden hallar en el genoma de todos los seres eucariotas y son secuencias de ADN que consisten en la repetición en tándem de 1-5 o 10-100 pares de bases, respectivamente. Estos MS y MN presentan polimorfismos de tamaño que son consecuencia de errores que suceden durante

la replicación del ADN, lo que se traduce en la ganancia o pérdida de unidades de repetición. En consecuencia, los alelos para los locus MS y MN suelen presentar polimorfismos de tamaño. Además, los MS y MN también pueden presentar polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs), además de las variaciones en el número de repeticiones en tándem (Sulaiman *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2003; Gatei *et al.*, 2006, 2007).

Ambos polimorfismos (de longitud y de nucleótidos simples) los convierten en idóneos para realizar el análisis subtípico de varias especies de *Cryptosporidium* (Feng *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2003a; Mallon *et al.*, 2003a; Widmer *et al.*, 2004).

Entre los métodos utilizados para la detección de alelos en estos marcadores MS y MN, la secuenciación está considerada como el “*gold standard*”, y es la única técnica que permite detectar sustituciones de nucleótidos (Cacciò *et al.*, 2000, 2001; Huetink *et al.*, 2001; Chalmers *et al.*, 2005; Wielinga *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayoría de las técnicas para la investigación de polimorfismos de micro y minisatélites están basados en el análisis de la longitud de los fragmentos de los productos amplificados mediante electroforesis capilar (Enemark *et al.*, 2002; Mallon *et al.*, 2003a; Schinder *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2007; Leoni *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2008) y electroforesis en geles de poliacrilamida o geles comerciales de alta resolución (Feng *et al.*, 2000; Hourihan *et al.*, 2001; Oura *et al.*, 2003; Tanriverdi and Widmer, 2006; Tanriverdi *et al.*, 2006). Estas técnicas basadas en la electroforesis, y especialmente cuando se emplea un marcador que presenta repeticiones de menos de 3 pb, pueden generar problemas que impidan una medición precisa de los fragmentos y, por tanto, su correcta asignación a un alelo determinado (Robinson y Chalmers, 2012). Además, los MS basados en repeticiones de 1 o 2 nucleótidos tienen una mayor probabilidad de generar “bandas tartamudas”, que son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original, resultado del deslizamiento de la ADN polimerasa. La presencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e incluso, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis de la secuencia y de los fragmentos (Shinde *et al.*, 2003; Pasqualotto *et al.*, 2007).

También cabe destacar la ausencia de una nomenclatura estandarizada, sobre todo para el subtípado con MS y MN, que favorece la confusión e impide comparar los resultados entre laboratorios.

La secuenciación del genoma de *C. parvum* y *C. hominis* ha permitido identificar diferentes secuencias micro y minisatélite que han favorecido el desarrollo de la tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Gatei *et al.*, 2006, 2007, 2008). La MLST es una potente herramienta de subtípado de alta resolución, que se basa en la combinación de diferentes marcadores genéticos; estas técnicas permiten apreciar la diversidad genética existente en una población natural.

Se han empleado numerosos loci en la realización de estos estudios multilocus, pero debido a que no se ha adoptado ninguna combinación de marcadores genéticos de forma universal, actualmente la visión de la variabilidad genética *C. parvum* y *C. hominis* está notablemente fragmentada, dificultando la comparación de los resultados obtenidos en diferentes estudios y la realización de metaanálisis (Widmer y Sullivan, 2012). Es destacable que algunos marcadores, como el ML1 (Cacciò *et al.*, 2001), el MS9 (Mallon *et al.*, 2003a) y el gp15 (Strong *et al.*, 2000), se han utilizado en diversos estudios, mientras que la mayoría solo los ha empleado un único grupo de investigación.

Widmer y Sullivan (2012) señalaron que para conseguir nuevos avances en el estudio genético de las poblaciones de *Cryptosporidium* se debe utilizar un método universal que incluya una cuidadosa elección de los marcadores. De este modo, éstos deben localizarse en diferentes cromosomas, o que estén suficientemente distantes en el mismo cromosoma, para evitar el ligamiento. Además, recomiendan utilizar el menor número posible de loci pero que repercutan significativamente en un incremento de la resolución y que a la vez sean aseguibles.

## 2.5. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.5.1. Ganado bovino

Numerosos estudios demuestran que un elevado número de especies y genotipos de *Cryptosporidium* pueden afectar al ganado vacuno (Tabla 2.6), aunque *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* son las más frecuentes y con una distribución geográfica más amplia. La aplicación de una técnica de PCR-RFLP, empleando la endonucleasa *MboII* para digerir los fragmentos amplificados del gen del SSU rRNA, ha permitido diferenciar las tres especies intestinales del protozoo más comunes en ganado vacuno (*C. bovis*, *C. parvum* y *C. ryanae*), lo que ha facilitado considerablemente el estudio de la distribución de estas especies en bóvidos (Feng *et al.*, 2007).

En los últimos años, la aplicación de técnicas de biología molecular permiten establecer una relación entre la edad del animal y la presencia de diferentes especies de *Cryptosporidium* (Santín y Trout, 2008; Xiao, 2010). De esta manera, en bovinos tanto de aptitud lechera como cárnica, *C. parvum* es responsable de la gran mayoría de las infecciones por este protozoo en terneros sin destetar, especialmente en animales con diarrea; varios estudios han señalado que la presencia de esta especie está asociada de forma significativa con la aparición de brotes de diarrea neonatal en granjas de ganado vacuno (Kváč *et al.*, 2006; Santín *et al.*, 2008; Santín y Trout, 2008; Rieux *et al.*, 2014).

Por todo ello, los terneros sin destetar se consideran el reservorio más importante de *C. parvum* para el ser humano (Wang *et al.*, 2011). En este rango de edad también se han descrito otras especies como *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* que son menos prevalentes

y procedentes, por lo general, de animales sin diarrea (Feng *et al.*, 2007; Silverlås *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2014). En España, los resultados obtenidos en terneros menores de 21 días con diarrea, procedentes del norte del país, muestran que *C. parvum* fue la especie más frecuente (147/149), mientras que *C. bovis* sólo se identificó en dos muestras (Quílez *et al.*, 2008a). Por el contrario, otros autores señalan a *C. bovis* como la especie más frecuente en terneros sin destetar, sobre todo si no presentan diarrea (Feng *et al.*, 2007; Maikai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Rieux *et al.*, 2014).

Tabla 2.6. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* identificados en ganado vacuno

Especies	Frecuencia	Distribución	Referencias
<i>C. parvum</i>	Común	Mundial	Santín y Trout, 2008; Xiao, 2010
<i>C. bovis</i>	Común	Mundial	Santín y Trout, 2008; Xiao, 2010
<i>C. ryanae</i>	Común	Mundial	Santín y Trout, 2008; Xiao, 2010
<i>C. andersoni</i>	Común	Mundial	Santín y Trout, 2008; Xiao, 2010
<i>C. suis</i>	Esporádica	Bélgica, Dinamarca, EE.UU., Sri Lanka y Zambia	Enemark <i>et al.</i> , 2003; Fayer <i>et al.</i> , 2006; Geurden <i>et al.</i> , 2006; Abeywardena <i>et al.</i> , 2014
<i>C. hominis</i>	Esporádica	Escocia, China, Corea, Kenia	Smith <i>et al.</i> , 2005b; Park <i>et al.</i> , 2006; Chen y Huang, 2012; Kang'ethe <i>et al.</i> , 2012
<i>C. scrofarum</i>	Esporádica	Dinamarca	Langkjær <i>et al.</i> , 2007
<i>C. serpentis</i>	Esporádica	Irán, China	Azami <i>et al.</i> , 2007; Chen y Huang, 2012
<i>C. felis</i>	Esporádica	Polonia	Bornay-Llinares <i>et al.</i> , 1999
<i>C. canis</i>	Experimental	EE.UU.	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. meleagridis</i>	Esporádica	China	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>C. wrairi</i>	Esporádica	Irán	Chrisp <i>et al.</i> , 1992; Azami <i>et al.</i> , 2007
<i>C. baileyi</i>	Esporádica	Irán	Azami <i>et al.</i> , 2007
<i>C. ubiquitum</i>	Esporádica	Francia, Italia	Follet <i>et al.</i> , 2011; Di Piazza <i>et al.</i> , 2013
<i>C. tyzzeri</i>	Esporádica	China	Chen y Huang, 2012
<i>C. suis-like</i>	Esporádica	Dinamarca, India	Langkjær <i>et al.</i> , 2007; Khan <i>et al.</i> , 2010
<i>C. parvum-like</i>	Esporádica	Nueva Zelanda	Shrestha <i>et al.</i> (2014)

En terneros destetados y en novillas predominan *C. bovis* y *C. ryanae*, mientras que *C. andersoni* es la especie más prevalente en animales adultos (Santín *et al.*, 2004; Santín y Trout, 2008; Fayer *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2014). Estas especies tienen un rango de hospedadores más limitado y son menos patógenas que *C. parvum*, por lo que parecen estar más adaptadas al ganado vacuno (Lindsay *et al.*, 2000; Fayer *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2007). No obstante, *C. parvum* puede aparecer en un pequeño porcentaje de terneros destetados y novillas. Un reciente estudio longitudinal realizado en Francia demostró que un mismo animal puede infectarse de forma sucesiva con *C. parvum*, *C. ryanae* y *C. bovis* (Follet *et al.*, 2011). Sin embargo, en vacas de entre 3 y 13 años procedentes de Galicia, Castro-Hermida *et al.* (2007) únicamente encontraron *C. parvum*.

#### Subtipos de *C. parvum* en ganado vacuno

Tras secuenciar el genoma de *C. parvum* y *C. hominis*, los análisis subgenotípicos basados en la gp60 determinaron la existencia de subtipos específicos de humanos y de animales, así como de otros zoonóticos, dentro de la especie *C. parvum* (Cacciò *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2000; Strong *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001, 2003; Leav *et al.*, 2002;

Alves *et al.*, 2003b; Gasser *et al.*, 2003; Tanriverdi *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Xiao y Ryan, 2004). Los análisis subgenotípicos realizados en ganado vacuno se han centrado en el estudio de *C. parvum*, debido a que es la especie zoonótica identificada con mayor frecuencia en estos animales. La mayoría de estos estudios se basan en el análisis de secuencia del gen que codifica para la gp60; así, en bovinos, se han identificado varias familias alélicas y subtipos dentro de *C. parvum*. Los resultados de estos estudios han demostrado que los terneros se infectan principalmente con subtipos de *C. parvum* pertenecientes a la familia zoonótica Ila (Tabla 2.7) (Xiao, 2010). Dentro de esta familia, la mayoría de los trabajos señalan al IlaA15G2R1 como el subtipo dominante, presentando una distribución mundial. Otros subtipos están restringidos a regiones determinadas; así, el subtipo IlaA16G1R1 es el más común en el este de Europa (Hungría, Eslovenia, República Checa, Rumanía, Serbia y Montenegro) y en Estonia y Suecia (Plutzer y Karanis, 2007; Misic y Abe, 2007; Soba y Logar, 2008; Ondráčková *et al.*, 2009; Kváč *et al.*, 2011; Imre *et al.*, 2013; Silverlås, *et al.*, 2013; Lassen *et al.*, 2014), mientras que el IlaA18G3R1 lo es en Irlanda del Norte y Australia (Thompson *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2012; Abeywardena *et al.*, 2013). Estudios recientes revelan que en Nueva Zelanda predomina el subtipo IlaA19G4R1 (Shrestha *et al.*, 2014), mientras que en Argentina destacan el IlaA20G1R1 y el IlaA21G1R1 (Tomazic *et al.*, 2013; Del Coco *et al.*, 2014).

Tabla 2.7. Subtipos de *C. parvum* descritos en ganado vacuno

Familia	Subtipos
Ila	IlaA11G2R1
	IlaA12G2R1
	IlaA13G1R1, IlaA13G1R2, IlaA13G2R1, IlaA13G2R2, IlaA13
	IlaA14G1R1, IlaA14G2R1, IlaA14R1, IlaA14
	IlaA15G1R1, IlaA15G2R1, IlaA15G2R2
	IlaA16G1R1, IlaA16G2R1, IlaA16G3R1, IlaA16R1
	IlaA17G1R1, IlaA17G2R1, IlaA17G3R1, IlaA17R1
	IlaA18G1R1, IlaA18G2R1, IlaA18G3R1, IlaA18G4R1, IlaA18R1
	IlaA19G1R1, IlaA19G2R1, IlaA19G3R1, IlaA19G4R1
	IlaA20G1R1, IlaA20G2R1, IlaA20G3R1, IlaA20G4R1, IlaA20G5R1
	IlaA21G1R1, IlaA21G2R1, IlaA21G3R1, IlaA21R1
	IlaA22G1R1
	IlaA23G1R1
	Ild
III	

Diversos autores (Thompson *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007; Quílez *et al.*, 2008a) han señalado la presencia de varios subtipos en una misma granja, e incluso en un mismo animal. Hay que destacar que todos los subtipos gp60 descritos en Europa y Australia sólo presentan una copia de la secuencia ACATCA (R1); por el contrario, únicamente en Norteamérica, se han identificado algunos subtipos con dos copias de esta secuencia (Feltus *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007).

De forma ocasional, también se han identificado aislados pertenecientes a otras familias, como la IId, la IIj y la III. En vacuno de Europa (España, Portugal, Hungría, Alemania, Bélgica, Suecia, Serbia y Montenegro), Asia (China, Irán y Malasia) y África (Egipto) se han identificado varios subtipos pertenecientes a la familia IId (Alves *et al.*, 2003b, 2006a; Misisic y Abe, 2007; Plutzer y Karanis, 2007; Broglia *et al.*, 2008; Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008a; Amer *et al.*, 2010, 2013; Muhid *et al.*, 2011; Nazemalhosseini-Mojarad *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Helmy *et al.*, 2013; Silverlås *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). De igual modo, se han detectado subtipos de la familia III en terneros de Eslovenia, Lituania y Serbia y Montenegro, aunque restringidos a un pequeño número de aislados (Misisic y Abe, 2007; Soba y Logar, 2008; Wielinga *et al.*, 2008). La familia IIj únicamente se ha identificado en un aislado identificado procedente de un ternero en Irlanda del Norte (Thompson *et al.*, 2007).

En España, únicamente Quílez *et al.* (2008a) realizaron un estudio sobre la caracterización subgenotípica (gp60) de aislados de *Cryptosporidium* procedentes de terneros del norte del País, se observó la presencia de dos familias alélicas (IIa y IId), siendo el subtipo más frecuente el IIaA15G2R1 (75,7%) y, en menor proporción, se identificaron IIaA16G3R1 (10,0%), IIaA16G2R1 (2,8%), IIaA17G2R1 (2,8%), IIaA18G3R1 (5,7%), IIaA19G3R1 (1,4%) y IIdA23G1 (1,4%).

### 2.5.2. Pequeños rumiantes

El número de investigaciones que incluyen análisis genotípicos y subgenotípicos de *Cryptosporidium* en ganado ovino y caprino son escasos y, por lo general, limitados al estudio de un escaso número de aislados del protozoo.

En ovinos se han identificado numerosas especies y genotipos, que incluyen *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. ubiquitum*, *C. xiaoi* y el genotipo oveja I (Tabla 2.8). De todas ellas, destacan, por el número de aislados identificados, *C. xiaoi*, *C. ubiquitum* y *C. parvum*; las dos últimas poseen potencial zoonótico y se han identificado en humanos en todo el mundo.

Los estudios moleculares realizados sobre las especies de *Cryptosporidium* que afectan al ganado ovino, sugieren que su presencia varía según la procedencia geográfica de los animales.

Varias investigaciones, sobre todo realizadas en Europa, señalaron a *C. parvum* como la especie dominante en ovejas, especialmente en las jóvenes, (McLauchlin *et al.*, 2000; Majewska *et al.*, 2000; Pritchard *et al.*, 2007, 2008; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Paoletti *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Imre *et al.*, 2013). Por el contrario, otros autores observaron que la presencia de *C. parvum* en ganado ovino es baja, sugiriendo que estos animales no juegan un papel importante

como reservorios zoonóticos para el ser humano; estos estudios apreciaron que *C. xiaoi*, *C. ubiquitum* o *C. bovis*, más específicas de rumiantes, serían las especies predominantes (Ryan *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2007; Soltane *et al.*, 2007; Elwin y Chalmers, 2008; Geurden *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Sweeny *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013; Paz e Silva *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014).

Tabla 2.8. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* descritos en ganado ovino

Especies	Nº aislados	Distribución	Referencias
<i>C. parvum</i>	628	Mundial	Majewska <i>et al.</i> , 2000; McLauchlin <i>et al.</i> , 2000; Chalmers <i>et al.</i> , 2002; Goma <i>et al.</i> , 2007; Leoni <i>et al.</i> , 2007; Pritchard <i>et al.</i> , 2007, 2008; Santín <i>et al.</i> , 2007; Geurden <i>et al.</i> , 2008; Mueller-Doblies <i>et al.</i> , 2008; Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Paoletti <i>et al.</i> , 2009; Yang <i>et al.</i> , 2009; Smith <i>et al.</i> , 2010; Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2011; Sweeny <i>et al.</i> , 2011, 2012; Cacciò <i>et al.</i> , 2013; Connelly <i>et al.</i> , 2013; Imre <i>et al.</i> , 2013; Ye <i>et al.</i> , 2013; Koinari <i>et al.</i> , 2014; Paz e Silva <i>et al.</i> , 2014; Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>C. xiaoi</i>	835	Mundial	Ryan <i>et al.</i> , 2005; Navarro i Martínez <i>et al.</i> , 2007; Santín <i>et al.</i> , 2007; Soltane <i>et al.</i> , 2007; Mueller-Doblies <i>et al.</i> , 2008; Robertson <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2010; Sweeny <i>et al.</i> , 2011, 2012; Connelly <i>et al.</i> , 2013; Imre <i>et al.</i> , 2013; Ye <i>et al.</i> , 2013; Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>C. ubiquitum</i>	503	Mundial	Chalmers <i>et al.</i> , 2002; Ryan <i>et al.</i> , 2005; Santín <i>et al.</i> , 2007; Elwin y Chalmers, 2008; Geurden <i>et al.</i> , 2008; Mueller-Doblies <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2009; Robertson <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2010; Fiuza <i>et al.</i> , 2011; Shen <i>et al.</i> , 2011; Sweeny <i>et al.</i> , 2011, 2012; Connelly <i>et al.</i> , 2013; Imre <i>et al.</i> , 2013; Ye <i>et al.</i> , 2013; Paz e Silva <i>et al.</i> , 2014; Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>C. bovis</i>	68	Reino Unido, Australia	Elwin y Chalmers, 2008; Pritchard <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2009; Smith <i>et al.</i> , 2010
<i>C. hominis</i>	32	Australia, Reino Unido	Ryan <i>et al.</i> , 2005; Pritchard <i>et al.</i> , 2008; Giles <i>et al.</i> , 2009; Connelly <i>et al.</i> , 2013
<i>C. andersoni</i>	11	Australia, China	Ryan <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2010; Sweeny <i>et al.</i> , 2011; Koinari <i>et al.</i> , 2014; Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>C. scrofarum</i>	9	Australia, Papúa N. Guinea	Ryan <i>et al.</i> , 2005; Koinari <i>et al.</i> , 2014; Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>C. fayeri</i>	4	Australia	Ryan <i>et al.</i> , 2005;
<i>C. suis</i>	3	Australia, Zambia	Ryan <i>et al.</i> , 2005; Goma <i>et al.</i> , 2007
<b>Genotipo oveja I</b>	7	Australia	Ryan <i>et al.</i> , 2005; Sweeny <i>et al.</i> , 2011; Yang <i>et al.</i> , 2014

Sin embargo, se deben considerar los resultados de un reciente estudio llevado a cabo en Australia, que demostró que las técnicas basadas en la PCR del gen de la SSU rRNA no permiten identificar *C. parvum* en heces de corderos debido a que, en aquellas muestras que presentan poblaciones mixtas de *Cryptosporidium*, únicamente detectan la especie dominante (Yang *et al.*, 2009); en estos casos se recomienda emplear una PCR con

cebadores específicos para *C. parvum*. De este modo, el número de aislados de *C. parvum* identificados aumentó desde 2 a 63.

Los estudios moleculares realizados en pequeños rumiantes todavía no han permitido evidenciar una relación evidente entre la edad y la aparición de diferentes especies de *Cryptosporidium*, aunque diversos autores (Pritchard *et al.*, 2007, 2008; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Paoletti *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Imre *et al.*, 2013) han observado que *C. parvum* afecta preferentemente a corderos sin destetar, siendo la principal responsable de brotes de diarrea en granjas de ovejas. Por el contrario, un estudio longitudinal realizado en ovino de aptitud cárnica mostró que *C. xiaoi* era la especie más frecuente en los corderos desde las 2 semanas de vida hasta los 8 meses de edad. Por el contrario, *C. ubiquitum* fue más común en los animales más jóvenes; sin embargo, *C. parvum* se detectó durante todo el estudio y su prevalencia fue superior en los animales de mayor edad, aunque formando parte de infecciones mixtas con *C. xiaoi* (Sweeny *et al.*, 2011). En China, Wang *et al.* (2010) observaron que *C. ubiquitum* era la especie más frecuente y presente en todos los grupos de edad; mientras que, *C. xiaoi* y *C. andersoni* sólo se identificaron en corderos y en hembras adultas, respectivamente, pero en menor proporción. Asimismo, un estudio reciente sugiere que las madres pueden transmitir *C. xiaoi* a los corderos en el parto (Ye *et al.*, 2013).

En **ganado caprino** se han identificado también varias especies y genotipos del protozoo, que se resumen en la Tabla 2.9. De todas ellas, *C. parvum* parece ser la especie predominante en todos los rangos de edad y la que tiene una distribución geográfica más amplia, ya que se ha detectado en ganado caprino de Europa (Italia, España, Bélgica, República Checa, Holanda y Francia), Asia (India y Sri Lanka) y África (Zambia y Egipto).

Tabla 2.9. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* identificados en ganado caprino

Especies	Nº aislados	Distribución	Referencias
<i>C. parvum</i>	82	Mundial	Cacciò <i>et al.</i> , 2000; Noordeen <i>et al.</i> , 2002; Chalmers <i>et al.</i> , 2002; Hajdušek <i>et al.</i> , 2004; Ngouanesavanh <i>et al.</i> , 2006; Goma <i>et al.</i> , 2007; Geurden <i>et al.</i> , 2008; Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Drumo <i>et al.</i> , 2012; Maurya <i>et al.</i> , 2013; Rieux <i>et al.</i> , 2013; Koinari <i>et al.</i> , 2014
<i>C. xiaoi</i>	24	China, Francia, Papúa N. Guinea	Karanis <i>et al.</i> , 2007; Rieux <i>et al.</i> , 2013; Koinari <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>C. ubiquitum</i>	35	China, Francia	Paraud <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>C. hominis</i>	10	Corea del Sur, Reino Unido, Papúa N. Guinea	Park <i>et al.</i> , 2006; Giles <i>et al.</i> , 2009; Koinari <i>et al.</i> , 2014
<i>C. andersoni</i>	16	China	Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>Genotipo rata II</i>	1	Papúa N. Guinea	Koinari <i>et al.</i> , 2014

Las cabras también pueden presentar infecciones por otras especies como *C. ubiquitum*, *C. xiaoi* y *C. hominis* que tienen un rango de hospedadores más restringido, aunque el número de aislados que se han identificados es más reducido. De todos modos, las diferencias geográficas en la distribución de especies y genotipos de *Cryptosporidium* en ganado caprino conlleva notables complicaciones debido al escaso número de animales analizados, procedentes, en muchas ocasiones, de unas pocas granjas localizadas en una zona determinada (Wang *et al.*, 2014).

El estudio de la relación entre la edad y la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium* en cabras es difícil debido al reducido número de aislados identificados en estos animales. Wang *et al.* (2010), en una investigación realizada en China, observaron *C. ubiquitum* en todos los grupos de edad, mientras que *C. xiaoi* solo se identificó en cabritos y en hembras gestantes. En el mismo sentido, Rieux *et al.* (2013) apreciaron que la mayoría (18/19) de los cabritos sin destetar estudiados eliminaban ooquistes de *C. xiaoi*. Estos resultados sugieren una posible transmisión de *C. xiaoi* en el periparto, similar a lo observado en ganado ovino (Ye *et al.*, 2013).

#### Subtipos de *C. parvum* en pequeños rumiantes

En el ser humano y en ganado vacuno existen numerosos trabajos en los que se han realizado el análisis subgenotípico de aislados de *C. parvum*; sin embargo, estos estudios son escasos en los pequeños rumiantes. Hasta el momento se han identificado subtipos de las familias alélicas IIa y IId, con potencial zoonótico, tanto en ganado ovino como en caprino, aunque el número de aislados identificados pertenecientes a subtipos de la familia IId es muy superior a la de subtipos IIa (Tablas 2.10 y 2.11). Aunque ambas familias poseen potencial zoonótico, se debe considerar que la presencia de subtipos pertenecientes a la familia IIa es más común en las infecciones por *C. parvum* en humanos (Xiao, 2010).

Si bien es cierto que el número de estudios que únicamente han detectado subtipos pertenecientes a la familia IIa en pequeños rumiantes es amplio (Geurden *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Connelly *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Paz e Silva, 2014; Yang *et al.*, 2014), sin embargo, el número de aislados identificados fue reducido y siempre inferior a 11.

Dentro de la familia alélica IIa, el subtipo IIaA15G2R1 es el más frecuente en ganado ovino y caprino, mientras que en la IId, destaca el subtipo IIdA17G1 (Tablas 2.10 y 2.11). Los resultados de algunos estudios sugieren que, cuando en una zona en particular coexisten poblaciones de *C. parvum* pertenecientes a las familias IIa y IId, los subtipos IIa son más frecuentes en ganado vacuno y los IId en pequeños rumiantes. Así, el 98% de los aislados de *C. parvum* identificados en terneros del norte de España pertenecían a la familia IIa (IIaA15G2R1, IIaA16G3R1, IIaA16G2R1, IIaA17G2R1, IIaA18G3R1 y

IlaA19G3R1), mientras que únicamente 2 muestras se identificaron como IIdA23G1 (Quílez *et al.*, 2008a).

Tabla 2.10. Subtipos de *C. parvum* identificados en muestras de ganado ovino

Subtipo	Nº aislados	Lugar	Referencia
IlaA15G2R1	16	Bélgica, Brasil, China, España, Italia, Papúa N. Guinea, Reino Unido	Geurden <i>et al.</i> , 2008; Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Smith <i>et al.</i> , 2010; Cacciò <i>et al.</i> , 2013; Ye <i>et al.</i> , 2013; Koinari <i>et al.</i> , 2014; Paz e Silva, 2014; Yang <i>et al.</i> , 2014
IlaA16G1R1	1	Rumanía	Imre <i>et al.</i> , 2013
IlaA17G1R1	11	Reino Unido y Rumanía	Smith <i>et al.</i> , 2010; Imre <i>et al.</i> , 2013
IlaA17G2R1	1	Reino Unido	Smith <i>et al.</i> , 2010
IlaA18G3R1	1	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IlaA19G1R1	1	Escocia	Connelly <i>et al.</i> , 2013
IlaA19G4R1	1	Papúa N. Guinea	Koinari <i>et al.</i> , 2014
IlaA20G2R1	3	Italia	Cacciò <i>et al.</i> , 2013
<b>TOTAL Ila</b>	<b>35</b>		
IIdA14G1	2	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA15G1	3	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA17G1	70	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA18G1	38	China y España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Yang <i>et al.</i> , 2014
IIdA19G1	43	China y España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Yang <i>et al.</i> , 2014
IIdA20G1	1	Rumanía	Imre <i>et al.</i> , 2013
IIdA21G1	1	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA22G1	2	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA22G2R1	1	Rumanía	Imre <i>et al.</i> , 2013
IIdA24G1	3	España y Rumanía	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Imre <i>et al.</i> , 2013
<b>TOTAL IId</b>	<b>164</b>		

Por el contrario, en explotaciones de pequeños rumiantes de Aragón, Quílez *et al.* (2008a) apreciaron que la mayoría de los subtipos identificados en corderos (98%) pertenecían a la familia subgenotípica IId (IIdA17G1, IIdA19G1, IIdA18G1, IIdA14G1, IIdA15G1, IIdA21G1, IIdA22G1, IIdA24G1, IlaA15G2R1 y IlaA18G3R1).

Tabla 2.11. Subtipos gp60 de *C. parvum* identificados en muestras de ganado caprino

Subtipo	Nº aislados	Lugar	Referencia
IlaA15G2R1	4	Bélgica, Papúa N. Guinea,	Geurden <i>et al.</i> , 2008; Koinari <i>et al.</i> , 2014;
IlaA19G4R1	1	Papúa N. Guinea	Koinari <i>et al.</i> , 2014
<b>TOTAL Ila</b>	<b>5</b>		
IIdA17G1	8	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA19G1	4	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA22G1	8	Bélgica	Geurden <i>et al.</i> , 2008
IIdA25G1	2	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA26G1	3	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
<b>TOTAL IId</b>	<b>25</b>		

En cabras, todos los aislados se incluyeron en la familia IId (IIdA17G1, IIdA19G1, IIdA25G1, IIdA26G1).

## 2.6. ASPECTOS ZOONÓTICOS

La criptosporidiosis es una de las infecciones entéricas más frecuentes en humanos tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (Tzipori y Ward, 2002). Mientras que en los países en desarrollo el proceso suele ser endémico, en los desarrollados aparece en forma de brotes esporádicos y epidémicos; hay que destacar que, en los últimos 20 años, se ha incrementado de manera notable el número de brotes de criptosporidiosis en los países desarrollados (Craun *et al.*, 2005). La enfermedad se detecta sobre todo en niños y ancianos (Neill *et al.*, 1996; Jaggi *et al.*, 1994), así como en personas que han estado en contacto con niños o animales jóvenes, han usado aguas recreativas o consumido agua de baja calidad higiénica (Xiao y Ryan, 2008; Chalmers *et al.*, 2009). Es especialmente frecuente en personas inmunodeprimidas, donde el proceso es más grave y suele cursar de forma crónica, pudiendo llegar a ser fatal (Chalmers y Davies, 2010).

Los primeros casos de criptosporidiosis en humanos se describieron a mediados de la década de los 70: una niña de 3 años con enterocolitis (Nime *et al.*, 1976) y un paciente afectado por SIDA (Meisel *et al.*, 1976). A principios de la década de los 80, la enfermedad atrae el interés de la comunidad médica como consecuencia de la detección de numerosos casos de criptosporidiosis en enfermos de SIDA (Ma y Soave, 1983; Navin y Juranek, 1984; Pitlik *et al.*, 1983; Soave *et al.*, 1984). Su transmisión a través del agua de bebida ha provocado importantes brotes clínicos, puesto que *Cryptosporidium* puede ser resistente a diferentes métodos empleados en el tratamiento de aguas, causando un gran impacto sobre el sector del agua potable (Chalmers y Katzer, 2013). De este modo, en el año 1993 se describió en la ciudad de Milwaukee (EE.UU.) uno de los mayores brotes de criptosporidiosis, donde aproximadamente 403.000 personas (de un total de 1.610.000 habitantes) se infectaron a través del consumo de agua contaminada (MacKenzie *et al.*, 1994). En un principio se señaló al ganado vacuno como la fuente de contaminación del agua de bebida; posteriormente, sin embargo, las técnicas de genotipado identificaron a *C. hominis* como la especie predominante, sugiriendo la vía antroponótica como la más probable (Zhou *et al.*, 2003).

Al menos 15 de las 27 especies reconocidas de *Cryptosporidium* (*C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*), y 4 de los más de 40 genotipos (*C. hominis* genotipo mono, y los genotipos ardilla I, caballo, y mofeta) se han identificado en humanos, aunque algunos de ellos son hallazgos ocasionales (Chalmers y Katzer, 2013). De todas ellas, actualmente seis especies de este protozoo se consideran patógenas para el ser humano: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis* y *C. canis* (Chalmers y Katzer, 2013), aunque las tres últimas se han identificado de

manera ocasional; sin embargo, se debe destacar que la infección con especies y genotipos de *Cryptosporidium* poco comunes puede presentarse tanto en pacientes inmunodeprimidos como inmunocompetentes (Cama *et al.*, 2008)

*C. hominis* y *C. parvum* son las especies más frecuentes y las responsables de la mayoría de los casos de criptosporidiosis en humanos. Los resultados de recientes estudios moleculares concluyen que, aparte de denuncias ocasionales en ganado, la transmisión de *C. hominis* es fundamentalmente antroponótica (Chalmers y Katzer, 2013). De todos modos, estudios recientes sugieren la existencia de poblaciones de *C. parvum* específicas de humanos (Cacciò *et al.*, 2005). La importancia y distribución de cada una de estas especies depende de las condiciones geográficas. *C. hominis* es más prevalente (62%) en América, Australia y África, mientras que *C. parvum* es la responsable de un elevado número de casos en Europa (57%), especialmente en el Reino Unido (Cacciò *et al.*, 2005). Además, mientras que en áreas urbanas predominan los casos por *C. hominis*, las personas que viven en áreas rurales, sobre todo niños, tienen mayores tasas de infección por *C. parvum*, lo que guarda relación con un mayor contacto con animales (Essid *et al.*, 2008; Llorente *et al.*, 2007).

La vía de infección de *Cryptosporidium* es fundamentalmente fecal-oral y se produce tras la ingestión de ooquistes; ocasionalmente se han descrito casos de infección respiratoria por inhalación o aspiración (Shirley *et al.*, 2012). Aunque la mayor parte de los brotes de criptosporidiosis en humanos se han atribuido a la contaminación del agua de bebida o de aguas destinadas a usos recreativos (MacKenzie *et al.*, 1994; Baldursson y Karanis, 2011), los ooquistes también se han detectado en alimentos tales como verduras frescas (Monge *et al.*, 1996) o bivalvos (Freire-Santos *et al.*, 2000). También se han descrito casos de contagio entre personas (Artieda *et al.*, 2012) o por contacto con animales, tanto de compañía como de granja (Gormley *et al.*, 2011).

En personas inmunocompetentes el proceso es autolimitante y la infección cursa, en muchos casos, de forma asintomática. En el caso de aparecer, los signos clínicos pueden ser muy variables (desde leves a graves). Tras un periodo de incubación de 3-12 días (= 5-7 días), es característica la aparición de diarrea acuosa que puede durar de 6 a 14 días, aunque se han descrito casos de hasta 1 mes. Además, los pacientes pueden presentar fatiga, pérdida de apetito, vómitos, dolor abdominal y febrícula (MacKenzie *et al.*, 1994; Mathiu *et al.*, 2004; Bushen *et al.*, 2007). Hunter *et al.* (2004) señalaron que la aparición de dolor articular y ocular, jaquecas recurrentes, mareos y fatiga era mucho más frecuente en las infecciones por *C. hominis* que en las causadas por *C. parvum*.

Los pacientes inmunodeprimidos, como los enfermos de SIDA o las personas con cáncer o sometidas a trasplantes de órganos, son especialmente sensibles a la infección (Gentile *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 2007) y ésta puede ser fatal debido a la deshidratación provocada por la diarrea crónica (Caccio, 2005; Chen *et al.*, 2005). En algunos casos se ha

descrito la extensión de la infección hacia otros tramos intestinales o incluso hacia zonas extraintestinales, como los conductos biliares e hígado (Denkinger *et al.*, 2008; Wolska-Kusnierz *et al.*, 2007) o los pulmones (Meynard *et al.*, 1996; Kibbler *et al.*, 1987)

En adultos inmunocompetentes no se han descrito diferencias en la sintomatología derivada de las infecciones por *C. parvum*, *C. hominis* o *C. meleagridis* (Chappell *et al.*, 2011). Por el contrario, en niños y pacientes inmunodeprimidos se han observado importantes diferencias en las manifestaciones clínicas dependiendo de la especie y subtipo implicado de *Cryptosporidium*, siendo el proceso causado por *C. hominis*, y en especial con algunos subtipos, más grave que el ocasionado por *C. parvum* (Xiao, 2010).





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3.1. ESTUDIO 1. PRESENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Cryptosporidium* EN RUMIANTES DOMÉSTICOS DE GALICIA.**

Para la realización de este estudio, entre 2008 y 2013 se tomaron un total de 611 muestras fecales de rumiantes domésticos sin destetar que presentaban diarrea, pertenecientes a 250 rebaños localizados en la Comunidad gallega.

En este apartado se exponen las características generales de los animales y de las explotaciones. Además se describen las diferentes técnicas microscópicas y moleculares utilizadas para detectar la presencia de ooquistes de este protozoo y para identificar la especie/genotipo y subtipo de *Cryptosporidium*, respectivamente.

#### **3.1.1. Características generales de la zona de estudio**

Galicia es una importante área ganadera situada en el Noroeste de España (43° 47'–41° 49' de latitud Norte y 6° 42'–9° 18' de longitud Oeste). El ganado vacuno de aptitud lechera y cárnica son, por este orden, los principales activos del sector ganadero en Galicia, siendo Lugo y A Coruña las provincias con un mayor censo de bovinos. En el año 2012, nuestra Comunidad contaba con 940.762 cabezas de vacuno repartidas en 41.407 explotaciones (Xunta de Galicia, 2014).

Galicia es líder en la producción de leche de vacuno a nivel estatal, ya que en ella se localizan el 55% de las explotaciones, con unos efectivos que representan el 39% de la producción total nacional (MAGRAMA, 2011). La producción lechera en nuestra Comunidad ha aumentado en los últimos años, gracias al gran incremento de la producción por vaca y a que se ha aumentado el número de animales por explotación. En esta Comunidad, las granjas de mayor tamaño tienen modelo de producción intensivo, debido a la estructura de la propiedad de la tierra, poca superficie y muy dividida (Roca Fernández *et al.*, 2012). Otras explotaciones emplean sistemas semiextensivos con objeto de reducir los costes de producción e incrementar su rentabilidad económica, utilizando el pastoreo para aprovechar de modo eficaz las praderas.

El ganado vacuno de carne está representado fundamentalmente por razas autóctonas de Galicia (sobre todo Rubia gallega, junto con la Cachena, Caldelá, Frieiresa, Limiá y Vianesa) y de otras regiones (Asturiana de los Valles) y sus cruces. La mayoría de las explotaciones gallegas de ganado vacuno dedicadas a la producción cárnica se caracterizan por ser pequeñas empresas de carácter familiar que sirven de complemento a su economía. Aunque algunos rebaños de vacuno de carne se explotan en régimen extensivo (pastos de montaña) o intensivo (cebaderos), la mayoría se manejan en semiextensivo, donde los animales salen diariamente a los prados, aunque el tiempo de pastoreo depende fundamentalmente del tiempo atmosférico; en general, durante la primavera y el otoño las

vacas permanecen todo el día en los pastos, mientras que en invierno y verano se estabulan en las horas en las que las condiciones son adversas. La alimentación está constituida principalmente por pasto que se complementa con heno o ensilado en invierno o cuando la hierba escasea.

Otras especies de rumiantes domésticos, como el ganado ovino y caprino, están consiguiendo cada vez mayor relevancia en nuestra Comunidad, debido a que la rentabilidad de las explotaciones se está incrementando. Según datos de la Consellería de Medio Rural (Xunta de Galicia, 2014), en el año 2011, en Galicia había censadas 211.198 ovejas y 43.985 cabras, distribuidas en 23.210 granjas, de las cuales 3.028 eran granjas mixtas de ganado ovino y caprino. Únicamente el 1,7% de los rebaños estaba constituido por más de 100 animales, predominando las pequeñas explotaciones que representan, fundamentalmente, un complemento de la economía familiar. La gran mayoría de las granjas de ganado ovino y caprino de la provincia de Galicia están compuestas por cruces de razas aptitud cárnica, que se explotan generalmente en régimen semiextensivo. Tradicionalmente, estos rebaños estaban ligados a la cría de ganado vacuno, con el que podían compartir pastos e incluso establos; debido a la profesionalización del sector en nuestra Comunidad, esta situación es cada vez más infrecuente.

### **3.1.2. Localización de las explotaciones de rumiantes domésticos y obtención de las muestras**

Todas las muestras fecales procedieron de animales menores de 35 días que presentaban un cuadro diarreico. Las heces se tomaron de forma individualizada y directamente del recto de los animales. En los terneros se emplearon frascos estériles de plástico, mientras que para los corderos y cabritos se utilizaron hisopos sin medio, a los que se les añadió 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) con objeto de evitar la desecación de las muestras. Las heces se transportaron en refrigeración hasta el laboratorio, donde se conservaron a 4°C hasta su procesado.

En la Tabla 3.1 se recoge el número de explotaciones estudiadas, así como la provincia a la que pertenecen, y en la Figura 3.1 se señala su localización en la Comunidad gallega. Se debe señalar que algunas de las granjas analizadas presentaron varios brotes de diarreas neonatales a lo largo del periodo de estudio y se visitaron en más de una ocasión, aunque en ningún caso se recogieron heces de animales muestreados previamente. Así, para el ganado vacuno, se recogieron 322 muestras fecales procedentes de 190 explotaciones ubicadas en las cuatro provincias gallegas. En cada granja se tomaron muestras de 1 a 16 animales, siendo la media de 1,7 muestras/granja.

Respecto al ganado ovino y caprino, se muestrearon 37 explotaciones de ovino localizadas en todas las provincias de Galicia y 23 de caprino situadas en Lugo y Ourense; todos los rebaños eran de aptitud cárnica. En total se tomaron un total de 171 muestras de

heces de corderos (1-20 muestras por granja;  $\bar{X}$ = 5,0) y 118 de cabritos (1-27 muestras por granja;  $\bar{X}$  = 7,0).

Tabla 3.1. Número de granjas muestreadas al considerar la provincia a la que pertenecen

Especie animal	Provincias	Granjas	Municipios
Vacuno	A Coruña	4	3
	Lugo	122	23
	Ourense	2	3
	Pontevedra	62	3
	<b>TOTAL</b>	<b>190</b>	<b>32</b>
Ovino	A Coruña	9	6
	Lugo	13	10
	Ourense	10	7
	Pontevedra	5	4
	<b>TOTAL</b>	<b>37</b>	<b>27</b>
Caprino	Lugo	10	6
	Ourense	13	7
	<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>13</b>

Cuando se recogieron las muestras, se anotaron datos relativos a la explotación (código de explotación agraria, titular de la explotación, localización de la misma, tipo y orientación productiva y censo), así como la edad, en días, de los animales.

Para el estudio de la dinámica de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* se consideraron las semanas de vida de los animales, de modo que éstos se dividieron en 4 grupos: G1: <8 días, G2: 8-15 días, G3: 16-21 días, G4: >21 días. Esta división no se realizó para los corderos y los cabritos debido a que los datos no eran fiables ya que la mayoría de los ganaderos no conocían con exactitud la fecha de nacimiento de los animales puesto que, al realizarse la concentración de partos, en un período corto de tiempo se registra un elevado número de nacimientos.

### 3.1.3. Análisis parasitológicos

Este apartado se divide en 2: en el primero se resumen las técnicas microscópicas realizadas con objeto de evidenciar los ooquistes presentes en las heces de las tres especies de rumiantes estudiadas; en el segundo se señalan los procedimientos moleculares que permiten identificar la especie/genotipo de *Cryptosporidium*, así como el subtipo de *C. parvum*.

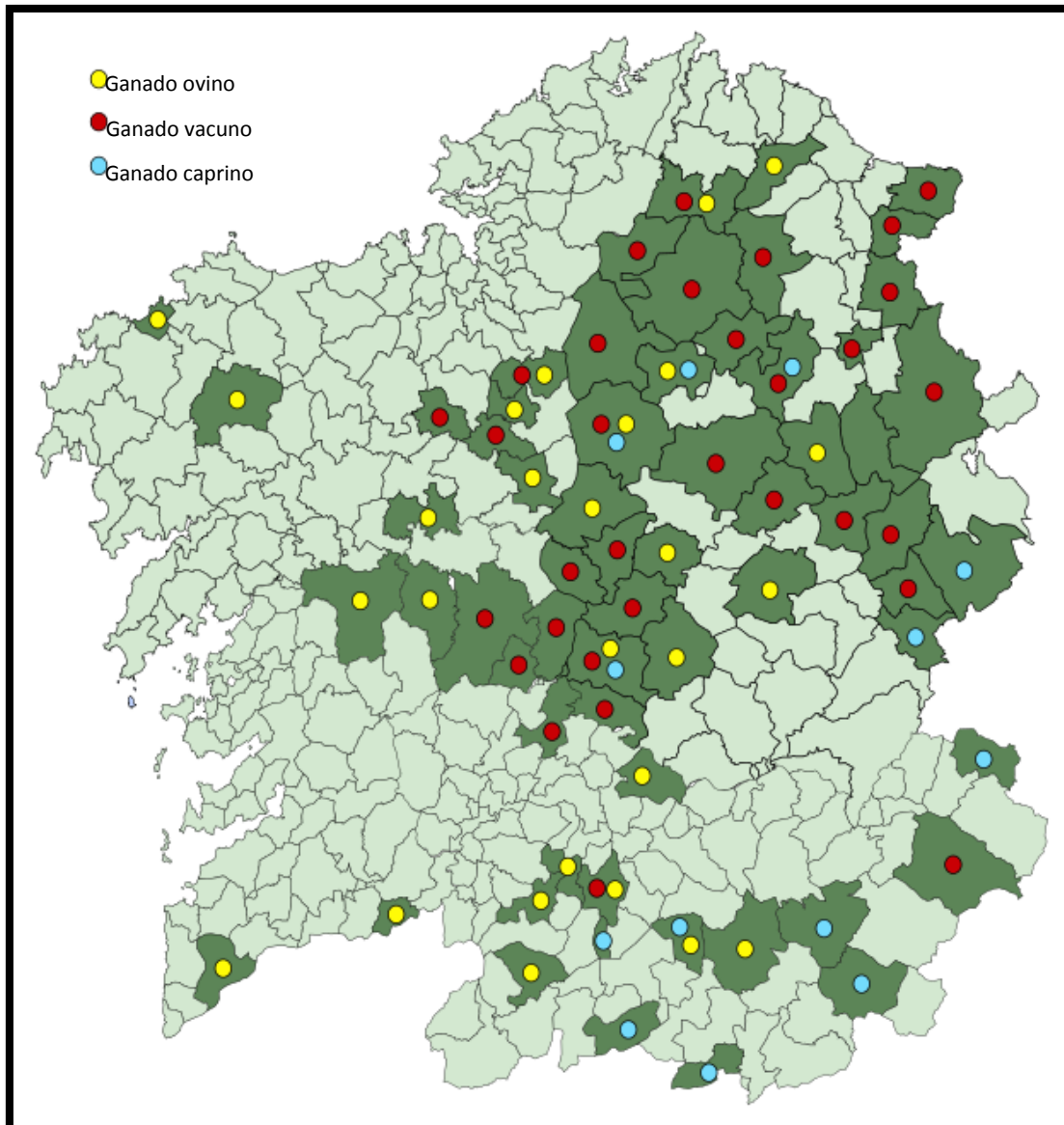


Figura 3.1. Municipios donde se recogieron las muestras de rumiantes domésticos empleadas en este estudio

#### 3.1.3.1. Técnicas microscópicas para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium*

Las muestras fecales de los rumiantes domésticos se analizaron utilizando tres técnicas microscópicas: tinción negativa de Heine (Heine, 1982), Ziehl-Neelsen modificado (Henriksen y Pohlenz, 1981) y tinción con auramina (Koneman *et al.*, 1997). Se empleó la tinción negativa de Heine como técnica de selección inicial, debido a su rapidez y bajo coste. Sin embargo, a causa de su baja sensibilidad, las muestras que resultaron negativas o dudosas al Heine, se volvieron a procesar mediante una de las otras dos técnicas.

Las heces de los terneros fueron, en general, de consistencia líquida, y se emplearon directamente en los análisis. Independientemente de la técnica microscópica utilizada, con el objetivo de 1000 aumentos, se contaron los ooquistes presentes en 20 campos elegidos al

azar. De esta manera se realizó una estimación semicuantitativa de la eliminación de ooquistes, siguiendo el protocolo descrito por Castro-Hermida *et al.* (2002b), que se recoge en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Estimación semicuantitativa de la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces de terneros

Ooquistes por campo	Intensidad de eliminación
0	-
<1	+
1-5	++
6-10	+++
>10	++++

En las muestras fecales de corderos y cabritos, primeramente el PBS se pasó desde los tubos de los hisopos rectales a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml; los hisopos se frotaron energicamente contra las paredes del vial con objeto de liberar los ooquistes. Posteriormente, el microtubo con los ooquistes se centrifugó en una centrífuga Eppendorf Mini Spin (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a velocidad máxima (13.400 rpm) durante 5 minutos, y posteriormente se eliminó parte del sobrenadante hasta un volumen de 250  $\mu$ l. En estas muestras no se realizó la estimación de la eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* debido a las notables diferencias que existían respecto a la cantidad de heces recogidas y a la eficacia en la recuperación de los ooquistes.

#### Tinción negativa de Heine

Para llevar a cabo esta técnica, o tinción con carbol-fucsina, se depositó sobre un portaobjetos una pequeña cantidad de heces de aproximadamente 5  $\mu$ l. Posteriormente se añadió una cantidad similar de fucsina básica fenicada (Panreac, Barcelona, España), se homogeneizó con las heces y se realizó una extensión muy fina, que se dejó secar al aire y se observó inmediatamente a 1000 aumentos (microscopio Olympus CH-2). Los ooquistes se observaron como estructuras redondeadas o ligeramente ovoides no coloreadas y con una sombra central que representa el cuerpo residual.

#### Tinción Ziehl-Neelsen modificado

Se realizó una extensión fina de heces en un portaobjetos, se dejó secar al aire y se fijó con metanol durante 5 minutos. Posteriormente, la muestra se cubrió con fucsina básica fenicada; tras un mínimo de 20 minutos, se lavó abundantemente con agua. El siguiente paso consistió en decolorar la preparación mediante la adición de ácido sulfúrico al 3% durante 20 segundos con el porta en agitación; posteriormente se lavó con agua. Por último, se aplicó una solución de verde malaquita al 3% durante 5 minutos con objeto de realizar una tinción de contraste; la preparación se lavó con agua para eliminar el colorante y después se secó en las condiciones ambientales que había en el laboratorio. A 1000 aumentos se visualizaron los ooquistes que se aprecian de color rosa oscuro, resaltando sobre el fondo de color verde-azulado que se correspondería con los detritus fecales.

### Tinción con auramina

Esta técnica se realizó a partir de una extensión de materia fecal sobre un portaobjetos, que se dejó secar al aire. La muestra se fijó mediante la adición de metanol, que se dejó durante 5 minutos; posteriormente se dejó secar al aire. A continuación se cubrió la preparación con una solución fenólica de auramina (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania). Transcurrido un tiempo mínimo de 15 minutos a temperatura ambiente, la preparación se lavó cuidadosamente con agua.

La muestra se decoloró empleando una solución de alcohol ácido (CIH al 0,5% en etanol al 70%). Transcurridos 2 minutos se retiró la solución decolorante y se lavó la preparación con agua abundante. Por último, la extensión se contracoloró con una solución acuosa de permanganato potásico al 0,5% durante 3 minutos. Se lavó con agua abundante para eliminar el exceso de colorante, se dejó secar la preparación, se montó con DPX y los ooquistes se observaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a 400 y 1000 aumentos, apreciándose que eran muy fluorescentes, de color amarillo o amarillo-verdoso.

#### 3.1.3.2. Técnicas moleculares

### Concentración de ooquistes y extracción de ADN

#### *a) Muestras con un elevado número de ooquistes*

En las muestras en las que se había observado un elevado número de formas de resistencia de *Cryptosporidium*, las suspensiones de ooquistes se prepararon siguiendo el método descrito por Elwin *et al.* (2001); este método permite obtener ooquistes muy purificados, pero su rendimiento no es elevado, al perderse muchas formas parásitas durante el proceso.

Las muestras fecales se homogeneizaron en solución salina saturada (1:4) y se centrifugaron durante 8 minutos a 3000 rpm (1100 x g) en una centrífuga Eppendorf centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante, que contiene los ooquistes, se lavó con agua destilada y, finalmente, los ooquistes se resuspendieron en 1 ml de agua destilada, conservándose a 4 °C hasta su posterior utilización.

Para obtener el ADN de *Cryptosporidium* se utilizó una alícuota de 200 µl de las soluciones de ooquistes. Para incrementar el rendimiento del proceso de extracción, los ooquistes se rompieron sometidos a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido (-196 °C, 1 minuto)/descongelación (100 °C, 5 minutos). Posteriormente, el ADN se extrajo mediante el kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se mantuvo en congelación a -28 °C hasta su utilización.

*b) Muestras con un número reducido de ooquistes*

En este caso los ooquistes se concentraron previamente mediante una técnica de concentración con agua destilada y acetato de etilo, y posteriormente el ADN se extrajo directamente a partir del sedimento, utilizando un kit de extracción de ADN específico para muestras fecales.

Se partió de 2 gramos de muestra fecal, que se homogeneizó con agua destilada (1:10) y se filtró a través de una malla de 40 µm de diámetro de poro; posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm en una centrifuga Allegra 21R Centrifuge (Beckman Coulter, Pasadena, California, EE.UU.). Tras desechar el sobrenadante, se añadió agua destilada y acetato de etilo (4:1) al sedimento, se mezcló bien mediante agitación con vórtex y se volvió a centrifugar 5 minutos a 3500 rpm. Por último, se desecharon las tres capas (acetato de etilo, restos grasa y agua) y el sedimento, que contiene los ooquistes del protozoo, se resuspendió en 500 µl de agua destilada.

La concentración y recuperación de ooquistes se determinó tras el examen, al microscopio, de 20 µl del sedimento teñido con auramina. En las muestras positivas, el ADN parasitario se extrajo directamente a partir de 200 µl del sedimento, empleando el kit Realpure Spin Food-Stool Kit (Real, Valencia, España). Este kit fue diseñado específicamente para la purificación de ADN genómico procedente de heces, puesto que elimina los contaminantes e inhibidores de la reacción de PCR que contienen las muestras fecales. Como se comentó previamente, antes de comenzar la extracción, las muestras se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación para romper los ooquistes e incrementar la cantidad de ADN recuperado.

Identificación de la especie/genotipo

Para determinar las especies y genotipos de *Cryptosporidium* se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando un fragmento de aproximadamente 850 pb del gen que codifica para la subunidad ribosómica pequeña (SSU rRNA), de acuerdo con el protocolo descrito por Xiao *et al.* (2001a).

**Tabla 3.3. Cebadores empleados en la amplificación de los genes que codifican para el SSU rRNA y la gp60**

	Cebador	Secuencia (5' a 3')	Autor
SSU rRNA	18S 1F (SSU-F2)	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG	Xiao <i>et al.</i> , 2001a
	18S 1R (SSU-R2)	CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA	Jiang <i>et al.</i> , 2005
	18S 2F (SSU-F3)	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	Xiao <i>et al.</i> , 2001a
	18S 2R (SSU-R4)	CTCATAAGG TGCTGAAGGAGTA	
GP60	GP601F (AL 3531)	ATA GTC TCC GCT GTA TTC	Alves <i>et al.</i> 2003
	GP601R (AL 3535)	GGA AGG AAC GAT GTA TCT	
	GP602F (AL3532)	TCC GCT GTA TTC TCA GCC	
	GP602R (AL3534)	GCA GAG GAA CCA GCA TC	

Dicha PCR se realizó en dos etapas (PCR anidada), constituida cada una de ellas por una reacción independiente, incluyéndose controles positivos y negativos en todos los ensayos. En la primera reacción se amplificó un fragmento de aproximadamente 1325 pb, y para ello se emplearon 5 µl de ADN purificado, MgCl<sub>2</sub> 6mM, tampón de PCR 1x, 200 µM de cada desoxirribonucleótido (dNTP MIX, Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania), 0,2 µM de cada cebador 18SF1 y 18SR1 (Tabla 3.3) y 2,5 unidades de Taq polimerasa (BIOTAQ DNA polymerase, Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania) en un volumen total de reacción de 50 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyCycler (Biorad, Hercules, California, EE.UU.), sometiendo a la mezcla a una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturalización), 45 segundos a 55°C (hibridación) y 60 segundos a 72°C (extensión), y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

La segunda reacción de PCR amplificó un fragmento interno de aproximadamente 840 pb, empleándose para ello 5 µl del producto de la primera reacción de PCR y los cebadores 18S2F y 18S2R (Tabla 3.3). La composición de esta segunda reacción de PCR, así como el programa del termociclador, fue idéntico al empleado en la primera PCR a excepción de la concentración de MgCl<sub>2</sub>, que en este caso fue de 3 mM.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en un analizador de imagen (Fluor-S Multimager, Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) tras someterlos a una electroforesis -100V durante 50 minutos en tampón TAE 1x (Applichem GmbH, Darmstadt, Alemania)- en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo un sustituto de bromuro de etidio 1x (RedSafe, INTRON biotechnology, Gyeonggi, Corea del Sur).

Para determinar la especie/genotipo presente en las muestras se realizó un análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Para ello, el producto de la segunda reacción de PCR se sometió a una digestión con las endonucleasas *SspI*, *VspI* y *MboII* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.) siguiendo el protocolo recogido en la Tabla 3.4, en un volumen total de 20 µl. El volumen de producto de la segunda PCR a digerir varió dependiendo de la cantidad de ADN obtenido en la PCR anidada y este se valoró mediante la observación de la intensidad de las bandas. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37°C durante al menos 2 horas.

Los fragmentos de restricción se sometieron a una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1x teñidos con un sustituto de bromuro de etidio aplicando un voltaje de 110V durante 70 minutos; posteriormente se visualizaron en un analizador de imagen. Las especies/genotipos de *Cryptosporidium* se identificaron comparando los patrones de restricción obtenidos con los recogidos en varios trabajos (Feng *et al.* 2007; Xiao y Ryan, 2008). Aquellos aislados cuyo patrón de restricción no coincidió con el de *C. parvum* se secuenciaron con objeto de confirmar los resultados de la RFLP.

Tabla 3.4. Protocolo utilizado para realizar la digestión de los productos de PCR con las enzimas Sspl, VspI y MbolI

	Bandas Intensas	Bandas moderadas	Bandas tenues
Endonucleasa	10 U	10 U	10 U
Buffer	1x	1x	1x
Producto PCR	2 µl	10 µl	17 µl

La purificación de las muestras y la determinación de la secuencia nucleotídica se realizó en la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la Universidad de Santiago de Compostela. Los productos de amplificación se secuenciaron en ambos sentidos utilizando el BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) y se leyeron en un secuenciador automático ABI-prism 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Las secuencias obtenidas se examinaron y solaparon con el programa Chromas Pro v.1.7.5. (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) y posteriormente se alinearon con BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3. (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, Estados Unidos). Finalmente, la identificación de las especies presentes se realizó mediante la comparación de las secuencias de ADN obtenidas con aquellas de especies/genotipos de *Cryptosporidium* depositadas en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), usando la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### Identificación del subtipo de *C. parvum*

Los aislados identificados como *C. parvum* en la RFLP, se subtiparon mediante el análisis de la secuencia de un fragmento (800-850 pb) del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (GP60), empleando una PCR anidada según el protocolo descrito por Alves et al (2003) y los cebadores señalados en la Tabla 3.3.

En ambas reacciones se empleó 1 µl de ADN (ADN patrón para la primera reacción y producto de la primera PCR para la segunda reacción), que se añadió a una mezcla compuesta por tampón de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 200 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada cebador (tabla X) y 5 U de Taq polimerasa, en un total de 50 µl. Las muestras se sometieron a 40 ciclos de 45'' a 95°C, 45'' a 52°C y un minuto a 72°C; también se incluyó un paso de desnaturalización inicial (3 minutos a 95°C) y otro de extensión final (10 minutos a 72°C).

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en un analizador de imagen (Fluor-S Multimager, Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) tras someterlos a una electroforesis - 100V durante 50 minutos en tampón TAE 1x- en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo un sustituto de bromuro de etidio 1x (RedSafe, INTRON biotechnology, Gyeonggi, Corea del Sur).

Para identificar los subtipos presentes, se determinó la secuencia de nucleótidos utilizando el procedimiento citado en el apartado anterior, y las secuencias consenso se compararon con las depositadas en el GenBank. El fragmento amplificado del gen de la GP60 posee en el extremo 5' una región integrada por repeticiones de los trinucleótidos TCA/TCG/TCT que codifican para la serina. Teniendo en cuenta esta característica, los subtipos se nombraron considerando el número de repeticiones de TCA y TCG en la región repetitiva y de las mutaciones presentes en la zona sin repeticiones, así como del número de copias de la secuencia ACATCA localizadas al final de la zona repetitiva en aquellos subtipos pertenecientes a la familia IIa (Sulaiman *et al.*, 2005).

### **3.2. ESTUDIO 2. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *C. parvum* EN TERNEROS Y CORDEROS DE GALICIA MEDIANTE ANÁLISIS MULTILOCUS (ML1, ML2 Y GP60).**

En este segundo estudio se realizó un análisis del tamaño de los fragmentos de las regiones microsatélite ML1 y ML2 de *Cryptosporidium*. Debido a la ausencia de un método estandarizado para realizar este análisis, se emplearon tres técnicas diferentes (electroforesis capilar, electroforesis en geles de alta definición y secuenciación), que se compararon en términos de fiabilidad, tipabilidad, poder discriminatorio, coste, tiempo de ejecución y facilidad de uso.

Los resultados obtenidos para los microsatélites ML1 y ML2 se combinaron posteriormente con los del gen de la gp60 para obtener un subtipo multilocus (MLT), lo que permitió determinar la variabilidad genética de *C. parvum* en los rumiantes domésticos de Galicia.

#### **3.2.1. Análisis del tamaño de los fragmentos de los microsatélites ML1 y ML2**

Se estudiaron dos regiones microsatélite empleadas para el subtipado de *C. parvum*: la ML1 consiste en una repetición de tres nucleótidos (GAG), mientras que la ML2 está formada por repeticiones del dinucleótido AG. El subtipo viene determinado por el nombre de la región microsatélite junto con la longitud, en pares de bases, de la secuencia amplificada. El análisis del tamaño de los fragmentos para estos dos marcadores se realizó empleando tres de las técnicas más empleadas, como la electroforesis capilar, electroforesis en geles de alta resolución y secuenciación, considerada como el *gold standard*.

Independientemente de la técnica empleada, la reacción de PCR consistió en una mezcla constituida por tampón TAE 1x, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada desoxiribonucleótido, 0,5 μM de cada uno de los cebadores (Tabla 3.5), 0,8 U de Taq polimerasa (HotStar Taq DNA polymerase; Qiagen, Crawley, Reino Unido) y 2 μl de ADN purificado, en un volumen total de 20 μl. En el caso de la electroforesis capilar, se

empleó un cebador antisentido marcado con el colorante WellRED D3 (Proligo, París, Francia).

Tabla 3.5. Cebadores empleados para la amplificación de las regiones microsatélite ML1 y ML2.

		Cebador (5' →3')	Referencia
ML1	ML1F	CTAAAAATGGTGGAGAATATTC	Cacciò <i>et al.</i> , 2000
	ML1R	CAACAAAATCTATATCCTC	
ML2	ML2F (M15)	CAATGTAAGTTTACTTATGATTAT	Cacciò <i>et al.</i> , 2001
	ML2R (M16)	CGACTATAAAGATGAGAGAAG	

Las condiciones que se usaron para la PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y 60 s a 72°C y un paso de extensión final a 72°C durante 7 min.

#### - Electroforesis capilar

El tamaño de los fragmentos amplificados se analizó en un secuenciador CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, High Wycombe, Reino Unido) empleando el marcador de ADN GenomeLab DNA Size Standard Kit 600 (Beckman Coulter, High Wycombe, Reino Unido) como escala de referencia de tamaño, siguiendo las instrucciones del fabricante. El software asigna automáticamente a los picos del electroferograma el valor de tamaño del fragmento; el tamaño del alelo resultó de la aproximación del valor del pico principal al del número de pares de bases más cercano a los señalados por Hunter *et al.* (2007).

#### - Electroforesis en geles de alta resolución

Los productos obtenidos en la PCR se separaron en geles comerciales prefabricados Spreadex EL500 (Elchrom Scientific AG, Cham, Suiza) empleando el sistema SEA2000 (Elchrom Scientific AG, Cham, Suiza), que permite regular la temperatura de la electroforesis (Figura 3.2). Los geles Spreadex están fabricados a partir del monómero N-acryloyl-tris(hydroxymethyl)-aminomethane que, de acuerdo con el fabricante, ofrece un poder de resolución tres veces superior al de otros geles sintéticos. Los geles se corrieron a 120 V y recirculación de buffer a una temperatura constante de 55°C durante 240 minutos, condiciones que, según una herramienta on-line del fabricante (<http://elchrom.com/index.php?id=virtualelectrophoresis>), permitían obtener una separación óptima de los fragmentos. Tras la electroforesis, las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador Dark Reader (Clare Chemical, Denver, USA). El tamaño de los productos de PCR se determinó mediante comparación con las bandas del patrón M3 DNA ladder (Elchrom Scientific).

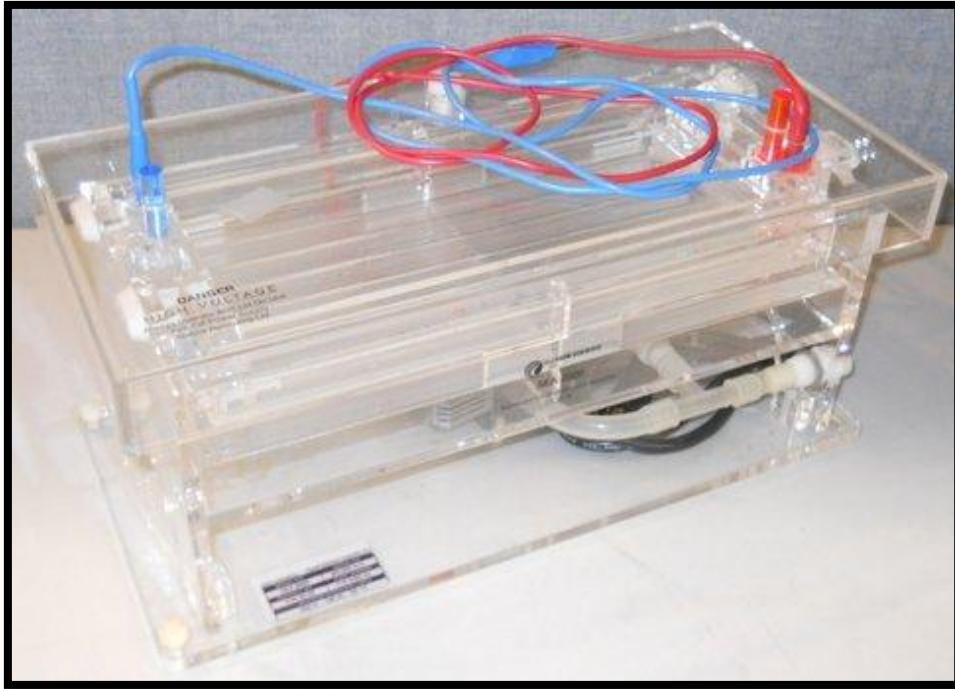


Figura 3.2. Sistema SEA2000, empleado para realizar la electroforesis en condiciones de temperatura controladas

- Secuenciación

Los productos de la PCR se purificaron con QIAquick PCR clean-up kit (Qiagen). La secuenciación bidireccional se realizó en un secuenciador ABI 3100xl (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Las secuencias se alinearon y editaron con el programa ChromasPro (Technelysium, Brisbane, Australia) y se analizaron comparándolas con las almacenadas en el GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) empleando la herramienta BLAST.

- Análisis comparativo de las tres técnicas

La nomenclatura de los alelos se basó en el tamaño de los fragmentos (en pares de bases), tal y como propuso Cacciò *et al.* (2001). El tamaño de los alelos obtenido mediante electroforesis capilar se ajustó comparándolo con el resultado del análisis de la secuencia; en el caso de no haber secuencias disponibles, se comparó con los resultados de la electroforesis en geles prefabricados de alta resolución.

La capacidad de cada método para asignar cada aislado a un alelo determinado o tipabilidad ( $T$ ), se obtuvo tras calcular la proporción de aislados tipados sobre el número total de muestras analizadas. Además, la utilidad de cada método para subtipar los aislados de *C. parvum* se calculó mediante el índice Hunter–Gaston de poder discriminatorio (Figura 3.3), que estima la probabilidad de tomar dos aislados sin relación al azar y clasificarlos como diferentes (Hunter y Gaston, 1988). El índice y los intervalos de confianza al 95% se obtuvieron con la herramienta on-line V-DICE (Variable Number

Tandem Repeat Diversity and Confidence Extractor; <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j (n_j - 1)$$

Figura 3.3. Ecuación empleada para calcular el índice de Hunter-Gaston (D), donde N es el número total de aislados, s el número de subtipos observados y  $n_j$  el número de aislados pertenecientes al subtipo j.

Por último, en este análisis también se tuvieron en cuenta el coste de cada método, así como el tiempo de análisis y la facilidad de uso.

### 3.2.2. Tipado multilocus y análisis de la variabilidad genética de *C. parvum*

Finalmente, los alelos para cada uno de los marcadores microsatélite, obtenidos con el método que ofreció las mejores características (electroforesis capilar), se combinaron con el subtipo obtenido tras análisis del gen de la GP60, creando un subtipo multilocus (MLT) para cada aislado, que se designó con un número. Solo se incluyeron en el análisis los aislados positivos para los tres locus.

El análisis de clusters se realizó empleando el algoritmo eBURST (Feil *et al.*, 2004; <http://eburst.mlst.net/>), desarrollado originariamente para el análisis multilocus de datos obtenidos mediante secuenciación y aplicado para tipado multilocus de *Cryptosporidium* por fragmentos por Tanriverdi *et al.* (2004). Este algoritmo vincula los MLT que difieren de otro en un solo locus (single-locus variants; SLVs), mientras que aquellos MLT que difieren en más de un locus no se vinculan. De este modo, los grupos de SLV se refieren a complejos clonales. Cada cluster se forma alrededor de un “miembro fundador”, que tiene el mayor número de SLV, y considerado el tipo ancestral.





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### 4.1. ESTUDIO MICROSCÓPICO

Los resultados obtenidos tras el análisis microscópico de las muestras fecales demuestran que, en las explotaciones de rumiantes domésticos de Galicia, *Cryptosporidium* se encuentra frecuentemente implicado en la aparición de brotes de diarreas en neonatos, ya que aproximadamente el 60% de las granjas y el 50% de los animales resultaron positivos (Tabla 4.1). Al considerar la prevalencia individual, se observó que la más elevada correspondía al ganado caprino y la más baja a los ovinos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 32,153$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabla 4.1. Porcentajes de animales y explotaciones positivos a *Cryptosporidium* en Galicia empleando técnicas microscópicas

	Prevalencia individual	Prevalencia por explotación
Terneros	172/322 (53,4%)	114/190 (60,0%)
Corderos	54/171 (31,6%)	20/37 (54,1%)
Cabritos	74/118 (62,7%)	15/23 (65,2%)
TOTAL	300/611 (49,1%)	149/250 (59,6%)

Es necesario señalar que, aunque existe una elevada prevalencia de infección por este protozoo, sin embargo, en las diarreas neonatales de los rumiantes intervienen otros enteropatógenos de naturaleza bacteriana o vírica que no se han considerado en este estudio.

En un elevado porcentaje de las granjas de ganado vacuno, en las que hubo brotes de diarreas neonatales (Tabla 4.1), se observó un elevado porcentaje de terneros que excretaban ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Asimismo, la prevalencia individual también fue elevada y similar a la observada (52,3-64,7%) en terneros menores de un mes que presentaban diarrea (Quílez *et al.*, 1996, 2008a; De la Fuente *et al.*, 1998). Por el contrario, en un estudio reciente realizado en Galicia, García-Meniño (2013) comprobó que el 76% de los terneros que presentaban diarrea excretaban ooquistes del parásito; este elevado porcentaje puede deberse al reducido número de muestras analizadas ( $n = 83$ ). En terneros que presentaban diarrea en el momento del muestreo, Martín-Gómez *et al.* (1995) obtuvieron prevalencias del 35,7%, aunque se debe considerar que muestrearon terneros de hasta 75 días de edad y se ha demostrado que la prevalencia de infección disminuye con la edad, observándose los mayores porcentajes de infección en terneros menores de 3 semanas (Causapé *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2007).

En el presente estudio, el porcentaje de corderos que eliminaban ooquistes de *Cryptosporidium* fue más bajo que los hallados en corderos del Centro y Noreste de España (entre el 40,2 y el 79,4%), que no habían sido todavía destetados y que presentaban diarrea (Pilar-Izquierdo *et al.*, 1993; Martín-Gómez *et al.*, 1995b; Muñoz *et al.*, 1996; Causapé *et al.*, 2002). Por el contrario, en nuestro estudio, el porcentaje de cabritos que eliminaban ooquistes de *Cryptosporidium* fue superior al señalado en diversos estudios

realizados en otras zonas del norte de España, donde el porcentaje de cabritos con diarrea fue del 41,7-55,7% (Muñoz *et al.*, 1996; Quílez *et al.*, 2001).

Los elevados porcentajes de infección observados en los rumiantes domésticos de Galicia pueden deberse al predominio de sistemas de explotación tradicionales, donde es frecuente la presencia de condiciones que favorecen el aumento de la presión de infección y, por lo tanto de la prevalencia por *Cryptosporidium*, generalmente asociadas a higiene deficiente y al manejo incorrecto de los animales. En granjas de vacuno de nuestra Comunidad Autónoma, Castro-Hermida *et al.* (2002a) comprobaron que el riesgo de infección por *Cryptosporidium* era superior en terneros que se alojaban en grupos y en cubículos con suelo de tierra o paja, ya que este tipo de suelos no permite realizar una correcta limpieza y desinfección de las instalaciones. En este sentido, los valores de prevalencia tan elevados hallados en las granjas gallegas de ganado caprino pueden deberse a que la mayoría de los rebaños de esta Comunidad son de pequeño tamaño y de carácter familiar, destinando la mayor parte de los animales al autoconsumo; así, son explotaciones poco profesionalizadas, cuyo manejo generalmente no incluye las medidas higiénicas adecuadas para evitar la transmisión de este protozoo, lo que sin duda se traduce en elevados porcentajes de infección. Por el contrario, en ganado vacuno, Castro-Hermida *et al.* (2002a) observaron que, en Galicia, en las explotaciones de mayor tamaño existen mejores condiciones de higiene y de manejo de los animales, lo que implica un menor riesgo de infección por este protozoo.

Los datos de prevalencia observados sugieren que *Cryptosporidium* es, actualmente, uno de los principales agentes etiológicos responsables de diarreas neonatales en terneros, corderos y cabritos en Galicia. Diversos estudios han identificado al protozoo como el enteropatógeno más frecuente en rumiantes neonatos con diarrea (Snodgrass *et al.*, 1986; Martín-Gómez *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 1996; De la Fuente *et al.*, 1998; Joachim *et al.*, 2003; Silverlås *et al.*, 2010a). En un estudio reciente realizado en brotes de diarrea neonatal en terneros en Galicia, García Meniño (2013) comprobaron que *Cryptosporidium* estaba asociado de forma significativa con la aparición de heces acuosas en los animales, siendo el agente más frecuente (76%), seguido, en mucha menor proporción, por rotavirus (20%), *E. coli* K99+ (11%) y coronavirus (3%).

Respecto a la posible **influencia de la edad** sobre la prevalencia y la estimación del número de ooquistes por gramo de heces, como se señaló en el apartado de Materiales y Métodos, se consideraron las semanas de vida de los animales, de modo que éstos se distribuyeron en 4 grupos: G1: <8 días, G2: 8-15 días, G3: 16-21 días, G4: >21 días. Esta división no se realizó para los corderos y los cabritos debido a que la mayoría de los ganaderos no conocían con exactitud la fecha de nacimiento, ya que al concentrarse los partos, en un período corto de tiempo se registra un elevado número de nacimientos.

Como se observa en la Tabla 4.2, los porcentajes de infección fueron significativamente superiores ( $\chi^2 = 10,718$ ;  $p = 0,013$ ) en los terneros menores de dos semanas de edad.

Tabla 4.2. Prevalencia y estimación de la eliminación en terneros al considerar los grupos de edad.

	1-7 días	8-14 días	15-21 días	>21 días
Prevalencia (%)	57,5	63,4	38,1	11,5
Eliminación ( $\pm$ DE)	2,2 $\pm$ 0,92	2,2 $\pm$ 1,02	2,6 $\pm$ 1,06	1,0 $\pm$ 0,99

Además, al considerar cada uno de los días de vida de los animales (Figura 4.1.), se observó que cuando estos contaban con solo 3 días ya eliminaban ooquistes con las heces, lo que coincide con los resultados obtenidos por Quílez *et al.* (1996) y Castro-Hermida *et al.* (2002b). Si se tiene en cuenta el período de prepatencia, estos datos indican que los animales adquirieron la infección inmediatamente después del parto.

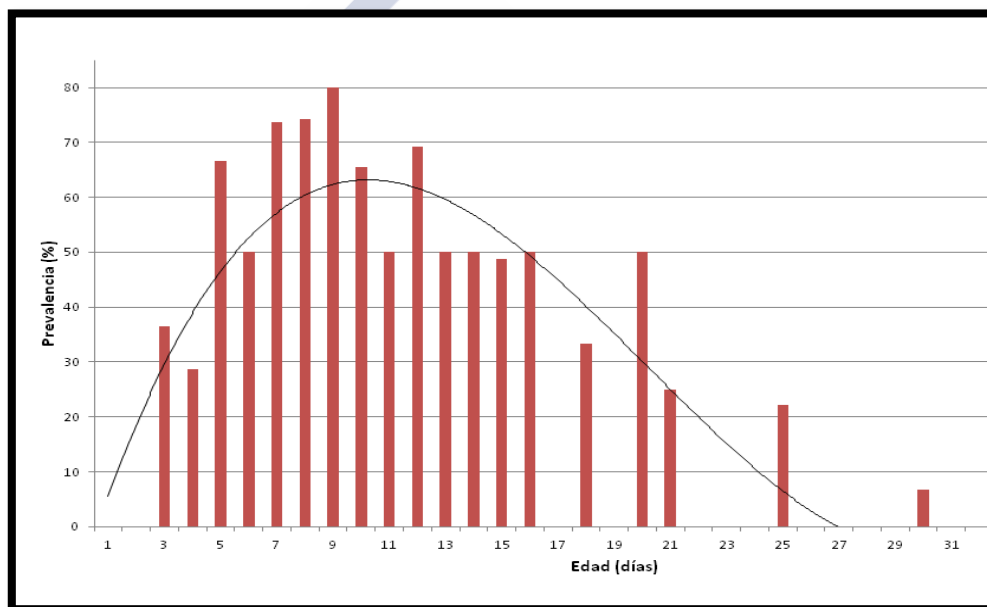


Figura 4.1. Porcentaje de animales que excretaron ooquistes de *Cryptosporidium* al considerar los días de vida.

Las prevalencias más elevadas se observaron entre los 5 y 12 días de edad, por lo que, los animales de menos de tres semanas de edad, además de ser los más sensibles a padecer criptosporidiosis clínica (Anderson, 1981; Fayer y Ungar, 1986; Santín *et al.*, 2004; Kváč *et al.*, 2006, Fayer *et al.*, 2008; Santín *et al.*, 2008; Santín y Trout, 2008; Rieux *et al.*, 2014) son los que tiene mayor importancia como portadores y diseminadores del parásito tanto para otros animales como para el hombre, lo que coincide con la mayoría de los autores (Wang *et al.*, 2011).

El porcentaje de animales positivos disminuyó notablemente a medida que aumentó la edad (Tabla 4.2; Figura 4.1), tal y como muestra la línea de tendencia de la Figura 4.1. Además, la intensidad de eliminación de ooquistes disminuyó de manera notable en los

animales de mayor edad (Tabla 4.2). Estos resultados confirman la pauta general descrita para esta protozoosis, en la que la exposición continuada de los animales jóvenes al parásito parece contribuir a que las reinfecciones tengan una menor significación clínica; no obstante, también los animales de más edad tienen un considerable interés epidemiológico, puesto que al continuar eliminando, durante algún tiempo, cifras reducidas de ooquistes constituyen una fuente de infección.

## 4.2. ESTUDIO MOLECULAR

### 4.2.1. Análisis genotípico

Todas las muestras que resultaron positivas al examen microscópico se seleccionaron para realizar su caracterización molecular. Tras la extracción de ADN, se realizó una PCR anidada para amplificar parte del gen SSU rRNA de *Cryptosporidium*. De este modo, se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado ( $\approx 850$  pb; Figura 4.2) en 270 muestras pertenecientes a 149 granjas; el número de muestras y granjas positivas al considerar las diferentes especies animales se muestra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Muestras y granjas positivas mediante el empleo de técnicas moleculares

	Muestras positivas	Granjas positivas
Terneros	162/172 (94,2 %)	114/114
Corderos	43/54 (79,6 %)	20/20
Cabritos	65/74 (87,8 %)	15/15
TOTAL	270/300 (90,0 %)	149/149

Aunque varios estudios han señalado que las técnicas moleculares poseen una mayor sensibilidad que las microscópicas para la detección de *Cryptosporidium* spp, un elevado porcentaje de muestras positivas a la microscopía resultaron negativas con PCR (5,8% en terneros, 18,9% en corderos y 12,2% en cabritos). No obstante, en general, las muestras negativas a PCR presentaban, mediante técnicas microscópicas, un reducido número de ooquistes, lo que sugiere, al menos, una recuperación deficiente de ooquistes a partir de las heces o de ADN en la fase de extracción. En pequeños rumiantes, estos hallazgos también pueden estar asociados a una cantidad de muestra insuficiente o al procedimiento empleado para analizar las muestras fecales. Varios autores ya han observado esta menor sensibilidad de la PCR en muestras que presentaban pocos ooquistes (Castro-Hermida *et al.*, 2007; Hamnes *et al.*, 2007). En este sentido, Fayer *et al.* (2007) y Mueller-Doblies *et al.* (2008) señalaron que, en la mayoría de las muestras que contenían menos de 10 ooquistes por gramo de heces, no se conseguía amplificar el ADN.

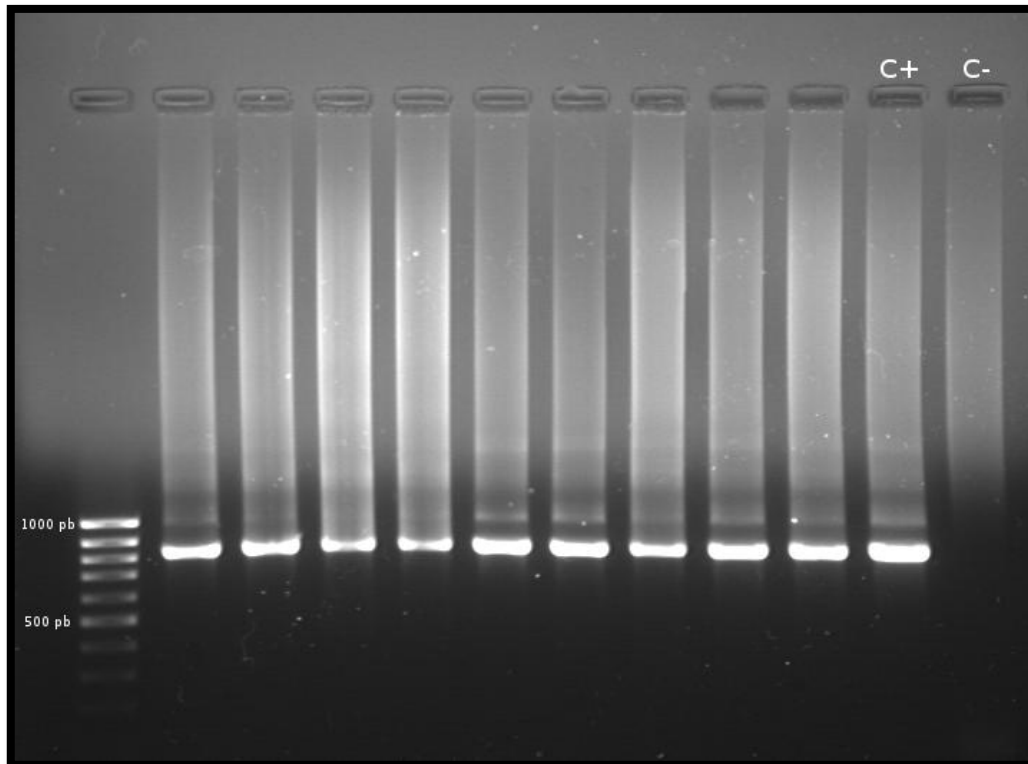


Figura 4.2. Amplificación de un fragmento de aproximadamente 850 pb del gen de la SSU rRNA

Para la identificación de las especies/genotipos del parásito, se realizó el análisis de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de los productos de PCR del gen SSU rRNA, utilizando las enzimas *SspI*, *VspI* y *MboII*. Así, en los rumiantes domésticos gallegos se observaron cuatro patrones de bandas diferentes (Figura 4.3; Tabla 4.4), que permitieron identificar las siguientes especies del protozoo: *C. bovis*, *C. parvum*, *C. ubiquitum* y *C. xiaoi* (Tabla 4.5). De todos modos, es necesario señalar que no se puede descartar la presencia de otras especies de *Cryptosporidium*, ya que las técnicas basadas en la PCR de un fragmento del gen de la SSU rRNA amplifican de forma selectiva la especie dominante en la muestra (Cama *et al.* 2006; Feng *et al.* 2007).

Tabla 4.4. Tamaño de los fragmentos de restricción para las cuatro especies de *Cryptosporidium* identificadas al considerar la enzima de restricción (Feng *et al.*, 2007; Xiao y Ryan, 2008)

	<i>SspI</i>	<i>VspI</i>	<i>MboII</i>
<i>C. bovis</i>	432,267,103,34	617,115,104	412,185,162,76
<i>C. parvum</i>	450,267,108,12,11	629,115,104	771,76
<i>C. ubiquitum</i>	454,384,11	461,169,115,104	-
<i>C. xiaoi</i>	413,267,103,34,19	617,115,104	412,185,162,76

De todos modos, para confirmar los resultados obtenidos en la PCR-RFLP, se secuenció un número representativo de aislados de cada una de las especies cuyo patrón de restricción fue diferente al de *C. parvum*, comparándolas con las incluidas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Debido a la gran similitud en el patrón de bandas mostrado por *C. bovis* y *C. xiaoi* con las tres

endonucleasas (Tabla 4.4), en los aislados donde la infección no fue mixta, la identificación se realizó mediante el análisis de la secuencia amplificada. En los casos de infecciones mixtas con *C. parvum*, y debido a la marcada especificidad de hospedador que muestran estas dos especies, las halladas en terneros se identificaron como *C. bovis*, y las detectadas en cabritos como *C. xiaoi*.

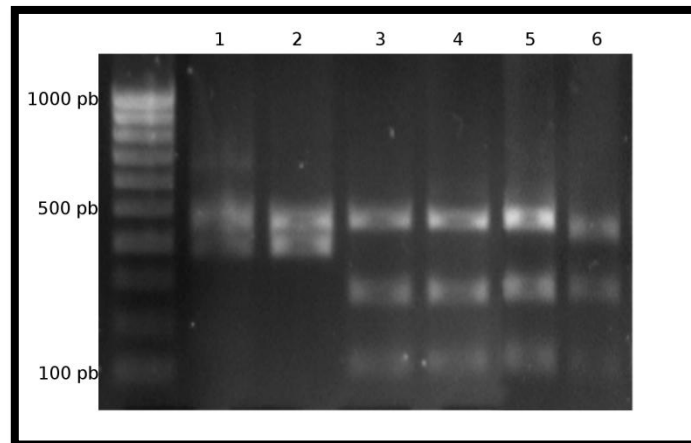
Tabla 4.5. Prevalencia individual y por granja de las diferentes especies de *Cryptosporidium* identificadas mediante PCR-RFLP del gen SSU rRNA

	Especie	Nº Acceso	Prev. Individual	Prev. Granja
Vacuno	<i>C. parvum</i>	KF830259	162/162 (100%)	111/114 (97,4%)
	<i>C. bovis</i>	-	2/162 (1,2%)	2/114 (1,8%)
Ovino	<i>C. parvum</i>	KF830259	32/43 (74,4%)	12/20 (60,0%)
	<i>C. ubiquitum</i>	KC608029	11/43 (25,6%)	7/20 (35,0%)
Caprino	<i>C. parvum</i>	KF830259	61/65 (93,8%)	13/15 (86,7%)
	<i>C. xiaoi</i>	JQ413443	5/65 (7,7%)	4/15 (26,7%)

En las tres especies de rumiantes domésticos se comprobó que *C. parvum* era la especie más prevalente, tanto a nivel individual como a nivel de explotación (Tabla 4.5); esta especie se ha considerado, junto a *C. hominis*, responsable de la mayoría de los brotes de criptosporidiosis en humanos (Xiao, 2010). Teniendo en cuenta los elevados porcentajes de infección observados, los terneros, corderos y cabritos menores de un mes en Galicia, poseen una gran importancia como portadores y diseminadores de especies del parásito con potencial zoonótico, por lo que las personas que tengan un gran contacto con estos animales deberían tomar precauciones para evitar adquirir y/o diseminar la infección. Además, los resultados de este trabajo también confirman el reducido grado de especificidad que tiene *C. parvum* respecto a sus hospedadores.

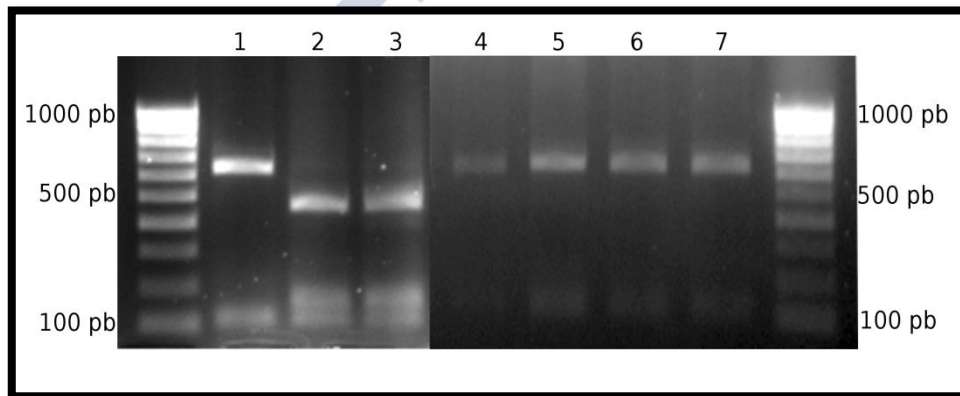
En el presente estudio, *C. ubiquitum* se identificó únicamente en corderos; aunque en la mayoría de los estudios esta especie es más frecuente en ganado ovino, también se ha detectado en una gran variedad de mamíferos, incluido el hombre (Ryan *et al.*, 2005, Santín y Fayer, 2007; Shen *et al.*, 2011; Chalmers y Katzer, 2013). Sin embargo, hasta el momento, todavía no se conoce completamente su distribución y rango de hospedadores (Fayer *et al.*, 2010a). Según Šlapeta (2013), *C. ubiquitum* no supone un riesgo para la Salud Pública; sin embargo, se ha identificado como causa de brotes esporádicos en humanos, sobre todo en países desarrollados, por lo que algunos autores consideran que es un patógeno emergente para el ser humano.

a)



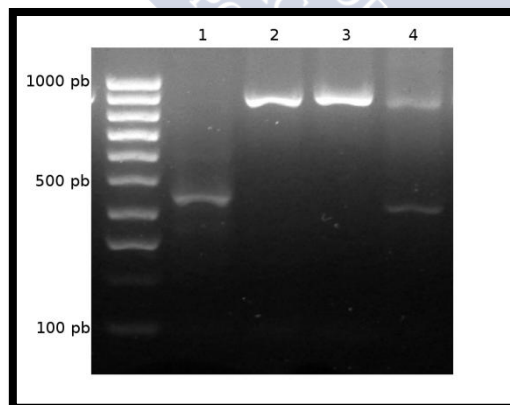
Líneas 1 y 2: *C. ubiquitum*; Líneas 3, 4 y 5: *C. parvum*; Línea 6: *C. xiaoi*

b)



Líneas 1, 5, 6 y 7: *C. parvum*; Líneas 2 y 3: *C. ubiquitum*; Línea 4: *C. xiaoi*

c)



Línea 1: *C. xiaoi*; Líneas 2 y 3: *C. parvum*; Línea 4: infección mixta *C. xiaoi*-*C. parvum*

Figura 4.3. Análisis de restricción de las especies de *Cryptosporidium* identificadas en rumiantes domésticos de Galicia con las enzimas *Sspl* (a), *Vspl* (b) y *MbolI* (c).

Aunque se ha sugerido una transmisión antroponótica (Fayer *et al.*, 2010b), los casos en humanos se han relacionado principalmente con el consumo de agua contaminada con oocistos de origen animal (Chalmers y Katzer, 2013).

Por último, *C. xiaoi* y *C. bovis* se identificaron en cabritos y en terneros, respectivamente; estas especies presentan un rango de hospedadores mucho más reducido y, por lo tanto, no se consideran zoonóticas (Šlapeta, 2013).

En **terneros**, en todos los aislados que se caracterizaron molecularmente, se identificó *C. parvum* (Tabla 4.5). Únicamente en dos animales, pertenecientes a dos explotaciones diferentes, se detectó una infección mixta por *C. parvum* y *C. bovis*. Nuestros resultados demuestran que *C. parvum* es la especie predominante en terneros gallegos con procesos diarreicos, lo que coincide con un estudio realizado en el norte de España por Quílez *et al.* (2008a), donde el 98,7% (147/149) de las muestras procedentes de terneros, menores de 21 días, con diarrea estaban infectados por esta especie. En este sentido, los resultados de un gran número de estudios sugieren la existencia de una relación entre la edad y la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium* en el ganado vacuno. Así, los terneros sin destetar están más predispuestos a la infección por *C. parvum*, que es la principal especie responsable de la aparición de importantes brotes de diarrea neonatal, mientras que otras especies, como *C. bovis*, sólo tendrían un papel secundario en estos animales (Santín *et al.* 2004, 2008; Kváč *et al.*, 2006, Fayer *et al.*, 2008; Quílez *et al.* 2008a; Santín y Trout, 2008; Rieux *et al.*, 2014). Por el contrario, los animales de más edad están infectados por especies más adaptadas al ganado vacuno: en terneros destetados y novillas predominan *C. bovis* y *C. ryanae*, mientras que *C. andersoni* es la especie más prevalente en animales adultos (Santín *et al.*, 2004; Santín y Trout, 2008; Fayer *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2014).

*C. bovis* sólo se identificó en dos muestras, conjuntamente con *C. parvum*; al aparecer únicamente en infecciones mixtas, y al no ser la especie dominante, no se pudo realizar el análisis de la secuencia. Varios estudios consideran esta especie poco patógena, por lo que sus infecciones suelen ser asintomáticas (Silverlås *et al.*, 2010a, 2010b).

En **ganado ovino**, la digestión de las 43 muestras positivas por PCR con las enzimas *SspI*, *VspI* y *MboII* generó patrones de restricción (Tabla 4.5) característicos de *C. parvum* (74,4%) y *C. ubiquitum* (25,6%); siendo ésta la primera denuncia de *C. ubiquitum* en corderos en España. Tras la secuenciación de los aislados identificados como *C. ubiquitum*, se detectaron tres tipos diferentes de secuencias (Figura 4.4). En cinco aislados pertenecientes a dos granjas, las secuencias fueron idénticas a la del subtipo 1 (AF442484). Dos aislados, pertenecientes a otras dos granjas, presentaron una homología del 99% con el subtipo 2 de *C. ubiquitum* (EF362480), al mostrar una transición de un nucleótido (G por A) en la posición 396; un aislado de otra explotación presentó el mismo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), junto con una delección del trinucleótido AAT.

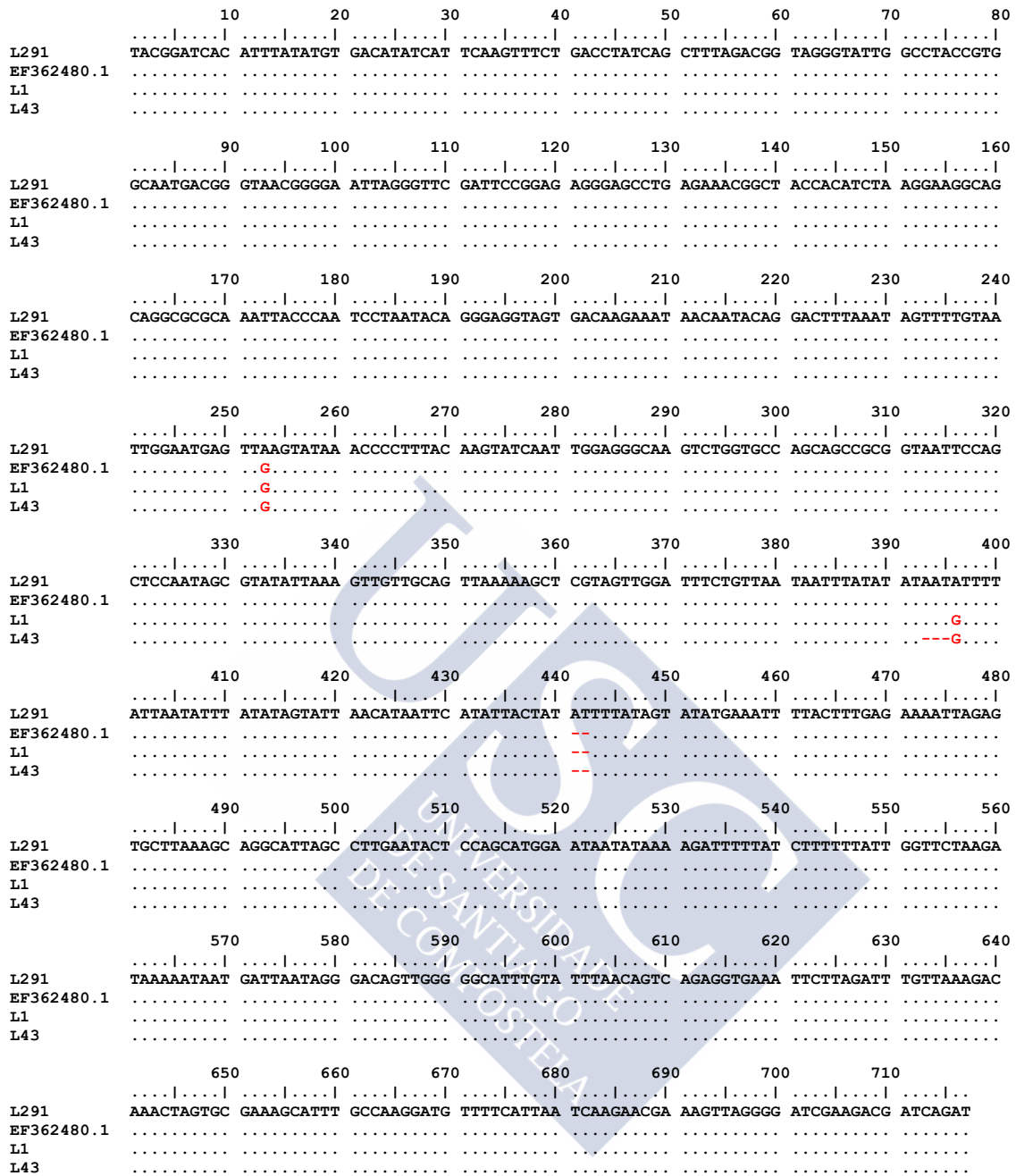


Figura 4.4. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen SSU rRNA de diversos aislados representativos de *C. ubiquitum* identificados en corderos. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado L291 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo. L291 (subtipo 1 de *C. ubiquitum*); EF362480, L1 y L43 (subtipo 2 de *C. ubiquitum*).

*C. parvum* fue la más especie más prevalente en las granjas de ovino y se detectó en el 32,4% (12/37) del total de los rebaños de ovejas, mientras que *C. ubiquitum* se identificó en el 18,9% (7/37). Cabe destacar la ausencia de *C. xiaoi* en las muestras analizadas, puesto que diversos autores (Soltane *et al.*, 2007; Sweeny *et al.*, 2011) la consideran la especie más frecuente en corderos sin destetar pero que no padecían diarrea neonatal. En todas las granjas donde se analizaron dos o más muestras se identificó una única especie

del protozoo, excepto en dos explotaciones en las que se identificaron *C. parvum* y *C. ubiquitum*. En una de ellas, localizada en el ayuntamiento de Friol (Lugo), se identificaron las dos especies en el mismo brote. Por el contrario, en un rebaño de Castroverde (Lugo), *C. ubiquitum* se detectó en un brote de diarrea neonatal en febrero de 2009 y *C. parvum* en otro brote en diciembre de ese mismo año.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que *C. parvum* y *C. ubiquitum* están implicados en la etiología de los procesos diarreicos de los corderos neonatos en Galicia, aunque, como en el caso del ganado vacuno, no se puede descartar la implicación de otros enteropatógenos. Estos datos contrastan con los resultados obtenidos en los estudios realizados en ganado ovino en España. Así, en Aragón, *C. parvum* fue la única especie identificada en 139 aislados procedentes de corderos, menores de 3 semanas, que tenían diarrea (Quílez *et al.* 2008b), mientras que en corderos y ovejas adultas de Galicia, Castro-Hermida *et al.* (2011) comprobaron que todos los aislados caracterizados molecularmente (27) pertenecían a esta especie.

Los estudios moleculares realizados en ganado ovino todavía no han permitido establecer una relación evidente entre la edad y la aparición de diferentes especies de *Cryptosporidium*. Nuestros resultados coinciden con los señalados en la mayoría de los trabajos realizados en ganado ovino de Europa, donde *C. parvum* es la especie predominante en los corderos sin destetar (McLauchlin *et al.*, 2000; Leoni *et al.*, 2007; Pritchard *et al.*, 2007, 2008; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Castro-Hermida *et al.*, 2011), estando muy relacionada (83-100%) con la presencia de brotes de diarrea neonatal en granjas de ovejas (Quílez *et al.*, 2008b; Cacciò *et al.*, 2013; Imre *et al.*, 2013). Sin embargo, otras investigaciones señalan a otras especies de *Cryptosporidium* como las más frecuentes en corderos. Así, *C. ubiquitum* fue la especie predominante en ovinos sin destetar de Australia (Ryan *et al.* 2005), Bélgica (Geurden *et al.*, 2008), China (Wang *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2011), Estados Unidos (Santín *et al.* 2007) o Reino Unido (Elwin y Chalmers, 2008), mientras que *C. xiaoi* lo fue en Australia (Sweeny *et al.*, 2011) y Túnez (Soltane *et al.*, 2007). Sin embargo, Yang *et al.* (2009) sugieren que el fallo en la detección de *C. parvum* en ganado ovino puede deberse a la utilización de técnicas moleculares que amplifican parte del gen del SSU rRNA y que el empleo de técnicas de PCR en tiempo real, empleando cebadores específicos para esta especie, permitiría detectar la prevalencia real de *C. parvum*.

El análisis RFLP de los 65 aislados de **cabritos** positivos a PCR evidenció la presencia de dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* (61/65; 93,8%) y *C. xiaoi* (4/65; 6,2%); siendo ésta la primera cita de *C. xiaoi* en cabritos procedentes de granjas españolas. Cabe destacar la ausencia de *C. ubiquitum* en las muestras de los cabritos, ya que esta especie la habíamos hallado en los corderos y, en Galicia, son frecuentes las explotaciones mixtas de ganado ovino y caprino (Lago *et al.*, 2012). Además, *C. ubiquitum* fue predominante en cabritos sin destetar en China (Wang *et al.*, 2014).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
L138  CCAATATTTT TGGTGACTCA TAATAACTTT ACGGATCACA TTATGTGACA TATCATTCAA GTTTCGACC TATCAGCTTT
L268  -----
GU014552
GU174541

      90      100     110     120     130     140     150     160
L138  AGACGGTAGG GTATTGGCCT ACCGTGGCTA TGACGGGTAA CGGGGAATTA GGGTTCGATT CCGGAGAGGG AGCCTGAGAA
L268  -----
GU014552
GU174541

      170     180     190     200     210     220     230     240
L138  ACGGCTACCA CATCTAAGGA AGGCAGCAGG CGCGCAAATT ACCCAATCCT AATACAGGGA GGTAGTGACA AGAAATAACA
L268  -----
GU014552
GU174541

      250     260     270     280     290     300     310     320
L138  ATACAGAACC TTACGGTTTT GTAATTGGAA TGAGTTAAGT ATAAACCCCT TAACAAGTAT CAATTGGAGG GCAAGTCTGG
L268  -----
GU014552
GU174541

      330     340     350     360     370     380     390     400
L138  TGCCAGCAGC CGCGGTAATT CCAGCTCCAA TAGCGTATAT TAAAGTTGTT GCAGTTAAAA AGCTCGTAGT TAATCTTCTG
L268  -----
GU014552
GU174541

      410     420     430     440     450     460     470     480
L138  TTAATTTTTA TATATAATAT CTCGATATTT ATATAATATT AACATAATTC ATATTACTTT TTAGTATATG AAACCTTACT
L268  .A.
GU014552 .A.
GU174541 .A.

      490     500     510     520     530     540     550     560
L138  TTGAGAAAAT TAGAGTGCTT AAAGCAGGCT ATTGCCCTGA ATACTCCAGC ATGGAATAAT ATTAAGGATT TTTATTCTTC
L268  -----
GU014552
GU174541

      570     580     590     600     610     620     630     640
L138  TTATTGGTTC TAGAATAAAA ATGATGATTA ATAGGAACAG TTGGGGGCAT TTGTATTTAA CAGTCAGAGG TGAATTCTTT
L268  -----
GU014552
GU174541

      650     660     670     680     690     700     710     720
L138  AGATTGTGTTA AAGACAAACT ACTGCGAAAG CATTTGCCAA GGATGTTTTC ATTAATCAAG AACGAAAGTT AGGGGATCGA
L268  -----
GU014552
GU174541

      730     740     750     760     770     780     790
L138  AGACGATCAG ATACCGTCGT AGTCTTAACC ATAAACTATG CCAACTAGAG ATTGGAGGTT GTTCCTTACT CC
L268  -----
GU014552 -----
GU174541 ----- T.

```

Figura 4.5. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen SSU rRNA de diversos aislados representativos de *C. xiaoi* identificados en cabritos. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado L138 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo. GU014552: *C. xiaoi* procedente de una oveja en China. GU174541: *C. xiaoi* procedente de una cabra en China.

Dos aislados identificados como *C. xiaoi* se secuenciaron para el gen SSU rRNA, originando secuencias que mostraron una homología del 99,88% (812pb/813pb) con respecto a las de *C. xiaoi* incluidas en el GenBank. De este modo, y como se muestra en la Figura 4.5, nuestros aislados mostraron una transversión de un solo nucleótido en comparación con diferentes aislados de *C. xiaoi* obtenidos a partir de muestras de ovinos de Noruega, China y Estados Unidos (números de acceso GQ337963, GU014552, FJ896051), y dos mutaciones con respecto a la secuencia GU174541 de *C. xiaoi* procedente de una cabra en China (Fayer y Santín, 2009; Wang *et al.*, 2010, Robertson *et al.*, 2010; Liu *et al.*, no publicado). Debido a las similitudes observadas en las secuencias de *C. xiaoi* y *C. bovis* para el gen SSU rRNA, las muestras se analizaron para el gen de la actina (Ng *et al.*, 2006).

El análisis de la secuencia del gen de la actina reveló una homología del 99,88% (852pb/853pb) con respecto a los aislados de *C. xiaoi* obtenidos en ovejas de Noruega (GQ337964; Robertson *et al.*, 2010) y de Estados Unidos (FJ896042; Fayer y Santín, 2009), observándose una transición (A por G) en la posición 671. Por el contrario, nuestros aislados mostraron una variación de 18 pb con respecto al aislado AY741307 de *C. bovis* (Fayer *et al.*, 2005). Las secuencias de *C. xiaoi* identificadas en el presente estudio se depositaron en el GenBank con los números de acceso GU553016 y GU553017.

Al igual que en las granjas de vacuno y ovino, *C. parvum* fue la especie más prevalente en los rebaños de ganado caprino, con una prevalencia total de 56,5% (13/23). *C. xiaoi* únicamente se halló en el 13,0% (3/23) de las explotaciones de cabras estudiadas. En el 93,3% (14/15) de las granjas positivas a PCR solo se hallaron infecciones por una especie de *Cryptosporidium*.

Además, en un rebaño (6,7%; 1/15) del ayuntamiento de Tomiño (Pontevedra) se identificaron *C. parvum* y *C. xiaoi* en muestras de dos cabritos pertenecientes a un mismo brote de diarrea neonatal.

La gran mayoría de los aislados procedentes de los cabritos con diarrea pertenecieron a la especie *C. parvum*, que es la especie identificada con mayor frecuencia en el ganado caprino a nivel mundial; de hecho es la única especie detectada en cabras en varias investigaciones llevadas a cabo en Bélgica, España, Italia, Francia, Reino Unido, República Checa, Sri Lanka y Zambia (Cacciò *et al.*, 2000; Noordeen *et al.*, 2002; Chalmers *et al.*, 2002; Hajdušek *et al.*, 2004; Ngouanesavanh *et al.*, 2006; Goma *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Drumo *et al.*, 2012; Maurya *et al.*, 2013). Al igual que en las otras especies de rumiantes, nuestros resultados demuestran que *C. parvum* es la especie implicada con mayor frecuencia en la aparición de criptosporidiosis clínica en cabritos; en este sentido, Quílez *et al.* (2008b), en Aragón, únicamente identificó *C. parvum* en 17 cabritos, menores de 3 semanas, que tenían diarrea.

*C. xiaoi* se describió inicialmente como el genotipo *C. bovis*-like en una cabra (Karanis *et al.*, 2007) y en un yak (Feng *et al.*, 2007) en China, pero la mayoría de las infecciones naturales con esta especie se han denunciado en ganado ovino, lo que probablemente sea consecuencia del análisis de un mayor número de aislados (Fayer y Santín, 2009). Nuestros resultados demuestran que las cabras domésticas son hospedadores de *C. xiaoi*; hasta la fecha, sólo se ha denunciado la presencia de esta especie en ganado caprino de China, Francia y Papúa Nueva Guinea (Karanis *et al.*, 2007; Rieux *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). En todos estos estudios, hay que destacar la ausencia de sintomatología clínica en los animales infectados con *C. xiaoi*. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que esta especie puede estar implicada en los brotes de diarrea neonatal en granjas de ganado caprino, si se tiene en cuenta el papel enteropatogénico de este protozoo. En este sentido, Navarro-i-Martínez *et al.* (2007) identificaron esta especie en un cordero de 8 días de edad procedente de España que murió tras presentar una diarrea aguda acompañada de una brusca pérdida de peso. De todos modos, y como ya indicamos anteriormente, hay que considerar que este síndrome clínico no se puede atribuir exclusivamente a *Cryptosporidium*, ya que como indicamos anteriormente, no se comprobó la existencia de infecciones bacterianas y víricas concurrentes.

Hasta la fecha, el reducido número de estudios moleculares sobre *Cryptosporidium* en ganado caprino, generalmente limitados a un escaso número de aislados (nunca superior a 44), dificulta notablemente la investigación de la posible relación entre la edad y la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium*. En ganado caprino de China, Wang *et al.* (2010) observaron que *C. ubiquitum* estaba presente en todos los grupos de edad; por el contrario *C. xiaoi* solo se identificó en cabritos y en hembras gestantes. En el mismo sentido, Rieux *et al.* (2013) apreciaron que la mayoría (18/19) de los cabritos sin destetar eliminaban ooquistes de *C. xiaoi*. Estos resultados sugieren una posible transmisión de *C. xiaoi* en el periparto, similar a lo observado en ganado ovino (Ye *et al.*, 2013).

#### 4.2.2. Análisis subgenotípico

El análisis de la secuencia de la gp60 permitió identificar 10 subtipos de *C. parvum* en los rumiantes domésticos de Galicia (Tabla 4.6), pertenecientes a las familias alélicas zoonóticas IIa (9) y IId (1); todos los aislados de *C. parvum* pertenecían a subtipos previamente identificados en humanos y por tanto, con potencial zoonótico (Soba y Logar, 2008; Plutzer y Karanis, 2009; Iqbal *et al.*, 2011). Diversos estudios reconocen que la familia IIa es la familia zoonótica que tiene una distribución geográfica más amplia (Plutzer y Karanis, 2009; Xiao, 2010). Por el contrario, la difusión de la familia IId es más reducida, aunque se ha detectado en aislados de *Cryptosporidium* procedentes de humanos, ganado vacuno, ovino, caprino y muestras de agua (Alves *et al.*, 2003, 2006; Peng *et al.*, 2003; Stantic-Pavlinic *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007), siendo más frecuente en pequeños rumiantes (Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et*

*al.*, 2008b; Xiao, 2010; Yang *et al.*, 2014).

Tabla 4.6. Subtipos gp60 de *C. parvum* identificados en rumiantes domésticos de Galicia

	Terneros	Corderos	Cabritos	Nº aislados identificados
IlaA11G2R1	X			2
IlaA13G1R1	X	X	X	9
IlaA13G2R1	X			2
IlaA14G2R1		X	X	2
IlaA15G2R1	X	X	X	177
IlaA16G1R1	X			1
IlaA16G2R1	X			3
IlaA16G3R1	X	X	X	40
IlaA18G3R1	X			4
IIdA17G1			X	3

La diversidad genética de los aislados de *C. parvum* procedentes de ganado vacuno (8 subtipos diferentes) fue mayor que los procedentes de ganado caprino (5) u ovino (4), aunque estos resultados pueden deberse al menor número de aislados de *C. parvum* caracterizados en los pequeños rumiantes. Únicamente se han hallado tres subtipos comunes a todas las especies de rumiantes estudiadas: IlaA13G1R1, IlaA15G2R1 y IlaA16G3R1 (Tabla 4.6). Algunos subtipos se hallaron sólo en terneros (IlaA11G2R1, IlaA13G2R1, IlaA16G1R1, IlaA16G2R1 y IlaA18G3R1) o en cabritos (IIdA17G1).

En **ganado vacuno**, la PCR del gen gp60 permitió obtener un amplicón del tamaño esperado en todas las muestras identificadas como *C. parvum* (162/162) tras el análisis PCR-RFLP del gen SSUrRNA. El análisis de secuenciación de estos aislados permitió obtener secuencias legibles en 159. Estos resultados confirman la elevada prevalencia de *C. parvum* en los terneros de nuestra Comunidad Autónoma, puesto que el protocolo empleado para el gen gp60, utilizando los cebadores descritos por Alves *et al.* (2003), solo permite amplificar ADN de *C. parvum* o de otras especies del protozoo estrechamente relacionadas (como *C. hominis* o *C. meleagridis*); esta técnica resulta negativa para otras especies comunes en el ganado vacuno como *C. bovis*, *C. ryanae* o *C. andersoni*.

Las secuencias se alinearon y se compararon con las de referencia depositadas en el GenBank, lo que permitió identificar 8 subtipos diferentes (Tabla 4.7) pertenecientes a la familia alélica Ila (159/159) de *C. parvum*, considerada como la principal familia zoonótica de esta especie en ganado vacuno. Además, los trabajos sobre la variación intraespecífica de *C. parvum* para el gen gp60 han demostrado que los subtipos pertenecientes a esta familia Ila son los más prevalentes en los terneros (Xiao, 2010).

También se han identificado otras familias en el ganado vacuno, aunque con menor frecuencia; se han detectado subtipos pertenecientes a la familia IId en terneros de Europa, Asia y África (Alves *et al.*, 2003, 2006; Misic y Abe, 2007; Plutzer y Karanis, 2007; Broglia *et al.*, 2008; Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008a; Amer *et al.*, 2010, 2013;

Muhid *et al.*, 2011; Nazemalhosseini-Mojarad *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Helmy *et al.*, 2013; Silverlas *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013), lo que la convierten en la segunda familia alélica más importante y ampliamente distribuida para este marcador en ganado vacuno. Por el contrario, las familias IIj y III solo se han identificado en un escaso número de aislados obtenidos de terneros procedentes de varios países europeos (Misic y Abe, 2007; Thompson *et al.*, 2007; Soba y Logar, 2008; Wielinga *et al.*, 2008).

Tabla 4.7. Distribución de los subtipos gp60 de *C. parvum* procedentes de terneros de Galicia

	Nº aislados	Nº explotaciones
IlaA11G2R1	2/162	1/111
IlaA13G1R1	3/162	3/111
IlaA13G2R1	2/162	2/111
IlaA15G2R1	123/162	90/111
IlaA16G1R1	1/162	1/111
IlaA16G2R1	3/162	3/111
IlaA16G3R1	21/162	14/111
IlaA18G3R1	4/162	2/111

La familia alélica Ila se ha identificado también en muestras procedentes de casos humanos, sobre todo en zonas rurales de países desarrollados de Norteamérica, Europa y Australia. Según Xiao (2010), la mayoría de los subtipos gp60 pertenecientes a la familia Ila que son comunes en el ganado bovino de estos países, son también subtipos dominantes en humanos de esas áreas (Alves *et al.*, 2006; Feltus *et al.*, 2006; Jex *et al.*, 2007, 2008; Ng *et al.*, 2008; O'Brien *et al.*, 2008; Soba y Logar, 2008; Waldron *et al.*, 2009; Zintl *et al.*, 2009). De este modo, se observó que los humanos en Irlanda, Irlanda del Norte y Australia se infectaban con los subtipos más comunes en ganado vacuno, siendo el IlaA18G3R1 el más prevalente (Jex *et al.*, 2007, 2008; Thompson *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2008; O'Brien *et al.*, 2008; Waldron *et al.*, 2009; Zintl *et al.*, 2009).

En este estudio se identificaron 8 subtipos gp60 de *C. parvum* (Tabla 4.7), todos ellos descritos previamente en humanos, siendo los más frecuentes el IlaA15G2R1 y el IlaA16G3R1. Así, en Galicia, los terneros menores de un mes con diarrea pueden considerarse un importante reservorio zoonótico. Estos resultados coinciden con los hallados por Quílez *et al.* (2008a), que encontraron siete subtipos diferentes en terneros del norte de España, siendo de nuevo el IlaA15G2R1 el subtipo predominante. Al analizar la presencia de más de un subtipo gp60 en aquellas explotaciones donde se identificaron varios aislados de *C. parvum*, se observó que en la mayoría de las granjas aparecía un único alelo; únicamente en 5 rebaños se identificaron dos subtipos diferentes. En todos estos casos estuvo presente el subtipo IlaA15G2R1, junto con el IlaA16G3R1 (4) y el IlaA13G1R1 (1). Por lo general, cada uno de los alelos apareció en un brote de diarrea neonatal diferente; sin embargo, en dos de estas granjas, ambos subtipos se identificaron en el mismo brote de diarrea neonatal.

Una comparativa de nuestros resultados con los señalados en otros estudios realizados en ganado bovino, muestra que la heterogeneidad de los aislados de *C. parvum* para este locus en la zona de estudio se puede considerar modesta, y similar a la observada por otros autores en Argentina, Bélgica, España, Rumanía o los Estados Unidos, donde se identificaron entre 5 y 7 subtipos (Xiao *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.* 2008a; Imre *et al.*, 2013; Del Coco *et al.*, 2014). Por el contrario, otros estudios realizados en Europa han descrito un mayor número de subtipos gp60, alcanzando los 18 (Thompson *et al.*, 2007; Wielinga *et al.*, 2008). Aunque estas diferencias pueden deberse a un mayor número de aislados identificados, algunos autores defienden que derivan de la política de adquisición de animales en un área o país determinado, de modo que la compra de ganado facilitaría la introducción de nuevos subtipos del parásito en una explotación (Peng *et al.*, 2003; Tanriverdi *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2008).



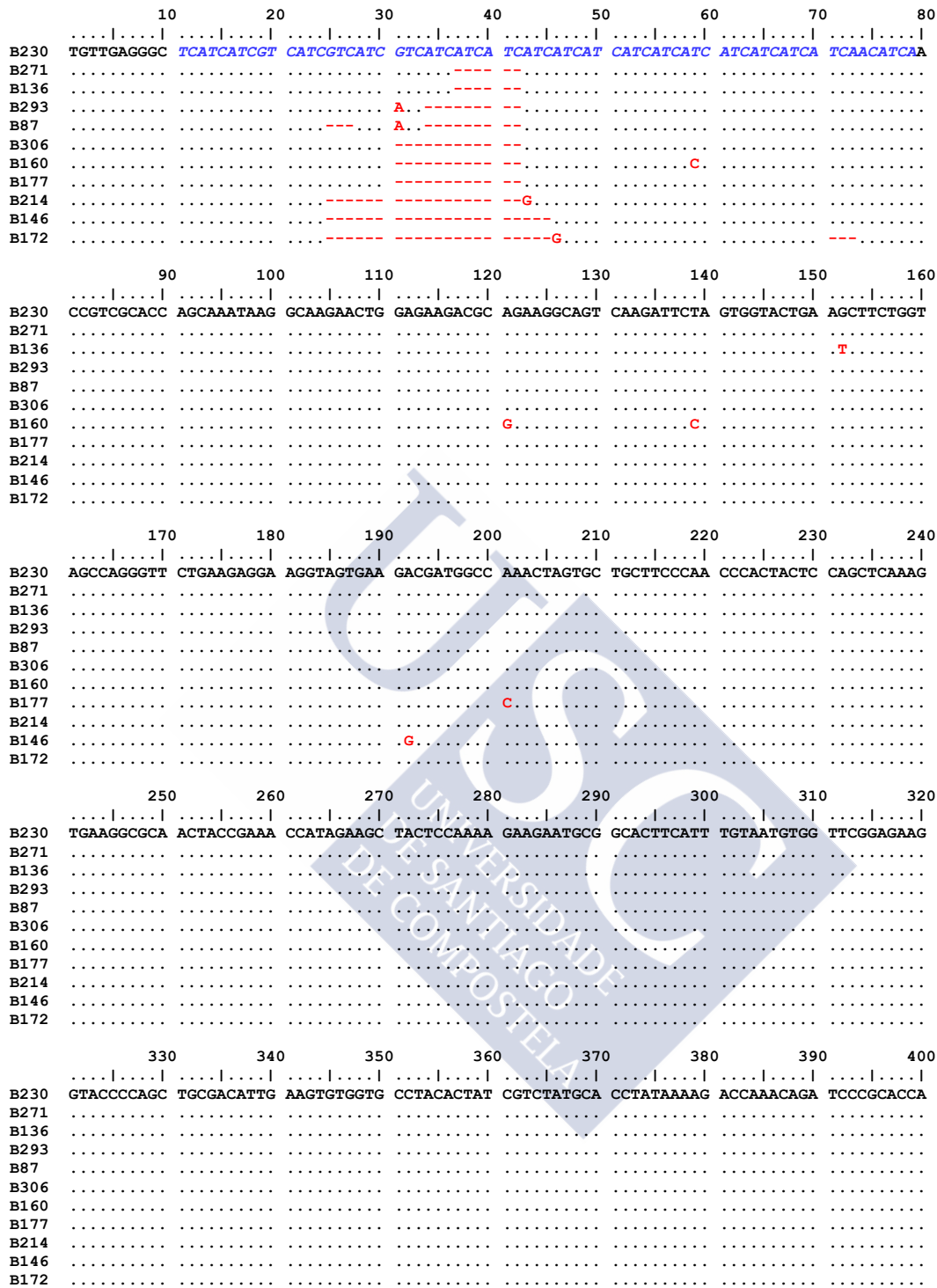


Figura 4.6. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen gp60 de diversos aislados representativos de *C. parvum* identificados en terneros. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado B230 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo y la región microsatélite en azul. Subtipos: B230 (IIaA18G3R1), B271 y B136 (IIaA16G3R1), B293 (IIaA16G2R1), B87 (IIaA16G1R1), B306, B160 y B177 (IIaA15G2R1), B214 (IIaA13G2R1), B146 (IIaA13G1R1) y B172 (IIaA11G2R1).

	410	420	430	440	450	460	470	480
B230	AGATATATCT	CTGGTGAAGT	TACATCTGTA	ACCTTTGAAA	AGAGTGATAA	TACAGTTAAA	ATCAAGGTTA	ACGGTCAGGA
B271	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B136	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B293	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B87	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B306	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B177	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B214	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B146	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B172	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	490	500	510	520	530	540	550	560
B230	TTTCAGCACT	CTCTCTGCTA	ATTCGAAGTAG	TCCAAC7GAA	AATGGCGGAT	CTGCGGGTCA	GGCTTCATCA	AGATCAAGAA
B271	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B136	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B293	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B87	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B306	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B177	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B214	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B146	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B172	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	570	580	590	600	610	620	630	640
B230	GATCACTCTC	AGAGGAAACC	AGTGAAGCTG	CTGCAACCGT	CGATTGTTT	GCCTTTACCC	TTGATGGTGG	TAAAAGAATT
B271	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B136	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B293	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B87	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B306	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B177	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B214	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B146	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B172	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	650	660	670	680	690	700	710	720
B230	GAAAGTGGCTG	TACCAAACGT	CGAAGATGCA	TCTAAAAGAG	ACAAGTACAG	TTTGGTTGCA	GACGATAAAC	CTTTCTATAC
B271	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B136	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B293	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B87	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B306	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B177	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B214	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B146	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B172	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	730	740	750	760
B230	CGGCGCAAAC	AGCGGCACTA	CCAATGGTGT	CTACAGGT
B271	.....	.....	.....	.....
B136	.....	.....	.....	.....
B293	.....	.....	.....	.....
B87	.....	.....	.....	.....
B306	.....	.....	.....	.....
B160	.....	.....	.....	.....
B177	.....	.....	.....	.....
B214	.....	.....	.....	.....
B146	.....	.....	.....	.....
B172	.....	.....	.....	.....

Figura 4.6. (Continuación)

La mayoría de los subtipos identificados en terneros mostraron una homología del 100% con los aislados de referencia de animales o humanos depositados en el GenBank, a excepción de un aislado del subtipo IIAA16G3R1 (B136) y dos del IIAA15G2R1 (B160 y B177), que presentaron mutaciones en la región no microsatélite del gen (Figura 4.6). Así, el aislado B136 mostró una transversión en la posición 152 (T x G), que se tradujo en un

cambio en el aminoácido codificado (alanina a serina). Por su parte, el aislado B177 presentó otra transversión (C x A) en la posición 201, aunque no generó cambios en el aminoácido codificado (prolina). El aislado B160 mostró 4 transiciones (Figura 4.6), aunque una de ellas se localizó en la región microsátelite (C x T en la posición 59), lo que supuso un cambio de serina a prolina; otra transición (G x A) en la posición 441 también generó un cambio en la codificación del aminoácido (de arginina a lisina). Las otras dos mutaciones (posiciones 121 y 139) no generaron cambios en el aminoácido codificado (alanina y serina, respectivamente).

Los tres aislados pertenecientes al subtipo IIaA13G1R1 fueron identificados como un nuevo subtipo no descrito en la bibliografía en ese momento, y su secuencia fue depositada en el GenBank con el número de acceso GU111578. Cabe destacar la presencia de una transición (G en vez de A) en la posición 192 (Figura 4.6). Esta mutación da lugar a un cambio en el aminoácido codificado, que pasa de ácido aspártico a Glicina.

El análisis subgenotípico confirmó que el alelo IIaA15G2R1 fue el más prevalente y ampliamente distribuido en los terneros, puesto que se identificó en el 80,4% de las granjas de ganado vacuno positivas a *C. parvum*. Este subtipo está considerado como uno de los principales subtipos responsables de criptosporidiosis en humanos (Glaberman *et al.*, 2002; Chalmers *et al.* 2005; Sulaiman *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006) y una de las variantes genéticas de *C. parvum* más prevalentes en terneros de Europa y Norte América (Peng *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007; Broglia *et al.*, 2008; O'Brien *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008a; Wielinga *et al.*, 2008; Brook *et al.*, 2009). Por ello, estos animales pueden constituir una importante fuente de infección para el ser humano.

El segundo subtipo más frecuente de *C. parvum* fue el IIaA16G3R1, que se detectó en el 12,9% y 12,6% de los aislados y granjas positivas, respectivamente. Este subtipo se encuentra también ampliamente distribuido en ganado vacuno, pues se ha identificado en Europa (España, Francia, Holanda, Reino Unido), América (Canadá, EE.UU.) o Australia (Strong *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2003; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Brook *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008a; Wielinga *et al.*, 2008; Rieux *et al.*, 2013). Aunque algunos estudios, sobre todo en España y Francia, lo señalan como el segundo subtipo de *C. parvum* más prevalente en terneros (Trotz-Williams *et al.*, 2006; Quílez *et al.*, 2008a; Rieux *et al.*, 2013), generalmente su identificación se restringe a unos pocos aislados, por lo que su papel zoonótico no parece ser importante. De hecho, su participación en casos humanos se reduce a casos esporádicos (Trotz-Williams *et al.*, 2006; Zintl *et al.*, 2009).

Nuestros resultados confirman la escasa importancia del subtipo IIaA18G3R1 en ganado vacuno de nuestro País, ya que se detectó únicamente en 4 muestras de dos explotaciones cercanas entre sí y localizadas en el noreste de Galicia. Estos datos coinciden

con los obtenidos por Quílez *et al.* (2008a) en terneros del norte de España, donde se identificó únicamente en 8 aislados de un total de 140; también se observó en un escaso número de muestras procedentes de vacuno de Canadá (Trotz-Williams *et al.*, 2006). Sin embargo, este subtipo se ha señalado como el más frecuente en ganado vacuno de otros países como Irlanda (Thompson *et al.*, 2007) y Australia (Waldron *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2012; Abeywardena *et al.*, 2013) y uno de los más comunes en bóvidos de Nueva Zelanda (Shrestha *et al.*, 2014). Dados los elevados porcentajes de infección por este subtipo en humanos de estos países, donde también es el más prevalente (Jex *et al.*, 2008; Zintl *et al.*, 2009, 2011; Ng *et al.*, 2010, 2012; Waldron *et al.*, 2011), la transmisión zoonótica podría ser la responsable de la aparición de brotes esporádicos de criptosporidiosis en humanos en estas áreas.

El resto de subtipos (IIaA11G2R1, IIaA13G1R1, IIaA13G2R1, IIaA16G1R1 y IIaA16G2R1) fueron claramente minoritarios, ya que cada uno se identificó en menos de 4 aislados pertenecientes a 1-3 explotaciones (Tabla 4.7); sin embargo, todos ellos poseen potencial zoonótico, pues se han detectado previamente en humanos, aunque generalmente en un reducido número de aislados (Jex *et al.*, 2008; Soba y Logar, 2008; Zintl *et al.*, 2009, 2011; Ng *et al.*, 2010; De Chierico *et al.*, 2011; Waldron *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2012; Del Coco *et al.*, 2014; Koehler *et al.*, 2014; Lassen *et al.*, 2014; Lobo *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2014).

Cabe destacar que este trabajo constituye la primera cita mundial del subtipo IIaA13G1R1 en ganado vacuno. Su presencia en tres explotaciones pertenecientes a las provincias de Pontevedra y Lugo, incluyendo una localizada en una zona de montaña de difícil acceso, así como su reciente identificación en corderos, cabritos y jabalíes de nuestra Comunidad Autónoma (García-Preseido *et al.*, 2013) sugiere una amplia distribución en el noroeste de la Península Ibérica. Por el contrario, el IIaA16G1R1 presenta una distribución más global, habiéndose identificado en vacuno de América (Argentina y Canadá) y Europa del Este (Eslovenia, Estonia, Hungría, República Checa, Rumanía), donde es especialmente importante (Trotz-Williams *et al.*, 2006; Plutzer y Karanis, 2007; Soba y Logar, 2008; Ondrakova *et al.*, 2009; Kvac *et al.*, 2011; Imre *et al.*, 2013; Del Coco *et al.*, 2014; Lassen *et al.*, 2014). El resto (IIaA11G2R1, IIaA13G2R1 y IIaA16G2R1) se han identificado en un reducido número de bovinos, por lo parecen desempeñar un papel poco relevante en la etiología de la criptosporidiosis en terneros (Alves *et al.*, 2003, 2006; Wu *et al.*, 2003; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008a; Soba y Logar, 2008).

En **pequeños rumiantes** son escasos los estudios previos sobre la variabilidad intraespecífica de *C. parvum* y, en general, se han realizado utilizando un reducido número de muestras. Hasta el momento únicamente se han subtipado, para el gen gp60, 199 aislados de *C. parvum* procedentes de ganado ovino de Europa, Brasil, China y Papúa

Nueva Guinea y 30 de caprino de Bélgica, España y Papúa Nueva Guinea (Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Connelly *et al.*, 2013; Imre *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Paz e Silva, 2014; Yang *et al.*, 2014). En nuestro estudio, la PCR que amplifica un fragmento de  $\approx 850$  pb del gen de la glicoproteína de 60 kDa (gp60) fue positiva en 29 de las 32 muestras de corderos y en 59 de las 61 procedentes de cabritos en las que, previamente, habíamos identificado *C. parvum*. Tras el análisis de los resultados de secuenciación, se obtuvieron 26 secuencias legibles para el ganado ovino y 58 para el caprino.

La comparación de las secuencias obtenidas con aquellas depositadas en el GenBank, reveló que los aislados de *C. parvum* que infectan al ganado ovino y caprino de Galicia presentan una baja diversidad genética, puesto que sólo se detectaron cinco subtipos (Tabla 4.6); cuatro de ellos (IIaA13G1R1, IIaA14G2R1, IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1) pertenecieron a la familia alélica IIa y se identificaron en las dos especies de pequeños rumiantes estudiadas. Además, en los cabritos, se identificó un único subtipo perteneciente a la familia IId (IIdA17G1). Esta la primera vez que se citan los subtipos IIaA13G1R1, IIaA14G2R1 y IIaA16G3R1 en ganado ovino y caprino. Debido a que todas las muestras procedían de animales con diarrea, estos subtipos deben considerarse patógenos. Estos resultados difieren, en general, de los obtenidos en pequeños rumiantes por diferentes autores (Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Yang *et al.*, 2014), puesto que en los trabajos en los que se subtiparon un número elevado de aislados de *C. parvum*, predominaron los subtipos pertenecientes a la familia IId. A la luz de estos resultados, algunos autores sugirieron que cuando en una zona en particular coexisten poblaciones de *C. parvum* pertenecientes a las familias IIa y IId, los subtipos IIa son más frecuentes en ganado vacuno y los IId en pequeños rumiantes (Quílez *et al.*, 2008a, b; Xiao, 2010).

Tabla 4.8. Distribución de los subtipos gp60 de *C. parvum* procedentes de corderos de Galicia

	Nº aislados	Nº explotaciones
IIaA13G1R1	1/26	1
IIaA14G2R1	1/26	1
IIaA15G2R1	16/26	6
IIaA16G3R1	8/26	2

Así, en España nuestros resultados contrastan con los observados en Aragón (Quílez *et al.*, 2008b) en granjas de pequeños rumiantes en los que hubo brotes de diarrea neonatal, ya que hallaron un claro predominio de subtipos gp60 pertenecientes a la familia alélica IId de *C. parvum* (98%). Estos autores hallaron una mayor variabilidad genética en los aislados de *C. parvum* procedentes de corderos, pues detectaron 11 subtipos diferentes, aunque el número de aislados identificados fue muy superior (137) al del presente estudio. Por el contrario, la variabilidad genética de *C. parvum* en ganado caprino de Aragón fue similar a la de los cabritos gallegos, pues se observaron 4 subtipos de la familia IId, aunque se debe destacar que sólo se caracterizaron 17 aislados (Quílez *et al.*, 2008b). Las marcadas diferencias en la diversidad e identidad de los subtipos de *C. parvum* en ganado

ovino y caprino en España, podrían estar relacionadas con las prácticas de manejo. Así, la presencia casi exclusiva de subtipos de la familia IIa en las tres especies de rumiantes domésticos de Galicia podría asociarse con el manejo tradicional de estos animales, que a veces comparten pastos e incluso instalaciones con el ganado vacuno, puesto que a veces comparten pastos e incluso instalaciones. Además, debido al menor grado de profesionalización y especialización de las explotaciones de ganado ovino y caprino en nuestra Comunidad, pueden favorecer la aparición y diseminación de brotes de criptosporidiosis. De todos modos, estas diferencias deberían estudiarse con mayor profundidad.

Tabla 4.9. Distribución de los subtipos gp60 de *C. parvum* procedentes de cabritos de Galicia

	Nº aislados	Nº explotaciones
IIaA13G1R1	5/58	4
IIaA14G2R1	1/58	1
IIaA15G2R1	38/58	8
IIaA16G3R1	11/58	1
IIaA17G1	3/58	2

La mayoría de los subtipos identificados en pequeños rumiantes coinciden totalmente con los aislados de referencia procedentes de animales o humanos depositados en el GenBank; únicamente 5 aislados pertenecientes a los subtipos IIaA15G2R1 (2 de origen ovino –L170 y L173- y 2 caprino –L208 y L302-) y IIaA13G1R1 (L307, de origen ovino) mostraron mutaciones con respecto a las secuencias de referencia. Los dos aislados IIaA15G2R1 procedentes de corderos presentaron una transición en la zona próxima al extremo 3' de la cadena (Figura 4.7), lo que generó un cambio en el aminoácido codificado (treonina en vez de alanina para la muestra L170 y alanina en vez de treonina para la L173). El aislado de origen caprino L208 presentó 5 mutaciones, aunque únicamente la transversión (A x T) localizada en la posición 635 dio lugar a un cambio en el aminoácido codificado (isoleucina por asparagina). La muestra L302, obtenida de un cabrito, mostró dos mutaciones, aunque únicamente la transición (G x A) en la posición 136 se tradujo en un cambio en el aminoácido codificado (serina por glicina). Por último, el aislado ovino L307 presentó una transición (T x C) en la región microsatélite, lo que implica la codificación de una leucina en vez de una serina.

En las granjas de pequeños rumiantes, al igual que en las de ganado vacuno, en las que previamente se había identificado *C. parvum*, el subtipo más frecuente y con mayor distribución fue el IIaA15G2R1 (Tablas 4.8 y 4.9) presente en el 60% y 50% de los rebaños ovinos y caprinos, respectivamente. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en diferentes estudios, que señalan que, dentro de la familia IIa, el subtipo zoonótico IIaA15G2R1 es el más frecuente en ganado ovino y caprino, mostrando además una amplia distribución, pues se ha detectado en Bélgica, Brasil, China, España, Italia, Papúa Nueva Guinea, Portugal y Reino Unido (Chalmers *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006;

Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Paz e Silva, 2014; Yang *et al.*, 2014).

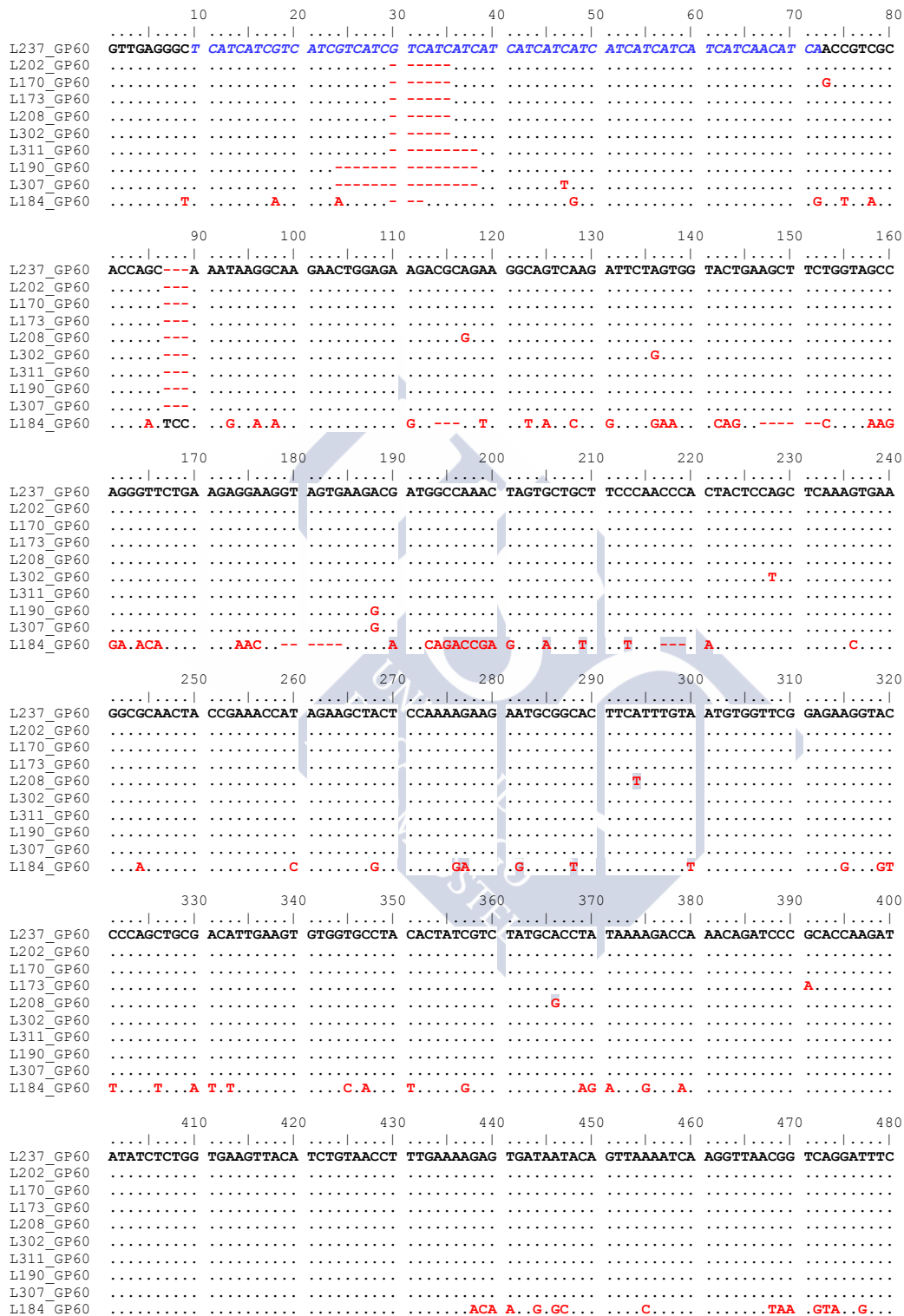


Figura 4.7. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen gp60 de diversos aislados representativos de *C. parvum* identificados en corderos y cabritos. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado L237 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de

nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo y la región microsatélite en azul. Subtipos: L237 (IIaA16G3R1), L202, L170, L173, L208 y L302 (IIaA15G2R1), L311 (IIaA14G2R1), L190 y L307 (IIaA13G1R1) y L184 (IIaA17G1).

	490	500	510	520	530	540	550	560
L237_GP60	AGCACTCTCT	CTGCTAATTC	AAGTAGTCCA	ACTGAAAATG	GCGGATCTGC	GGGTCAGGCT	TCATCAAGAT	CAAGAAGATC
L202_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L170_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L173_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L208_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L302_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L311_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L190_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L307_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L184_GP60	.....T.....	.....A.....GC.....	.....	.....A.....	.....	.....A.....	.....T.....	.....C.....

	570	580	590	600	610	620	630	640
L237_GP60	ACTCTCAGAG	GAAACCAGTG	AAGCTGCTGC	AACCGTCGAT	TTGTTGCTT	TTACCCTTGA	TGGTGGTAAA	AGAATTGAAG
L202_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L170_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L173_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L208_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.....	.....A.....
L302_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L311_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L190_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L307_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L184_GP60	.....GG.T.....	.....A.....	.....---	.....	.....	.....C.....	.....	.....

	650	660	670	680	690	700	710	720
L237_GP60	TGGCTGTACC	AAACGTCGAA	GATGCATCTA	AAAGAGACAA	GTACAGTTTG	GTTGCAGACG	ATAAACCTTT	CTATACCGGC
L202_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L170_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L173_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L208_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L302_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L311_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L190_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L307_GP60	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L184_GP60	.....T.....	.....G.A.....	.....	.....A.C.....	.....	.....	.....	.....

	730	740
L237_GP60	GCAAACAGCG	GCACTACCAA TGGT
L202_GP60	.....	.....
L170_GP60	.....	.....
L173_GP60	.....	.....
L208_GP60	.....	.....
L302_GP60	.....	.....
L311_GP60	.....	.....
L190_GP60	.....	.....
L307_GP60	.....	.....
L184_GP60	.....T.....T.....	.....G.C.TG.....

Figura 4.7. (Continuación)

El resto de subtipos identificados se detectaron en un pequeño número de granjas, siempre inferior a 5. Coincidiendo con lo observado en ganado vacuno, el segundo subtipo más prevalente en pequeños rumiantes fue el IIaA16G3R1, aunque solo se detectó en tres rebaños (2 de ovino y 1 de caprino), siendo esta la primera vez que se cita el subtipo IIaA16G3R1 en ganado ovino y caprino. En general, este subtipo no es muy común en el ganado vacuno y parece no ser demasiado importante desde el punto de vista zoonótico, ya que únicamente se ha identificado en un reducido número de muestras de terneros y en un caso de criptosporidiosis humana (Strong *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2003; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Wielinga *et al.*, 2008; Brook *et al.*, 2009). Sin embargo, el hallazgo de este subtipo como el segundo alelo más frecuente en ganado vacuno de Galicia, así como en terneros en el norte de España (Quílez *et al.* 2008a) sugiere que podría tener una amplia distribución en explotaciones de rumiantes en España.

Un hallazgo significativo fue la presencia del nuevo subtipo IIaA13G1R1 en las tres especies de rumiantes estudiadas. Nuestros resultados sugieren que la presencia de este alelo está restringida a un área geográfica muy limitada, ya que únicamente se ha identificado en animales explotados en Galicia. Este subtipo, no fue muy abundante y su distribución fue reducida, ya que se detectó en 4 granjas de caprino, 3 de vacuno y 1 de ovino. Además, recientemente se ha identificado en jabalíes de Galicia (García-Presedo *et al.*, 2013) lo que podría contribuir a su diseminación. Asimismo, se ha comprobado que este subtipo posee potencial zoonótico, al haberse identificado en una persona inmunodeprimida con criptosporidiosis en Malasia (Iqbal *et al.*, 2012).

El resto de los subtipos hallados en pequeños rumiantes, incluido el perteneciente a la familia IId, fueron claramente minoritarios, aunque también poseen potencial zoonótico (Plutzer y Karanis, 2009).

Aunque el subtipo IIdA17G1 se identificó únicamente en un reducido número de aislados procedentes de ganado caprino, Quílez *et al.* (2008b) comprobaron que era el subtipo más frecuente en corderos y cabritos de Aragón. Este subtipo se ha detectado en muestras humanas en Portugal (Alves *et al.*, 2006), lo que demuestra su potencial zoonótico.

El análisis global de estos resultados revela que la dinámica de la transmisión de la criptosporidiosis en las explotaciones de pequeños rumiantes es muy similar a la observada en ganado vacuno, puesto que las tres especies comparten los subtipos más prevalentes. De esta manera, la notable presencia de subtipos zoonóticos (IIa) comunes en el hombre en las explotaciones de ganado vacuno, ovino y caprino de Galicia, permite concluir que los rumiantes domésticos de nuestra Comunidad Autónoma constituyen una importante fuente de contagio para el hombre, pudiendo jugar un papel importante en la epidemiología de la criptosporidiosis humana.

Al analizar la presencia de varios subtipos en aquellas granjas de ganado ovino donde se detectaron más de dos aislados de *C. parvum*, se observó que únicamente en una se identificaron dos alelos, aunque en brotes diferentes: en febrero de 2009 se halló el IIaA16G3R1 y en enero de 2011 el IIaA15G2R1. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de las técnicas de subtipado para conocer las fuentes de contagio en los brotes de criptosporidiosis y refleja el carácter endémico de la infección en las explotaciones de ganado ovino, que se corresponde con el sistema de explotación que haya en la zona de estudio. Según Torres (2010), en las explotaciones de ovino los partos se producen en épocas concretas del año, lo que permite el nacimiento, en un corto período de tiempo, de un alto número de animales receptivos al parásito que, en general, están hacinados y por lo tanto en estrecho contacto, todo lo cual proporciona las condiciones idóneas para la rápida diseminación de un único subtipo de *C. parvum* que proviene de los primeros corderos que se hayan infectado.

En ganado caprino, aunque en la mayoría de las granjas se identificó un único subtipo, en tres explotaciones se detectaron múltiples subtipos de *C. parvum*, siempre asociados al mismo brote de diarrea neonatal. En dos granjas se observaron dos subtipos (IIaA15G2R1 + IIaA13G1R1 y IIaA13G1R1 + IIdA17G1) y en una tres (IIaA15G2R1 + IIaA14G2R1 + IIaA13G1R1).

#### 4.2. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *C. parvum* EN TERNEROS Y CORDEROS DE GALICIA MEDIANTE ANÁLISIS MULTILOCUS (ML1, ML2 Y GP60)

Los análisis multilocus que emplean regiones micro y minisatélite se han empleado recientemente en el estudio de la estructura de la población y la dinámica de transmisión de *Cryptosporidium* spp. Sin embargo, la diversidad de técnicas empleadas para la amplificación e identificación de los alelos, así como la falta de información sobre su fiabilidad y tipabilidad ha limitado su empleo para poder comparar los resultados hallados en diferentes laboratorios.

##### 4.2.1. Análisis de las regiones ML1 y ML2 mediante secuenciación, electroforesis capilar y geles de alta resolución

Para la región microsatélite ML1, la mayor tipabilidad se observó con la electroforesis capilar ( $T= 0,95$ ), seguido por la electroforesis en geles Spreadex® de alta resolución ( $T= 0,93$ ) (Tabla 4.10), mientras que, la tipabilidad obtenida con la secuenciación fue la más reducida ( $T= 0,76$ ) debido a que 3 muestras no amplificaron y 7 generaron secuencias ilegibles.

Tabla 4.10. Valores de tipabilidad y poder discriminatorio para los tres marcadores empleados y su combinación (MLT)

Marcador	Técnica	Tipabilidad (positivos)	Poder discriminatorio (IC 95%)
ML1	CE	0.95 (39/41)	0.148 (0.001-0.296)
	Spreadex	0.93 (38/41)	0.102 (0.000-0.229)
	Secuenciación	0.76 (31/41)	0.125 (0.000-0.275)
ML2	CE	0.98 (40/41)	0.810 (0.755-0.866)
	Spreadex	0.95 (39/41)	0.725 (0.645-0.804)
gp60	Secuenciación	0.90 (37/41)	0.359 (0.195-0.523)
MLT		0.90 (37/41)	0.833 (0.773-0.893)

Con la electroforesis capilar (EC) se identificaron 3 alelos para el ML1, cuyos tamaños fueron 242 pb, 233 pb y 230 pb (Tabla 4.11; tamaños ajustados). Con las otras dos técnicas se identificaron 2 alelos: el primero, de un tamaño de 238 pb, correspondió con el alelo de 242 pb observado con la EC y su secuencia fue idéntica a la ML1-238 (número de acceso en GenBank AJ249582). El segundo, de 226 pb y secuencia idéntica a la ML1-226 (número de acceso AJ249583), correspondió con el alelo de 230 pb detectado mediante

EC. Sin embargo, el fragmento de 233 pb identificado con la EC no pudo compararse con los resultados obtenidos mediante secuenciación o electroforesis en geles de alta resolución, puesto que resultaron negativos.

Para el marcador ML1, los tamaños de los fragmentos obtenidos con las tres técnicas mostraron un alto grado de correlación: se detectaron fragmentos de igual tamaño con la secuenciación y la electroforesis en geles de alta resolución, mientras que los tamaños obtenidos con la EC fueron siempre 4 pb más largos. Empleando el índice Hunter-Gaston se comprobó que el poder discriminatorio para el ML1 fue bajo ( $< 0,15$ ) independientemente de la técnica utilizada (Tabla 4.10).

Para la región microsatélite ML2, la mayor tipabilidad también se obtuvo con la EC (Tabla 4.10), ya que 40 de las 41 muestras se asignaron a un subtipo ( $T= 0,98$ ). La tipabilidad observada para la electroforesis en geles Spreadex® de alta resolución fue un poco menor de 0,95, debido a que en la PCR dos muestras no amplificaron. Por el contrario, ninguno de los aislados pudo caracterizarse con exactitud empleando la secuenciación ( $T= 0$ ) a causa del “tartamudeo” de la polimerasa, que se debe a que la enzima genera errores al copiar la secuencia de ADN, dando lugar a productos de amplificación que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. Todo ello da lugar a interferencias en el cromatograma que impiden la precisa asignación de las bases.

Este artefacto es más frecuente cuanto más pequeña sea la unidad de repetición y cuanto mayor sea el número de repeticiones (Shinde *et al.*, 2003; Pasqualotto *et al.*, 2007); por ello, este artefacto se encontró con frecuencia para el ML2, cuya región microsatélite está formada por un dinucleótido, mientras que no se observó para el ML1 que está integrado por un trinucleótido.

Mediante EC se identificaron 8 alelos en la región ML2, mientras que con la electroforesis en geles de alta resolución se detectaron únicamente seis (Tabla 4.11), aunque, con este último método, la determinación del tamaño de los fragmentos de más de 201 pb no resultó fiable, debido de nuevo a la presencia de bandas “tartamudas”, que dificultaron notablemente la lectura de los geles (Figura 4.8).

Únicamente dos muestras, cuyo tamaño para el alelo ML2 fue pequeño (176 pb y 201 pb), no presentaron dudas en su identificación. Mediante la EC también se observó el efecto del tartamudeo de la polimerasa en la región ML2; sin embargo, los picos “tartamudos” se observaron en orden decreciente en tamaño e intensidad a partir del pico principal, que se mostró bien definido y permitió una asignación fiable del tamaño de los alelos.

Tabla 4.11. Subtipos gp60, ML1 y ML2 de *C. parvum* en terneros y corderos empleando diferentes técnicas

Muestra*	Subtipo GP60	Microsatélite ML1			Microsatélite ML2**		MLT
		CE <sup>+</sup>	Spreadex	Secuenciación	CE <sup>+</sup>	Spreadex	
B-01	IlaA15G2R1	238	238	ND <sup>#</sup>	231	-231	1
B-14	IlaA15G2R1	ND	238	238	231	-231	1
B-17	IlaA15G2R1	238	238	ND	231	-231	1
B-18	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-231	1
B-22	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-231	1
B-42	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-231	1
B-43	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-231	1
B-48	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-231	1
B-50	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-231	1
B-51	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-233	1
B-54	IlaA15G2R1	238	238	238	231	-231	1
L-101	ND	238	ND	ND	231	-225	-
B-27	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
B-29	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
B-41	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
B-46	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
B-47	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
B-58	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
B-59	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
L-10	IlaA15G2R1	238	238	238	225	-225	2
L-95	IlaA16G3R1	238	238	238	227	-225	3
L-96	IlaA16G3R1	238	238	238	227	-225	3
L-97	IlaA16G3R1	238	238	238	227	-225	3
L-100	IlaA16G3R1	238	238	238	227	-225	3
L-102	IlaA16G3R1	238	238	238	227	ND	3
L-103	IlaA16G3R1	238	238	238	227	-225	3
L-104	IlaA16G3R1	238	238	238	227	-225	3
B-02	IlaA15G2R1	238	238	238	227	-229	4
B-15	IlaA15G2R1	ND	238	238	227	-229	4
B-16	IlaA15G2R1	238	238	ND	227	-231	4
B-44	IlaA15G2R1	238	238	ND	233	-233	5
B-52	IlaA15G2R1	238	238	ND	233	-233	5
L-23	IlaA15G2R1	238	238	238	233	-233	5
B-19	IlaA15G2R1	238	238	ND	229	-229	6
B-40	IlaA15G2R1	238	238	238	229	-231	6
L-128	ND	238	238	ND	229	-225	-
L-127	ND	238	ND	ND	ND	ND	-
L-22	IlaA15G2R1	238	238	238	235	-233	7
B-61	IlaA13G1R1	226	226	226	201	201	8
B-28	IlaA15G2R1	226	226	226	233	-233	9
L-04	ND	229	ND	ND	176	176	-

\*B, terneros; L, corderos; \*\*No se caracterizaron aislados mediante secuenciación del ML2; \* Valores ajustados; # ND: Sin datos; - Estimado.

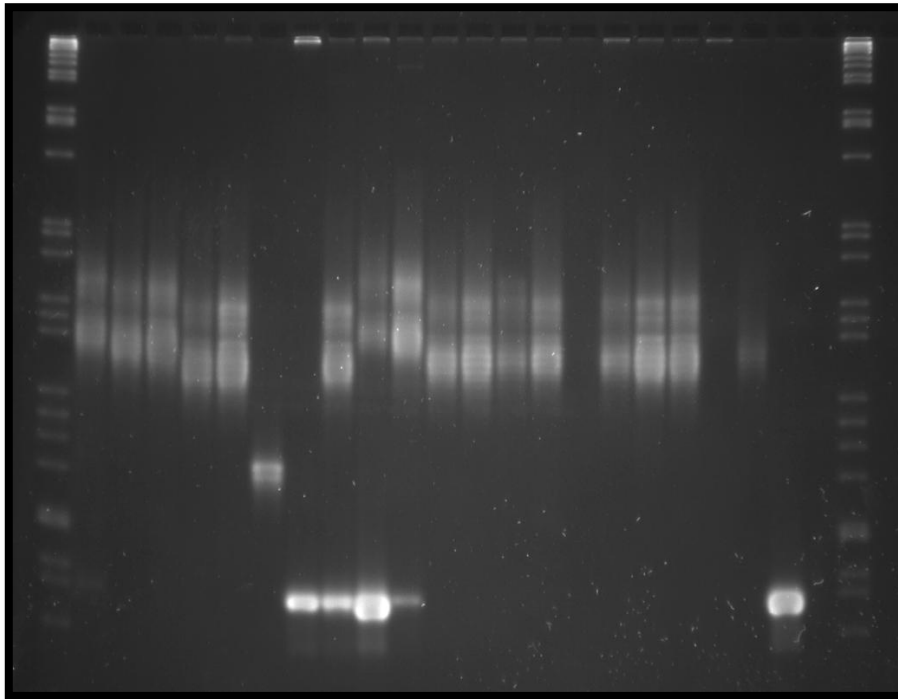


Figura 4.8. Electroforesis de los productos de PCR para el ML2 en un gel Spreadex. Obsérvense la presencia de “bandas tartamudas” en los fragmentos de mayor tamaño, lo que dificulta su asignación a un alelo determinado.

Al comparar el tamaño de los alelos generados con ambas técnicas para el ML2, se observó que los obtenidos con la EC fueron entre 0 y 10 pb más largos que con la electroforesis en geles de alta resolución, siendo las discrepancias más frecuentes las de 4 pb (64,1% de los aislados), 6 pb (17,9%) y 2 pb (10,2 pb) ( $\bar{x} = 4,3 \pm 1,69$  pb). Varios trabajos han señalado discrepancias en el tamaño de los alelos obtenidos mediante EC y otras técnicas como la secuenciación (Delmotte *et al.*, 2001; Pasqualotto *et al.*, 2007), lo que dificulta la realización de comparaciones directas con otros estudios. La presencia de una diferencia constante de 4 pb entre la EC y la secuenciación permitió establecer un factor de corrección para el locus ML1. Aunque esta discrepancia fue también la más común para el locus ML2, al comparar el tamaño del alelo obtenido con la EC y la electroforesis en geles de alta resolución, se observaron diferencias de hasta 10 pb; esta mayor variabilidad en las discrepancias para el ML2 es consecuencia de una mayor dificultad para realizar la correcta lectura de los geles y la identificación de los alelos, debido a la presencia de bandas tartamudas.

Varios autores han constatado variaciones en el tamaño de los productos de la PCR al comparar los resultados de la EC obtenidos en diferente laboratorios, que pueden deberse a varios factores que influyen sobre la esta técnica, como son las diferentes propiedades de migración de los estándares y de los fragmentos amplificados, relacionados con la

composición nucleotídica de las secuencias; por ello es necesario que cada equipo, normalice el tamaño de los fragmentos para que se pueda realizar una correcta comparación de los alelos (Mansfield *et al.*, 1996; Pasqualotto *et al.*, 2007; Deemer y Nelson, 2010). En una reciente investigación se llevó a cabo el tipado multilocus de *C. parvum*, procedentes de terneros explotados en España, mediante el empleo de 6 marcadores micro y minisatélite, observando que, para la mayoría de los loci, la EC generaba alelos de mayor tamaño que la secuenciación (Quílez *et al.*, 2011). Por el contrario, en otros estudios se han obtenido resultados similares cuando se compara la secuenciación y la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque no se describen estas comparaciones de manera pormenorizada (Alves *et al.*, 2003; Mallon *et al.*, 2003b; Leoni *et al.*, 2007).

Los valores del índice de discriminación para el ML2 fueron superiores con la EC (Tabla 4.10). Además, al comparar ambas regiones microsatélite, las cifras del índice Hunter-Gaston indicaron que, independientemente de la técnica empleada, el marcador ML2 permite una mayor discriminación que el ML1.

Finalmente, el análisis de costes demostró que la EC es aproximadamente un 70% más cara que la electroforesis en geles de alta definición, mientras que la secuenciación bidireccional comercial es la técnica más cara (aproximadamente un 500% más que las otras técnicas).

En resumen, la electroforesis capilar mostró mejores valores de tipabilidad y poder discriminatorio en el análisis de fragmentos de las regiones microsatélite ML1 y ML2 y su coste es asumible. Los alelos fueron fácilmente identificables. Para el ML1 se observó un único pico, mientras que para el ML2 se observaron picos “tartamudos” que no impidieron determinar de manera sencilla el tamaño de los fragmentos. Por ello, mediante la EC se consiguió tipar la mayoría de los aislados.

La electroforesis en geles Spreadex® de alta resolución fue la técnica más rápida y barata, ofreciendo también elevados valores de tipabilidad y poder discriminatorio que fueron similares a los obtenidos mediante EC. Sin embargo, la presencia de “bandas tartamudas” de similar intensidad, dificultó de manera notable la asignación de aislados a un determinado alelo ML2. De hecho, nuestros resultados revelan que debido a estas dificultades, la electroforesis en geles de alta resolución no es una técnica suficientemente precisa para realizar el análisis del tamaño de los fragmentos para este marcador.

Con la secuenciación se obtuvieron los valores más bajos de tipabilidad, requirió mayor tiempo de análisis y es más cara, lo que concuerda con las observaciones de Enemark *et al.* (2002). Esta técnica no permitió tipar el 24% de los aislados para el locus ML1, lo que se debió principalmente a una deficiente calidad de las secuencias que impidieron su lectura; además, fue imposible obtener alguna secuencia para el marcador

ML2. En alelos con largas regiones microsatélite integradas por repeticiones del dinucleótido AG, varios autores señalaron que estas dificultades pueden deberse al “tartamudeo” de la polimerasa, que genera secuencias de diferentes tamaños que se traducen en cromatogramas con picos mixtos, muy difíciles de analizar (Alves *et al.*, 2003; Quílez *et al.*, 2011). Cabe destacar el escaso éxito de los intentos para reducir o eliminar el “tartamudeo” de la polimerasa en secuencias microsatélite integradas por repeticiones cortas (Coticone y Bloch, 2011). Además, nuestros resultados revelan que, la presencia de este artefacto, resulta de mayor dificultad para realizar el análisis de fragmentos para el marcador ML2 que para el ML1.

#### 4.2.2. Subtipo multilocus de aislados de *C. parvum* procedentes de terneros y corderos mediante la combinación del análisis de fragmentos de las regiones ML1 y ML2 y secuenciación de la gp60

Como la EC mostró, en general, los mejores valores de tipabilidad y poder discriminatorio, los resultados obtenidos con esta técnica se utilizaron para realizar el análisis multilocus, combinando el tamaño de los alelos para las regiones ML1 y ML2 con el subtipo gp60. Con objeto de comparar nuestros resultados con los señalados por otros autores que habían empleado secuenciación o electroforesis (verificada con secuenciación), los tamaños obtenidos con la EC se ajustaron mediante la sustracción de 4 pb. Para la región ML1, este valor correspondió con la diferencia de tamaño de los alelos entre la EC y la secuenciación, mientras que para la ML2 fue la discrepancia de tamaño más común entre la EC y la electroforesis en geles de alta resolución, incluyendo las dos muestras que no presentaron dudas para su identificación (Tabla 4.11). Los valores ajustados se combinaron posteriormente con el subtipo gp60 para dar lugar al subtipo multilocus (MLT; Tabla 4.12).

Tabla 4.12. Distribución de los MLTs para los aislados de *C. parvum* procedentes de terneros y corderos. No se les asignó un MLT a aquellos aislados que mostraron un perfil incompleto

MLT	GP60	ML1*	ML2*	Terneros		Corderos	
				Nº aislados	Nº granjas	Nº aislados	Nº granjas
1	IlaA15G2R1	238	231	11	7	0	0
2	IlaA15G2R1	238	225	7	5	1	1
3	IlaA16G3R1	238	227	0	0	7	1
4	IlaA15G2R1	238	227	3	3	0	0
5	IlaA15G2R1	238	233	2	1	1	1
6	IlaA15G2R1	238	229	2	2	0	0
7	IlaA15G2R1	238	235	0	0	1	1
8	IlaA13G1R1	226	201	1	1	0	0
9	IlaA15G2R1	226	233	1	1	0	0
-	-	229	176	0	0	1	1
-	-	238	231	0	0	1	1
-	-	238	229	0	0	1	1
-	-	238	-	0	0	1	1

\* El tamaño de los fragmentos obtenidos mediante CE está ajustado

Teniendo en cuenta que la secuenciación es la técnica considerada “*gold standard*” para el ML1, y debido al elevado nivel de correlación con las otras dos técnicas, en las muestras que resultaron negativas para la EC (B-14, B-15) se emplearon los resultados obtenidos tras el análisis de la secuencia (Tabla 4.10). De este modo, se tiparon 41 muestras; este locus mostró una variabilidad genética muy baja, puesto que sólo permitió identificar 3 alelos (ML1-238, ML1-229 y ML1-226). Además, el ML1-238 fue el más prevalente tanto en terneros (25/27) como en corderos (13/14), puesto que el 93% del total de los aislados mostraron este alelo. Este alelo se ha identificado previamente en animales y humanos en Europa, EE.UU. y Japón (Cacciò *et al.*, 2000, 2001; Mallon *et al.*, 2003a; Huetink *et al.*, 2001; Enemark *et al.*, 2002; Chalmers *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2007, 2008; Leoni *et al.*, 2007; Wielinga *et al.*, 2008). Además, diversos varios autores (Hunter *et al.*, 2007; Chalmers *et al.*, 2005) han comprobado que la presencia de este alelo en humanos está claramente relacionado con el contacto con animales de granja. Con respecto a los otros dos alelos, solo dos terneros mostraron el ML1-226, mientras que el ML1-229, que se describe por primera vez en el presente estudio, aunque se identificó únicamente en un cordero.

Se tiparon un total de 40 muestras para el locus ML2 (Tabla 4.10), hallándose 8 alelos de *C. parvum*: ML2-231 (12 aislados), ML2-227 (10), ML2-225 (8), ML2-233 (4), ML2-229 (3), ML2-235 (1), ML2-201 (1) y ML2-176 (1). Este estudio constituye la primera cita de los dos últimos alelos. Tanto en terneros como en corderos se identificaron cinco alelos (ML2-233, ML2-231, ML2-229, ML1-227 y ML2-225), mientras que dos fueron específicos para el ganado ovino (ML2-235 y ML2-176) y uno para el bovino (ML2-201). El alelo más prevalente en los terneros fue el ML2-231 (40,7%), mientras que el más común en los corderos fue el ML2-227 (70%). Todos los alelos ML2 identificados en este trabajo, exceptuando el ML2-201 y el ML2-235, se han hallado previamente en las personas (Cacciò *et al.*, 2001; Chalmers *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2007, 2008; Wielinga *et al.*, 2008), lo que confirma el potencial zoonótico de los aislados de *C. parvum* obtenidos de rumiantes domésticos en Galicia. Por el contrario, sólo tres de los alelos ML2 identificados en este estudio (ML2-231, ML2-229 y ML2-227), se han detectado previamente en aislados procedentes de animales (Cacciò *et al.*, 2001; Chalmers *et al.*, 2005; Wielinga *et al.*, 2008). Cabe destacar que el único aislado que presentó el nuevo alelo ML2-201, así como un subtipo gp60 poco frecuente (IIaA13G1R1), procedía de una explotación de ganado vacuno de raza Rubia Gallega procedente de una zona montañosa del ayuntamiento de Muras, con escaso contacto con otras granjas. También es remarcable la presencia, en un cordero, de un aislado que mostraba los alelos ML1-229 y ML2-176, no detectados previamente en *C. parvum*, aunque muy comunes en *C. hominis* (Mallon *et al.*, 2003a; Chalmers *et al.*, 2005; Leoni *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2007, 2008). La ausencia de *C. hominis* en esta muestra se confirmó mediante el empleo de una PCR a tiempo real (Lib13) específica para *C. parvum* y *C. hominis* (Tanriverdi *et al.*, 2003), confirmando que estos alelos eran genuinos de *C. parvum*.

Cuando los tamaños de los alelos para los dos marcadores microsatélite obtenidos con la EC se combinaron con los subtipos gp60, se tiparon 37 aislados de *C. parvum* para los tres loci ( $T= 0,90$ ; Tabla 4.12), que se emplearon para el análisis multilocus. Así, se identificaron 9 subtipos multilocus (MLTs). Se observó que el ML2 fue el marcador que presentó un mayor polimorfismo, contribuyendo en mayor medida al poder discriminatorio del análisis multilocus, lo que coincide con estudios previos (Cacciò *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2007, 2008; Quílez *et al.*, 2011), aunque el empleo de otros marcadores diferentes podría proporcionar una mayor discriminación (Robinson y Chalmers, 2012). De este modo, con la EC se identificaron 8 alelos para este único marcador, en comparación con los 9 MLTs identificados tras la combinación de los alelos para los tres loci. En general, el nivel de diversidad genética observado en el presente estudio es similar al hallado previamente en aislados de *C. parvum* procedentes de humanos y rumiantes domésticos en Italia, Reino Unido y Países Bajos (Cacciò *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2007, 2008; Wielinga *et al.*, 2008). Los resultados del análisis multilocus permitieron diferenciar los 29 aislados pertenecientes al subtipo IIA15G2R1 en 7 MLTs. Por el contrario, todos los IIA16G3R1 se asignaron en un solo MLT (MLT3, Tabla 4.12); estos aislados provenían de corderos de una única granja, donde el MLT3 fue el único MLT detectado (Tabla 4.12). Los MLT 7, 8 y 9 también estuvieron restringidos a granjas individuales, y a un único animal. El MLT más frecuente fue el MLT1, detectado en 7 granjas de ganado bovino (Tabla 4.12). En las 9 explotaciones donde se identificaron más de un aislado de *C. parvum*, en 5 se observó un único MLT, mientras que en 4 se hallaron más de uno.

Se observó un mayor número de MLT (Tabla 4.12) en las muestras procedentes de terneros (7 MLT) que en aquellas de origen ovino (4 MLT), aunque esto podría deberse a que se analizaron más muestras de ganado vacuno procedentes de un mayor número de granjas. Los MLT 1, 4, 6, 8 y 9 se detectaron únicamente en terneros, mientras que el MLT 3 y 7 sólo en ovinos. Sólo dos de los 9 MLT se observaron tanto en vacas como en ovejas, lo que demuestra el valor potencial de estos marcadores para el tipado de aislados y su aplicación en estudios epidemiológicos.

Cuando los MLT identificados en terneros y corderos se analizaron en conjunto mediante el algoritmo eBURST (Figura 4.9), se observó un complejo clonal, con el MLT5 como fundador, que incluye a todos los MLT a excepción del MLT8, que es idéntico al MLT9 únicamente para el locus ML1.

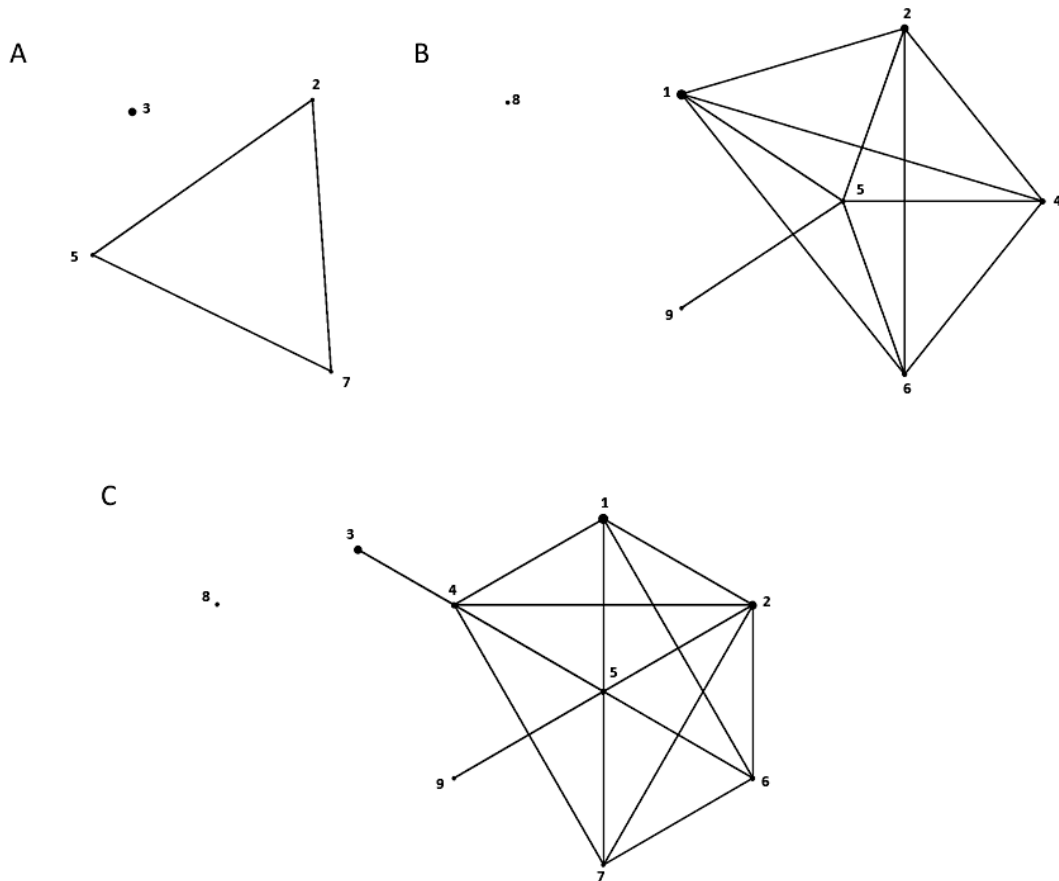


Figura 4.9. Red eBURST para los subtipos multilocus de *C. parvum* hallados en muestras tanto de terneros como de corderos (A; n= 37), sólo corderos (B; n= 10) y sólo terneros (C; n= 27). Los puntos indican los MLTs, con un diámetro proporcional al número de aislados. Las variaciones en un solo locus se han unido con líneas.

El análisis de estos resultados revela que la mayoría de los MLT identificados en el ganado bovino y ovino de Galicia evolucionaron a partir del MLT5, uno de los dos MLT identificados en ambas especies animales, lo que apoya su papel como potencial ancestro. Los resultados de este análisis también confirman la singularidad del único aislado identificado como MLT8, ya que fue el único MLT considerado como un subtipo atípico. Cuando se analizaron únicamente los 4 MLT identificados en los corderos, tres de ellos formaron un complejo clonal. Aunque la mayoría de los aislados de origen ovino (7/10) pertenecían al MLT3, éste difería del resto en dos loci y se identificó como un valor atípico. Cuando los 7 MLT identificados en terneros se analizaron de forma independiente, 6 formaron un complejo clonal de variantes para un único locus, agrupándose alrededor del fundador MLT5, mientras que el MLT8 se identificó como un MLT atípico. No obstante, para realizar un análisis estadístico más exhaustivo y detallado, se deberían analizar un mayor número de muestras procedentes de más granjas.

Un análisis global de nuestros resultados indica que se puede alcanzar una alta discriminación mediante el empleo del subtipado multilocus, aunque es necesario

seleccionar cuidadosamente los marcadores y las técnicas a emplear. La secuenciación se considera la técnica “*gold standard*” para realizar estos análisis, permitiendo además detectar polimorfismos de nucleótidos y asignar correctamente un aislado a un alelo determinado; sin embargo la tipabilidad puede ser baja. La EC fue la técnica con mayor sensibilidad y poder discriminatorio para realizar el subtipado de aislados de *C. parvum*, aunque el tamaño de los fragmentos debe calibrarse mediante la comparación con material secuenciado junto con marcadores adecuados.







## **5. CONCLUSIONES**



De los resultados obtenidos en este trabajo, se extraen las siguientes conclusiones:

1ª.- En Galicia, *Cryptosporidium* spp es un parásito muy prevalente en granjas de rumiantes domésticos con brotes de diarrea neonatal, puesto que en un elevado porcentaje de explotaciones se hallaron cabritos (62,7%), terneros (53,4%) y corderos (31,6%) que excretaban ooquistes del protozoo.

2ª.- En los terneros, la prevalencia y las cifras medias de eliminación de ooquistes disminuyeron a medida que aumentaba la edad, observándose las más elevadas en los animales menores de 2 semanas y las más bajas en los mayores de 21 días, constatándose que estas diferencias eran significativas.

3ª.- El análisis de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de los productos de PCR del gen SSU rRNA, utilizando las enzimas *SspI*, *VspI* y *MboII*, permitieron identificar *C. parvum* y *C. bovis* en terneros, *C. parvum* y *C. ubiquitum* en corderos y *C. parvum* y *C. xiaoi* en cabritos. Es la primera vez que se cita en España *C. ubiquitum* y *C. xiaoi* en corderos y cabritos, respectivamente.

4ª.- La especie más prevalente, tanto a nivel individual como de explotación, fue *C. parvum* por lo que, en Galicia, los rumiantes domésticos menores de un mes tienen una gran importancia como portadores y diseminadores de esta especie potencialmente zoonótica y, por tanto, pueden jugar un importante papel en la epidemiología de la criptosporidiosis humana.

5ª.- El análisis de la secuencia del gen gp60 permitió identificar 10 subtipos de *C. parvum* pertenecientes a las familias alélicas IIa y IId, todos ellos identificados previamente en humanos, y por tanto con potencial zoonótico. Además, la diversidad genética de los aislados de *C. parvum* procedentes de ganado vacuno fue superior a la de los cabritos y corderos.

6ª.- Las tres especies de rumiantes domésticos compartieron los tres subtipos más prevalentes (IIaA13G1R1, IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1), lo que puede estar relacionado con el manejo de estos animales en las granjas gallegas. En este estudio se cita por primera vez el subtipo IIaA13G1R1 en estos rumiantes.

7ª.- Los aislados de *C. parvum* procedentes de terneros mostraron una diversidad genética moderada (8 subtipos IIa). Los aislados de *C. parvum* hallados en pequeños rumiantes tuvieron menor diversidad genética (4 subtipos IIa); además, en los cabritos se identificó un subtipo de la familia IId (A17G1). Estos resultados aportan la primera cita mundial de los subtipos IIaA13G1R1, IIaA14G2R1 y IIaA16G3R1 en ganado ovino y caprino.

8ª.- La electroforesis capilar dio los mejores resultados de tipabilidad y poder discriminatorio en el análisis de fragmentos de las regiones microsatélite ML1 y ML2. La electroforesis en geles de alta resolución fue la técnica más rápida y económica, con niveles altos de tipabilidad y poder discriminatorio, pero sin suficiente fiabilidad cuando se desea analizar el tamaño de los fragmentos para el ML2. Finalmente, la secuenciación es la más limitada si se consideran los resultados de tipabilidad, tiempo de análisis y coste.

9ª.- El análisis de las regiones microsatélite ML1 y ML2 permitió identificar tres alelos nuevos: el ML2-201 en terneros y el ML1-229 y ML2-176 en corderos.

10ª.- La combinación de los alelos para los tres loci (ML1, ML2 y gp60) permitió incrementar la resolución del subtipado, al identificar 9 subtipos multilocus, siendo el ML2 el marcador con mayor polimorfismo y poder discriminatorio. Sólo dos MLT fueron comunes en los terneros y en los corderos, lo que demuestra el valor potencial de estos marcadores para el tipado de aislados y su aplicación en estudios epidemiológicos.





## **6. RESUMEN**



Con objeto de conocer la prevalencia de *Cryptosporidium* en rumiantes domésticos explotados en Galicia, entre los años 2008 y 2013, se tomaron un total de 611 muestras de heces de animales menores de 35 días que presentaban un cuadro diarreico. Las heces se recogieron de forma individualizada y directamente del recto de estos animales; en los terneros se emplearon frascos estériles de plástico, mientras que para los corderos y cabritos se utilizaron hisopos sin medio. Las heces se transportaron en refrigeración hasta el laboratorio, donde se conservaron a 4°C hasta su procesado.

En un primer estudio, se procedió a la detección y caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* en rumiantes domésticos de Galicia. Se analizaron 322 muestras de heces de terneros pertenecientes a 190 explotaciones. Asimismo, se muestrearon 37 granjas de ovino (171 animales) y 23 de caprino (118 individuos). Al tiempo que se recogían las muestras, se anotaron diversos datos relativos a la explotación (orientación productiva, censo), así como la edad, en días, de los animales. Los terneros se dividieron en 4 grupos de edad (<8 días, de 8 a 15 días, de 16 a 21 días y >21 días). Esta división no se pudo realizar para los corderos y los cabritos debido a que, al realizarse la concentración de partos, no se pudo establecer su edad exacta en días.

Las muestras fecales se analizaron utilizando tres técnicas microscópicas: tinción negativa de Heine, Ziehl-Neelsen modificado y tinción con auramina. La tinción negativa de Heine fue la técnica de cribado inicial; sin embargo, a causa de su baja sensibilidad, las muestras que resultaron negativas o dudosas al Heine, se volvieron a procesar mediante una de las otras dos técnicas.

En las heces de los terneros se realizó una estimación semicuantitativa de la intensidad de eliminación de ooquistes, según lo descrito por Castro-Hermida *et al.* (2002a). Esta estimación no se pudo realizar en el caso de los corderos y cabritos debido a las notables diferencias que existían respecto a la cantidad de muestra recogida, lo que condicionó notablemente la recuperación de los ooquistes.

El 49,1% de los neonatos que tenían diarrea eliminaban ooquistes de *Cryptosporidium* y en el 59,6% de las granjas había algún animal infectado por este protozoo. En un elevado porcentaje de granjas de ganado vacuno (60%), de ovino (54,1%) y de caprino (65,2%) se hallaron terneros (53,4%), corderos (31,6%) y cabritos (62,7%) que excretaban ooquistes de *Cryptosporidium* spp., mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2=32,153$ ;  $p<0,001$ ) al considerar la prevalencia individual.

Los terneros comenzaron a eliminar ooquistes a los 3 días de vida, lo que indica que se tuvieron que infectar inmediatamente después del parto. No obstante, los porcentajes de eliminación más elevados se observaron entre los 5 y 12 días de edad, siendo significativamente superiores ( $\chi^2=10,718$ ;  $p=0,013$ ) en los terneros menores de dos

semanas que en los que superaban esa edad. Además, tanto el porcentaje de animales que excretaban ooquistes como la intensidad de eliminación disminuyeron a medida que aumentaba la edad de los animales (63,4%;  $x = 2,2 \pm 1,02$  en los menores de 2 semanas y 11,5%;  $x = 1,0 \pm 0,99$  en los mayores de 21 días).

Las muestras positivas por microscopía se seleccionaron para su posterior caracterización molecular. Los ooquistes se purificaron utilizando la técnica de Elwin *et al.* (2001) y el ADN se extrajo con un kit comercial, con tres pasos previos de congelación/descongelación. En las muestras con un número reducido de ooquistes, la concentración se hizo con el método del agua destilada y acetato de etilo, y el ADN se extrajo directamente a partir del sedimento, utilizando un kit de extracción específico para muestras fecales. Para la identificación de las especies/genotipos de *Cryptosporidium*, se realizó el análisis de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de los productos de PCR del gen SSU rRNA, utilizando las enzimas *SspI*, *VspI* y *MboII*. Los patrones de restricción obtenidos se compararon con los de Feng *et al.* (2007) y Xiao y Ryan (2008). Los aislados cuyo patrón de restricción no coincidió con el de *C. parvum* se secuenciaron para confirmar los resultados de la RFLP; las secuencias de ADN obtenidas se compararon con las especies/genotipos de *Cryptosporidium* depositadas en el GenBank.

En los rumiantes domésticos gallegos se observaron cuatro patrones de bandas diferentes que permitieron identificar *C. parvum* y *C. bovis* en terneros, *C. parvum* y *C. ubiquitum* en corderos y *C. parvum* y *C. xiaoi* en cabritos. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de otras especies de *Cryptosporidium*, ya que las técnicas basadas en la PCR de un fragmento del gen de la SSU rRNA amplifican de forma selectiva la especie dominante en la muestra. Cabe destacar que la PCR del SSU rRNA resultó negativa en el 5,8%, 18,9% y 12,2% de los terneros, corderos y cabritos, respectivamente. En general, estas muestras presentaban, mediante técnicas microscópicas, un reducido número de ooquistes.

Debido a que *C. parvum* fue la especie más prevalente, tanto a nivel individual como de explotación, en las tres especies animales estudiadas y, además, es junto a *C. hominis*, responsable de la mayoría de los brotes de criptosporidiosis en humanos, los rumiantes domésticos lactantes y intervendrían como portadores y diseminadores de especies zoonóticas del parásito en Galicia, pudiendo tener una notable importancia en la epidemiología de la criptosporidiosis humana.

En todos los aislados procedentes de terneros se identificó *C. parvum* y estuvo presente se observó en el 97,4% de las granjas. Únicamente en dos animales, pertenecientes a dos explotaciones diferentes, se detectó una infección mixta por *C. parvum* y *C. bovis*. Esta última especie, muy adaptada a su hospedador, se considera poco patógena y su infección suele ser asintomática. No obstante, al no ser la especie dominante, no se pudo realizar el correspondiente análisis de la secuencia.

Asimismo, *C. parvum* fue la especie más prevalente en ganado ovino, pues se halló en el 74,4% de los corderos y en el 60% de las explotaciones; además, en el 25,6% de los animales y en el 35% de las granjas de ganado ovino se identificó *C. ubiquitum*, siendo ésta la primera denuncia en corderos en España. En todas las granjas donde se analizaron dos o más muestras se identificó solo una especie de *Cryptosporidium*, excepto en dos explotaciones en las que se identificaron *C. parvum* y *C. ubiquitum*. En cinco aislados pertenecientes a dos granjas, las secuencias fueron idénticas a la del subtipo 1 (AF442484), mientras que otros 2 aislados, pertenecientes a otras dos granjas, presentaron una homología del 99% con el subtipo 2 de *C. ubiquitum*, al mostrar una transición de un nucleótido (G por A) en la posición 425; un aislado de otra explotación presentó el mismo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), junto con una delección del trinucleótido AAT.

En el ganado caprino también predominó *C. parvum* (93,8% de los animales y en el 86,7% de las granjas). Además, se halló *C. xiaoi* (7,7% de los animales y en el 26,7% de las explotaciones), siendo ésta la primera cita de *C. xiaoi* en cabritos explotados en España. Dos aislados identificados como *C. xiaoi* se secuenciaron para el gen SSU rRNA y sus secuencias mostraron una homología del 99,88% (812pb/813pb) con respecto a las de *C. xiaoi* incluidas en el GenBank. Debido a las similitudes observadas en las secuencias de *C. xiaoi* y *C. bovis* para el gen SSU rRNA, las muestras se analizaron para el gen de la actina y el análisis de la secuencia reveló una homología del 99,88% (852pb/853pb) con respecto a los aislados de *C. xiaoi* obtenidos en ovejas explotadas en otros países, observándose una transición (A por G) en la posición 671. Por el contrario, nuestros aislados mostraron una variación de 18 pb con respecto al aislado AY741307 de *C. bovis*. Las secuencias de *C. xiaoi* identificadas en el presente estudio se depositaron en el GenBank con los números de acceso GU553016 y GU553017. Finalmente, llama la atención la ausencia de *C. ubiquitum* en las muestras de los cabritos, debido a que sí la habíamos hallado en corderos y, en Galicia, son frecuentes las explotaciones mixtas de ganado ovino y caprino.

Los aislados identificados como *C. parvum* en la RFLP, se subtiparon mediante el análisis de la secuencia de un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (gp60), según el protocolo descrito por Alves *et al.* (2003). Los subtipos se nombraron de acuerdo a Sulaiman *et al.* (2005). En los rumiantes domésticos gallegos, se identificaron 10 subtipos de *C. parvum* que pertenecieron a las familias alélicas zoonóticas IIa (9) y IID (1).

La diversidad genética de los aislados de *C. parvum* procedentes de terneros (8 subtipos) fue mayor que la hallada en los cabritos (5) o en los corderos (4). Algunos subtipos se hallaron sólo en terneros (IIaA11G2R1, IIaA13G2R1, IIaA16G1R1, IIaA16G2R1 y IIaA18G3R1) o en cabritos (IIDA17G1). Por el contrario, en las 3 especies de rumiantes, se detectaron 3 subtipos comunes: IIaA13G1R1, IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1. El subtipo IIaA13G1R1 se cita por primera vez en rumiantes domésticos, así

como el IIaA14G2R1 y el IIaA16G3R1 en corderos y cabritos.

En terneros, los 8 subtipos identificados pertenecieron a la familia alélica IIa de *C. parvum* y presentaron una homología del 100% con los aislados de referencia, excepto 1 aislado del subtipo IIaA16G3R1 (B136) y 2 del IIaA15G2R1 (B160 y B177) que presentaron mutaciones en la región no microsatélite del gen. El análisis subgenotípico confirmó que el alelo IIaA15G2R1, considerado uno de los principales subtipos responsables de criptosporidiosis en humanos, fue el más prevalente y ampliamente distribuido en los terneros (en el 80,4% de las granjas positivas a *C. parvum*). El segundo subtipo más frecuente fue el IIaA16G3R1 (12,9% y 12,6% de los aislados y granjas positivas, respectivamente), también descrito en humanos. Los tres aislados pertenecientes al subtipo IIaA13G1R1 se identificaron como un nuevo subtipo y su secuencia se depositó en el GenBank (número de acceso GU111578). El resto de subtipos (IIaA11G2R1, IIaA13G1R1, IIaA13G2R1, IIaA16G1R1, IIaA16G2R1 y IIaA18G3R1) fueron claramente minoritarios, pues se identificaron en menos de 4 aislados de 1-3 explotaciones.

Al analizar la presencia de más de un subtipo gp60 en aquellas explotaciones de ganado vacuno en las que se habían detectado varios aislados de *C. parvum*, se observó que en la mayoría de las granjas se identificó un único alelo y solo en 5 rebaños se hallaron dos subtipos diferentes. En estas 5 explotaciones se halló el subtipo IIaA15G2R1, junto con el IIaA16G3R1 (4) y el IIaA13G1R1 (1). En general, cada uno de los alelos se observó en un brote de diarrea neonatal diferente; sin embargo, en 2 de estas 5 granjas, ambos subtipos se identificaron en el mismo brote de diarrea.

Para el gen gp60, se obtuvieron 26 secuencias legibles en ganado ovino y 58 en el caprino. Al compararlas con las depositadas en el GenBank, se comprobó que los aislados de *C. parvum* que infectan a los pequeños rumiantes en Galicia presentan poca diversidad genética, puesto que sólo se detectaron cinco subtipos; de los cuales, 4 (IIaA13G1R1, IIaA14G2R1, IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1) pertenecen a la familia alélica IIa y se identificaron tanto en corderos como en cabritos. Además, en estos últimos, se identificó un subtipo (IIaA17G1) de la familia IId. Es la primera vez que se citan los subtipos IIaA13G1R1, IIaA14G2R1 y IIaA16G3R1 en pequeños rumiantes, y debido a que las muestras procedían de animales con diarrea, estos subtipos deben considerarse patógenos.

En el 60% de los rebaños de ovinos y en el 50% de los de caprino se identificó el subtipo IIaA15G2R1, siendo el IIaA16G3R1 el segundo subtipo más prevalente. El resto de los subtipos identificados se detectaron en menos de 5 granjas.

En granjas de ganado ovino en las que se habían detectado más de dos aislados de *C. parvum*, se observó que solo en 1 se identificaron dos alelos, aunque en brotes diferentes, lo que pone de manifiesto la utilidad de las técnicas de subtipado para reconocer las fuentes de contagio. Sin embargo, aunque en la mayoría de las granjas de caprino se

identificó un único subtipo, en tres explotaciones se detectaron múltiples subtipos de *C. parvum*, siempre asociados al mismo brote de diarrea neonatal.

En el segundo estudio se determinó la variabilidad genética de *C. parvum*, en los rumiantes domésticos de Galicia, mediante un análisis multilocus en tres marcadores (ML1, ML2 y gp60). Debido a la ausencia de un método estandarizado para realizar este análisis de fragmentos para las regiones microsatélite ML1 y ML2, primero se evaluó la utilidad de tres técnicas empleadas habitualmente para su análisis: electroforesis capilar, electroforesis en geles de alta resolución y secuenciación (considerada la técnica de referencia).

Los marcadores microsatélite ML1 y ML2 se amplificaron mediante una PCR descrita por Cacciò *et al.* (2000, 2001). En el caso de la *electroforesis capilar*, se empleó un cebador antisentido marcado con el colorante WellRED D3, y el tamaño de los fragmentos amplificados se analizó en un secuenciador CEQ 8000 Genetic Analysis System. En la *electroforesis en geles de alta resolución*, los productos obtenidos en la PCR se separaron en geles comerciales prefabricados Spreadex EL500 empleando el sistema SEA2000. En la *secuenciación*, las secuencias se compararon con las almacenadas en el GenBank. Posteriormente, la utilidad de cada técnica para subtipar los aislados de *C. parvum* para estos marcadores se evaluó mediante el cálculo de la tipabilidad y poder discriminatorio (índice Hunter–Gaston), aunque también se incluyó el coste de cada método, así como el tiempo de análisis y la facilidad de uso.

Para el marcador ML1, la mayor tipabilidad ( $T= 0,95$ ) se halló con la electroforesis capilar (EC) y con la electroforesis en geles de alta resolución ( $T= 0,93$ ); por el contrario, la secuenciación mostró la menor tipabilidad ( $T= 0,76$ ). Con el índice Hunter-Gaston se comprobó que el poder discriminatorio para el ML1 fue bajo ( $< 0,15$ ) independientemente de la técnica utilizada.

Para la región ML2, también se obtuvo la mayor tipabilidad con la EC ( $T= 0,98$ ) y con la electroforesis en geles de alta resolución ( $T= 0,95$ ); con este último método, la determinación del tamaño de los fragmentos de más de 201 pb no resultó fiable, debido a la presencia de “bandas tartamudas”, que dificultan notablemente la lectura de los geles. Por el contrario, ninguno de los aislados pudo caracterizarse con exactitud empleando la secuenciación ( $T= 0$ ) debido a que la enzima genera errores al copiar la secuencia microsatélite, dando lugar a interferencias en el cromatograma que impiden la precisa asignación de las bases. Los valores del índice de discriminación para el ML2 fueron superiores con la EC.

Una visión global de los resultados demuestra que la EC muestra los mejores valores de tipabilidad y poder discriminatorio en el análisis de fragmentos de las regiones

microsatélite ML1 y ML2, con un coste asumible. Aunque la electroforesis en geles de alta resolución fue la técnica más rápida y de menor coste, ofreciendo también elevados valores de tipabilidad y poder discriminatorio, la presencia de “bandas tartamudas” de similar intensidad, dificulta la asignación precisa de aislados a un determinado alelo ML2.

Los resultados obtenidos para los microsatélites ML1 y ML2 obtenidos con el método que mostró las mejores características (electroforesis capilar) se combinaron posteriormente con los del gen de la gp60 para obtener un subtipo multilocus (MLT), lo que permitió determinar la variabilidad genética de *C. parvum* en los rumiantes domésticos de Galicia. Solo se incluyeron en el análisis los aislados que resultaron positivos para los tres locus.

Para el ML1 se tiparon 41 muestras; este locus mostró una variabilidad genética muy baja, puesto que sólo permitió identificar 3 alelos (ML1-238, ML1-229 y ML1-226). Además, el ML1-238 fue el más prevalente tanto en terneros (25/27) como en corderos (13/14), puesto que el 93% del total de los aislados mostraron este alelo; además, se ha demostrado que su presencia en humanos está relacionada con el contacto con animales de granja. Con respecto a los otros dos alelos, solo dos terneros mostraron el ML1-226, mientras que el ML1-229, que se describe por primera vez en el presente estudio, se identificó únicamente en un cordero.

Para el locus ML2, se obtuvieron 8 alelos de *C. parvum*: ML2-231 (12 aislados), ML2-227 (10), ML2-225 (8), ML2-233 (4), ML2-229 (3), ML2-235 (1), ML2-201 (1) y ML2-176 (1). Este estudio constituye la primera cita de los dos últimos alelos. Tanto en terneros como en corderos se identificaron cinco alelos (ML2-233, ML2-231, ML2-229, ML1-227 y ML2-225), mientras que dos fueron específicos para el ganado ovino (ML2-235 y ML2-176) y uno para el vacuno (ML2-201). El alelo más prevalente en los terneros fue el ML2-231 (40,7%), mientras que el más común en los corderos fue el ML2-227 (70%). Todos los alelos ML2 identificados en este trabajo, exceptuando el ML2-201 y el ML2-235, se han hallado previamente en las personas, lo que confirma el potencial zoonótico de los aislados de *C. parvum* obtenidos de rumiantes domésticos en Galicia. Por el contrario, sólo tres de los alelos ML2 identificados en este estudio (ML2-231, ML2-229 y ML2-227) se habían detectado previamente en aislados procedentes de animales.

Cuando los tamaños de los alelos para los dos marcadores microsatélite obtenidos con la EC se combinaron con los subtipos gp60, se tiparon 37 aislados de *C. parvum* para los tres loci ( $T=0,90$ ). Se identificaron 9 subtipos multilocus (MLTs) y se observó que el ML2 fue el marcador con mayor polimorfismo y el de mayor poder discriminatorio. De este modo, con la EC se identificaron 8 alelos para este único marcador, en comparación con los 9 MLTs identificados tras la combinación de los alelos para los tres loci. Los resultados del análisis multilocus permitieron diferenciar los 29 aislados pertenecientes al subtipo IIaA15G2R1 en 7 MLTs. Por el contrario, todos los IIaA16G3R1 se asignaron a un solo

MLT procedentes de corderos de una única granja. Otros tres MLT también estuvieron restringidos a granjas individuales, y a un único animal. El MLT más frecuente fue el MLT1, detectado en 7 granjas de ganado vacuno. En las 9 explotaciones donde se identificaron más de un aislado de *C. parvum*, en 5 se observó un único MLT, mientras que en 4 se hallaron más de uno.

Se observó un mayor número de MLT en las muestras procedentes de terneros (7 MLT) que en las de origen ovino (4 MLT). Sólo dos de los 9 MLT se observaron tanto en terneros como en corderos, lo que demuestra el valor potencial de estos marcadores para el tipado de aislados y su aplicación en estudios epidemiológicos.

Se realizó el análisis de clusters empleando el algoritmo eBURST, que vincula los MLT que difieren de otro en un solo locus (single-locus variants; SLVs), mientras que aquellos MLT que difieren en más de un locus no se vinculan. De este modo cada cluster se forma alrededor de un “miembro fundador”, que tiene el mayor número de SLV, y que es considerado el tipo ancestral.

Cuando los MLT identificados en terneros y corderos se analizaron en conjunto mediante el algoritmo eBURST, se observó un complejo clonal, con el MLT5 como núcleo fundador, que incluye a todos los MLT a excepción del MLT8. El análisis global de nuestros resultados indica que se puede alcanzar una adecuada discriminación mediante el empleo del subtipado multilocus, aunque previamente es necesario seleccionar cuidadosamente los marcadores y las técnicas a emplear.





## **7. BIBLIOGRAFÍA**



Abe, N.; Matsubayashi, M.; Kimata, I.; Iseki, M., 2006. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology Research*, **99**: 303-305.

Abeywardena, H.; Jex, A.R.; Firestone, S.M.; McPhee, S.; Driessen, N.; Koehler, A.V.; Haydon, S.R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Stevens, M.A.; Gasser, R.B., 2013. Assessing calves as carriers of *Cryptosporidium* and *Giardia* with zoonotic potential on dairy and beef farms within a water catchment area by mutation scanning. *Electrophoresis*, **34**: 2259-2267.

Abeywardena, H.; Jex, A.R.; Koehler, A.V.; Rajapakse, R.P.; Udayawarna, K.; Haydon, S.R.; Stevens, M.A.; Gasser, R.B., 2014. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from bovines (*Bos taurus* and *Bubalus bubalis*) in Sri Lanka: unexpected absence of *C. parvum* from pre-weaned calves. *Parasites and Vectors*, **7**: 75.

Abrahamsen, M.S.; Templeton, T.J.; Enomoto, S.; Abrahante, J.E.; Zhu, G.; Lancto, C.A.; Deng, M.; Liu, C.; Widmer, G.; Tzipori, S.; Buck, G.A.; Xu, P.; Bankier, A.T.; Dear, P.H.; Konfortov, B.A.; Spriggs, H.F.; Iyer, L.; Anantharaman, V.; Aravind, L.; Kapur, V., 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*, **304**: 441-445.

Agnamey, P.; Sarfati, C.; Pinel, C.; Rabodoniriina, M.; Kapel, N.; Dutoit, E.; Garnaud, C.; Diouf, M.; Garin, J.F.; Totet, A.; Derouin, F.; ANOFEL *Cryptosporidium* National Network, 2011. Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 1605-1607.

Aiello, A.E.; Xiao, L.; Limor, J.R.; Liu, C.; Abrahamsen, M.S.; Lal, A.A., 1999. Microsatellite analysis of the human and bovine genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46**: 46S-47S.

Alvarez-Pellitero, P.; Sitja-Bobadilla, A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L.. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1007-1021.

Alvarez-Pellitero, P.; Quiroga, M.I.; Sitja-Bobadilla, A.; Redondo, M.J.; Palenzuela, O.; Padros, F.; Vazquez, F.; Nieto, J.M., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**: 133.

- Alves, M.; Matos, O.; Antunes, F., 2003a. Microsatellite analysis of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in Portugal: a preliminary study. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50** Suppl: 529-530.
- Alves, M.; Xiao, L.; Sulaiman, I.; Lal, A.A.; Matos, O.; Antunes, F., 2003b. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans; cattle; and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 2744-2747.
- Alves, M.; Xiao, L.; Antunes, F.; Matos, O., 2006a. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, **99**: 287-292.
- Alves, M.; Ribeiro, A.M.; Neto, C.; Ferreira, E.; Benoliel, M.J.; Antunes, F.; Matos, O., 2006b. Distribution of *Cryptosporidium* species and subtypes in water samples in Portugal: a preliminary study. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** Suppl 1: S24-25.
- Amer, S.; Honma, H.; Ikarashi, M.; Tada, C.; Fukuda, Y.; Suyama, Y.; Nakai, Y., 2010. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Veterinary Parasitology*, **169**: 382-386.
- Amer, S.; Zidan, S.; Adamu, H.; Ye, J.; Roellig, D.; Xiao, L.; Feng, Y., 2013. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces; Egypt. *Experimental Parasitology*, **135**: 518-523.
- Anderson, B.C., 1981. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **178**: 982-984.
- Anderson, B.C., 1982. Cryptosporidiosis: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **180**: 1455-1457.
- Anderson, B.C., 1983. Cryptosporidiosis. *Laboratory Medicine*, **14**: 55-56.
- Anderson, B.C., 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Veterinary Pathology*, **24**: 235-238.
- Anderson, B.C., 1990. A preliminary report on prevalence of *Cryptosporidium muris* oocysts in dairy cattle feces. *California Veterinarian*, **44**: 11-12.
- Angus, K.W.; Tzipori, S.; Gray, E.W., 1982. Intestinal lesions in SPF lambs associated with *Cryptosporidium* from calves with diarrhoea. *Veterinary Pathology*, **19**: 67-68.

- Anusz, K.Z.; Mason, P.H.; Riggs, M.W.; Perryman, L.E., 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 2770-2774.
- Arrowood, M.J.; Sterling, C.R., 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 1490-1495.
- Artieda, J.; Basterrechea, M.; Arriola, L.; Yagüe, M.; Albisua, E.; Arostegui, N.; Astigarraga, U.; Botello, R.; Manterola, J.M., 2012. Outbreak of cryptosporidiosis in a child day-care centre in Gipuzkoa; Spain; October to December 2011. *Euro Surveill*, **17**.
- Awad-el-Kariem, F.M.; Warhurst, D.C.; McDonald, V., 1994. Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction. *Parasitology*, **109**: 19-22.
- Azami, M.; Moghaddam, D.D.; Salehi, R.; Salehi, M., 2007. The identification of *Cryptosporidium* species (protozoa) in Ifsahan, Iran by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. *Molekuliarnaia Biologiia* (Mosk), **41**: 934-939.
- Baldursson, S.; Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research*, **45**: 6603-6614
- Barta, J.R. and Thompson, R.C.A., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, **22**: 463-468.
- Björkman, C.; Mattsson, J.G., 2006. Persistent infection in a dairy herd with an unusual genotype of bovine *Cryptosporidium parvum*. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **254**: 71-74.
- Blewett, D.A.; Wright, S.E.; Casemore, D.P.; Booth, N.E.; Jones, C.E., 1993. Infective dose size studies on *Cryptosporidium parvum* using gnotobiotic lambs. *Water Science Technology*, **27**: 61-64.
- Bornay-Llinares, F.J.; da Silva, A.J.; Moura, I.N.S.; Myjak, P.; Pietkiewicz, H.; Kruminis-Lozowska, W.; Graczyk, T.K.; Pieniazek, N.J., 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1455-1458.

- Broglia, A.; Reckinger, S.; Cacciò, S.M.; Nöckler, K., 2008. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology*, **154**: 8-13.
- Brook, E.J.; Hart, C.A.; French, N.P.; Christley, R.M., 2008. Prevalence and risk factors for *Cryptosporidium* spp. infection in Young calves. *Veterinary Parasitology*, **152**: 46-52.
- Brook, E.J.; Hart, C.A.; French, N.P.; Christley, R.M., 2009. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Veterinary Journal*, **179**: 378-382.
- Bushen, O.Y.; Kohli, A.; Pinkerton, R.C.; Dupnik, K.; Newman, R.D.; Sears, C.L.; Fayer, R.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L., 2007. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **101**: 378-384.
- Cacciò, S.M., 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*, **47**: 185-192.
- Cacciò, S., 2012. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. En: Warrell, D.; Cox, T.M.; Firth, J.; Török, E. (Eds.). Oxford Textbook of Medicine: Infection. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Cacciò, S.; Homan, W.; Camilli, R.; Traldi, G.; Kortbeek, T.; Pozio, E., 2000. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, **120**: 237-244.
- Cacciò, S.; Spano, F.; Pozio, E., 2001. Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1082-1086.
- Cacciò, S.M.; Thompson, R.C.; McLauchlin, J.; Smith, H.V., 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, **21**: 430-437.
- Cacciò, S.M.; Sannella, A.R.; Mariano, V.; Valentini, S.; Berti, F.; Tosini, F.; Pozio, E., 2013. A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. *Veterinary Parasitology*, **191**: 128-131.
- Cama, V.A.; Arrowood, M.J.; Ortega, Y.R.; Xiao, L., 2006. Molecular characterization of the *Cryptosporidium parvum* IOWA isolate kept in different laboratories. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** Suppl 1: S40-42.

Cama, V.A.; Ross, J.M.; Crawford, S.; Kawai, V.; Chavez-Valdez, R.; Vargas, D.; Vivar, A.; Ticona, E.; Navincopa, M.; Williamson, J.; Ortega, Y.; Gilman, R.H.; Bern, C.; Xiao, L., 2007. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *The Journal of Infectious Diseases*, **196**: 684-691.

Cama, V.A.; Bern, C.; Roberts, J.; Cabrera, L.; Sterling, C.R.; Ortega, Y.; Gilman, R.H.; Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children; Peru. *Emerging Infectious Diseases*. **14**: 1567-1574.

Campbell, A.T.; Robertson, L.J.; Smith, H.V., 1993. Effects of Preservatives on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 4361-4362.

Campbell, A.T.; Smith, H.V., 1997. Immunomagnetsable separation of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. *Water Science and Technology*, **35**: 397-401.

Casemore, D.P., 1987. The antibody response to *Cryptosporidium*: development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons. *The Journal of Infection*, **14**: 125-134.

Casemore, D.P., 1991. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *ACP Broadsheet*, **128**: 445-451.

Casemore, D.P.; Armstrong, M.; Sands, R.L., 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*. **38**: 1337-1341.

Castro-Hermida, J.A.; González-Losada, Y.A.; Ares-Mazás, E., 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **106**: 1-10.

Castro-Hermida, J.A.; González-Losada, Y.A.; Mezo-Menéndez, M.; Ares-Mazás, E., 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, **106**: 11-17.

Castro-Hermida, J.A.; Delafosse, A.; Pors, I.; Ares-Mazás, E.; Chartier, C., 2005. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *The Veterinary Record*, **157**: 623-627.

Castro-Hermida, J.A.; Carro-Corral, C.; González-Warleta, M.; Mezo, M., 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, **53**: 244-246.

- Castro-Hermida, J.A.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J.M.; Rumbo-Lorenzo, C.; Mezo, M., 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research*, **101**: 1443-1448.
- Castro-Hermida, J.A.; García-Preledo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2011. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *The Science of the Total Environment*, **409**: 2451-2459.
- Causapé, A.C.; Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; López-Bernad, F., 2002. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **104**: 287-298.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Reilly, W.J.; Irvine, H.; Thomas, A.L.; Hunter, P.R., 2002. *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. *International Journal for Parasitology*, **32**: 21-26.
- Chalmers, R.M.; Ferguson, C.; Cacciò, S.; Gasser, R.B.; Abs EL-Osta, Y.G.; Heijnen, L.; Xiao, L.; Elwin, K.; Hadfield, S.; Sinclair, M.; Stevens, M., 2005. Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal for Parasitology*, **35**: 397-410.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Thomas, A.L.; Guy, E.C.; Mason, B., 2009. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveillance*, **14**. pii: 19086.
- Chalmers, R.M.; Davies, A.P., 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, **124**: 138-146.
- Chalmers, R.M.; Katzer, F., 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, **29**: 237-251.
- Chan, R.; Chen, J.; York, M.K.; Setijono, N.; Kaplan, R.L.; Graham, F.; Tanowitz, H.B., 2000. Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 393-394.
- Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C.; Langer-Curry, R.C.; Akiyoshi, D.E.; Widmer, G.; Tzipori, S., 2011. *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 238-242.

- Chartier, C.; Mallereau-Pellet, M.P.; Mancassola, R.; Nussbaum, D., 2002. Détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans les fèces de caprins: comparaison entre un test d'agglutination au latex et trois autres techniques conventionnelles. *Veterinary Research*, **33**: 169-177.
- Chen, F.; Huang, K., 2012. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle from farms in China. *Journal of Veterinary Science*, **13**: 15-22.
- Chen, X.M.; Keithly, J.S.; Paya, C.V.; LaRusso, N.F., 2002. Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*, **346**: 1723-1731.
- Chen, X.M.; O'Hara, S.P.; Huang, B.Q.; Splinter, P.L.; Nelson, J.B.; LaRusso, N.F., 2005. Localized glucose and water influx facilitates *Cryptosporidium parvum* cellular invasion by means of modulation of host-cell membrane protrusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 6338-6343.
- Chrisp, C.E.; Suckow, M.A.; Fayer, R.; Arrowood, M.J.; Healey, M.C.; Sterling, C.R., 1992. Comparison of the host ranges and antigenicity of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* from guinea pigs. *The Journal of Protozoology*, **39**: 406-409.
- Clavel, A.; Fleta, J.; Castillo, J.; Sánchez-Acedo, C., 1989. Incidencia de *Cryptosporidium* en heces de ovino. Comparación de métodos de identificación. *VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología*. Cáceres, 25-29 de septiembre.
- Clavel, A.; Arnal, A.C.; Sánchez, E.; Varea, M.; Quilez, J.; Ramírez, I.; Castillo, F.J., 1996. Comparison of 2 centrifugation procedures in the formalin-ethyl acetate stool concentration technique for the detection of *Cryptosporidium* oocysts. *International Journal for Parasitology*, **26**: 671-672.
- Connelly, L.; Craig, B.H.; Jones, B.; Alexander, C.L., 2013. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of Soay Sheep on St. Kilda Islands; Scotland. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**: 2240-2246.
- Coticone, S.R.; Bloch, W., 2011. Methods for the reduction of stutter in microsatellite amplification. *United States Patent Application Publication US2011/0143352 A1*.
- Craun, G.F.; Calderon, R.L.; Craun, M.F., 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *International Journal of Environmental Health Research*, **15**: 243-262.

Crawford, F.G.; Vermund, S.H., 1988. Human cryptosporidiosis. *Critical Reviews in Microbiology*, **16**: 113-159.

Current, W.L.; Upton, S.J.; Haynes, T.B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa; Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*, **33**: 289-296.

Current, W.L.; Garcia, L.S., 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**: 325-358.

Current, W.L.; Reese, N.C., 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, **33**: 98-108.

Current, W.L.; Snyder, D.B., 1988. Development of and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. *Poultry Science*, **67**: 720-729.

de Graaf, D.C.; Vanopdenbosch, E.; Ortega-Mora, L.M.; Abbassi, H.; Peeters, J.E., 1999a. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1269-1287.

de Graaf, D.C.; Spano, F.; Petry, F.; Sagodira, S.; Bonnin, A., 1999b. Speculation on whether a vaccine against cryptosporidiosis is a reality or fantasy. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1289-306.

De la Fuente, R.; García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Luzón, M.; Cid, D.; García, S.; Orden, J.A.; Gómez-Bautista, M., 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, **36**: 145-152.

De la Fuente, R.; Luzón, M.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; García, A.; Cid, D.; Orden, J.A.; García, S.; Sana, R.; Gómez-Bautista, M., 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, **80**: 179-185.

Deemer, D.L.; Nelson, C.D., 2010. Standardized SSR allele naming and binning among projects. *Biotechniques*, **49**: 835-836.

Del Chierico, F.; Onori, M.; Di Bella, S.; Bordi, E.; Petrosillo, N.; Menichella, D.; Cacciò, S.M.; Callea, F.; Putignani, L., 2011. Cases of cryptosporidiosis co-infections in AIDS patients: a correlation between clinical presentation and GP60 subgenotype lineages from aged formalin-fixed stool samples. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **105**: 339-349.

Del Coco, V.F.; Córdoba, M.A.; Bilbao, G.; de Almeida Castro, A.P.; Basualdo, J.A.; Fayer, R.; Santín, M., 2014. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires; Argentina. *Research in Veterinary Science*, **96**: 311-314.

Delmotte, F.; Leterme, N.; Simón, J.C., 2001. Microsatellite allele sizing: difference between automated capillary electrophoresis and manual technique. *Biotechniques*, **31**: 814-818.

Denkinger, C.M.; Harigopal, P.; Ruiz, P.; Dowdy, L.M., 2008. *Cryptosporidium parvum*-associated sclerosing cholangitis in a liver transplant patient. *Transplant Infectious Disease*, **10**: 133-136.

Di Piazza, F.; Di Benedetto, M.A.; Maida, C.M.; Glorioso, S.; Adamo, G.; Mazzola, T.; Firenze, A., 2013. A study on occupational exposure of Sicilian farmers to *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, **54**: 212-217.

Díaz, P.; Pipia A.P.; Varcasia, A.; Sanna, G.; Ruiiu, A.; Spissu, P.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Scala, A., 2010. Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* spp infection in cattle farms in Sardinia (Italy). *XXVI Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia*. Perugia (Italia), 22-25 de junio.

Drumo, R.; Widmer, G.; Morrison, L.J.; Tait, A.; Grelloni, V.; D'Avino, N.; Pozio, E.; Cacciò, S.M., 2012. Evidence of host-associated populations of *Cryptosporidium parvum* in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 3523-3529.

DuPont, H.L.; Chappell, C.L.; Sterling, C.R.; Okhuysen, P.C.; Rose, J.B.; Jakubowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*, **332**: 855-859.

Egyed, Z.; Sréter, T.; Széll, Z.; Varga, I., 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp.- recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, **111**: 103-114.

Elwin, K.; Chalmers, R.M.; Roberts, R.; Guy, E.C.; Casemore, D.P., 2001. Modification of a rapid method for the identification of gene-specific polymorphisms in *Cryptosporidium parvum* and its application to clinical and epidemiological investigations. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 5581-5584.

Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2008. Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). *Parasitology Research*, **102**: 1103-1105.

Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Robinson, G.; Crouch, N.D.; Chalmers, R.M., 2012. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*, **42**: 675-682.

Enemark, H.L.; Ahrens, P.; Juel, C.D.; Petersen, E.; Petersen, R.F.; Andersen, J.S.; Lind, P.; Thamsborg, S.M., 2002. Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. *Parasitology*, **125**: 331-341.

Enemark, H. L.; Ahrens, P.; Bille-Hansen, V.; Heegaard, P.M.; Vigre, H.; Thamsborg, S.M.; Lind, P., 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. *Parasitology*, **126**: 407-416.

Essid, R.; Mousli, M.; Aoun, K.; Abdelmalek, R.; Mellouli, F.; Kanoun, F.; Derouin, F.; Bouratbine, A., 2008. Identification of *cryptosporidium* species infecting humans in Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**: 702-705.

Esteban, E.; Anderson, B.C., 1995. *Cryptosporidium muris*: prevalence; persistency; and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *Journal of Dairy Science*, **78**: 1068-1072.

Fayer, R., 1995. Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal BALB/c mice. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 844-846.

Fayer, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, **126**: 37-56.

Fayer, R., 2008. General biology. En: Fayer, R.; Xiao, L. (Eds). En: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 1-42.

Fayer, R.; Ungar, B.L., 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, **50**: 458-483.

Fayer, R.; Santín, M., 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, **164**: 192-200.

Fayer, R., Speer, C.A. and Dubey, J.P. 1990. General biology of *Cryptosporidium*. En: Dubey, J.P., Speer, C.A. y Fayer, R. (Eds), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-29.

- Fayer, R.; Speer, C.A.; Dubey, J.P., 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. En R. Fayer (ed.); *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press; Boca Raton; Florida. p. 1-41.
- Fayer, R.; Gasbarre, L.; Pasquali, P.; Canals, A.; Almeria, S.; Zarlenga, D., 1998. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical; parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, **28**: 49-56.
- Fayer, R.; Morgan, U.; Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission; detection and identification. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1305-1322.
- Fayer, R.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Morgan, U.M.; Lai, A.A.; Dubey, J.P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, **87**: 1415-1422.
- Fayer, R.; Santín, M.; Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology*, **91**: 624-629.
- Fayer, R.; Santin, M.; Trout, J.M.; Greiner, E., 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, **135**: 105-112.
- Fayer, R.; Santin, M.; Trout, J.M., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, **145**: 260-266.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J.M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, **156**: 191-198.
- Fayer, R.; Santín, M.; Dargatz, D., 2010a. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Veterinary Parasitology*, **170**: 187-192.
- Fayer, R.; Santín, M.; Macarisin, D., 2010b. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, **172**: 23-32.
- Feil, E.J.; Li, B.C.; Aanensen, D.M.; Hanage, W.P.; Spratt, B.G., 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, **186**: 1518-1530.
- Feltus, D.C.; Giddings, C.W.; Schneck, B.L.; Monson, T.; Warshauer, D.; McEvoy, J.M., 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 4303-4308.

Feng, X.; Rich, S.M.; Akiyoshi, D.; Tumwine, J.K.; Kekitiinwa, A.; Nabukeera, N.; Tzipori, S.; Widmer, G., 2000. Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 3344-3349.

Feng, Y.; Ortega, Y.; He, G.; Das, P.; Xu, M.; Zhang, X.; Fayer, R.; Gatei, W.; Cama, V.; Xiao, L., 2007. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, **144**: 1-9.

Fiuza, V.R.; Cosendey, R.I.; Frazão-Teixeira, E.; Santín, M.; Fayer, R.; de Oliveira, F.C., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. *Veterinary Parasitology*, **175**: 360-362.

Fleck, S.L.; Moody, A.H., 1988. Diagnostic Techniques in Medical Parasitology. *Butterworth-Heinemann Ltd.; London; U.K.*

Fleta, J.; Sánchez-Acedo, C.; Clavel, A.; Quílez, J., 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology*, **59**: 201-205.

Follet, J.; Guyot, K.; Leruste, H.; Follet-Dumoulin, A.; Hammouma-Ghelboun, O.; Certad, G.; Dei-Cas, E.; Halama, P., 2011. *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Veterinary Research*, **42**: 116.

Freire-Santos, F.; Oteiza-Lopez, A.M.; Vergara-Castiblanco, C.A.; Ares-Mazas, E.; Varez-Suarez, E.; Garcia-Martin, O., 2000. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *Journal of Parasitology*, **86**: 853-854.

Garber, L.P.; Salman, M.D.; Hurd, H.S.; Keefe, T.; Schlater, J.L., 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **205**: 86-91.

García, L.S., 2007. Diagnostic Medical Parasitology. ASM Press, Washington D.C. (EE.UU.).

García, L.S.; Bruckner, D.A.; Brewer, T.C.; Shimizu, R.Y., 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **18**: 185-190.

García, L.S.; Brewer, T.C.; Bruckner, D.A., 1987. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **25**: 119-121.

García, L.S.; Shum, A.C.; Bruckner, D.A., 1992. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **30**: 3255-3257.

García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Orden, J.A.; Cid, D.; Sanz, R.; Gómez-Bautista, M.; de la Fuente, R., 2000. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **23**: 175-183.

García Meniño, I. 2013. Implicación de *Escherichia coli* y otros enteropatógenos en la diarrea neonatal del ternero. Trabajo de Master Universitario en Investigación en medicina y sanidad veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.

García-Preedo, I.; Pedraza-Díaz, S.; González-Warleta, M.; Mezo, M.; Gómez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L.M.; Castro-Hermida, J.A., 2013. The first report of *Cryptosporidium bovis*, *C. ryanae* and *Giardia duodenalis* sub-assemblage A-II in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, **197**: 658-664.

Gardiner, C.H.; Imes, G.D. Jr., 1984. *Cryptosporidium* sp in the kidneys of a black-throated finch. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **185**: 1401-1402.

Gasser, R.B.; El-Osta, Y.G.; Chalmers, R.M., 2003. Electrophoretic analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 2719-2730.

Gasser, R.B.; Abs EL-Osta, Y.G.; Prepens, S.; Chalmers, R.M., 2004. An improved 'cold SSCP' method for the genotypic and subgenotypic characterization of *Cryptosporidium*. *Molecular and Cellular Probes*, **18**: 329-332.

Gatei, W.; Hart, C.A.; Gilman, R.H.; Das, P.; Cama, V.; Xiao, L., 2006. Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** Suppl 1: S43-48.

Gatei, W.; Das, P.; Dutta, P.; Sen, A.; Cama, V.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2007. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata; India. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**: 197-205.

Gatei, W.; Barrett, D.; Lindo, J.F.; Eldemire-Shearer, D.; Cama, V.; Xiao, L., 2008. Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons; Jamaica. *Emerging Infectious Diseases*, **14**: 841-843.

Gentile, G.; Venditti, M.; Micozzi, A.; Caprioli, A.; Donelli, G.; Tirindelli, C.; Meloni, G.; Arcese, W.; Martino, P., 1991. Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. *Reviews of Infectious Diseases*, **13**: 842-846.

Geurden, T.; Goma, F.Y.; Siwila, J.; Phiri, I.G.; Mwanza, A.M.; Gabriel, S.; Claerebout, E.; Vercruyse, J., 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Veterinary Parasitology*, **138**: 217-222.

Geurden, T.; Berkvens, D.; Martens, C.; Casaert, S.; Vercruyse, J.; Claerebout, E., 2007. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*, **134**: 1981-1987.

Geurden, T.; Thomas, P.; Casaert, S.; Vercruyse, J.; Claerebout, E., 2008. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Veterinary Parasitology*, **155**: 142-145.

Gibbons-Matthews, C.; Prescott, A.M., 2003. Intra-isolate variation of *Cryptosporidium parvum* small subunit ribosomal RNA genes from human hosts in England. *Parasitology Research*, **90**: 439-444.

Giles, M.; Chalmers, R.; Pritchard, G.; Elwin, K.; Mueller-Doblies, D.; Clifton-Hadley, F., 2009. *Cryptosporidium hominis* in a goat and a sheep in the UK. *The Veterinary Record*, **164**: 24-25.

Glaberman, S.; Moore, J.E.; Lowery, C.J.; Chalmers, R.M.; Sulaiman, I.; Elwin, K.; Rooney, P.J.; Millar, B.C.; Dooley, J.S.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks; Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, **8**: 631-633.

Goma F.Y.; Geurden, T.; Siwila, J.; Phiri, I.G.K.; Gabriel, S.; Claerebout, E.; Vercruyse, J., 2007. The prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in small ruminants in Zambia. *Small Ruminant Research* **72**: 77-80

Gonçalves, E.M.; da Silva, A.J.; Eduardo, M.B.; Uemura, I.H.; Moura, I.N.; Castilho, V.L.; Corbett, C.E., 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. *Clinics (Sao Paulo)*, **61**: 119-126.

Gormley, F.J.; Little, C.L.; Chalmers, R.M.; Rawal, N.; Adak, G.K., 2011. Zoonotic cryptosporidiosis from petting farms; England and Wales, 1992-2009. *Emerging Infectious Diseases*, **17**: 151-152.

Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R.; Fayer, R., 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **54**: 274-279.

Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R.; Bostwick, E.F., 1999. Hyperimmune bovine colostrum treatment of moribund Leopard geckos (*Eublepharis macularius*) infected with *Cryptosporidium* sp. *Veterinary Research*, **30**: 377-382.

Grigoriev, G.A.; Walmsley, S.; Law, L.; Chee, S.L.; Yang, J.; Keystone, J.; Krajden, M., 1994. Evaluation of the Merifluor immunofluorescent assay for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sodium acetate formalin-fixed stools. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **19**: 89-91.

Guarino, A.; Canani, R.B.; Pozio, E.; Terracciano, L.; Albano, F.; Mazzeo, M., 1994. Enterotoxic effect of stool supernatant of *Cryptosporidium*-infected calves on human jejunum. *Gastroenterology*, **106**: 28-34.

Hajdusek, O.; Ditrich, O.; Slapeta, J., 2004. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, **122**: 183-192.

Hamnes, I.S.; Gjerde, B.K.; Forberg, T.; Robertson, L.J., 2007. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, **143**: 347-353.

Harp, J.A.; Woodmansee, D.B.; Moon, H.W., 1990. Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infection and Immunity*, **58**: 2237-2240.

Harris, J.R.; Petry, F., 1999. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *The Journal of Parasitology*, **85**: 839-849.

Heine, J., 1982. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, **29**: 324-327.

- Heine, J.; Pohlenz, J.F.; Moon, H.W.; Woode, G.N., 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *The Journal of infectious diseases*, **150**: 768-775.
- Helmy, Y.A.; Krücken, J.; Nöckler, K.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Zessin, K.H., 2013. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Veterinary Parasitology*, **193**: 15-24.
- Henriksen, S.A.; Pohlenz, J.F., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **22**: 594-596.
- Hill, B.D.; Blewett, D.A.; Dawson, A.M.; Wright, S., 1990. Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Research in Veterinary Science*. **48**: 76-81.
- Hill, B.D., 1990. Enteric protozoa in ruminants: diagnosis and control of *Cryptosporidium*, the role of the immune response. *Revue Scientifique et technique*, **9**: 423-440.
- Hong, D.K.; Wong, C.J.; Gutierrez, K., 2007. Severe cryptosporidiosis in a seven-year-old renal transplant recipient: case report and review of the literature. *Pediatric Transplantation*, **11**: 94-100.
- Hourihan, R.N.; O'Sullivan, G.C.; Morgan, J.G., 2001. High-resolution detection of loss of heterozygosity of dinucleotide microsatellite markers; *Biotechniques*, **30**: 342-346
- Howerth, E.W., 1981. Bovine cryptosporidiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, **52**: 251-253.
- Huetink, R.E.; van der Giessen, J.W.; Noordhuizen, J.P.; Ploeger, H.W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, **102**: 53-67.
- Hunter, P.R.; Hughes, S.; Woodhouse, S.; Raj, N.; Syed, Q.; Chalmers, R.M.; Verlander, N.Q.; Goodacre, J., 2004. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases*, **39**: 504-510.
- Hunter, P.R.; Hadfield, S.J.; Wilkinson, D.; Lake, I.R.; Harrison, F.C.; Chalmers, R.M., 2007. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerging Infectious Diseases*, **13**: 82-88.

Hunter, P.R.; Wilkinson, D.C.; Lake, I.R.; Harrison, F.C.; Syed, Q.; Hadfield, S.J.; Chalmers, R.M., 2008. Microsatellite typing of *Cryptosporidium parvum* in isolates from a waterborne outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 3866-3867.

Hunter, P.R.; Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**: 2465-2466.

Iqbal, J.; Khalid, N.; Hira, P.R., 2011. Cryptosporidiosis in Kuwaiti children: association of clinical characteristics with *Cryptosporidium* species and subtypes. *Journal of Medical Microbiology*, **60**: 647-652.

Iqbal, A.; Lim, Y.A.; Surin, J.; Sim, B.L., 2012. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One*, **7**: e31139.

Imre, K.; Luca, C.; Costache, M.; Sala, C.; Morar, A.; Morariu, S.; Ilie, M.S.; Imre, M.; Dărăbuș, G., 2013. Zoonotic *Cryptosporidium parvum* in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, **191**: 119-122.

Iseki, M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*, **28**, 285-307.

Jaggi, N.; Rajeshwari, S.; Mittal, S.K.; Mathur, M.D.; Baveja, U.K., 1994. Assessment of the immune and nutritional status of the host in childhood diarrhoea due to *Cryptosporidium*. *The Journal of Communicable Diseases*, **26**: 181-185.

Jex, A.R.; Whipp, M.; Campbell, B.E.; Cacciò, S.M.; Stevens, M.; Hogg, G.; Gasser, R.B., 2007. A practical and cost-effective mutation scanning-based approach for investigating genetic variation in *Cryptosporidium*. *Electrophoresis*, **28**: 3875-3883.

Jex, A.R.; Pangasa, A.; Campbell, B.E.; Whipp, M.; Hogg, G.; Sinclair, M.I.; Stevens, M.; Gasser, R.B., 2008. Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 2252-2262.

Jiang, J.; Xiao, L., 2003. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50** Suppl: 542-547.

- Jirků, M.; Valigurová, A.; Koudela, B.; Krížek, J.; Modrý, D.; Slapeta, J., 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica (Praha)*, **55**: 81-94.
- Joachim, A.; Krull, T.; Schwarzkopf, J.; Dauschies, A., 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Veterinary Parasitology*, **112**: 277-288.
- Johnston, S.P.; Ballard, M.M.; Beach, M.J.; Causer, L.; Wilkins, P.P., 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 623-626.
- Juranek, D.D., 2000. Cryptosporidiosis. En: Strickland, G.T. (Ed.). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 8<sup>a</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders.
- Juste, R.A.; García, A.L.; Gelabert, J.L.; González, L.; Marco, J., 1987. Presencia de *Cryptosporidium* spp. en casos de diarreas neonatales de rumiantes. *II Jornadas sobre Producción Animal ITEA*, Volumen extra N° 7, Zaragoza, pp. 256-258.
- Kang'ethe, E.K.; Mulinge, E.K.; Skilton, R.A.; Njahira, M.; Monda, J.G.; Nyongesa, C.; Mbae, C.K.; Kamwari, S.K., 2012. *Cryptosporidium* species detected in calves and cattle in Dagoretti, Nairobi, Kenya. *Tropical Animal Health and Production*, **44** Suppl 1: S25-31.
- Karanis, P.; Plutzer, J.; Halim, N.A.; Igori, K.; Nagasawa, H.; Ongerth, J.; Liqing, M., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitology Research*, **101**: 1575-1580.
- Kehl, K.S.; Cicirello, H.; Havens, P.L., 1995. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**: 416-418.
- Khan, S.M.; Debnath, C.; Pramanik, A.K.; Xiao, L.; Nozaki, T.; Ganguly, S., 2010. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology*, **171**: 41-47.
- Kibbler, C.C.; Smith, A.; Hamilton-Dutoit, S.J.; Milburn, H.; Pattinson, J.K.; Prentice, H.G., 1987. Pulmonary cryptosporidiosis occurring in a bone marrow transplant patient. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **19**: 581-584.
- Kimbell, L.M.; Miller, D.L.; Chavez, W.; Altman, N., 1999. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism- based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 5345-5349.

- Koch, K.L.; Phillips, D.J.; Aber, R.C.; Current, W.L., 1985. Cryptosporidiosis in hospital personnel: Evidence for person-to-person transmission. *Annals of Internal Medicine*, **102**: 593-596.
- Koehler, A.V.; Whipp, M.; Hogg, G.; Haydon, S.R.; Stevens, M.A.; Jex, A.R.; Gasser, R.B., 2014. First genetic analysis of *Cryptosporidium* from humans from Tasmania, and identification of a new genotype from a traveller to Bali. *Electrophoresis*.
- Koinari, M.; Lymbery, A.J.; Ryan, U.M., 2014. *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. *Experimental Parasitology*, **141**: 134-137.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Washington, C.W. Jr., 1997. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott, Philadelphia, p. 1337-1339.
- Korich, D. G.; Mead, J. R.; Madore, M. S.; Sinclair, N. A.; Sterling, C. R., 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1423-1428.
- Koudela, B.; Jiri, V., 1997. Experimental cryptosporidiosis in kids. *Veterinary Parasitology*, **71**: 273-281.
- Koudela, B.; Modry, D., 1998. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitologica*, **45**: 93-100.
- Kváč, M.; Vitovec, J., 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine. B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, **50**: 451-457.
- Kváč, M.; Kouba, M.; Vitovec, J., 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, **137**: 202-209.
- Kváč, M.; Hromadová, N.; Květoňová, D.; Rost, M.; Sak, B., 2011. 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. *Veterinary Parasitology*, **177**: 378-382.
- Kváč, M.; Kestřánová, M.; Pinková, M.; Květoňová, D.; Kalinová, J.; Wagnerová, P.; Kotková, M.; Vítovec, J.; Ditrich, O.; McEvoy, J.; Stenger, B.; Sak, B., 2013.

*Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, **191**: 218-227.

Kváč, M.; Hofmannová, L.; Hlásková, L.; Květoňová, D.; Vítovec, J.; McEvoy, J.; Sak, B., 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*, **201**: 9-17.

Lago, N.; López, C.; Panadero, R.; Cienfuegos, S.; Pato, J.; Prieto, A.; Díaz, P.; Mourazos, N.; Fernández, G., 2012. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, **103**: 163-169.

Lamps, L.W., 2009. Infectious disorders of the GI tract. En: Odze, R.D.; Goldblum, J.R. (Eds). *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*. Saunders Elsevier, Philadelphia, Estados Unidos. pp. 51-80.

Langkjaer, R.B.; Vigre, H.; Enemark, H.L.; Maddox-Hyttel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*, **134**: 339-350.

Lassen, B.; Ståhl, M.; Enemark, H.L., 2014. Cryptosporidiosis - an occupational risk and a disregarded disease in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **56**: 36.

Laxer, M.A.; Timblin, B.K.; Patel, R.J., 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **45**: 688-694.

Leav, B.A.; Mackay, M.R.; Anyanwu, A.; O' Connor, R.M.; Cevallos, A.M.; Kindra, G.; Rollins, N.C.; Bennish, M.L.; Nelson, R.G.; Ward, H.D., 2002. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infection and Immunity*. **70**: 3881-3890.

Leng, X.; Mosier, D.A.; Oberst, R.D., 1996. Differentiation of *Cryptosporidium parvum*, *C. muris*, and *C. baileyi* by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, **62**: 1-7.

Leoni, F.; Gallimore, C.I.; Green, J.; McLauchlin, J., 2003a. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals by using a heteroduplex mobility assay and nucleic acid sequencing based on a small double-stranded RNA element. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 981-992.

Leoni, F.; Gallimore, C.I.; Green, J.; McLauchlin, J., 2003b. A rapid method for identifying diversity within PCR amplicons using a heteroduplex mobility assay and synthetic polynucleotides: application to characterisation of dsRNA elements associated with *Cryptosporidium*. *Journal of Microbiological Methods*, **54**: 95-103.

Leoni, F.; Gallimore, C.I.; Green, J.; McLauchlin, J., 2006. Characterisation of small double stranded RNA molecule in *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Parasitology International*, **55**: 299-306.

Leoni, F.; Mallon, M.E.; Smith, H.V.; Tait, A.; McLauchlin, J., 2007. Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* isolates from sporadic livestock cases in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 3286-3294.

Levine, N.D., 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa, Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology*, **66**: 830-834.

Li, N.; Xiao, L.; Alderisio, K.; Elwin, K.; Cebelinski, E.; Chalmers, R.; Santin, M.; Fayer, R.; Kvac, M.; Ryan, U.; Sak, B.; Stanko, M.; Guo, Y.; Wang, L.; Zhang, L.; Cai, J.; Roellig, D.; Feng, Y., 2014. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*; a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, **20**: 217-224.

Lindsay, D.S.; Upton, S.J.; Owens, D.S.; Morgan, U.M.; Mead, J.R.; Blagburn, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**: 91-95.

Llorente, M.T.; Clavel, A.; Goñi, M.P.; Varea, M.; Seral, C.; Becerril, R.; Suarez, L.; Gómez-Lus, R., 2007. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International*, **56**: 201-205.

Lobo, M.L.; Augusto, J.; Antunes, F.; Ceita, J.; Xiao, L.; Codices, V.; Matos, O., 2014. *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bienersi* and other intestinal parasites in young children in Lobata province, Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. *PLoS One*, **9**: e97708.

Lorenzo-Lorenzo, M.J.; Ares-Mazás, E.; Villacorta Martínez de Maturana, I., 1993. Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*, **47**: 9-15.

Ma, P.; Soave, R., 1983. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *The Journal of infectious diseases*, **147**: 824-828.

MacKenzie, W.R.; Hoxie, N.J.; Proctor, M.E.; Gradus, M.S.; Blair, K.A.; Peterson, D.E.; Kazmierczak, J.J.; Addiss, D.G.; Fox, K.R.; Rose, J.B.; Davis, J.P., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, **331**: 161-167.

Maddox-Hyttel, C.; Langkjaer, R.B.; Enemark, H.L.; Vigre, H., 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs--occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, **141**: 48-59.

MAGRAMA, 2011 Anuario de estadística 2010. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en España, Madrid.

Maikai, B.V.; Umoh, J.U.; Kwaga, J.K.; Lawal, I.A.; Maikai, V.A.; Cama, V.; Xiao, L., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State; Nigeria. *Veterinary Parasitology*, **178**: 241-245.

Majewska, A.C.; Werner, A.; Sulima, P.; Luty, T., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west- central region of Poland. *Veterinary Parasitology*, **89**: 269-275.

Mallon, M.E.; MacLeod, A.; Wastling, J.M.; Smith, H.; Tait, A., 2003a. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infection, Genetics and Evolution*, **3**:207-218.

Mallon, M.; MacLeod, A.; Wastling, J.; Smith, H.; Reilly, B.; Tait, A., 2003b. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Molecular Evolution*, **56**: 407-417.

Mann, E.D.; Sekla, L.H.; Eibisch, G., 1987. *Cryptosporidium* antibodies in manitoba cattle: a pilot study using an indirect fluorescent antibody procedure. *The Canadian Veterinary Journal*, **28**: 126-128.

Mansfield, E.S.; Vainer, M.; Enad, S.; Barker, D.L.; Harris, D.; Rappaport, E.; Fortina, P., 1996. Sensitivity, reproducibility, and accuracy in short tandem repeat genotyping using capillary array electrophoresis. *Genome Research*, **6**: 893-903.

Martín-Gómez, S.; Ortega-Mora, L.M.; Pilar-Izquierdo, M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Pereira-Bueno, J., 1995a. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en terneros en la provincia de León. *IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela*, pp. 118-119.

- Martín-Gómez, S.; Ortega-Mora, L.M.; Pilar-Izquierdo, M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Pereira-Bueno, J., 1995b. Factores epidemiológicos asociados a la infección por *Cryptosporidium parvum* en corderos. *IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela*, pp. 119-120.
- Mathieu, E.; Levy, D.A.; Veverka, F.; Parrish, M.K.; Sarisky, J.; Shapiro, N.; Johnston, S.; Handzel, T.; Hightower, A.; Xiao, L.; Lee, Y.M.; York, S.; Arrowood, M.; Lee, R.; Jones, J.L., 2004. Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**: 582-589.
- Matos-Fernández, M.J.; Pereira-Bueno, J.; Ortega-Mora, L.M.; Pilar-Izquierdo, M.; Ferre, I.; Rojo Vázquez, F.A., 1993. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en corderos; cabritos y terneros en la provincia de León. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **1**: 211.
- Matos-Fernández, M.J.; Ortega-Mora, L.M.; Pereira-Bueno, J.; González-Paniello, R.M.; Reguera de Castro, E.N.; Reyero-Fernández, F.; Álvarez-Pacios, C.; Rojo-Vázquez, F.A., 1994. Epidemiology of cryptosporidiosis in lambs and goats of León. *Medicina Veterinaria*, **11**: 147-154.
- Maurya, P.S.; Rakesh, R.L.; Pradeep, B.; Kumar, S.; Kundu, K.; Garg, R.; Ram, H.; Kumar, A., Banerjee, P.S., 2013. Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* spp. infection in young domestic livestock in India. *Tropical Animal Health and Production*, **45**: 941-946.
- McLauchlin, J.; Casemore, D.P.; Harrison, T.G.; Gerson, P.J.; Samuel, D.; Taylor, A.G., 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts by monoclonal antibody. *Lancet* (i); 51.
- McLauchlin, J.; Amar, C.; Pedraza-Díaz, S.; Nichols, G.L., 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1; 705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 3984-3990.
- Mead, J.R.; Arrowood, M.J.; Sterling, C.R., 1988. Antigens of *Cryptosporidium* sporozoites recognized by immune sera of infected animals and humans. *Journal of Parasitology*, **74**: 135-143.
- Meisel, J.L.; Perera, D.R.; Meligro, C.; Rubin, C.E., 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, **70**: 1156-1160.

Meynard, J.L.; Meyohas, M.C.; Binet, D.; Chouaid, C.; Frottier, J., 1996. Pulmonary cryptosporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Infection*, **24**: 328-331.

Misic, Z.; Abe, N., 2007. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology*, **134**: 351-358.

Misic, Z.; Radivojevic, S.; Katic, K.; Kulisic, Z., 2006. *Cryptosporidium* infection in lambs and goat kids in Serbia. *Acta Veterinaria*, **56**: 49-54.

Mohammed, H.O.; Wade, S.E.; Schaaf, S., 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, **83**: 1-13.

Monge, R.; Chinchilla, M.; Reyes, L., 1996. Seasonality of parasites and intestinal bacteria in vegetables that are consumed raw in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, **44**: 369-375.

Morgan, U.M.; Pallant, L.; Dwyer, B.W.; Forbes, D.A.; Rich, G.; Thompson, R.C.A., 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**: 995-998.

Morgan-Ryan, U.M.; Fall, A.; Ward, L.A.; Hijjawi, N.; Sulaiman, I.; Fayer, R.; Thompson, R.C.A.; Olsen, M.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49**: 433-440.

Morrison, L.J.; Mallon, M.E.; Smith, H.V.; MacLeod, A.; Xiao, L.; Tait, A., 2008. The population structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Scotland: a complex picture. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**: 121-129.

Mtambo, M.M.; Nash, A.S.; Blewett, D.A.; Wright, S., 1992. Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. *Veterinary Parasitology*, **45**: 49-57.

Mueller-Doblies, D.; Giles, M.; Elwin, K.; Smith, R.P.; Clifton-Hadley, F.A.; Chalmers, R.M., 2008. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. *Veterinary Parasitology*, **154**: 214-219.

Muhid, A.; Robertson, I.; Ng, J.; Ryan, U., 2011. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor; Malaysia. *Experimental Parasitology*, **127**: 534-538.

- Muñoz, M.; Alvarez, M.; Lanza, I.; Cármenes, P., 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiology and Infection*, **117**: 203-211.
- Muthusamy, D.; Rao, S.S.; Ramani, S.; Monica, B.; Banerjee, I.; Abraham, O.C.; Mathai, D.C.; Primrose, B.; Muliyl, J.; Wanke, C.A.; Ward, H.D.; Kang, G., 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 632-634.
- Nakamura, K.; Abe, F., 1988. Respiratory (especially pulmonary) and urinary infections of *Cryptosporidium* in layer chickens. *Avian Pathology*, **17**: 703-711.
- Navarro-i-Martinez, L.; da Silva, A.J.; Bornay-Llinares, F.J.; Moura, I.N.; del Aguila, C.; Oleaga, A.; Pieniasek, N.J., 2007. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium bovis-like* isolate from a newborn lamb in Spain. *The Journal of Parasitology*, **93**: 1536-1538.
- Navin, T.R.; Juranek, D.D., 1984. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. *Reviews of Infectious Diseases*, **6**: 313-327.
- Nazemalhosseini-Mojarad, E.; Haghighi, A.; Taghipour, N.; Keshavarz, A.; Mohebi, S.R.; Zali, M.R.; Xiao, L., 2011. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology*, **179**: 250-252.
- Neill, M.A.; Rice, S.K.; Ahmad, N.V.; Flanigan, T.P., 1996. Cryptosporidiosis: An unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, **22**: 168-170.
- Ng, J.; Eastwood, K.; Durrheim, D.; Massey, P.; Walker, B.; Armson, A.; Ryan, U., 2008. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. *Experimental Parasitology*, **119**: 192-195.
- Ng, J.; MacKenzie, B.; Ryan, U., 2010. Longitudinal multi-locus molecular characterisation of sporadic Australian human clinical cases of cryptosporidiosis from 2005 to 2008. *Experimental Parasitology*, **125**: 348-356.
- Ng, J.S.; Eastwood, K.; Walker, B.; Durrheim, D.N.; Massey, P.D.; Porigneaux, P.; Kemp, R.; McKinnon, B.; Laurie, K.; Miller, D.; Bramley, E.; Ryan, U., 2012. Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. *Experimental Parasitology*, **130**: 437-441.

- Ngouanesavanh, T., Guyot, K.; Certad, G.; Le Fichoux, Y.; Chartier, C.; Verdier, R.I.; Cailliez, J.C.; Camus, D., Dei-Cas, E.; Bañuls, A.L., 2006. *Cryptosporidium* population genetics: evidence of clonality in isolates from France and Haiti. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** Suppl 1: S33-6.
- Nichols, R.A.; Campbell, B.M.; Smith, H.V., 2006. Molecular fingerprinting of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 5428-5435.
- Nime, F.A.; Burek, J.D.; Page, D.L.; Holscher, M.A.; Yardley, J.H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, **70**: 592-598.
- Noordeen, F.; Horadagoda, N.U.; Faizal, A.C.; Rajapakse, R.P.; Razak, M.A.; Arulkanthan, A., 2002. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goat kids. *Veterinary Parasitology*, **103**: 217-225.
- Nydam, D.V.; Wade, S.E.; Schaaf, S.L.; Mohammed, H.O., 2001. Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research*, **62**: 1612-1615.
- O'Brien, E.; McInnes, L.; Ryan, U., 2008. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Experimental Parasitology*, **118**: 118-121.
- O'Connor, R.M.; Wanyiri, J.W.; Cevallos, A.M.; Priest, J.W.; Ward, H.D., 2007. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Molecular and Biochemical parasitology*, **156**: 80-83.
- O'Donoghue, P.J., 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, **25**: 139-195.
- Olson, M.E.; Thorlakson, C.L.; Deselliers, L.; Morck, D.W.; McAllister, T.A., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*, **68**: 375-381.
- Ondráčková, Z.; Kvác, M.; Sak, B.; Kvetonová, D.; Rost, M., 2009. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia; the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, **165**: 141-144.

Ongerth, J.E.; Stibbs, H.H., 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**: 672-676.

Oporto, B.; Esteban, J.I.; Aduriz, G.; Juste, R.A.; Hurtado, A., 2007. Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle; sheep and swine farms. *Journal of applied microbiology*, **103**: 977-984.

Orden, J.A.; Cid, D.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; García, S.; Martínez, S.; de la Fuente, R., 2002. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC); enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *Journal of applied microbiology*, **93**: 29-35.

Ortega-Mora, L.M.; Wright, S.E., 1994. Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. *Infection and Immunity*, **62**: 5003-5009.

Ortega-Mora, L.M.; Troncoso, J.M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Gómez-Bautista, M., 1992. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Infection and Immunity*, **60**: 3442-3445.

Ortega-Mora, L.M.; Troncoso, J.M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Gómez-Bautista, M., 1993. Serum antibody response in lambs naturally and experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary Parasitology*, **50**: 45-54.

Ortega-Mora, L.M.; Troncoso, J.M.; Rojo-Vazquez, F.A.; Gomez-Bautista, M., 1994. Identification of *Cryptosporidium parvum* oocyst/sporozoite antigens recognized by infected and hyperimmune lambs. *Veterinary Parasitology*, **53**: 159-166.

Ortega-Mora, L.M.; Gomez-Bautista, M.; Rojo-Vazquez, F.A., 1999. Criptosporidiosis. En: Cordero del Campillo, M. y Rojo-Vázquez, F.A. (Eds.), *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid (España).

Oura, C.A.; Odongo, D.O.; Lubega, G.W.; Spooner, P.R.; Tait, A.; Bishop, R.P., 2003. A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. *International Journal for Parasitology*, **33**: 1641-1653.

Paoletti, B.; Giangaspero, A.; Gatti, A.; Iorio, R.; Cembalo, D.; Milillo, P.; Traversa, D., 2009. Immunoenzymatic analysis and genetic detection of *Cryptosporidium parvum* in lambs from Italy. *Experimental Parasitology*, **122**: 349-352.

- Park, J.H.; Guk, S.M.; Han, E.T.; Shin, E.H.; Kim, J.L.; Chai, J.Y., 2006. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun; Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, **44**: 27-33.
- Paraud, C.; Pors, I.; Rieux, A.; Brunet, S., 2014. High excretion of *Cryptosporidium ubiquitum* by peri-parturient goats in one flock in western France. *Veterinary Parasitology*, **202**: 301-304.
- Pasqualotto, A.C.; Denning, D.W.; Anderson, M.J., 2007. A cautionary tale: lack of consistency in allele sizes between two laboratories for a published multilocus microsatellite typing system. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 522-528.
- Pavlassek, I., 1984. Effect of disinfectants in infectiousness of oocysts of *Cryptosporidium* spp.. *Ceskoslovenská Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, **33**: 97-101.
- Paz e Silva, F.M.; Lopes, R.S.; Bresciani, K.D.; Amarante, A.F.; Araujo, J.P. Jr., 2014. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. *Acta Parasitologica*, **59**: 193-196.
- Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.; Nichols, G.L.; McLauchlin, J., 2001. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerging Infectious Diseases*, **7**: 49-56.
- Peng, M.M.; Xiao, L.; Freeman, A.R.; Arrowood, M.J.; Escalante, A.A.; Weltman, A.C.; Ong, C.S.; Mac Kenzie, W.R.; Lal, A.A.; Beard, C.B., 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, **3**: 567-573.
- Peng, M.M.; Matos, O.; Gatei, W.; Das, P.; Stantic-Pavlinic, M.; Bern, C.; Sulaiman, I.M.; Glaberman, S.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2001. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, Suppl:28S-31S.
- Peng, M.M.; Meshnick, S.R.; Cunliffe, N.A.; Thindwa, B.D.; Hart, C.A.; Broadhead, R.L.; Xiao, L., 2003. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50** Suppl: 557-559.
- Pilar-Izquierdo, M.; Ortega-Mora, L.M.; Pereira-Bueno, J.; Rojo-Vázquez, F.A., 1993. Participación de *Cryptosporidium parvum* en brotes de diarrea en corderos en el NO de Castilla y León. *III Congreso Ibérico de Parasitología. Lisboa*, **1**: 223.

- Pitlik, S.D.; Fainstein, V.; Garza, D.; Guarda, L.; Bolivar, R.; Rios, A.; Hopfer, R.L.; Mansell, P.A., 1983. Human cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. *Archives of Internal Medicine*, **143**: 2269-2275.
- Plutzer, J.; Karanis, P., 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology*, **146**: 57-62.
- Plutzer, J.; Karanis, P., 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, **165**: 187-199.
- Potters, I.; Van Esbroeck, M., 2010. Negative Staining Technique of Heine for the Detection of *Cryptosporidium* spp.: A Fast and Simple Screening Technique. *The Open Parasitology Journal*, **4**: 1-4 11874-4214/10.
- Power, M.L.; Ryan, U.M., 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, **94**: 1114-1117.
- Pritchard, G.C.; Marshall, J.A.; Giles, M.; Chalmers, R.M.; Marshall, R.N., 2007. *Cryptosporidium parvum* infection in orphan lambs on a farm open to the public. *The Veterinary Record*, **161**: 11-14.
- Pritchard, G.C.; Marshall, J.A.; Giles, M.; Mueller-Doblies, D.; Sayers, A.R.; Marshall, R.N.; Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2008. *Cryptosporidium* species in lambs submitted for diagnostic postmortem examination in England and Wales. *The Veterinary Record*, **163**: 688-689.
- Quigley, J.D.; Martin, K.R.; Bemis, D.A.; Potgieter, L.N.; Reinemeyer, C.R.; Rohrbach, B.W.; Dowlen, H.H.; Lamar, K.C., 1994. Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, **77**: 3124-3131.
- Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; Del Cacho, E.; Clavel, A.; Causapé, A.C., 1996a. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **66**: 139-146.
- Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., Clavel, A., del Cacho E. and López-Bernad, F. 1996b. Comparison of an acidfast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Veterinary Parasitology*, **67**: 75-81.

- Quílez, J.; Vergara-Castiblanco, C.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; Lopez-Bernad, F., 2001. Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en ganado caprino en la provincia de Zaragoza. Estudio preliminar. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **8**: 167.
- Quílez, J.; Sanchez-Acedo, C.; Avendaño, C.; del Cacho, E.; Lopez-Bernad, F., 2005. Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 2479-2483.
- Quílez, J.; Torres, E.; Chalmers, R.M.; Robinson, G.; Del Cacho, E.; Sanchez-Acedo, C., 2008a. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology*, **135**: 1613-1620.
- Quílez, J.; Torres, E.; Chalmers, R.M.; Hadfield, S.J; Del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C., 2008b. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, **74** pp. 6026-6031.
- Quílez, J.; Vergara-Castiblanco, C.; Monteagudo, L.; Del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C., 2011. Multilocus fragment typing and genetic structure of *Cryptosporidium parvum* Isolates from diarrheic preweaned calves in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 7779-7786.
- Randall, C.J., 1986. Renal and nasal cryptosporidiosis in a junglefowl (*Gallus sonneratii*). *The Veterinary Record*, **119**: 130-131.
- Reduker, D.W.; Speer, C.A.; Blixt, J.A., 1985. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. *The Journal of Protozoology*, **32**: 708-711.
- Reed, C.; Sturbaum, G.D.; Hoover, P.J.; Sterling, C.R., 2002. *Cryptosporidium parvum* mixed genotypes detected by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 427-429.
- Ren, X.; Zhao, J.; Zhang, L.; Ning, C.; Jian, F.; Wang, R.; Lv, C.; Wang, Q.; Arrowood, M.J.; Xiao, L., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, **130**: 274-281.
- Rieux, A.; Paraud, C.; Pors, I.; Chartier, C., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. *Veterinary Parasitology*, **192**: 268-272.

- Rieux, A.; Paraud, C.; Pors, I.; Chartier, C., 2014. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. *Veterinary Parasitology*, **202**: 171-179.
- Robert, B.; Ginter, A.; Antoine, H.; Collard, A.; Coppe, P., 1990. Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, **37**: 1-8.
- Robertson, L.J.; Gjerde, B.K.; Furuseth Hansen, E., 2010. The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Veterinary Parasitology*, **171**: 140-145.
- Robinson, G.; Wright, S.; Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Katzer, F.; Bartley, P.M.; Hunter, P.R.; Nath, M.; Innes, E.A.; Chalmers, R.M., 2010. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, **40**: 1539-1548.
- Robinson, G.; Chalmers, R.M., 2012. Assessment of polymorphic genetic markers for multi-locus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Experimental Parasitology*, **132**: 200-215.
- Roca Fernández A.I.; González A.; López Mosquera M.E., 2012. Los recursos forrajeros en las explotaciones de vacuno de leche. *Albéitar*, N° **160**, pp.8-9
- Rojo-Vázquez, F.A.; Gass, A.; Alunda, J.M., 1985. Denuncia en España de la criptosporidiosis ovina. *IV Congreso Nacional de Parasitología, Tenerife*, p. 166.
- Roy, S.S.; Sarkar, S.; Batabyal, S.; Pramanik, A.K.; Das, P., 2006. Observations on the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in India. *Veterinary Parasitology*, **141**: 330-333.
- Rusnak, J.; Hadfield, T.L.; Rhodes, M.M.; Gaines, J.K., 1989. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by an indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 1135-1136.
- Ryan, U.M.; Xiao, L.; Read, C.; Sulaiman, I.M.; Monis, P.; Lal, A.A.; Fayer, R.; Pavlasek, I., 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa, *Cryptosporidiidae*) from birds. *Journal of Parasitology*, **89**: 809-813.
- Ryan, U.M.; Monis, P.; Enemark, H.L.; Sulaiman, I.; Samarasinghe, B.; Read, C.; Buddle, R.; Robertson, I.; Zhou, L.; Thompson, R.C.; Xiao, L., 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa, *Cryptosporidiidae*) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, **90**: 769-773.

- Ryan, U.M.; Power, M.; Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55**: 22-26.
- Ryan, U.M.; Bath, C.; Robertson, I.; Read, C.; Elliot, A.; McInnes, L.; Traub, R.; Besier, B., 2005. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 4992-4997.
- Sanz-Ceballos, L.; Illescas Gómez, P.; Sanz Sampelayo, M.R.; Gil Extremera, F.; Rodríguez Osorio, M., 2009. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats maintained under semi-extensive feeding conditions in the southeast of Spain. *Parasite*, **16**: 315-318.
- Sanford, S.E.; Josephson, G.K., 1982. Bovine Cryptosporidiosis: Clinical and Pathological Findings in Forty-two Scouring Neonatal Calves. *The Canadian Veterinary Journal*, **23**: 343-347.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Zhou, L.; Greiner, E.; Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, **122**: 103-117.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Fayer, R., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Veterinary Parasitology*, **146**: 17-24.
- Santín, M.; Fayer, R., 2007. Intragenotypic variations in the *Cryptosporidium* sp. cervine genotype from sheep with implications for public health. *The Journal of Parasitology*, **93**: 668-672.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, **155**: 15-23.
- Santín, M., 2013. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, **61**: 1-10.
- Santín, M.; Trout, J.M., 2008. Livestock. En: Fayer, R. and Xiao, L. (Eds.); *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 451-483.
- Schindler, A.R.; Abs El-Osta, Y.G.; Stevens, M.; Sinclair, M.I.; Gasser, R.B., 2005. Capillary electrophoretic analysis of fragment length polymorphism in ribosomal markers of *Cryptosporidium* from humans. *Molecular and Cellular Probes*, **19**: 394-399.

- Shen, Y.; Yin, J.; Yuan, Z.; Lu, W., Xu, Y.; Xiao, L.; Cao, J., 2011. The identification of the *Cryptosporidium ubiquitum* in pre-weaned Ovines from Aba Tibetan and Qiang autonomous prefecture in China. *Biomedical and Environmental Sciences*, **24**: 315-320.
- Shinde, D.; Lai, Y.; Sun, F.; Arnheim, N., 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. *Nucleic Acids Research*, **31**: 974-980.
- Shirley, D.A.; Moonah, S.N.; Kotloff, K.L., 2012. Burden of disease from cryptosporidiosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **25**: 555-563.
- Shrestha, R.D.; Grinberg, A.; Dukkipati, V.S.; Pleydell, E.J.; Prattley, D.J.; French, N.P., 2014. Infections with multiple *Cryptosporidium* species and new genetic variants in young dairy calves on a farm located within a drinking water catchment area in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, **202**: 287-291.
- Siddons, C.A.; Chapman, P.A.; Rush, B.A., 1992. Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in faeces and environmental samples. *Journal of Clinical Pathology*, **45**: 479-482.
- Silverlås, C.; de Verdier, K.; Emanuelson, U.; Mattsson, J.G.; Björkman, C., 2010a. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. *Parasitology Research*, **107**: 1435-1444.
- Silverlås, C.; Näslund, K.; Björkman, C.; Mattsson, J.G., 2010b. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Veterinary Parasitology*, **169**: 289-295.
- Silverlås, C.; Bosaeus-Reineck, H.; Näslund, K.; Björkman, C., 2013. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves? *International Journal for Parasitology*, **43**: 155-161.
- Šlapeta, J., 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow?. *International Journal for Parasitology*, **43**: 957-970.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, **65**: 262-270.
- Smith, H., 2008. Diagnostics. En: En: Fayer, R. and Xiao, L. (Eds.); *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida (EE.UU.).

- Smith, H.V.; Ronald, A., 2001. *Cryptosporidium*: the analytical challenge, in *Cryptosporidium: The Analytical Challenge*, Smith, M. and Thompson, K., Eds. *The Royal Society of Chemistry; Cambridge; U.K.* pp. 1-43; chap. 1.
- Smith, H. V.; Grimason, A. M., 2003. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater, in *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Mara, D. and Horan, N. Eds., *Elsevier Science Limited; Oxford; U.K.*, pp. 619-781.
- Smith, H.V.; Nichols, R.A.; Grimason, A.M., 2005a. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, **21**: 133-142.
- Smith, H.V.; Nichols, R.A.; Mallon, M.; Macleod, A.; Tait, A.; Reilly, W.J.; Browning, L.M.; Gray, D.; Reid, S.W.; Wastling, J.M., 2005b. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *The Veterinary Record*, **156**: 710-711.
- Smith, A.; Reacher, M.; Smerdon, W.; Adak, G.K.; Nichols, G.; Chalmers, R.M., 2006. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales; 1992-2003. *Epidemiology and Infection*, **134**: 1141-1149.
- Smith, R.P.; Chalmers, R.M.; Mueller-Doblies, D.; Clifton-Hadley, F.A.; Elwin, K.; Watkins, J.; Paiba, G.A.; Hadfield, S.J.; Giles, M., 2010. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Preventive Veterinary Medicine*, **94**: 9-17.
- Smith, R.P.; Clifton-Hadley, F.A.; Cheney, T.; Giles, M., 2014. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Veterinary Parasitology*, **204**: 111-119.
- Snodgrass, D.R.; Angus, K.W.; Gray, E.W., 1984. Experimental cryptosporidiosis in germfree lambs. *Journal of comparative pathology*, **94**: 141-452.
- Snodgrass, D.R.; Terzolo, H.R.; Sherwood, D.; Campbell, I.; Menzies, J.D.; Syngé, B.A., 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *The Veterinary Record*, **119**: 31-34.
- Soave, R.; Danner, R.L.; Honig, C.L.; Ma, P.; Hart, C.C.; Nash, T.; Roberts, R.B., 1984. Cryptosporidiosis in homosexual men. *Annals of Internal Medicine*, **100**: 504-511.
- Soba, B.; Petrovec, M.; Mioc, V.; Logar, J., 2006. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infection*, **12**: 918-921.

- Soba, B.; Logar, J., 2008. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*, **135**: 1263-1270.
- Soltane, R.; Guyot, K.; Dei-Cas, E.; Ayadi, A., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. *Parasite*, **14**: 335-33.
- Spano, F.; Crisanti, A., 2000. *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *International Journal for Parasitology*, **30**: 553-65.
- Stantic-Pavlinic, M.; Xiao, L.; Glaberman, S.; Lal, A.A., Orazen, T.; Rataj-Verglez, A.; Logar, J.; Berce, I., 2003. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wiener Klinische Wochenschrift*, **115**: 125-127.
- Starkey, S.R.; Zeigler, P.E.; Wade, S.E.; Schaaf, S.L.; Mohammed, H.O., 2006. Factors associated with shedding of *Cryptosporidium parvum* versus *Cryptosporidium bovis* among dairy cattle in New York State. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **229**: 1623-1626.
- Sterling, C.R.; Arrowood, M.J., 1986. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. *Pediatric Infectious Disease*, **5**: S139-142.
- Stibbs, H.H.; Ongerth, J.E., 1986. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*, **24**: 517-521.
- Strong, W.B.; Gut, J.; Nelson, R.G., 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and Immunity*, **68**: 4117-4134.
- Sulaiman, I.M.; Morgan, U.M.; Thompson, R.C.A.; Lal, A.A.; Xiao, L.H., 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 2385-2391.
- Sulaiman, I.M.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2001. A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, Suppl: 24S-27S.
- Sulaiman, I.M.; Lal, A.A.; Xiao, L.H., 2002. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology*, **88**: 388-394.

Sulaiman, I.M.; Hira, P.R.; Zhou, L.; Al-Ali, F.M.; Al-Shelahi, F.A.; Shweiki, H.M.; Iqbal, J.; Khalid, N.; Xiao, L., 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 2805-2809.

Sweeny, J.P.; Ryan, U.M.; Robertson, I.D.; Yang, R.; Bell, K.; Jacobson, C., 2011. Longitudinal investigation of protozoan parasites in meat lamb farms in southern Western Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, **101**:192-203.

Sweeny, J.P.; Robertson, I.D.; Ryan, U.M.; Jacobson, C.; Woodgate, R.G., 2012. Impacts of naturally acquired protozoa and strongylid nematode infections on growth and faecal attributes in lambs. *Veterinary Parasitology*, **184**: 298-308.

Tanriverdi, S.; Arslan, M.O.; Akiyoshi, D.E.; Tzipori, S.; Widmer, G., 2003. Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Molecular and Biochemical parasitology*, **130**: 13-22.

Tanriverdi, S.; Markovics, A.; Arslan, M.O.; Itik, A.; Shkap, V.; Widmer, G., 2006. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 2507-2513.

Tanriverdi, S.; Widmer, G., 2006. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infection, Genetics and Evolution*, **6**: 113-122.

Thompson, R.C.; Olson, M.E.; Zhu, G.; Enomoto, S.; Abrahamsen, M.S.; Hijjawi, N.S., 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, **59**: 77-158.

Thompson, R.C.; Palmer, C.S.; O'Handley, R., 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary Journal*, **177**: 18-25.

Thompson, H.P.; Dooley, J.S.; Kenny, J.; McCoy, M.; Lowery, C.J.; Moore, J.E.; Xiao, L., 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitology Research*, **100**: 619-624.

Tyzzer, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **5**, 12 y 13.

Tyzzer, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv fuer Protistenkunde*, **26**: 394-412.

- Tomazic, M.L.; Maidana, J.; Dominguez, M.; Uriarte, E.L.; Galarza, R.; Garro, C.; Florin-Christensen, M.; Schnittger, L., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Veterinary Parasitology*, **198**: 382-386.
- Torres, E., 2010. Aportaciones al conocimiento de la epidemiología molecular de la criptosporidiosis en ruminantes y ganado porcino en el norte de España. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Trampel, D.W.; Pepper, T.M.; Blagburn, B.L., 2000. Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens. *Avian Diseases*, **44**: 479-484.
- Trotz-Williams, L.A.; Martin, D.S.; Gatei, W.; Cama, V.; Peregrine, A.S.; Martin, S.W.; Nydam, D.V.; Jamieson, F.; Xiao, L., 2006. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research*, **99**: 346-352.
- Tzipori, S., 1988. Cryptosporidiosis in perspective. *Advances in Parasitology*, **27**: 63-129.
- Tzipori, S.; Campbell, I., 1981. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *Journal of Clinical Microbiology*, **14**: 455-456.
- Tzipori, S.; Ward, H., 2002. Cryptosporidiosis: biology; pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, **4**: 1047-1058.
- Tzipori, S.; Campbell, I.; Sherwood, D.; Snodgrass, D.R.; Whitelaw, A., 1980. An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *The Veterinary Record*, **107**: 579-580.
- Tzipori, S.; Angus, K.W.; Gray, E.W.; Campbell, I.; Allan, F., 1981. Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *American Journal of Veterinary Research*, **42**: 1400-1404.
- Tzipori, S.; Larsen, J.; Smith, M.; Luefl, R.U., 1982. Diarrhoea in goat kids attributed to *Cryptosporidium* infection. *Veterinary Record*, **111**: 35-36.
- Tzipori, S.; Smith, M.; Halpin, C.; Angus, K.W.; Sherwood, D.; Campbell, I., 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *The Veterinary Record*, **112**: 116-120.
- Ungureanu, E.M.; Dontu, G.E., 1992. A new staining technique for the identification of *Cryptosporidium* oocysts in faecal smears. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**: 638.

Valenzuela, O.; González-Díaz, M.; Garibay-Escobar, A.; Burgara-Estrella, A.; Cano, M.; Durazo, M.; Bernal, R.M.; Hernandez, J.; Xiao, L., 2014. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. *PLoS One*, **9**: e96128.

Vetterling, J.M.; Jarvis, H.R.; Merrill, T.G.; Sprinz, H., 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus* with an emendation of the genus. *Journal of Protozoology*, **18**: 243-247.

Villacorta Martínez de Maturana, M.I., 1989. Diagnóstico; incidencia y profilaxis de la cryptosporidiosis. Infecciones experimentales. *Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela*. 119 pp.

Vítovec, J.; Koudela, B., 1988. Location and pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* in experimentally infected mice. *Zentralbl Veterinarmed B*, **35**:515-524.

Waldron, L.S.; Ferrari, B.C.; Power, M.L., 2009. Glycoprotein 60 diversity in *C. hominis* and *C. parvum* causing human cryptosporidiosis in NSW, Australia. *Experimental Parasitology*, **122**(2): 124-7.

Waldron. L.S.; Dimeski, B.; Beggs, P.J.; Ferrari, B.C.; Power, M.L., 2011. Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 7757-7765

Wang, Y.; Feng, Y.; Cui, B.; Jian, F.; Ning, C.; Wang, R.; Zhang, L.; Xiao, L., 2010. Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitology Research*, **106**: 341-347.

Wang, R.; Wang, H.; Sun, Y.; Zhang, L.; Jian, F.; Qi, M.; Ning, C.; Xiao, L., 2011. Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan; China. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 1077-1082.

Wang, R.; Li, G.; Cui, B.; Huang, J.; Cui, Z.; Zhang, S.; Dong, H.; Yue, D.; Zhang, L.; Ning, C.; Wang, M., 2014. Prevalence; molecular characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium* spp. in goats in Henan and Chongqing; China. *Experimental Parasitology*, **142**: 11-16.

Weir, S. C.; Pokorny, N. J.; Carreno, R. A.; Trevors, J. T.; Lee, H., 2002. Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2576-2579.

- Weitzel, T.; Dittrich, S.; Möhl, I.; Adusu, E.; Jelinek, T., 2006. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clinical Microbiology and Infection*, **12**: 656-659.
- Wetzel, D.M.; Schmidt, J.; Kuhlenschmidt, M.S.; Dubey, J.P.; Sibley, L.D., 2005. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*, **73**: 5379-5387.
- Whitmire, W.M.; Harp, J.A., 1991. Characterization of bovine cellular and serum antibody responses during infection by *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity*, **59**: 990-995.
- Widmer, G.; Feng, X.; Tanriverdi, S., 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. *Methods in Molecular Biology*, **268**: 177-187.
- Widmer, G.; Sullivan, S., 2012. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunology*, **34**: 61-71.
- Wielinga, P.R.; de Vries, A.; van der Goot, T.H.; Mank, T.; Mars, M.H.; Kortbeek, L.M.; van der Giessen, J.W., 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *International Journal for Parasitology*, **38**: 809-817.
- Williams, R.O.; Burden, D.J., 1987. Measurement of class specific antibody against *cryptosporidium* in serum and faeces from experimentally infected calves. *Research in Veterinary Science*, **43**: 264-265.
- Wolska-Kusnierz, B.; Bajer, A.; Caccio, S.; Heropolitanska-Pliszka, E.; Bernatowska, E.; Socha, P.; van Dongen, J.; Bednarska, M.; Paziewska, A.; Sinski, E., 2007. *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiencies. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **45**: 458-464.
- Wu, Z.; Nagano, I.; Boonmars, T.; Nakada, T.; Takahashi, Y., 2003. Intraspecies polymorphism of *Cryptosporidium parvum* revealed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and RFLP-single-strand conformational polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 4720-4726.
- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, **124**: 80-89.
- Xiao, L.; Ryan, U.M., 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **17**: 483-490.

Xiao, L.; Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **52**: 309-323.

Xiao, L.; Ryan, U.M., 2008. Molecular epidemiology. En: Fayer R., Xiao, L. (Eds). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *CRC Press; Taylor and Francis Group; Boca Raton*. pp 119-172.

Xiao, L.; Escalante, L.; Yang, C.; Sulaiman, I.; Escalante, A.A.; Montali, R.J.; Fayer, R.; Lal, A.A., 1999a. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1578-1583.

Xiao, L.; Morgan, U.M.; Limor, J.; Escalante, A.; Arrowood, M.; Shulaw, W.; Thompson, R.C.; Fayer, R.; Lal, A.A., 1999b. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 3386-3391.

Xiao, L.; Singh, A.; Limor, J.; Graczyk, T.K.; Gradus, S.; Lal, A., 2001a. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied Environmental Microbiology*, **67**: 1097-1101.

Xiao, L.; Limor, J.; Bern, C.; Lal, A.A., 2001b. Epidemic Working Group. Tracking *Cryptosporidium parvum* by sequence analysis of small double-stranded RNA. *Emerging Infectious Diseases*, **7**: 141-145.

Xiao, L.; Fayer, R.; Ryan, U.; Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**: 72-97.

Xiao, L.; Zhou, L.; Santin, M.; Yang, W.; Fayer, R., 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitology Research*, **100**: 701-706.

Xu, P.; Widmer, G.; Wang, Y.; Ozaki, L.S.; Alves, J.M.; Serrano, M.G.; Puiu, D.; Manque, P.; Akiyoshi, D.; Mackey, A.J.; Pearson, W.R.; Dear, P.H.; Bankier, A.T.; Peterson, D.L.; Abrahamsen, M.S.; Kapur, V.; Tzipori, S.; Buck, G.A., 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, **431**: 1107-1112.

Yang, R.; Jacobson, C.; Gordon, C.; Ryan, U., 2009. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in preweaned sheep in Australia. *Veterinary Parasitology*, **161**: 19-24.

Yang, R.; Jacobson, C.; Gardner, G.; Carmichael, I.; Campbell, A.J.; Ng-Hublin, J.; Ryan, U., 2014. Longitudinal prevalence; oocyst shedding and molecular characterisation of

*Cryptosporidium* species in sheep across four states in Australia. *Veterinary Parasitology*, **200**: 50-58.

Ye, J.; Xiao, L.; Wang, Y.; Wang, L.; Amer, S.; Roellig, D.M.; Guo, Y.; Feng, Y., 2013. Periparturient transmission of *Cryptosporidium xiaoi* from ewes to lambs. *Veterinary Parasitology*, **197**: 627-633.

You, X.; Arrowood, M.J.; Lejkowski, M.; Xie, L.; Schinazi, R.F.; Mead, J.R., 1996. A chemiluminescence immunoassay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* growth in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, **136**: 251-256.

Zhang, W.; Wang, R.; Yang, F.; Zhang, L.; Cao, J.; Zhang, X.; Ling, H.; Liu, A.; Shen, Y., 2013. Distribution and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in Northeastern China's Heilongjiang Province. *PLoS One*, **8**: e54857.

Zhou, L.; Singh, A.; Jiang, J.; Xiao, L., 2003. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 5254-5257.

Zintl, A.; Proctor, A.F.; Read, C.; Dewaal, T.; Shanaghy, N.; Fanning, S.; Mulcahy, G., 2009. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiology and Infection*, **137**: 270-277.

Zintl, A.; Ezzaty-Mirashemi, M.; Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Mulcahy, G.; Lucy, F.E.; DE Waal, T., 2011. Longitudinal and spatial distribution of GP60 subtypes in human cryptosporidiosis cases in Ireland. *Epidemiology and Infection*, **139**: 1945-1955.