

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



Técnicas de diagnóstico de *Cryptosporidium spp* en animales domésticos

POR

ANA GABRIELA GAETA RAMÍREZ

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE DE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Técnicas de diagnóstico de *Cryptosporidium spp* en animales domésticos

POR

ANA GABRIELA GAETA RAMÍREZ

MONOGRAFÍA

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

PRESIDENTE:

M.V.Z JESUS GAETA COVARRUBIAS

VOCAL:

M.C. MARÍA HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE

VOCAL:

M.C. JORGE ITÚRBIDE RAMÍREZ

VOCAL SUPLENTE:

M.C. ARACELY ZUÑIGA SERRANO

MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE DE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Técnicas de diagnóstico de *Cryptosporidium spp* en animales domésticos

POR

ANA GABRIELA GAETA RAMÍREZ

MONOGRAFÍA

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

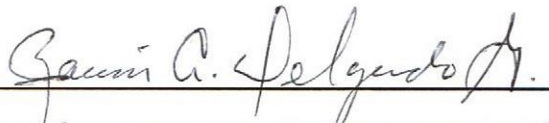
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

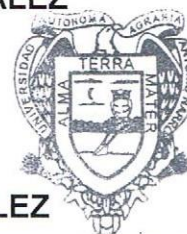
ASESOR PRINCIPAL:



MC. RAMÓN A. DELGADO GONZÁLEZ



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ



COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

NOVIEMBRE DE 2015

I. DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi papá, por brindarme todo su amor y su apoyo incondicional sin medida, por ser ejemplo de mi vida, por enseñarme a continuar aún en la adversidad y por impulsarme con su ejemplo y su amor interminable a convertirme en una mejor profesionalista y sobre todo, en un mejor ser humano.

A mi mamá y a mi hermana, por enseñarme con su ejemplo y su vida a dar siempre lo mejor, a ser gentil y a la vez ser fuerte y no rendirse nunca. Aunque ellas ya no se encuentran físicamente conmigo, aún siento su amor.

II. AGRADECIMIENTOS

A mi ALMA MATER y a cada uno de los profesores que compartieron sus conocimientos y su experiencia profesional conmigo, a todos los que con sus clases y su ejemplo me motivaron a seguir preparándome. Gracias por hacer todo lo posible por ofrecernos una clase interesante y práctica y de esa manera motivarnos a aprender, pero sobre todo por sembrar en nosotros la semillita de la curiosidad y la motivación.

A mis amigos, mis hermanos y hermanas por elección. Gracias por su apoyo en todo momento, por su compañía y por aportar tantos buenos momentos y tanta alegría a mi vida.

A mi asesor y amigo, el M.C. Ramón Delgado, por compartir todos sus conocimientos y su apoyo incondicional y a su adorable esposa Norma, por abrirme las puertas de su casa y hacerme parte de un grupo de amigos muy selecto.

A mi prometido, Fernando, por todo su amor, su confianza y su esfuerzo, por ayudarme a soñar y convertir mis sueños en sus sueños, por ser mi brazo derecho y mi apoyo siempre.

Pero sobre todo gracias a ti, papá, por creer en mí y en mis sueños siempre, por hacer de mí una mujer de provecho, honesta, autosuficiente y segura de mí misma. Gracias por tanto amor y tanto apoyo siempre inagotables, por tus abrazos, por llenarme de armas para salir adelante en la vida. Gracias por todo lo que me has dado.

III. ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Índice de contenido.....	III
Índice de figuras.....	IV
Resumen.....	V
1. Introducción.....	1
2. Historia.....	2
3. <i>Cryptosporidium</i> y criptosporidiosis.....	4
3.1. Criptosporidiosis en el reino animal.....	6
3.1. Consideraciones generales.....	8
4. Técnicas de diagnóstico de <i>Cryptosporidium spp</i> en animales domésticos.....	10
4.1. Microscopía.....	11
4.1.1. Técnica de concentración de ooquistes.....	11
4.1.2. Uso de la tinción para la identificación de ooquistes de <i>Cryptosporidium spp</i>	13
A) Tinción Ziehl-Neelsen.....	13
B) Tinción Kinyoun.....	16
C) Tinción Giemsa.....	16
D) Tinción Heine.....	17
E) Tinción Köster.....	18
4.2. Pruebas inmunológicas.....	20
A) Inmunofluorescencia.....	20
B) Detección de antígenos de <i>Cryptosporidium spp</i> por	

Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	22
C) Detección de antígenos por inmunocromatografía.....	23
4.3. Diagnóstico molecular.....	25
4.3.1. Extracción de ADN.....	29
5. Conclusiones.....	31
6. Literatura citada.....	34

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Frotis fecal teñido con Safranina-Azul de metileno. Esta imagen, muestra los ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> (naranja-rosas) y levaduras (azul) (1500X)	15
Figura 2	Frotis de heces teñido con la técnica caliente de Ziehl-Neelsen y decolorado con alcohol ácido. A diferencia de la imagen anterior, muestra una pobre retención de carbol fucsina. (1500X)	15
Figura 3	<i>Cryptosporidium</i> en corte histológico de estómago teñido con técnica Giemsa	17
Figura 4	Ooquistes de <i>Cryptosporium spp.</i> teñidos con la técnica Ziehl-Neelsen (A) y teñidos con la técnica Heine (B)	18
Figura 5	En contraste con el fondo azul-verde, es muy sencillo identificar los ooquistes. Los esporozoitos se observan dentro de los dos ooquistes a la derecha	19
Figura 6	Quistes <i>Giardia</i> y ooquistes de <i>Cryptosporidium</i>	20
Figura 7	<i>C. parvum</i> . Técnica DAPI (tinción vital basada en la absorción de fluorocromos específicos)	22

V. RESUMEN

La criptosporidiosis es una infección producida por parásitos protozoarios del género *Cryptosporidium* los cuales pueden ser ingeridos en el agua y el alimento contaminado, siendo capaz de producir diarrea en diversos vertebrados, incluyendo al hombre. Se han identificado *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. parvum* y *C. meleagridis* como los principales causantes de la criptosporidiosis en bovinos y *C. hominis* como el principal causante de la “diarrea del viajero” en humanos. Los signos característicos son diarrea acuosa, inapetencia, fiebre, deshidratación, pobre condición corporal y depresión. En individuos inmunocompetentes la mortalidad es baja y la infección se autolimitada de 9 a 15 días aproximadamente. Generalmente los animales destetados y los adultos infectados no manifiestan síntomas de la enfermedad, pero pueden excretar ooquistes que contaminan el medio. La importancia de esta infección radica en la facilidad de su contagio siendo un tema muy importante en las explotaciones pecuarias por su alto costo en tratamientos prolongados e importantes pérdidas que conllevan la baja tasa de ganancia de peso y conversión alimenticia en animales neonatos. En humanos afecta principalmente a niños pequeños, ancianos y a personas inmunodeprimidas. Es considera como una enfermedad definitoria del VIH, en los cuales, la diarrea es severa y es capaz de provocar la muerte en la mayoría de los casos. Para su diagnóstico, es necesario realizar la identificación del parásito mediante pruebas de laboratorio, de las cuales existe una variedad de ellas, desde las pruebas más sencillas que pueden ser elaboradas en un laboratorio estándar, hasta las pruebas más especializadas que solo pueden ser llevadas a cabo con equipo especializado y personal capacitado.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, diagnóstico, microscopía, serología, biología molecular

1. Introducción

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria provocada por *Cryptosporidium spp.*, pertenecen al *phylum* Apicomplexa, parásitos intracelulares que infectan a gran cantidad de mamíferos como aves, reptiles, anfibios y humanos, entre otros. Es considerada como una de las principales causas de diarrea neonatal en bovinos (Angus, 1990). Es cosmopolita y de gran importancia tanto en países desarrollados como no desarrollados, ya que afectan principalmente a individuos con sistema inmune comprometido siendo capaz de provocar la muerte del hospedador (Domenech y col., 2011, Kurniawan y col., 2013). Los protozoarios del género *Cryptosporidium* son patógenos clínicamente importantes por causar enfermedades gastrointestinales (Cacciò y Widmer, 2014). *Cryptosporidium* es un parásito intracelular obligado, por lo tanto solo necesita de un único huésped (monoxeno) para completar su ciclo de vida y su distribución puede variar por temporada y geográficamente (Borowski y col., 2008). Los patógenos entéricos son ingeridos por agua contaminada y alimento y pasan a través del tracto gastrointestinal, una vez establecido en el huésped, la infección se dispersa a nuevos huéspedes por una eliminación posterior. Para el diagnóstico de esta enfermedad, está disponible una variedad de métodos para la identificación del agente, *Cryptosporidium spp.*, incluyendo microscopía y técnicas inmunológicas y diagnóstico molecular. Durante dos décadas, las herramientas de biología molecular se han desarrollado para identificar y diferenciar el parásito a nivel de especie/genotipo y niveles de subtipos (Xiao y Ryan, 2004; Cacciò, 2005). Sin embargo, las técnicas inmunológicas y moleculares son más complejas y costosas, haciéndolos métodos menos prácticos para la detección, especialmente en entornos con escasos recursos. Sin embargo tienen mejor sensibilidad y mayor especificidad (Morgan y col., 1998; Siddons y col., 1992).

2. Historia

Las primeras especies de *Cryptosporidium* fueron descritas en 1907 por Edward Tyzzer. El parásito fue encontrado en las glándulas ventriculares de un ratón y fue nombrado *Cryptosporidium muris* (*C. muris*). Más tarde, en 1912, fueron encontradas especies más pequeñas nombradas *C. parvum*. Desde entonces, *Cryptosporidium* ha sido identificado en todas las clases de vertebrados. *Cryptosporidium parvum* fue reconocido como un patógeno importante en los años setentas, cuando fue ligado a la diarrea crónica en una vaquilla de 8 meses, (Panciera y col., 1971) y varios años después en diarrea en humanos (Nime y col., 1976). En 1993 ocurrió un brote masivo de *Cryptosporidium* en Milwaukee, Wisconsin, en el cual, aproximadamente 400,000 personas resultaron enfermas (Mac Kenzie y col., 1994). Hasta el año 2012 han sido nombradas por lo menos 26 especies de *Cryptosporidium* y han sido descritos más de 73 genotipos adaptados al huésped de especies con estatus aún indefinido, capaces de infectar tracto gastrointestinal y/o respiratorio en más de 280 especies de animales vertebrados y por supuesto, a humanos (Fayer, 2010; Ren y col., 2012; Ryan y Power, 2012; Baldursson y Karanis, 2011). Las especies de *Cryptosporidium* han sido identificadas en ganado suizo; con un alto rango de infección, seguido de ganado joven y vacas (Silverlas y Blanco-Penedo, 2013). La transmisión zoonótica involucra especies como *C. meleagridis*, *C. canis* y visto ocasionalmente, *C. felis* (Lebbad y col., 2013). El primer caso de aislamiento de *Cryptosporidium* en ganado bovino fue en un becerro con diarrea en 1971 (Panciera y col., 1971). Desde entonces, han habido numerosos reportes de criptosporidiosis en diferentes países y regiones, incluyendo infecciones en humanos (Chen y Huang, 2010).

Las especies de *Cryptosporidium* ocasionan problemas en rumiantes neonatos y es considerado como un agente etiológico importante en el síndrome de la diarrea neonatal en becerros, causando considerables pérdidas económicas directa e indirectamente (Tiranti y col., 2011). Las pérdidas económicas asociadas con esta

enfermedad no son únicamente debido a la mortalidad resultante, sino también al retardo del crecimiento de los animales, el costo de los medicamentos, la asistencia veterinaria y el incremento de trabajo involucrado (De Graafa y col., 1999). *C. parvum* es una de las causas principales de diarrea en bovinos en todo el mundo (Blanchard, 2012).

Los becerros recién nacidos son particularmente susceptibles a la infección y pueden excretar millones de ooquistes cuando desarrollan la criptosporidiosis. Los animales infectados pueden presentar signos que van de infecciones asintomáticas a diarreas profusas y deshidratación y en algunos casos la muerte (Ollivett y col., 2009). Algunos estudios indican que los animales adultos, en ganado asintomático, también excretan ooquistes y el total del número de ooquistes excretados puede ser considerable debido a la cantidad de heces producidas (Kuczynska y col., 2005). En caso de brotes, la identificación rápida y precisa de la infección es importante realizar para el tratamiento eficaz y manejo de la transmisión de la enfermedad. (Lee y col., 2014).

A pesar de que *C. parvum* es la principal especie zoonótica de interés en salud pública y salud animal, se han identificado subtipos de *C. parvum*, animal específico, humano específico y zoonóticos, revelando que las herramientas de subtipos moleculares son esenciales para desentrañar la dinámica de transmisión de infecciones por *Cryptosporidium* en humanos y animales, aunque las cuestiones fundamentales relativas a la genética de poblaciones, tales como la extensión de la recombinación sexual en las poblaciones de parásitos en el campo, todavía no han sido resueltas por completo (Xiao y Feng, 2008). *C. parvum* tiene un amplio rango de huéspedes incluyendo humanos y ganado, en donde *C. bovis* y *C. ryanae* parece haberse adaptado al ganado (Robertson y col., 2014). Se han identificado siete especies y tres genotipos en bovinos, incluyendo *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. suis*, genotipo *C. suis*, *Cryptosporidium* porcino genotipo II y el genotipo *Cryptosporidium deer-like* (Wang y col., 2011). Sin embargo, los primeras cuatro especies son principalmente responsables de la criptosporidiosis bovina. *C. parvum* coloniza el

intestino delgado y constituye un importante agente del síndrome diarreico de los neonatos, además numerosos estudios han demostrado una correlación significativa entre su ocurrencia y la diarrea, en bovinos adultos también ha sido reportada esta especie causando una enfermedad que generalmente cursa de forma subclínica y presenta bajos niveles de infección (Bednarska y col., 1998; Trotz-Williams y col., 2005). *C. andersoni* es comúnmente visto en bovinos adultos asintomáticos y ha sido asociado a abomasitis, reducción de la producción de leche y baja ganancia de peso y aunque presenta amplia distribución, su prevalencia es baja (Esteban y Anderson, 1995; Wang y col., 2011a). En contraste, las otros dos especies comunes, *C. bovis* y *C. ryanae* generalmente infectan terneros antes del destete (Fayer y col., 2000; Lindsay y col., 2000; Santín y col., 2004; Fayer y col., 2006; Fayer y col., 2007). Además, estudios previos han sugerido que la infección del ganado con éstas dos especies no se asocian con ningún signo de enfermedad (Fayer y col., 2008). El genotipo *Cryptosporidium deer-like* es encontrados en todos los grupos de edades de bovinos de diversas áreas geográficas y son mucho más prevalentes en ganado post destete. Se ha encontrado que *C. andersoni* es más común en vacas mientras que *C. bovis*, *C. parvum* y el genotipo de *Cryptosporidium* en venados son menos prevalentes (Santín y col., 2008; Fayer y col., 2006).

3. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis

Cryptosporidium spp es un parásito protozoario extracitoplásmico, entérico obligado, del Phylum *Apicomplexa*, clase *Gregarinasina* (Leander y col., 2003; Fayer, 2010; Templeton y col., 2010) y es una importante causa de enfermedades diarreicas en el mundo. El modo de infección es por vía fecal-oral, en alimentos y agua y es iniciada cuando los esporozoitos son liberados de los ooquistes, estos se fijan al tracto intestinal e invaden a las células epiteliales de la mucosa (Hashim y col., 2006).

Los protozoarios del género *Cryptosporidium* son parásitos epicelulares que infectan el tracto gastrointestinal y/o respiratorio en una amplia gama de vertebrados. (Ryan y Power, 2012). Es una enfermedad parasitaria de distribución mundial provocada por el parásito protozoario *Cryptosporidium*, el cual es transmitido por el agua y es encontrado intracelularmente en animales (Hussein 2011; Lee y col., 2011).

Este parásito entre otros, produce infecciones importantes y prevalentes en el intestino delgado principalmente (Eckmann, 2002; Pierce y Kirkpatrick, 2009). En individuos inmunocompetentes la infección y colonización del patógeno en el tracto intestinal puede provocar síntomas transitorios de diarrea, también puede ser asintomática o, desarrollar la enfermedad causando gastroenteritis autolimitada de una duración aproximada de 9 a 15 días (Chalmers y Davies, 2010; Rongchang y col., 2014). La duración y la gravedad de la criptosporidiosis está directamente relacionada a la edad, alimentación y estado inmune del huésped, además, los portadores pueden desarrollar diarrea bajo condiciones de estrés. (Ungar y col., 1991; Robinson y Chalmers, 2010). Además, la diarrea producida suele ser aguda y profusa y solo se observa en humanos y rumiantes (Tzipori y Griffiths, 1998; Xiao y col., 2004). Si la diarrea se vuelve persistente, puede causar la muerte del hospedador (Shing y col., 2011; Wang y col., 2011). En animales, además, produce reducción de la tasa de crecimiento, la tasa de conversión alimenticia y la producción láctea en ganado bovino y ovino y los rangos de mortalidad en ganado joven puede alcanzar el 35% resultando en una pérdida económica significativa (Azami, 2007; Esteban y Anderson, 1995; Alonso-Fresán y col., 2005; Singh y col., 2006). Aún debe de ser identificado un régimen de tratamiento efectivo, sin embargo ha sido reportado el efecto de la nitazoxanida, derivado nitrotiazolil-salicilamida (Krauze y col., 2012). En el 2010, aproximadamente 27,000 personas se enfermaron en Östersund por beber agua contaminada por *Cryptosporidium* (Widerström y col., 2014) y los brotes por agua contaminada son comunes en países como Suecia (Widerström y col., 2014; Insulader y col., 2013). En África y otras regiones, la criptosporidiosis es una de

las causas más comunes y serias de diarrea relacionada a mortalidad y morbilidad de niños (Kotloff y col., 2013).

3.1. Criptosporidiosis en el reino animal.

Hoy en día, han sido identificadas distintas especies tales como: *C. varanii*, en lagartos monitores esmeralda; *C. serpentis*, en serpientes y lagartos y *C. molnari*, en peces (Fayer, 2008), *C. hominis*, encontrado fundamentalmente en humanos (previamente llamado *C. parvum* Tipo 1); *C. parvum*, en humanos y otros mamíferos (previamente llamado *C. parvum* Tipo 2); *C. andersoni* y *C. bovis*, en bovinos; *C. canis*, en perros; *C. muris*, en ratones; *C. felis*, en gatos; *C. wairi*, en cobayas; *C. suis*, en cerdos; *C. fayeri*, en canguros rojos (Ryan y col., 2008), *C. macropodum*, en canguros grises (Power, 2010), *C. meleagridis*, en pavos y humanos; *C. baileyi*, en pollos; *C. gali*, en gallinas adultas y algunas aves silvestres (Pavlásek, 1999, Pavlásek, 2001).

El género está compuesto de diversas especies y genotipos genéticamente distintos pero morfológicamente indistinguibles, siendo *Cryptosporidium parvum* la más común de las especies zoonóticas (Xiao y Feng, 2008). Las especies que han sido identificadas en bovinos, incluyen *C. parvum* (Anusz y col., 1990), *C. bovis* (Fayer y col., 2005), *C. andersoni* (Lindsay y col., 2000; Satoh y col., 2003) *C. ryanae* (Fayer y col., 2008), *C. felis* (Bornay-Llinares y col., 1999), *C. hominis*, *C. suis*, *Cryptosporidium* genotipo-ciervo (Fayer y col., 2008), *Cryptosporidium* genotipo-*suis* y *Cryptosporidium* porcino genotipo II (Langkjaer y col., 2007). Las especies responsables de la criptosporidiosis bovina principalmente son *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* y *C. ryanae* (Maikai y col., 2011; Šlapeta, 2011; Wang y col., 2011a).

C. parvum coloniza el intestino delgado y constituye un importante agente del síndrome diarreico de los neonatos, en ocasiones acompañado por depresión, inapetencia, fiebre, deshidratación y pobre condición corporal. El parásito puede diseminarse a través del tracto gastrointestinal y respiratorio. La invasión de las

células del huésped se limita al borde luminal y conduce a la pérdida de la superficie del epitelio, provocando interrupción y atrofia de vellosidades, produciendo inflamación e hiperplasia de las células de las criptas, infiltración de células mononucleares en la lámina propia y finalmente, la muerte del enterocito (Farthing, 2000). En bovinos adultos también ha sido reportada esta especie causando una enfermedad que generalmente cursa en forma subclínica y presenta bajos niveles de infección (Fayer y col., 1998; Trotz-Williams y col., 2005; Singh y col., 2006). *C. andersoni* comúnmente se ha visto en ganado adulto asintomático, sin embargo, se ha asociado con abomasitis, con una ligera hiperplasia epitelial e infiltración de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en lámina propia (Masuno y col., 2006).

Se asocia a una reducción de la producción de leche y pobre ganancia de peso, además ha sido encontrado en ovinos y caprinos y es considerada una especie zoonótica (Esteban y Anderson, 1995; Feng y col., 2011). Las especies *C. bovis* y *C. ryanae* infectan becerros destetados y de hasta un año de edad y es más frecuente *C. bovis* que *C. ryanae* (Fayer y col., 2006; Fayer y col., 2007; Santín, M. y col., 2008), en ambos casos, la infección del ganado con estas especies, no se asocia con ningún signo clínico de enfermedad (Fayer y col., 2005; Fayer y col., 2008).

Algunos estudios sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* en hatos han mostrado que el bovino es la especie primaria no humana afectada por criptosporidiosis (Sanford y Josephson, 1982; Hashim y col., 2004). Los terneros antes del destete son frecuentemente infectados por *C. parvum* y contribuyen de manera significativa a la zoonosis de la criptosporidiosis (Fayer y col., 2007).

La gravedad de los cambios morfológicos está relacionada con el número de parásitos presentes en el sitio de infección y estos pueden ser observados como macro y micro gametos color rojo, de 4-5 micrómetros de diámetro, adheridos a la superficie formando eslabones (Pantenburg y col., 2008).

Existen evidencias de lesiones que ocurren en intestino delgado y ocasionalmente en el ciego y el colon, consistentes en atrofia leve, moderada o intensa de las vellosidades intestinales y fusión de las mismas, las cuales se presentan

ensanchadas y acortadas; hiperplasia, dilatación de las criptas intestinales, infiltración de la lámina propia con neutrófilos, además de presencia de ooquistes en la superficie epitelial e intensa apoptosis (Sasahara y col., 2003, Angus y col., 1982). Sin embargo, en bovinos infectados natural y experimentalmente se han detectado grandes cantidades de ooquistes en sus excretas sin que haya una demostración de signos clínicos y el periodo infeccioso es más frecuente entre el primero y segundo mes de edad (Iseki y col., 1989, Atwill y col., 1999).

La prevalencia de criptosporidiosis en becerras lactantes de 1 a 30 días de edad, es generalmente elevada, mayor al 65%, observándose la mayor frecuencia entre los 7 y 21 días de edad (Delgado, 2007). La criptosporidiosis produce un impacto económico significativo debido a los costos de gastos médicos y a las pérdidas en la productividad (Xiao y col., 2004).

3.2. Consideraciones generales.

La fuente de contaminación principal de los animales susceptibles es el agua, ya que se han realizado estudios que mencionan que el 10% de las infecciones pueden ser transmitidas de individuo a individuo y la mayoría de las ocasiones es debido a la contaminación del agua potable (Eisenberg y col., 2005).

Las manifestaciones patológicas de criptosporidiosis son más frecuentes en animales lactantes de 1 a 3 semanas, aunque eventualmente los animales afectados se encuentran entre las 6 y 12 semanas de edad. La frecuencia de criptosporidiosis detectada es relativamente baja en becerras con diarrea en la primera semana pero se incrementa considerablemente la segunda semana para disminuir hasta los 45 días de edad (Harp y col., 1990).

La susceptibilidad a *Cryptosporidium* varía de acuerdo con la edad y otros factores de riesgo que causen la expansión de la infección, además las infecciones mixtas con *E. coli* y *Rotavirus*, contribuyen en asociación con *Cryptosporidium* a la presentación de diarrea en becerras, con más severidad (Harp y col., 1989; Nussbaum y col., 1999).

El control y prevención de la enfermedad tiene beneficios económicos para la salud pública y la salud animal. En general la efectividad de un programa de control depende de la sensibilidad y especificidad de una prueba utilizada para identificar animales asintomáticos y clínicamente infectados (De Waele y col., 2011). A la fecha no existe una prueba estándar de oro para la detección de *Cryptosporidium* spp., incluyendo ooquistes en heces (Kehl y col., 1995). Por tal motivo la finalidad de la presente revisión es recopilar los métodos de diagnóstico de la criptosporidiosis en los animales domésticos. Hay una extensa variación genética dentro del género *Cryptosporidium*. Con al menos 23 especies de *Cryptosporidium* considerados como válidos por la mayoría de los investigadores, éstas especies son colectivamente encontradas en humanos, ratones, bovinos, cerdos, borregos, caballos cabras, gatos, perros, canguros, pollos, pavos, peces, hurones, lagartos, tortugas, monos y venados (Fayer, 2010; Traversa, 2010).

4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE *CRYPTOSPORIDIUM SPP* EN ANIMALES DOMÉSTICOS.

La materia fecal de animales y humanos es una fuente de gran cantidad de microorganismos, que se dispersan directamente o a través de lluvias por escorrentía de tierras agrícolas, suburbanas y urbanas, aguas residuales de los ríos, arroyos, estuarios y aguas costeras, contaminando además el mar y sus habitantes (EFSA, 2012), convirtiendo esto en una fuente sumamente importante de propagación de la infección, siendo esto un riesgo para la salud pública.

Las escasas características patognomónicas de la infección por criptosporidiosis dificultan su diferenciación entre otras patologías diarreicas, por lo que debe confrontarse con otras posibles etiologías de diarrea (Chacín-Bonilla, 1995). *C. parvum* es mayormente encontrada en bovinos jóvenes de 2 meses de edad, donde *C. bovis* y *C. ryanae* son las especies más comunes en bovinos de mayor edad y jóvenes (Robertson y col., 2014). *C. andersoni* es principalmente encontrado en ganado joven y adulto (Robertson y col., 2014).

La infección puede ser diagnosticada antemortem por el análisis de heces y post-mortem, por examen histológico de una sección de intestino. La criptosporidiosis se diagnostica al demostrar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en muestras de heces, o por la identificación de esquizontes y gametocitos en biopsias de tejido intestinal (Chacín-Bonilla, 1995). Sin embargo, la mayoría de los métodos de diagnóstico se basan en la detección de los ooquistes en heces por microscopía. Estos métodos son menos invasivos (Trotz-Williams y col., 2005).

Las muestras de heces directas o concentradas son teñidas y examinadas bajo el microscopio para identificar a los parásitos en sus formas quísticas. En la actualidad están disponibles una variedad de métodos para la identificación de *Cryptosporidium spp.*, desde pruebas diagnósticas sencillas como la microscopía, hasta técnicas más especializadas y sensibles que requieren equipo más especializado como las técnicas inmunológicas y especialmente, el diagnóstico molecular (Haque y col., 2007).

4.1. MICROSCOPIA

La detección microscópica se basa en la búsqueda de ooquistes ambientales y químicamente resistentes en muestras fecales. (O'Donoghue, 1995; Quílez y col., 1996). La introducción de la microscopía tuvo una influencia en el campo del diagnóstico médico. Para cualquier nuevo método de diagnóstico, si es molecular, serológico, o proteonómico, para tener un impacto significativo en el campo del diagnóstico, es probable que se compare con la microscopía, considerado el estándar de oro. El desarrollo de herramientas de diagnóstico más recientes en el campo de la parasitología se ha estancado en los últimos 20 a 30 años, fortaleciendo la dependencia del diagnóstico basado en la microscopía (Riccardi y Momar, 2015).

La popularidad de esta técnica radica en su simplicidad, ya que no requiere nada más que un microscopio, el agente y para algunas técnicas, tinciones fácilmente disponibles. La microscopía ha sido el pilar de las herramientas de diagnóstico por décadas, incluso aunque existan otras técnicas los resultados aún requieren confirmación por microscopio ya que los nuevos diagnósticos carecen de estandarización (Riccardi y Momar, 2015). No obstante, algunos autores indican que resulta muy complicada la identificación de los ooquistes por sus características morfológicas, transparencia y por la presencia de impurezas y desechos fecales, particularmente en diarrea severa. Por lo cual se desarrollaron técnicas de concentración de ooquistes, las cuales facilitan la concentración de los mismos ya sea por técnicas de flotación o sedimentación, teniendo disponibles diversas soluciones (Pavlásek, 1982).

4.1.1. Técnicas de concentración de ooquistes:

En 1982, Pavlásek demostró que los ooquistes excretados en heces de animales infectados, pueden ser aislados utilizando métodos de flotación por centrifugación. Esto es muy importante para la detección de este parásito en los animales infectados y para estudiar su distribución en diferentes condiciones. El aislamiento

de los ooquistes de heces es útil para elucidar el ciclo de vida de *Cryptosporidium* en base a las infecciones experimentales y su participación en la muerte de los animales, especialmente los becerros (Pavlásek, 1982).

Cuando se espera un bajo conteo de ooquistes en las muestras de heces, o en circunstancias donde es necesaria una purificación previa de los ooquistes, tales pruebas pueden aumentar la sensibilidad de la detección. El mejor método para concentrar ooquistes de heces son las soluciones de azúcares como la solución Sheather, sales como el sulfato de Zinc, formalina-eter (formalina-etil acetato) (Smith, 1992; Smith, 1998; Smith, 2008). También la solución de flotación Breza (Breza, 1957) lo cual consiste en porciones de solución saturada de $MgSO_4$, tres porciones de solución de $Na_2S_2O_3$ y una porción de agua corriente en gravedad específica, en donde fueron utilizadas heces diarréicas, muy acuosas obteniendo excelentes resultados. Las soluciones glucosadas SAEX y Sheather han demostrado resultados similares y satisfactorios. A pesar de eso, algunos organismos fecales parecidos en tamaño y morfología a los ooquistes complican un diagnóstico exacto. Por consiguiente, es indispensable realizar un método de tinción posterior para incrementar la certeza del diagnóstico parasitológico (Kageruka y col., 1984). Ya que los ooquistes no pueden ser correctamente identificados en medios húmedos. Por esta razón, la muestra de heces se extiende en un portaobjetos y deben ser posteriormente teñidas (Casemore, 1991). Además, la tinción sin una concentración previa puede no ser muy sensible (Tee y col., 1993).

En 1982, Willson y Acres mezclaron heces con solución de dicromato de potasio al 2.5% (una parte de heces por 2 partes de solución dicromato de potasio), la cual fue utilizada como un excelente medio para almacenar y preservar los ooquistes y para su posterior diagnóstico y descripción, lo cual podría ser de al menos 1 año. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente por al menos 61 días. (Willson y Acres, 1982).

Es un hecho que la concentración de los ooquistes mejora la calidad de la detección de las técnicas de tinción. Sin embargo, es necesario saber que estas técnicas necesitarán más tiempo para ser realizadas a comparación de las

técnicas que no requieren ser teñidas como por ejemplo, la inmunofluorescencia (Abassi y col., 2000; Sheather, 1922).

En vista de que todas las técnicas de concentración ofrecen resultados similares, la técnica que además, ofrece un tiempo prolongado para la conservación de los ooquistes es la solución de dicromato de potasio, que puede preservar los ooquistes y su morfología intacta por más de 12 meses. Por lo anterior las soluciones glucosadas o de sales para la concentración de ooquistes podrían ser utilizadas si la muestra va a trabajarse en un periodo de no más de 24 horas de haber sido tomada la muestra y si la muestra no va a trabajarse inmediatamente después de haber tomado la muestra sino que por el contrario, tardará algunos meses en ser trabajada, sería recomendable utilizar la solución de dicromato de potasio para preservar los ooquistes hasta su examen.

4.1.2. El uso de la tinción para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium spp*:

A) Tinción Ziehl-neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen modificada es clásicamente llevada a cabo por teñir un delgado frotis de materia fecal, fijado con metanol, con una solución de carbol-fucsina sin diluir por lo menos 15 minutos. Después, la laminilla es enjuagada con agua corriente y colocada en una solución de alcohol-ácido para remover el tinte y las estructuras ácido resistentes van a resistir la decoloración. Después de un nuevo enjuague, se tiñe con azul de metileno, el cual le dará un fondo de contraste entre el material y las estructuras ácido-resistentes. Se realiza un último enjuague con agua corriente y se deja secar al aire, puede ser examinada utilizando el objetivo 10X y el objetivo de aceite de inmersión de magnificación 100X (Henriksen y Pohlenz, 1981; Casemore y col., 1985). La tinción de Heine y la

tinción Ziehl-Neelsen modificada, que suelen necesitar muy pocos productos para su realización, fueron comparadas con otras técnicas como la microscopía de fluorescencia entre otras, mostrando ser económicas, fáciles y muy eficientes para la detección de *Cryptosporidium spp* (Potters y Esbroeck, 2010).

La técnica Ziehl-Neelsen modificada, facilita la visualización de los ooquistes, teñidos de rosa, sobre un fondo azul, dado por el azul de metileno, este contraste facilita la identificación de estas estructuras ácido-resistentes que son los ooquistes, apareciendo como estructuras redondas u ovaladas de 3 a 4 micrómetros de diámetro, que contienen distintas estructuras internas. Sin embargo, la tinción de Ziehl-Neelsen modificada es un procedimiento que lleva tiempo (de 30 a 45 minutos), la cual requiere entrenamiento intenso y experiencia para interpretar los resultados (Mtambo y col., 1992; Tee y col., 1993; Chartier y col., 2002). La técnica de tinción Ziehl-Neelsen es una coloración para organismos ácido-alcohol resistentes; actualmente se emplea una técnica que es la modificación de la original, que recibe el nombre de tinción de Ziehl-Neelsen modificada en la cual, el colorante primario (fucsina) se halla asociado a un mordiente químico (ácido dénico o carbólico), al que se le aplica un mordiente físico (calor) y que la decoloración se realiza mediante la combinación de dos solventes orgánicos, como el ácido y el alcohol (Velazco, 1995).

Esta técnica es muy popular y se ha convertido en el método de referencia para la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* en frotis de heces. Tiñe alrededor del 60% de los ooquistes presentes en una muestra microscópica (Ziehl-Neelsen, 1882). Esta técnica también es sumamente útil para detectar ooquistes de *Cyclospora* y *Coccidia*, así como hongos y levaduras (Casemore, 1991), por lo que debe tenerse en cuenta que, de estar presentes, también se teñirán en la muestra, lo que pudiera traducirse en una relativa dificultad, si no se tienen bien claros los criterios de reconocimiento de los ooquistes de *Cryptosporidium*.

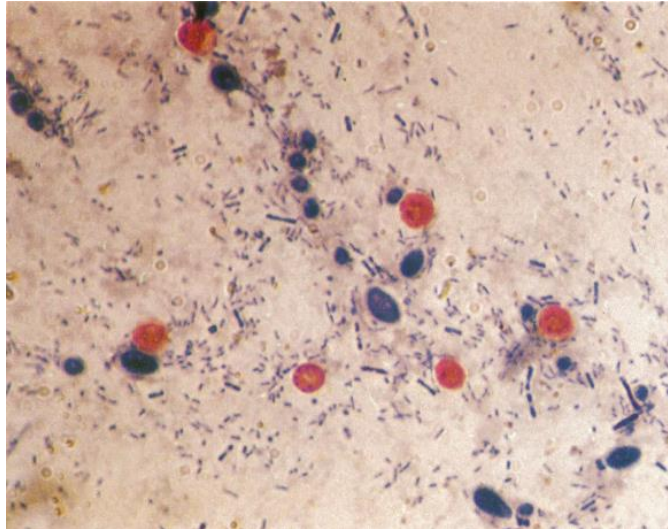


Figura 1: Frotis fecal teñido con Safranina-Azul de metileno. Esta imagen, muestra los ooquistes de *Cryptosporidium* (naranja-rosas) y levaduras (azul) (1500X) (Baxby y col., 1984).

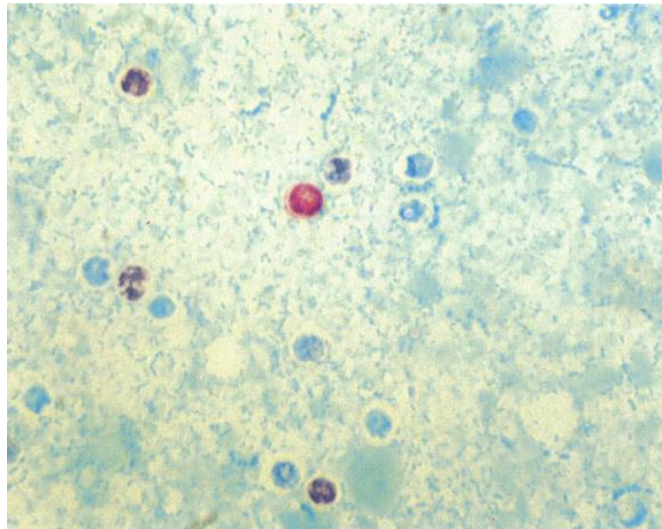


Figura 2: Frotis de heces teñido con la técnica caliente de Ziehl-Neelsen y decolorado con alcohol ácido. A diferencia de la imagen anterior, muestra una pobre retención de carbol fucsina (1500X) (Baxby y col., 1984).

B) Tinción Kinyoun

La técnica Kinyoun es muy similar a técnica Ziehl-Neelsen, pero con tres diferencias básicas: no se calienta el colorante principal (no se utiliza calor como segundo mordiente), el ácido utilizado para decolorar es más débil y no se decolora con alcohol. Las coloraciones de Ziehl-Neelsen y de Kinyoun tienen la misma sensibilidad, especificidad y contraste; pero esta última (método frío Kinyoun) requiere menos tiempo y su ejecución es más sencilla (Velazco, 1995). Por lo tanto, la única ventaja que ofrece la técnica de Kinyoun, en comparación con Ziehl-Neelsen, es que puede llevarse a cabo en un menor tiempo.

C) Tinción Giemsa

La técnica de tinción Giemsa es una modificación de la coloración de Romanowsky, resulta de la combinación de eosina y azul de metileno en una misma solución. Esta técnica es utilizada en los laboratorios de hematología para demostrar la diferencia entre el núcleo y el citoplasma de las distintas células sanguíneas y en microbiología, para la diferenciación intra y extra celular de parásitos en sangre circulante y además es útil para la observación de levaduras (Díaz y col., 1955).

Este método presenta ciertas dificultades cuando son utilizados para diagnóstico rutinario. Los ooquistes tienen poca afinidad por la tinción Giemsa y suelen perderse en el fondo, mezclados con proteínas u otros materiales presentes en los frotis fecales, por lo tanto, pueden no ser detectados sobre todo cuando son pocos ooquistes. Además, los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden confundirse con levaduras en la tinción de Giemsa por su tamaño y color similar (Angus y col., 1981).

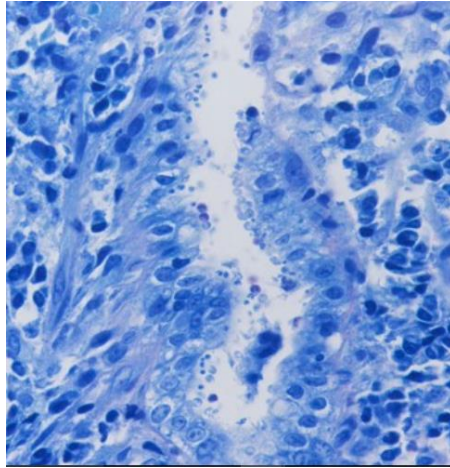


Figura 3: *Cryptosporidium* spp en corte histológico de estómago. Técnica de tinción Giemsa.

Fuente: http://www.vacunasyviajes.es/vacunasyviajes/Criptosporidiosis_Atlas.html

D) Tinción de Heine

Para la técnica de tinción negativa de Heine, la muestra de heces que es mezclada con la misma porción de solución de carbol-fucsina sin diluir en un portaobjetos. Se hace un frotis delgado, se deja secar al aire y se examina utilizando el objetivo 10X y el objetivo de aceite de inmersión a una magnificación 50X o 100X (Heine, 1982).

En esta tinción, los oocistos de *Cryptosporidium* aparecen sin teñir, fuertemente refractivos, como estructuras redondas u ovaladas de 3 a 6 micrómetros de diámetro. Las estructuras internas son ligeramente visibles, como manchas oscuras dentro del oociste. Esta técnica tiene una limitante, las laminillas deben ser examinadas 15 minutos después de haber sido secadas al aire (Heine, 1982). Este lapso de tiempo puede prolongarse a 30 minutos si se utilizan muestras que hayan sido fijadas en formalina al 10%, anterior a la tinción. Si la laminilla no es examinada en 15 a 30 minutos, los oocistos se desecan y se volverán menos visibles. De acuerdo con algunos investigadores es indispensable un microscopio de contraste de fase para su observación (Chartier y col., 2002), ya que el

contraste de fase aumenta la especificidad y la sensibilidad, pero los ooquistes pueden ser aun reconocidos sin el contraste de fase. Para aumentar la sensibilidad de la técnica de tinción negativa, se recomienda agregar una gota de aceite a la laminilla y colocar un cubreobjetos. Haciendo lo anterior, la preparación puede ser observada utilizando el objetivo 10X y un objetivo “seco” de magnificación 40X obteniendo buenos resultados (Heine, 1982).

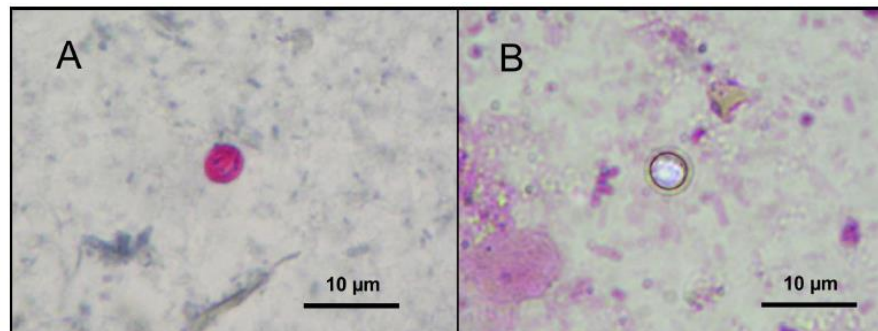


Figura 4: Ooquistes de *Cryptosporidium spp.* Técnica de tinción Ziehl-Neelsen (A) y teñidos con la técnica Heine (B) (Potters y Van Esbroeck, 2010).

E) Tinción Köster

Gracias a la alta afinidad de la tinción por los ooquistes de *Cryptosporidium*, estos se observan de un color rojo pálido contra un fondo verde; tiene ventaja sobre la técnica Ziehl-Neelsen, ya que los esporozoitos pueden ser visualizados en el interior del ooquiste. Para realizar la técnica, es necesario hacer un frotis de la muestra de heces y permitir secar al aire, posteriormente se fija en alcohol metílico de 2 a 5 minutos, se deja secar en un mechero por algunos segundos hasta que el alcohol se queme. Posteriormente se tiñe por 5 minutos con una mezcla de 2 partes de una solución acuosa saturada de safranina más 5 partes de solución KOH al 5,6%. Se lava con agua y se diferencia en H₂SO₄ al 1% por 10 segundos, se lava con agua, se sumerge en solución acuosa de verde de malaquita al 5%

por 10 a 15 segundos y se realiza un último lavado con agua (Castro y Guerrero-Bermúdez, 2004).

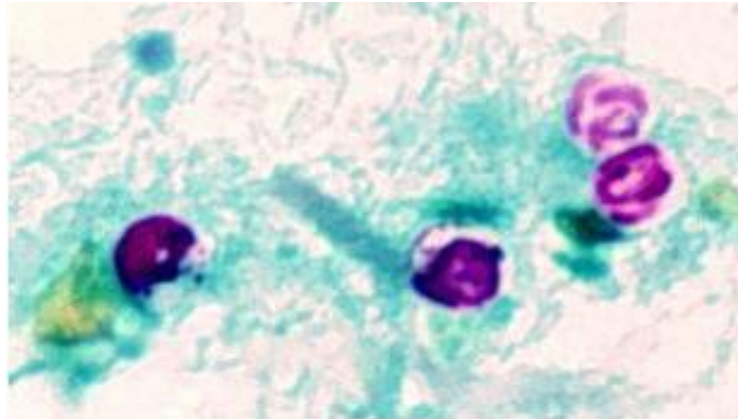


Figura 5: En contraste con el fondo azul-verde, es muy sencillo identificar los ooquistes. Los esporozoitos se observan dentro de los dos ooquistes a la derecha.

Fuente: http://www.phsource.us/PH/PARA/Chapter_2.htm

4.2. PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

A) Inmunofluorescencia

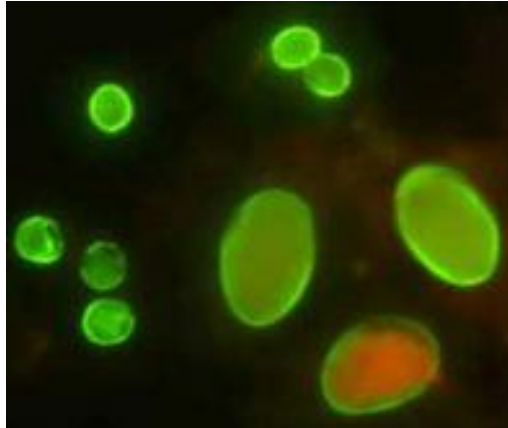


Figura 6: Quistes *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*. (Uribarren, s/a).

Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/criptosporidiasis.html>

Las pruebas de inmunofluorescencia pueden utilizarse para detectar anticuerpos o la presencia de un patógeno. En ambos casos la reacción finaliza mediante la adición de un anticuerpo conjugado a una sustancia fluorescente, habitualmente fluoresceína. Estas pruebas son muy sensibles pero su interpretación tiene un alto grado de subjetividad. Las pruebas de inmunofluorescencia presentan dos variantes, directa (detección de antígeno) e indirecta (detección de anticuerpo) Cañavate y col., 2009).

La detección de anticuerpos de *Cryptosporidium* puede realizarse por medio de la inmunofluorescencia indirecta (IFI). La prueba de IFI se ha utilizado para evaluar otros ensayos de diagnóstico, sin embargo, solo puede ser realizada en laboratorios especializados, por personal calificado para evitar que los resultados puedan ser interpretados de manera subjetiva. Además, la prueba IFI es lenta, con cierta dificultad de analizar muestras múltiples de manera simultánea y no es una técnica sencilla de realizar en un laboratorio estándar. Otras desventajas que presenta esta prueba diagnóstica es que detecta anticuerpos de infección y

exposición. Por esta razón necesitan desarrollarse otros ensayos serológicos para el diagnóstico de infección por *Cryptosporidium* (Cañavate y col., 2009).

Las tinciones fluorocrómicas con agentes como el 4´6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el ioduro de propidio son sensibles pero complejas (Carey y col., 2004). Éstas permiten establecer la viabilidad de los ooquistes y los resultados que se obtienen guardan una buena correlación con el desenquistamiento *in vitro*. Un anticuerpo marcado con Isotiocianato de fluoresceína (sus siglas en inglés FITC) contra los epítomos de la superficie de los ooquistes, específicos de un género, se unen a los ooquistes de *Cryptosporidium* que se encuentran presentes en la muestra. Gracias a un sistema de filtro para el Isotiocianato de fluoresceína, la excitación con luz Ultra Violeta (con una longitud máxima de excitación 490 nm y una longitud de onda media de emisión de 530 nm) provoca una reacción en los ooquistes marcados y estos muestran una fluorescencia color verde manzana brillante. Los materiales incluidos en los equipos tienen variaciones, pero normalmente incluyen controles positivos y negativos (Carey, 2004).

Los frotis de heces secados al aire o concentrados de heces se fijan con metanol absoluto o acetona, según las instrucciones del fabricante y se dejan secar. No es recomendable diluir los reactivos suministrados para tratar de incrementar el volumen de la prueba. Posteriormente se aplica el MAb anti-*Cryptosporidium*, específico de género y marcado con Isotiocianato de fluoresceína se aplica en el material que se había trabajado anteriormente en la laminilla (Guzmán, 1989).

Se incuba horizontalmente en completa oscuridad en una cámara húmeda. Si existiera un exceso de anticuerpos, esto se elimina con un ligero lavado y se deja secar. Se monta un cubreobjetos con un medio de montaje adecuado, asegurándose de no tener burbujas de aire. Se observa la laminilla con objetivo 20X y 40X, se realiza un conteo de los ooquistes presentes. Si en el equipo se incluye el colorante azul de Evans, que reduce la fluorescencia inespecífica, la fluorescencia de fondo será roja. La fluorescencia inespecífica es amarilla. Se ha de observar siempre el control positivo para asegurarse de que el tamaño, la forma y el color del posible ooquiste coincide con los del control positivo (OIE,

2008). Para resaltar los núcleos de los esporozoitos dentro de los ooquistes puede utilizarse fluorógeno nuclear "DAPI", 4'6-diamidino-2-fenil indol (C₁₆H₁₅N₅.2HCl, peso 350,2), esto proporciona una conformación morfológica adicional, originando una fluorescencia azul celeste (Grimason y col., 1994; Smith y col., 2002).

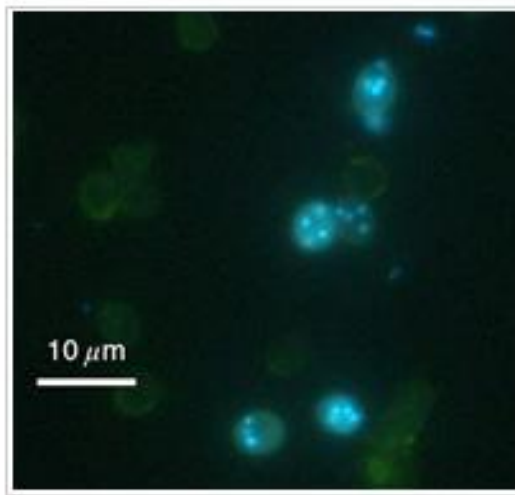


Figura 7: *C. parvum*. Técnica DAPI (tinción vital basada en la absorción de fluorocromos específicos) (Uribarren, T.B., s/a).

Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/criptosporidiosis.html>

B) Detección de Antígenos de *Cryptosporidium* spp por Enzimoimmunoensayo (ELISA).

El copro-antígeno Elisa es una prueba sencilla para antígeno *Cryptosporidium* y esto sugiere que puede ser utilizado como única prueba en lugar de las técnicas convencionales de microscopio. También se sugiere que puede ser particularmente útil en laboratorios que no diagnostiquen criptosporidiosis comúnmente, en estudios epidemiológicos a falta de estandarización del diagnóstico y en situaciones donde el procesamiento de la muestra por lotes puede ser crucial (Brook y col., 2008). Tiene una sensibilidad del 100% (Direkel y col., 2008). En ELISA, se busca la presencia de los antígenos de los ooquistes en

heces. Dependiendo del kit comercial, los coproantígenos de *Cryptosporidium* se capturan y desarrollan con una mezcla de anticuerpos mono y policlonales.

Los equipos de detección de antígeno por ELISA en “sandwich” son un procedimiento de doble capa diseñado para visualizar anticuerpos específicos, para desarrollar una reacción, están conjugados a una enzima (peroxidasa), a un sustrato y a un sistema para desarrollar el cromógeno/sustrato una solución parada (que al añadir la mezcla de reacción, inhibe la catálisis enzimática posterior). El nombre de la determinación deriva de la observación que el antígeno se ubica entre el anticuerpo presente en el sustrato de la célula y el agregado como segunda capa (Rojas, 1995).

C) Detección de antígenos por inmunocromatografía

La Inmunocromatografía es un ensayo alternativo, apropiado para la detección cualitativa de los anticuerpos contra los antígenos del agente patógeno que se esté buscando muestras de heces y se ha informado de que la especificidad es alta (98–100%). Continúa el debate sobre si la Inmunocromatografía (o el ELISA) tiene una sensibilidad menor, igual o mayor que la de los métodos de tinción de ooquistes. Al igual que ocurre con los métodos ELISA, los ensayos de inmunocromatografía, pueden ser muy valiosos en casos de infección en los que no hay presencia de ooquistes detectables. Debido a la variedad de los métodos descritos para diferentes pruebas comerciales, en este capítulo no se incluye ningún método para la detección de coproantígeno por Inmunocromatografía. Si los anticuerpos contra el agente en cuestión, están presentes en la muestra, estos se unen a los antígenos del agente, obteniendo así una respuesta de cambio de color. Si los anticuerpos contra el agente en cuestión no están presentes, los antígenos del agente traspasan la ventana de resultados y no se obtiene ninguna respuesta de cambio de color (López y Estrada, 2005).

Este método, a comparación de ELISA, no se apoya en la difusión molecular para estipular la tasa de unión al antígeno mediante el anticuerpo de captura. En la inmunocromatografía de flujo lateral (IC), la velocidad de unión del antígeno al anticuerpo de captura ligado a la fase sólida, se aumenta por la acción de la absorción. Esto atrae rápidamente a todos los fluidos a través de una membrana incluida en la cajita para inmunocromatografía y reduce el tiempo del análisis de horas a minutos o segundos. Los antígenos solubles de *Cryptosporidium* en la muestra de prueba son atraídos dentro de la membrana y entran en contacto y se unen a los anticuerpos inmovilizados obtenidos contra los antígenos de *Cryptosporidium*, lo cual aumenta drásticamente la velocidad de la interacción del anticuerpo-antígeno. Las reacciones positivas son cualitativas y se ven como una banda de color en un lugar específico de la membrana, normalmente identificado por una línea en la caja inmunocromatográfica. El formato de ensayo puede variar de unos kits comerciales a otros. Con respecto a la detección del antígeno mediante el ELISA, el técnico debe determinar siempre si existen algunas contraindicaciones relacionadas con el uso de una prueba comercial y el uso de algún fijador (OIE, 2008).

4.3. Diagnóstico Molecular

Actualmente, el estándar de oro es el análisis de muestras fecales en el microscopio, complementado con la Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR) o la detección de Antígeno para su confirmación (Haque y col., 2007).

La reacción de la cadena de la polimerasa es una técnica molecular basada en las propiedades bioquímicas del DNA, asociadas a la composición y secuencia de nucleótidos. La PCR emplea pequeños segmentos de nucleótidos, llamados primers o Cebadores (pueden ser genéricos o especie-específico), cuyas secuencias son complementarias a las secuencias del DNA del organismo que se está investigando. PCR es el método molecular más común para diagnosticar *Cryptosporidium*. Diversos estudios han demostrado que PCR es un método efectivo y extremadamente sensible para la detección de agentes patógenos. La técnica convencional se basa en la amplificación de regiones de un gen específico para *Cryptosporidium* (18s RNA) y ha demostrado su efectividad en heces humanas y de origen animal. Existe la técnica de PCR tipo anidado, que ofrece la ventaja de poder determinar las especies de *Cryptosporidium* utilizando el mismo producto de la primera reacción. Esta técnica de PCR anidada, ha demostrado ser útil para el diagnóstico de *Cryptosporidium* en todo el mundo, ya sea en humanos, aves, mamíferos domésticos o silvestres, peces y reptiles (Nethery, 2007).

La amplificación de los primers (cebadores) permite la identificación del DNA patógeno. Estos primers, en conjunto con otros reactivos, se añaden a un volumen de solución que contiene DNA representativo de la muestra de estudio, incluido DNA del hospedador y del Agente patógeno buscado. La muestra puede ser de cualquier tejido del hospedador que pueda portar el agente (López y col., 2007).

Los primers utilizados para detectar *Cryptosporidium* pueden ser a nivel de género o específicos de una especie. Los primers a nivel de género, detectan muchos grupos del organismo dentro del mismo género, mientras que los primers específicos diseñados para amplificar porciones altamente variables del genoma, pueden ser elegidos para identificar sola una especie particular de

Cryptosporidium. La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una técnica fiable para el análisis del DNA, específica y secuencial de RNA. El uso de colorantes no específicos en qPCR tiene varias ventajas, incluyendo la capacidad para detectar la contaminación de productos inespecíficos. Las tinciones específicas permiten el análisis de temperaturas de fusión (T_m). La generación de productos de amplificación no específicos resultan a partir de productos dímeros de hibridación no apropiada para los cebadores designados. Estos subproductos no deseados se forman debido a la débil complementariedad en los extremos 3' de un primer. Los subproductos permiten la hibridación de los cebadores a las hebras, seguido por la iniciación y la elongación de dímeros de DNA polimerasa termoestable (Morales y Nava, 2006).

Para la identificación de género se pueden utilizar técnicas de detección de antígenos como Inmunofluorescencia (Xiao y Herd, 1993) o enzimoimmunoensayos (Polage y col., 2011). Sin embargo, la identificación de especie requiere del uso de técnicas moleculares de amplificación por PCR (Wang y col., 2011 b), debido a que hay diferencias morfométricas de los ooquistes y una baja especificidad de hospedador de las especies del género *Cryptosporidium* (Chen y Huang, 2010). Para determinar las especies de *Cryptosporidium*, a partir de heces de humanos y animales, se ha utilizado el gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (RNAr 18S), con fragmentos de ~830 pb a 849 pb, utilizando pruebas de reacción en cadena de la polimerasa – polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) de extractos de ADN de ooquistes y una proteína de la pared del ooquiste (COWP), usando enzimas de restricción SspI y MboII (Gatei y col., 2003; Morse y col., 2007; Wang y col., 2011 b).

Este método puede ayudar a detectar al parásito en forma rápida y de manera sensible ya que con pequeñas cantidades de parásitos, no detectadas por microscopía, el PCR anidado con cebadores internos RNAr 18S, son capaces de reconocer la infección (Kuzehkanan y col., 2011).

Se han realizado aislamientos de ADN de heces y agua y se ha amplificado la región genómica 18S rDNA de *Cryptosporidium*. Para la identificación de *Cryptosporidium* spp., se ha utilizado un protocolo de PCR anidado a dos pasos para amplificar el gen 18S rDNA. Los productos de PCR son sometidos a electroforesis en un gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio (Hussein, 2011). Con la caracterización molecular del parásito *Cryptosporidium* se ha hecho posible diferenciar ooquistes identificando especies, genotipos y niveles de subgenotipos (Xiao y col., 2000).

Actualmente una de las herramientas de subtipificación utilizados más comúnmente se basa en el análisis de la secuencia del gen GP60, el cual es el más adecuado y extensamente usado como marcador genético para especies de *Cryptosporidium* que infecta humanos, ya que permite la identificación de subtipos de familias dentro de *C. parvum*, así como varios subtipos (alelos) dentro de cada familia (Quílez y col., 2011; Chen y Huang, 2010). El entendimiento de los subgenotipos de *C. hominis* y *C. parvum* puede aportar pistas sobre los mecanismos de infección de estos organismos y sentar las bases científicas para la eficacia de las modalidades terapéuticas (Feng y col., 2003; Widmer, 2009; Widmer y Lee, 2010). Estudios del gen GP60 han demostrado que ciertas familias de genotipos están geográficamente relacionadas (Leav y col., 2002; Sulaiman y col., 2005; Hira y col., 2010).

Las herramientas de diagnóstico molecular han sido utilizadas para caracterizar la transmisión de *Cryptosporidium* spp intestinal humano-patógena, como *C. hominis* and *C. parvum* (Widmer, 2009). Estas herramientas han demostrado ser especialmente útiles para comparar la genética poblacional del parásito hacia el hospedador o las especies de *Cryptosporidium* spp., la identificación de las fuentes de infección en humanos, el seguimiento de la propagación temporal y geográfica de los agentes patógenos y la investigación de los brotes y endemias (Feng y col., 2011).

Para la designación de especies dentro del género *Cryptosporidium* se deberán cumplir los siguientes requisitos básicos:

- a) Estudios morfométricos del ooquiste.
- b) Caracterización multigénica con genes de segregación independiente
- c) Estudios de especificidad de hospedador, tanto natural como experimental
- d) Conformidad con el ICZN –International Code of Zoological Nomenclature– (Xiao y col, 2004; Fayer, 2010).

La detección se llevará a cabo mediante la preparación de extendidos fecales a partir de cada muestra y teñidas utilizando la técnica de Ziehl Neelsen modificada. Los extendidos fecales serán tratados con una solución de carbol fucsina (1 g fucsina, 10 ml de etanol 96%, 5 fenol g, 95 ml de agua destilada) durante 30 min, se desteñirán con una solución al 1% de ácido clorhídrico-alcohol (70%), durante 2 min, se lavarán con agua corriente y se contrateñirán con una solución de azul de metileno al 1% durante 1 min. Después de un lavado final con agua, los extendidos se secarán a temperatura ambiente y se examinarán por microscopía de luz usando un lente con objetivo de 40X, para verificar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*. Se registrarán las características de tinción de los ooquistes, tamaño y forma y el promedio de ooquistes (rojo brillante) en 20 campos visuales con un aumento de 400X y se clasificarán de la siguiente manera: (+) de 1-10 ooquistes, (++) de 11-20, (+++) de 21-40, (++++) > de 40 y (-) para ningún ooquiste (Chen y Huang, 2010).

Las muestras positivas serán almacenadas a 4 °C en una solución acuosa de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 2,5%. Para su purificación, cada muestra será filtrada a través de un cedazo de malla de poro de 0.035 mm, para remover los residuos grandes, y el filtrado será procesado dentro de 24 horas de la toma de muestras de la siguiente manera: El $K_2Cr_2O_7$ se eliminará mediante tres ciclos de precipitación con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS; 0,1 M, pH 7,4) y suspendida en PBS. Los ooquistes se aislarán a continuación, utilizando una solución saturada de sacarosa por la técnica de flotación (Scott y col., 1995) y se

purificará por gradiente de centrifugación discontinua con sacarosa. Los ooquistes se contarán con un hemocitómetro y los tamaños de 50 ooquistes serán medidos utilizando un lente micrométrico (Thompson y col., 2007).

4.3.1. Extracción de ADN.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* serán lavados tres veces con PBS y se suspenderán en 0.2 mL de agua destilada estéril antes de la extracción de ADN. El genoma de ADN será extraído usando un kit de extracción de ADN. El sobrenadante conteniendo ADN será diluido en 50 μ L de una solución amortiguadora (AE) y almacenada a -20°C antes de ser usada para el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa. El genoma de ADN será extraído de una muestra negativa (sin ADN de ooquistes) como control negativo (Chen y Huang 2010).

Amplificación de una pequeña subunidad del gen ARN ribosomal (SSU rRNA). Se utilizará un protocolo de PCR tiempo final anidado en dos etapas para amplificar un fragmento de ~430 bp del gen SSU rRNA usando cebadores 5'-GTGGCAATGACGGGTAACGG -3' y 5'-CAGGACATCTAAGGGCATCA -3' para el PCR primario y 5'-AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG -3' (CPB-DIAGF) y 5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG -3' (CPBDIAGR) para el PCR secundario. La PCR se llevará a cabo en un volumen de 25 μ L conteniendo 2.0 μ L (10 ng/ μ L) de ADN genómico, 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 1.0 μ L MgCl₂ (50 mM), 0.2 μ L (5 IU/ μ L) Taq DNA polimerasa, 0.5 μ L dNTP (10 mM), 1.0 μ L (20 pmol/ μ L) de cada cebador de avance y retroceso y nucleasa libre de agua de hasta 25 μ L. El primer paso del programa de PCR incluirá 35 ciclos (94 $^{\circ}\text{C}$ por 45 seg, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 seg y 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min), y el segundo paso de PCR incluirá 40 ciclos (94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 seg, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 seg y 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min) usando el producto de ADN del primer paso como plantilla (Chen y Huang 2010).

Para saber que la reacción de la PCR transcurrió eficientemente, se visualizan los resultados a través de una electroforesis en gel de agarosa (Lee y col., 2012). La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo una solución buffer. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona una carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en la solución buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Se agrega Bromuro de Etidio, el cual es una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización del producto de la amplificación en forma de bandas, esta visualización se lleva a cabo tomando una fotografía digital al gel de agarosa expuesto a la luz UV; adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas. En la PCR tiempo real, no es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra, el análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación genética. Para ello los termocicladores están provistos de una computadora con un software que genera una serie de gráficas donde se muestran los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Otro paso importante del análisis es elegir el tipo de cuantificación a utilizar para determinar la amplificación precisa del blanco génico; este proceso depende del interés del investigador. Para ello existen dos tipos de cuantificación: la absoluta, que ayuda a conocer el número exacto de copias amplificadas o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra; la relativa: esta se aplica cuando se desea evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos (Tamay y col., 2013).

5. CONCLUSIONES

Durante muchos años se han realizado investigaciones donde se compara la eficiencia de distintas técnicas de tinción a las cuales, incluso se les han realizado modificaciones para obtener una identificación de ooquistes más certera, sin embargo, para poder tomar una decisión objetiva sobre cuál es la mejor técnica deben de tenerse en cuenta el tiempo de realización y la facilidad de la técnica, la afinidad y especificidad de la tinción con los ooquistes, la facilidad de identificación mediante un buen contraste entre los ooquistes, el fondo y su costo. Haciendo una comparación de la literatura, podríamos concluir que la mejor técnica de diagnóstico hasta el momento es la PCR, ya que nos ofrece información rápida y sumamente específica sobre el agente que se investiga, ofreciendo información a nivel de especie, genotipo y subgenotipo, lo que la convierte en una prueba altamente sensible. Sin embargo, es una prueba costosa y requiere equipo de laboratorio más especializado y reactivos costosos. Resulta sumamente útil para comparar la genética de la población parasitaria hacia el hospedador, siendo necesaria una cantidad muy pequeña de muestra (microlitros) y solo necesita algunos ooquistes para poder obtener un resultado positivo. No obstante, se requiere personal calificado y por su gran exactitud y especificidad, es relativamente fácil contaminar la muestra y alterar el resultado si no es realizada por personal entrenado.

Dentro de las pruebas inmunológicas, la inmunocromatografía es una excelente prueba cualitativa con una alta especificidad, sin embargo, comparándola con ELISA, que ofrece excelentes resultados cuando se busca un género o especie específicos, mostrando una especificidad del 100%, no existe diferencia en cuanto a la calidad de los resultados, además, si existiera una infección provocada por más agentes, en ambas, se vería la necesidad de realizar pruebas complementarias. Es una prueba relativamente sencilla pero es costosa ya que requiere equipo especial y personal certificado y aún existe la necesidad de realizar una estandarización del diagnóstico. También es necesario refrigerar las

muestras hasta su utilización ya que las temperaturas elevadas pueden deteriorar el antígeno parasitario.

El diagnóstico por microscopía ofrece una excelente opción para uso rutinario en laboratorios estándar, en donde no existe la necesidad de trabajar un gran volumen de muestras, siendo las tinciones una técnica sencilla de realizar, práctica, que no necesita de mucho entrenamiento para poder ser llevada a cabo, ofreciendo excelentes resultados, especialmente las técnicas Köster modificada Heine y Kinyoun (Ziehl-Neelsen modificada), las cuales muestran un excelente contraste entre los ooquistes y el fondo, facilitando su identificación y que además, tiene alta afinidad con los ooquistes y no así con hongos y levaduras. No obstante, la microscopía solo nos ofrece un diagnóstico a nivel de género. Cuando se sospecha de un conteo bajo de ooquistes o en una infección subclínica, también cuando sea necesario realizar un lavado o purificación de los ooquistes para pruebas posteriores, será estrictamente necesario realizar una previa concentración de ooquistes. Ya que todas las técnicas de concentración ofrecen resultados similares, la técnica que además, ofrece un tiempo prolongado para la conservación de los ooquistes es la solución de dicromato de potasio, que puede preservar los ooquistes y su morfología intacta por más de 12 meses. Por lo anterior las soluciones glucosadas o de sales para la concentración de ooquistes podrían ser utilizadas si la muestra va a trabajarse en un periodo de no más de 24 horas de haber sido tomada la muestra y si el material a analizar no va a trabajarse inmediatamente después de haber tomado la muestra sino que, por el contrario, tardará algunos meses en ser trabajada, sería recomendable utilizar la solución de dicromato de potasio para preservar los ooquistes hasta su examen.

Las técnicas de concentración facilitan la detección de los ooquistes, eliminan los desechos y material que pudiera afectar la observación e identificación, son fáciles de hacer y la mayoría suelen ser económicas, acortan el tiempo de búsqueda del agente en la laminilla y sobre todo aumentan la certeza del diagnóstico, sin embargo, esto no es estrictamente necesario para realizar una

tinción en muestras con alto conteo de ooquistes ya que su observación resulta sencilla.

6. Literatura citada

1. **Abassi, H., Wyers, M., Naciri, M. (2000).** Rapid detection and quantification of *Cryptosporidium* baileyi oocysts in feces and organs of chickens using a microscopic slide flotation method. *Parasitol. Res.* 86, 179–187.
2. **Alonso-Fresán, M.U., García-Álvarez, A., Salazar-García, F., Vázquez-Chagoyán, J.C., Pescador-Salas, N., Saltijeral-Oaxaca, J. (2005).** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. *J Vet Med B* 2005; 52: 482-3.
3. **Angus, K. W., Campbell, I., Gray, E. W. y Sherwood, D. (1981).** Staining of faecal yeasts and *cryptosporidium* oocysts. *Vet. Rec.* 108: 173.
4. **Angus, K.W. (1990).** Cryptosporidiosis in ruminants. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, Eds. *Cryptosporidiosis of man and animals*, CRC. Press Inc., Boca Raton; pp.83-104.
5. **Angus, K.W., Tzipori, S. y Gray, E. W. (1982).** Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from Calves with Diarrhea. *Vet. Pathol.* 19: 67-78.
6. **Anusz, K. Z., Mason, P. H., Riggs, M. W. y Perryman, L. E. (1990).** Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2770–2774.
7. **Atwill, E.R., Johnson, E., Klingborg, D.J., Vesperat, G.M., Markegard, G., Jensen, W.A., Pratt, D.W., Delmas, R.E., George, H.A., Forero, L.C.,**

- Philips, R.L., Barry, S.J., McDougald, N.K., Gildersleeve, R.R. y Frost, W.E. (1999).** Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. *Am. J. Vet. Res.* 60: 420–425.
8. **Azami, M. (2007).** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cattle in Isfahan, Iran. *J Eukaryot Microbiol.* 54: 100-2.
9. **Baldursson, S. y Karanis, P. (2011).** Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Research* 45: 6603–6614.
10. **Baxby, D., Blundell, N. y Hart, C.A. (1984).** The development and performance of a simple, sensitive method for detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J. Hyg., Camb.* 92, 317-323.
11. **Bednarska, M., Bajer, A. y Sinsky, E. (1998).** Calves as a potential reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* sp. *Ann. Agric. Environ. Med.* 5 (2): 135-138.
12. **Blanchard, P. C. (2012).** Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28, 443–464.
13. **Bornay-Llinares, F.J., da Silva, A.J., Moura, N.S., Myjak, P., Pietkiewicz, H., Kruminis-Lozowska, W., Graczyk, T.K. y Pieniazek, N.J. (1999).** Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 1455-1458.
14. **Borowski, H., Clode, P.L. y Thompson, R.C.A. (2008).** Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology.* 24: 509-516.

15. **Breza, M. 1957.** Some practical knowledge and suggestions to the helminth-coprologic diagnostic. *Helmintologia* 1: 57-63.
16. **Brook, E.J., Christley R.M., French, N.P. y Hart, C.A. (2008).** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen cattle faeces: comparison of three methods. *Lett Appl Microbiol.* 46, 26-31.
17. **Cacciò, S. M. y Widmer, G. (2014).** *Cryptosporidium: Parasite and Disease*, Springer-Verlag, Wien.
18. **Cacciò, S. M. (2005).** Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia.* 2005; 47: 185-192.
19. **Cañavate, C., Cuadros, J., Martínez, R.R. y Martín-Rabadán, P. (2009).** Procedimientos en Microbiología Clínica. Fuente:
20. **Carey, C.M., Lee, H. y Trevors, J.T. (2004).** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 38: 818-62.
21. **Casemore, D. P., Armstrong M. y Sands R. L. (1985).** Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 38: 1337-1341.
22. **Casemore, D.P. (1991).** Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *J Clin Pathol.* 44, 445–451.
23. **Castro, A. y Guerrero-Bermúdez, O. (2004).** Técnicas de Diagnóstico Parasitológico 1. Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José. pp. 99

24. **Chacín-Bonilla L. (1995).** Criptosporidiosis en humanos. Revisión. *Invest Clin.* 36(4): 207-50.
25. **Chalmers, R. M. y Davies, A. P. (2010).** Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology.* 124:138-146.
26. **Chartier, C., Mallereau-Pellet, M. P., Mancassola, R. y 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. *Vet Res.* 33: 169-77.
27. **Chen, F. y Huang, K. (2010).** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. In dairy cattle from farms in China. *J. Vet. Sci.* 13(1): 15-22.
28. **De Graafa, D., Vanopdenboscha, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., y Peeters, J. (1999).** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals international. *J. Parasitol.* 30 (29): 1269-1287.
29. **De Waele, V., Berzano, M., Berkvens, D., Speybroeck, N., Lowery, C., Mulcahy, G.M. y Murphy, T.M. (2011).** Age-Stratified Bayesian Analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. *J. Clin. Microbiol.* 49(1): 76–84.
30. **Delgado, G.R., Mijangos, M.L., Ávila, A.S., Martínez, V.G., y Espinoza, V.J. (2007).** Criptosporidiosis en becerras Holstein con diarrea de la Comarca Lagunera, México. XVI Congreso Nacional de Patología Veterinaria. Mazatlán, Sin., México.
31. **Díaz R., Gamazo C. y López-Goñi Y. (1955).** Manual práctico de microbiología. España: Editorial Masson, pp. 39-41.

32. **Direkel, S., Ozerol, I.H. y Durmaz, R. (2008).** Ishalli Hastalarda *Cryptosporidium parvum*'un ELISA ve Modifiye Ehrlich-Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemleriyle Araştırılması. *Mersin Univ. Sağlık Bilim Derg* 1: 20–25.
33. **Domenech C., Rabodonirina M., Bleyzac N., Pages MP. y Bertrand Y. (2011).** Cryptosporidiosis in children with acute lymphoblastic leukemia on maintenance chemotherapy. *J. Ped. Hematol/Oncol.* 33: 570–572.
34. **Eckmann, L. (2002).** “Small bowel infections,” *Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 18, no. 2, pp. 197–202, 2002.
35. **EFSA (2012).** European Food Safety Authority. Disponible en: www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2613.
36. **Eisenberg, J.N., Lei, X., Hubbard, A.H., Brookhart, M.A. y Colfors, Jr. J.M. (2005).** The Role of Disease Transmission and Conferred Immunity in Outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* Outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am. J. Epidem.* 161: 62-72.
37. **Esteban, E. y Anderson. B. C. (1995).** *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J Dairy Sci* 1995; 78: 1068-72.
38. **Farthing, M. J. G. (2000).** Clinical aspects of human cryptosporidiosis. In: Petry F, ed. *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. Contributions in Microbiology*, (6) Basel: Karger. 50-74.
39. **Fayer R. (2010).** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 124(1): 90–97.

40. **Fayer, R. (2008).** General biology of *Cryptosporidium*. In: Cryptosporidiosis of Man and Animals, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, 1075 Boca Raton, FL, USA, 1–42.
41. **Fayer, R. (2010).** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 124: 90–97.
42. **Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S. y Zarlenga, D. (1998).** *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int. J. Parasitol.* 28(1): 49-56.
43. **Fayer, R., Santín, M y Trout, J.M. (2008).** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156(3-4): 191-198.
44. **Fayer, R., Santín, M. y 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. *Vet. Parasitol.* 145(3-4): 260-266.
45. **Fayer, R., Santín, M. y Xiao, L. (2005).** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol.* 91 (3): 624-629.
46. **Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M. y Greiner, E. (2006).** Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet. Parasitol.* 135(2): 105-112.
47. **Fayer, R., Santín, M., y Trout, J.M. (2008).** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156: 191–198.

48. **Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.K y Lewis E.J. (2000).** Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. *Vet Parasitol.* 93 (2): 103-112.
49. **Feng, Y., Ong, S., Hu, J., Song, L., Tan, X. y Ng, W. (2003).** Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. *Appl Environ Microbiol*; 69(4): 1898-1903.
50. **Feng, Y., Yang, W., Ryan, U., Zhang, L., Kvác, M., Koudela, B., Modry, D., Li, N., Fayer, R. y Xiao, L. (2011).** Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 49(1): 34–41.
51. **Gatei, W., Greensill, j., Ashford, R. W., Cuevas, L. E., Parry, C. M., Cunliffe, N. A. Beeching, N. J. y Hart, C.A. (2003).** Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1458–1462.
52. **Grimason, A. M., Smith, H. V., Parker, J. F. W., Bukhari, Z., Campbell, A. T. y Robertson, L. J. (1994).** Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium spp.* Oocysts in water samples. *Water Res.*, 28, 733-736.
53. **Guzmán, M. (1989).** Inmunofluorescencia: Fundamentos. INAS. Serie de notas e informes técnicos # 1. 16 p.3.
54. **Haque, R., Roy, S., Siddique, A., Mondal, U., Rahman, S. M. M., Mondal, D., Houpt, E. y Petri A. W. (2007).** Multiplex Real-Time PCR Assay For Detection Of *Entamoeba Histolytica*, *Giardia Intestinalis*, And *Cryptosporidium Spp.* *Am J Trop Med Hyg* 76: 713–717.

55. **Harp, J. A., Woodmansee, D. B. y Moon, H. W. (1989).** Effects of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. *Am J Vet Res.* 50(12): 2117-2119.
56. **Hashim, A. G., Clyne, M., Mulcahy, G., Akiyoshi, D., Chalmers, R. y Bourke, B. (2004).** Host cell tropism underlies species restriction of human and bovine *Cryptosporidium parvum* genotypes. *Infect immune.* 72(10): 6125–6131.
57. **Hashim, A. G., Mulcahy, B. B. y Marguerite, C. (2006).** Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect Immun.* 74(1): 99-107.
58. **Heine, J. (1982).** Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zbl Vet Med B.* 29: 324-7.
59. **Henriksen S. A. y Pohlenz J. F. L. (1981).** Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand.* 22: 594-6.
60. **Hira, K. G., Mackay, M. R., Hempstead, A. D., Ahmed, S., Karim, M. M., O'Connor, R. M., Hibberd, P. L., Calderwood, S. B., Ryan, E. T., Khan, W. A. y Ward, H. D. (2010).** Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. from Bangladeshi Children. *J. Clin. Microbiol.* 49(6): 2307-2310.
61. **Hussein, A. S. (2011).** *Cryptosporidium parvum* causes gastroenteritis epidemics in the Nablus region of Palestine. *Tropical Med. Internal. Health.* 16(1): 12-17.
62. **Insulander, M., Silverlas, C. y Lebbad, M. (2013).** Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiol Infect.* 141:1009-20.

63. **Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S. y Takada, S. (1989).** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (Strain RN66) In various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75: 218-222.
64. **Kageruka, P., Brandt, J. R. A., Taelman, H. y Jonas, C. (1984).** Modified Köster staining method for the diagnosis of Cryptosporidiosis. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 1984, 64, 171-175.
65. **Kehl, K. S., Cicirello, H. y Havens, P.L. (1995).** Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.* 33: 416–418.
66. **Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C. (2013).** Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the global enteric multicenter study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 382: 209-22.
67. **Krause, I., Amir, J., Cleper, R. (2012).** Cryptosporidiosis in children following solid organ transplantation. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:1135-8.
68. **Kuczynska, E., Shelton, D. y Pachepsky, Y. (2005).** Bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst attachment to soil. *Appli. Environ. Microbiol.* 71 (10): 6394-6397.
69. **Kurniawan, A., Dwintasari, S.W., Connelly, L., Nichols, R.A., Yuniastuti, E., Karyadi, T. y Diauzi, S. (2013).** Cryptosporidium species from human immunodeficiency-infected patients with chronic diarrhea in Jakarta, Indonesia. *Ann. Epidemiol.* 23(11): 720-723.
70. **Kuzehkanan, A.B., Rezaeian, M., Zeraati, H., Mohebali, M., Meamar, A.R., Babaei, Z., Kashi, L., Heydarnezhadi, M y Rezaie, S. (2011).** A

sensitive and specific PCR based method for identification of *Cryptosporidium* sp. using new primers from 18S ribosomal RNA. *Iranian J. Parasitol.* 6(4): 1-7.

71. **Langkjaer, R. B., Vigre, H., Enemark, H. L. y Maddox-Hyttel, C. (2007).** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* 134(3): 339-350.
72. **Leander, B. S., Clopton, R. E. y Keeling, P. J. (2003).** Phylogeny of gregarines (*Apicomplexa*) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(1): 345–354.
73. **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. y 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. *Infect. Immun.* 70: 3881–3890.
74. **Lebbad, M., Beser, J. y Insulander, M. (2013).** Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium viatorum* and *Cryptosporidium* chipmunk genotype I. *Parasitology.* 140:1735-40.
75. **Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012).** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments fragments. *J. Vis Exp.* 62: 3923.
76. **Lee, S. A., Erath, J., Zheng, G., Ou, X., Willems, P., Eichinger, D. I., Rodriguez, A., Yang, C. (2014).** Imaging and Identification of Waterborne Parasites Using a Chip-Scale Microscope PLoS ONE 9(2): e89712.

77. **Lee, S. U., Joung, M., Nam, T., Park., W. Y., Ji, Y. H. y Yu, J. R. (2011).** *Cryptosporidium parvum*: radiation-induced alteration of the oocyst proteome. *Exp Parasitol.* 127(1): 25-30.
78. **Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R. y Blagburn, B. L. (2000).** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(1): 91-95.
79. **López, C. y Estrada, S. (2005).** Comparación de la técnica de inmunocromatografía con la prueba de aglutinación de partículas contra *T. pallidum* (TP-PA) para el diagnóstico confirmatorio de sífilis. *Medicina UPB.* vol. 24, núm. 2, pp. 159-163.
80. **López, L., Venteo, A., Aguirre, E., García, M., Rodríguez, M., Amusátegui, I., Tesouro, M. A., Vela, C., Sainz, A. y Rueda, P. (2007).** Development of a sensitive and specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay base on a baculovirus recombinant antigen for detection of specific antibodies against *ehrichia canis*. *J Vet Diagn Invest.* 19(6): 635-42.
81. **Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K. A., Peterson, D. A., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., y Davis, J. P. (1994).** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med;* 331: 161–7.
82. **Maikai, B.V., Umoh, J.U., Kwaga, J.K., Lawal, I.A., Maikai, V.A., Cama, V. y Xiao, L. (2011).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Vet. Parasitol.* 178(3-4): 241-245.

83. **Masuno, K., Yanai, T., Hirata, A., Yonemaru, K., Sakai, H., Satoh, M., Masegi, T. y Nakai, Y. (2006).** Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43(2): 202–207.
84. **Morales, S.M y Nava, J.R.A. (2006).** Construcción de un control integral de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acárida: Ixodidae) en Morelos, México. *Investigación Agropecuaria.* 2006. Vol.3, p:122.
85. **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. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 995-8.
86. **Morse, T. D., Nichols, R. A. B., Grimason, A. M., Campbell, B. M., Tembo, K. C. y Smith, H. V. (2007).** Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol. Infect.* 135: 1307–1315.
87. **Mtambo, M. M., Nash, A. S., Blewett, D. A. y Wright, S. (1992).** Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. *Vet Parasitol.* 45: 49-57.
88. **Nethery K.A., Doyle C.K, Zhang X.F. y McBride J.W. (2007).** Ehrlichia canis gp200 contains Dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. *Infect. Immun.* vol. 75 no. 10 4900-4908.
89. **Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A. y Yardley, J. H. (1976).** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70(4), 592-8.

90. **Nussbaum, D. J., Salord, J. R., y Rimmele, D. D. (1999).** Evaluation of quantitative latex agglutination for detection of *Cryptosporidium parvum*, *E. Coli* K99, and Rotavirus in calf feces. *J. Vet. Diagnost. Invest.* 11: 314-318.
91. **O'Donoghue, P. J. (1995).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol.* 25: 139-95.
92. **OIE (2008).** Manual de la OIE sobre animales terrestres. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.04.%20Criptosporidiosis.PDF (Última revisión: 8 de octubre de 2015).
93. **Ollivett, T. L., Nydam, D. V., Bowman, D. D., Zambriski, J. A., Bellosa, M. L., Linden, T. C., y Divers, T. J. (2009).** Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 92: 1643–1648.
94. **Pancieria, R.J., Thomassen, R.W. y Garner, F.M. (1971).** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479-84.
95. **Pantenburg, B, Dann, SW, Wang, HC, Robinson, P., Castellanos-Gonzalez, A., Lewis, D.E., White, C. (2008).** Intestinal immune response to human *Cryptosporidium sp.* Infection. *Infect Immun.* 76: 23-9.
96. **Pavlásek, I. (1982).** First detection of *Cryptosporidium sp.* Oocysts in calf faeces by flotation method. *Folia Parasitol.* 29: 115-118.
97. **Pavlásek, I. (1999).** Kryptosporidie: biologie, diagnostika, hostitelské spektrum, specificita a vztah k životnímu prostředí (Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environment). *Remedia Klin. Microbiol.*, 3 (9), 290–301.

98. **Pavlásek, I. (2001).** Nález kryptosporidií ve žláznatém žaludku u slepic a u volně žijících a exotických ptáků odchycených z volné přírody (Findings of cryptosporidia in the proventriculum of hens and in wild and exotic birds). *Veterinářství*, **3**, 103–108 (in Czech).
99. **Pierce, K.K. y Kirkpatrick, B.D. (2009).** Update on human infections caused by intestinal protozoa. *Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 25, no. 1, pp. 12–17, 2009.
100. **Polage, C. R., Stoddard, G. J., Rolfs, R. T. y Petti, C. A. (2011).** Physician use of parasite tests in the United States from 1997 to 2006 and in a Utah *Cryptosporidium* outbreak in 2007. *J. Clin. Microbiol.* 49(2):591–596.
101. **Potters, I. y Van, Esbroeck, M. (2010).** Negative Staining Technique of Heine for the Detection of *Cryptosporidium* spp.: A Fast and Simple Screening Technique. *Open Parasitol J. I*, **4**, 1-4.
102. **Power, M. (2010).** Biology of *Cryptosporidium* from marsupial hosts. *Exp. Parasitol.* 124: 40–44.
103. **Quílez, J., Sanchez-Acedo, C., Del-Cacho, E., Clavel, A., Causapé, A. C. (1996).** Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (Northeastern Spain). *Vet Parasitol.* 66: 139-46.
104. **Quílez, J., Vergara-Castiblanco, C., Monteagudo, L., del Cacho, E. y Sánchez-Acedo, C. (2011).** Multilocus fragment typing and genetic structure of *Cryptosporidium parvum* isolates from diarrheic preweaned calves in Spain. *Applied Environ. Microbiol.* 77(21): 7779–7786.
105. **Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, M. J. y Xiao, L. (2012).** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp.

- (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol*, 130(3): 274–281.
106. **Riccardi, A. y Momar, N. (2015).** Diagnosis of Parasitic Infections: What's Going On?. *J.biomol. screen.* Vol. 20 (1), 6-21.
 107. **Robertson, L. J., Björkman, C., Axén, C. and Fayer, R. (2014).** Cryptosporidiosis in farmed animals. In *Cryptosporidium: Parasite and Disease* (ed. Caccio, S. M. and Widmer, G.), pp. 149–235. Springer-Verlag, Wien.
 108. **Robinson, G., Chalmers, R.M. (2010).** The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. *Zoonoses and Public Health* 57. e1–e13.
 109. **Rojas, W. (1995).** Inmunología. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. Capítulo 14. pg.197-200.
 110. **Rongchang, Y., Jacobson, C., Gardner, G., Carmichael, I., Angus, Campbell, J.D., Ng-Hublin, J., Ryan, U. (2014).** Longitudinal prevalence, oocyst shedding and molecular characterisation of *Cryptosporidium* species in sheep across four states in Australia. *Vet Parasitol.* 200 50– 58.
 111. **Ryan, U., Power, M. (2012).** *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology* 139, 1673–1688.
 112. **Ryan, U. M., Power, M. y Xiao, L. (2008).** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **55**, 22–26.

113. **Sanford, S. E. y Josephson, G. K. A. (1982).** Bovine Cryptosporidiosis: Clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. *Can. Vet. J.* 23: 343-347.
114. **Santín, M., Trout, J. M. y Fayer, R. (2008).** A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet. Parasitol.* 155(1-2): 15-23.
115. **Santín, M., Trout, J. M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E. y Fayer, R. (2004).** Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122: 103–117.
116. **Sasahara, T., Maruyama, H., Aoki, M., Kikuno, R., Sekiguchi, T., Takahashi, A., Satoh, Y., Kitsato, H., Takayama, Y., Inoue, M. (2003).** Apoptosis of intestinal crypt epithelium after *Cryptosporidium parvum* infection. *J Infect Chemother.* 9: 278-81.
117. **Satoh, M., Hikosaka, K., Sasaki, T., Suyama, Y., Yanai, T., Ohta, M. y Nakai, Y. (2003).** Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Appl. Envir. Microbiol.* 69: 691-692.
118. **Scott, C.A., Smith, H.V., Mtambo, M.M.A. y Gibbs, H.A. (1995).** An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle. *Vet. Parasitol.* 57: 277-288.
119. **Sheather, A.L. (1922).** The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J. Comp. Pathol. Ther.* 35, 266–275.
120. **Shing, I., Carville, A. y Tzipori, S. (2011).** Cryptosporidiosis in *Rhesus Macaques* challenged during acute and chronic phases of SIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 27(9): 989–997.

121. **Siddons, C. A., Chapman, P. A., Rush, B. A. (1992).** Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in faeces and environmental samples. *J Clin Pathol.* 1992; 45: 479-82.
122. **Silverlas, C. y Blanco-Penedo, I. (2013).** *Cryptosporidium* spp. In calves and cows from organic and conventional dairy herds. *Infection and Immunity* 141, 529–539.
123. **Singh, B. B., Sharma, R., Kumar, H., Banga, H. S., Aulakh, R. S., Gill, J. P. y Sharma, J. K. (2006).** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet Parasitol.* 140: 162-5.
124. **Šlapeta, J. (2011).** Naming of *Cryptosporidium pestis* is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as *C. parvum* 'bovine genotype'. *Vet. Parasitol.* 177(1-2): 1-5.
125. **Smith H. V. (1992).** Intestinal protozoa. *In: Medical Parasitology: a Practical Approach*, Hawkey P.M. y Gillespie S.H., eds. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, 79–121.
126. **Smith, H. V., Campbell, B. M., Paton, C. A. y Nichols, R. A. B. (2002).** Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates using DAPI and immunofluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5198–5201.
127. **Smith, H.V. (1998).** Detection of parasites in the environment. *Parasitology*, 117, S113–S141.

128. **Smith, H.V. (2008).** Diagnostics. *In: Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, 1075 Boca Raton, FL, USA, 173-208.
129. **Sulaiman, I. M., Hira, P.R., Zhou, L., Al-Ali, F. M., Al-Shelahi, F. A., Shweiki, H. M., Iqbal, J. Khalid, N. y Xiao, L. (2005).** Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2805–2809.
130. **Sulaiman, I. M., Morgan, U. M., Thompson, R. C., Lal, A. A., Xiao, L. (2000).** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2385–2391.
131. **Tamay, D. L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013).** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud*, 2(2): 70-78.
132. **Tee, G.H., Moody, A.H., Cooke, A.H., Chiodini, P.L. (1993).** Comparison of techniques for detecting antigens of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in faeces. *J Clin Pathol.* 46: 555-8.
133. **Templeton, T.J., Enomoto, S., Chen, W.J., Huang, C.G., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S. y Zhu, G. (2010).** A Genome-Sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a *Gregarine* and *Cryptosporidium*. *Mol. Biol. Evol.* 27(2): 235–248.
134. **Thompson, H. P., Dooley, J. S. G., Kenny, J., McCoy, M., Lowery, C. J., Moore, J. E. y Xiao, L. (2007).** Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitol. Res.* 100: 619-624.

135. **Tiranti, K., Larriestra, A., Vissio, C., Picco, N., Alustiza, F., Degioanni, A. y Vivas, A. (2011).** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering and patterns of shedding in dairy calves from Córdoba, Argentina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 20(2): 140-147.
136. **Traversa, D. (2010).** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Paras. Vect.* 3: 21.
137. **Trotz-Williams, L. A., Jarvie, B. D., Martin, S. W., Leslie, K. E. y Peregrine, A. S. (2005).** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can. Vet. J.* 46(4): 349-351.
138. **Trotz-Williams, L. A., Martin, S. W., Martin, D., Duffield, T., Kenneth, E. L., Nydam, D. V., Jamieson, F., Peregrine, A. S. (2005).** Multiattribute evaluation of two simple tests for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf faeces. *Vet. Parasitol.* 134, 15-23.
139. **Tzipori, S. y Griffiths, J. (1998).** Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Parasitol.* 40: 5-36.
140. **Ungar, B. L. P., Kao, T. C., Burris, J. A., Finkelman, F. D. (1991).** *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model: independent roles for IFN-alpha and CD4 T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 1991; 147: 1014-1022.
141. **Uribarren, T.B. (s/a).** Criptosporidiosis o Criptosporidiasis. Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cryptosporidiasis.html>

142. **Velazco, J. (1995).** Tinción ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen). En: Díaz R., Gamazo C., López-Goñi Y. Manual práctico de microbiología. España: Editorial Masson, pp. 39-41.
143. **Wang, R., Ma, G., Zhao, J., Lu, Q., Wang, H., Zhang, L., Jian, F., Ning, C. y Xiao, L. (2011).** *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitology Internal*. 60: 1–4.
(a).
144. **Wang, R., Zhang, X., Zhu, H., Zhang, L., Feng, Y., Jian, F., Ning, C., Qi, M., Zhou, Y., Fu, K., Wang, Y., Sun, Y., Wang, Q. y Xiao, L. (2011).** Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in humans in Henan, China. *Exp. Parasitol*. 127(1): 42-45.(b)
145. **Widerström, M., Schönning, C., Lilja, M. (2014).** Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerg Infect Dis*. 20: 581-9.
146. **Widmer, G. (2009).** Meta-analysis of a polymorphic surface glycoprotein of the parasitic protozoa *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Epidemiol. Infect*. 137: 1800–1808.
147. **Widmer, G. y Lee, Y. (2010).** Comparison of single- and multilocus genetic diversity in the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis*. *Appl. Environ. Microbiol*. 76: 6639–6644.
148. **Willson, P.J y Acres, S.D. (1982).** A comparison of dichromate solution floatation and fecal smears for diagnosis of criptosporidiosis in calves. *Can. vet. J*. 23: 240-246.

149. **Xiao, L. y Herd, R.P. (1993).** Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J. Clin. Microbiol.* 31(11): 2944-2946.
150. **Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M. y Lal, A. (2000).** Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5492–5498.
151. **Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. y Upton, S.J. (2004).** *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1): 72-97.
152. **Xiao, L., Ryan, U.M., (2004).** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 2004; 17: 483-490.
153. **Xiao, L., y Feng., Y. (2008).** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52: 309–323.
154. **Ziehl-Neelsen, F. (1882).** Zur Färbung des Tuberkelbacillus (Staining of the tuberculosis bacteria) *Deut. Med. Wochenschr.* 8: 451.