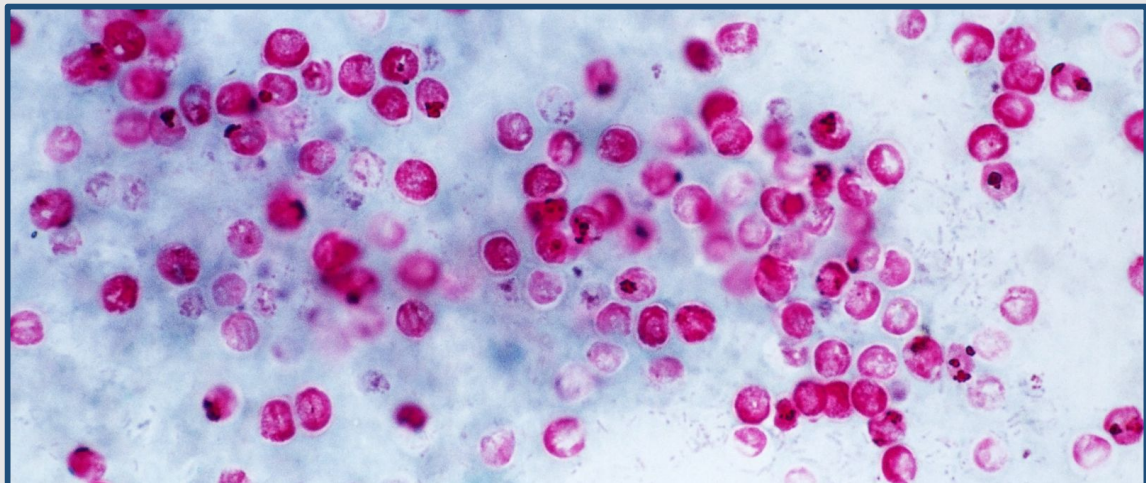




TFG experimental

# CRIPTOSPORIDIOSIS



Marta Argüeso Ruiz

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla



Marta Argüeso Ruiz

Grado en Farmacia

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

Trabajo de Fin de Grado: CRIPTOSPORIDIOSIS

TFG de carácter experimental

Departamento de Microbiología y Parasitología (Área de Parasitología)

Tutora del trabajo: Dña Concepción Ariza Astolfi

Presentación en Sevilla, Junio de 2016

## RESUMEN

---

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria que afecta tanto a animales como al hombre y que es reconocida como una de las causas más importantes de diarrea a nivel mundial. Está producida por especies del género *Cryptosporidium*, un protozoo descubierto hace más de cien años que infecta las células intestinales y que se puede transmitir tanto de persona a persona como de animal a persona y también mediante ingestión de alimentos o agua contaminada.

La sintomatología de la enfermedad incluye normalmente una diarrea acuosa abundante y en ocasiones dolor abdominal, aunque es también frecuente que curse de forma asintomática, sobre todo en pacientes inmunocompetentes. A pesar de que puede afectar a cualquier género, a cualquier edad y de no tener una zona endémica concreta, es especialmente considerada de mayor riesgo en algunos grupos específicos como son pacientes inmunocomprometidos y niños, donde en algunos casos puede llegar a ser mortal.

Por este motivo, en este trabajo se estudia la prevalencia de esta enfermedad en uno de estos grupos, más concretamente en niños que acuden a guarderías donde la transmisión del parásito mediante la vía fecal-oral es de gran importancia. Para llevarlo a cabo se tomaron muestras fecales de cada uno de los niños y se analizaron en el laboratorio. El número de muestras fue de 112, para su análisis se utilizó el método de tinción de Ziehl-Neelsen modificado o Kinyoun y posteriormente se observaron al microscopio para evaluar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium sp* en cada una de las muestras tomadas.

Palabras clave: Criptosporidiosis, guardería, prevalencia, *Cryptosporidium*.

# ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
El parásito.....	4
Epidemiología.....	8
Manifestaciones clínicas de la enfermedad .....	13
Diagnóstico.....	16
Tratamiento.....	17
Prevención.....	19
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
Resultados .....	23
Discusión .....	26
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>28</b>

# INTRODUCCIÓN

---

La criptosporidiosis es una enfermedad causada por *Cryptosporidium sp*, parásito que fue descrito por primera vez en 1907 cuando Tyzzer descubrió la infestación en el tracto digestivo de un ratón que causaba una importante diarrea (Navarro-i-Martinez y cols., 2011)(Guerrant y cols., 2016), siendo más tarde en el año 1971 cuando se describe por primera vez la infestación en ganado bovino joven presentando como síntoma una diarrea intensa y crónica, la cual se asoció a la presencia de *Cryptosporidium sp*, en concreto *Cryptosporidium parvum* (Ortega-Pierres y cols., 2009).

A partir de este momento se empieza a reconocer la importancia de esta enfermedad en el ámbito animal afectando tanto a este tipo de ganado como a pollos, ratas y ratones, perros, gatos, cerdos y monos (Cobo, 2006), estableciéndose entonces la criptosporidiosis en aquella época como una zoonosis de gran importancia.

Tuvieron que pasar años hasta que en 1976 aparecieran los primeros casos de infección en humanos, concretamente dos casos: el primero, el de un niño de tres años que presentaba enterocolitis y al que se le realizó una biopsia rectal detectándose la presencia de *Cryptosporidium sp* (Nime y cols., 1976); y el segundo, el de un paciente de treinta y nueve años con diarrea intensa al que también se le detectó la presencia de este parásito (Meisel y cols., 1976). Más tarde en el año 1982 aparece el primer caso de infección en humanos VIH positivo reconociéndose entonces como un parásito oportunista y elevando la tasa de mortalidad de este tipo de pacientes inmunodeprimidos (Navarro-i-Martinez y cols., 2011).

Uno de los episodios más significativos asociado a esta enfermedad fue la epidemia ocurrida en Milwaukee en 1993 que afectó a más de cuatrocientas mil personas que acusaban diarrea intensa y otros síntomas que duraron al menos nueve días (Kothavade, 2011), y que fue debida a la ingesta de agua contaminada, descubriéndose entonces la resistencia de este parásito al tratamiento con cloro que se le había aplicado a este agua (Mac Kenzie y cols., 1994).

## EL PARÁSITO

*Cryptosporidium sp* es un género perteneciente al phylum Apicomplexa, clase Esporozoa, orden Eucoccidiida, suborden Eimeriina y familia Cryptosporidiidae. Dentro de este género existen numerosas especies, en concreto se han descrito veinticinco de las cuales dos de ellas, *C. parvum* y *C. hominis*, afectan al ser humano y también otras especies como *C. muris* y *C. meleagridis* que afectan a mamíferos y aves respectivamente.

*Cryptosporidium parvum* es la especie responsable de la criptosporidiosis en humanos, animales domésticos, y de granja, de ahí la importancia de su estudio. La forma de infección se produce mediante la ingestión de ooquistes por parte del hospedador. Esta enfermedad se puede transmitir de animal a persona, de persona a persona o mediante la ingestión de alimentos o agua contaminada (Cobo, 2006), siendo esta última una de las causas más frecuentes reportando un total de 165 epidemias de origen hídrico (Becerril, 2014).

## CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de vida de este parásito (Ilustración 1) se produce por completo en un solo hospedador y da comienzo una vez que se ingieren ooquistes esporulados, los cuales llegan al intestino delgado y da comienzo el ciclo.

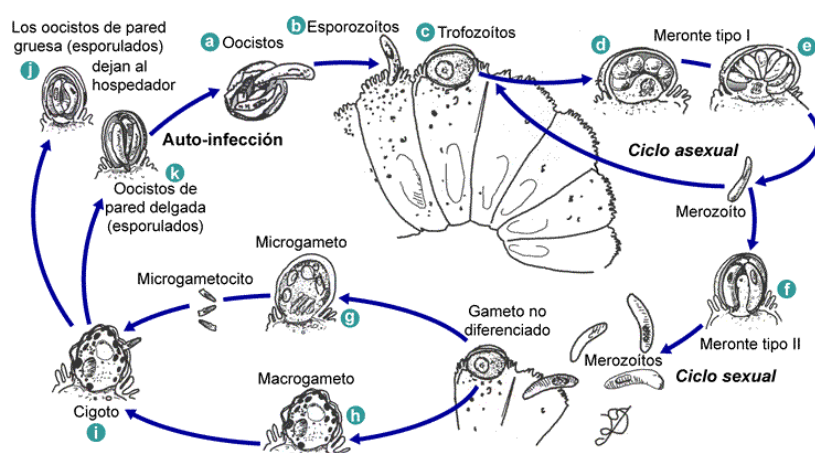


ILUSTRACIÓN 1. CICLO BIOLÓGICO *CRYPTOSPORIDIUM SP.* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2016)

- **Desenquistamiento**

Consiste en la rotura de la pared que envolvía a los ooquistes, liberando de esta manera a los cuatro esporozoítos que se encuentran en el interior (Guerrant y cols., 2016). Este desenquistamiento puede estar desencadenado por diferentes factores como la exposición a agentes reductores y enzimas digestivas una vez que ha llegado al intestino delgado, lo cual causa variaciones de pH y temperatura que podrían favorecer este proceso, aunque de igual manera se podría dar de forma espontánea (Cacciò, Widmer, 2014)(Cobo, 2006).

- **Invasión y ataque**

Una vez que los esporozoítos son liberados se produce el siguiente paso en el ciclo, el cual consiste en la invasión de las células epiteliales del intestino. Los esporozoítos tienen una morfología específica, poseen un complejo apical que es un orgánulo de penetración celular gracias al cual se lleva a cabo la invasión de la célula epitelial del hospedador. El esporozoíto queda envuelto en una vacuola parasitófora que se encuentra al borde del cepillo pero debajo de la membrana de la célula epitelial, de forma que la ubicación de *Cryptosporidium sp* es intracelular y extracitoplasmática (Fayer, Xiao, 2007)(Cobo, 2006).

A medida que el proceso avanza, el esporozoíto pasa a tomar una forma más esférica y se le da el nombre de trofozoíto (Becerril, 2014).

- **Reproducción asexual (merogonia):**

Consiste en la división nuclear del trofozoíto dando lugar a una célula llamada meronte tipo I que puede contener seis u ocho núcleos que darán lugar a merozoítos, estructuralmente parecidos a los esporozoítos. Estos merozoítos maduros salen del meronte y pueden volver a infectar células epiteliales y volver a empezar un ciclo asexual o también pueden ocurrir dos divisiones nucleares y convertirse en merontes tipo II, los cuales darán cuatro merozoítos (Becerril, 2014).

- **Reproducción sexual**

Una vez los merozoítos de segunda generación son liberados al lumen del intestino y vuelven a infectar las células epiteliales, comienza la reproducción sexual donde se diferencia entre gameto femenino (macrogameto) y gameto masculino (microgameto), siendo dentro de este último donde se producen varias divisiones dando lugar a los microgametocitos que viajan hasta el macrogameto, lo invaden y se produce la fecundación dando lugar al cigoto (Guerrant y cols., 2016)(Becerril, 2014)

- **Esporogonia**

Este cigoto que se ha formado puede desarrollarse de dos maneras diferentes. Por un lado se puede producir un ooquiste esporulado, con una pared gruesa y diferenciada y que contiene cuatro esporozoítos. Este ooquiste sale del organismo del hospedador por las heces, convirtiéndose en la forma infectante (Guerrant y cols., 2016). Estos ooquistes que salen al exterior pueden sobrevivir por meses fuera del organismo hasta que se vuelva a producir otra infección, todo ello gracias a esa pared que los protege (Gómez, 2010).

Por otro lado se puede producir un ooquiste inmaduro con una pared mucho más débil que la del ooquiste anteriormente mencionado y que es causante de la autoinfección del hospedador (Pérez, 2006). Este aspecto es muy importante dentro del ciclo ya que es una de las causas más importantes por las que se puede producir la enfermedad de forma intensa e imparable, sobre todo en personas inmunodeprimidas.

### MORFOLOGÍA DE LA FORMA INFECTANTE

---

Como ya hemos señalado anteriormente, el ooquiste esporulado es la forma infectante tanto de seres humanos como de animales y es por eso por lo que es importante conocer su morfología, sobre todo a la hora de la identificación del parásito.

El ooquiste de *Cryptosporidium parvum* mide entre 4,5-5,5  $\mu\text{m}$ , se caracteriza por ser esférico y por tener una pared gruesa, aunque la capa más superficial de esta pueda ser



algo irregular (Ilustraciones 2 y 3). También se pueden observar en su interior los cuatro esporozoítos móviles en forma de banana (Gómez, 2010) (Fayer, Xiao, 2007).

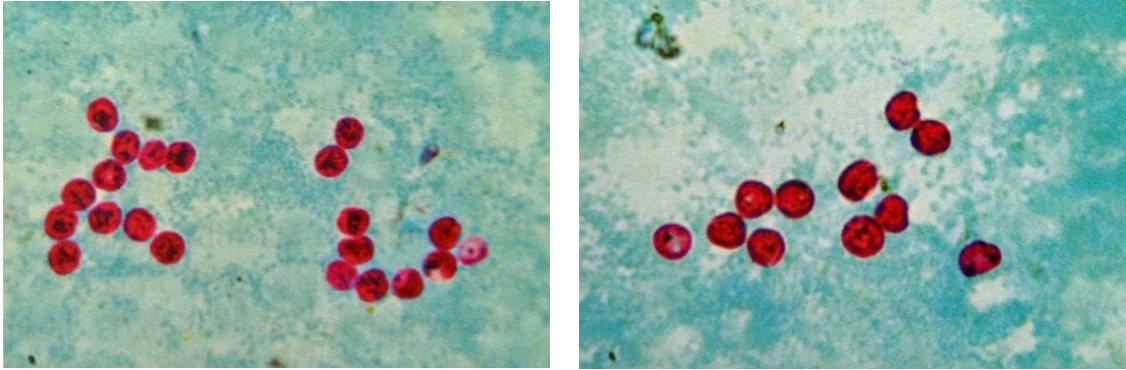


ILUSTRACIÓN 2 Y 3. OOQUISTES DE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* AL MICROSCOPIO TEÑIDOS MEDIANTE MÉTODO DE TINCIÓN KINYOUN(BECERRIL, 2014)

Es importante saber las características principales de esta forma de infección (Tabla 1), como el tamaño que presentan los ooquistes, el sitio de infección y los posibles hospedadores. De esta manera se puede diferenciar de mejor forma las distintas especies de *Cryptosporidium sp.*

ESPECIE	TAMAÑO OOQUISTES (µm)	SITIO DE INFECCIÓN	HOSPEDADOR
<i>C. parvum</i>	4,5 x 5,5	Intestino delgado	Mamíferos
<i>C. hominis</i>	4,5 x 5,5	Intestino delgado	Humanos
<i>C. muris</i>	5,6 x 7,4	Estómago	Mamíferos
<i>C. bailey</i>	4,6 x 6,2	Tráquea, bolsa de fabricio,cloaca	Gallináceas
<i>C. meleagridis</i>	4,5-4,0 x 4,6-5,2	Intestino	Pavos
<i>C. suis</i>	5,05 x 4,41	Intestino delgado	Cerdos
<i>C. andersoni</i>	5,5 x 7,4	Estómago	Bovinos y camellos

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE DIFERENTES ESPECIES DE *CRYPTOSPORIDIUM SP* (GÓMEZ, 2010)

---

## EPIDEMIOLOGÍA

---

No fue hasta el año 2004 cuando la Organización Mundial de la Salud reconoció la importancia y el impacto que causaban las infecciones parasitarias como la que estamos tratando en este trabajo (Becerril, 2014), y por ello más tarde fue incluida como enfermedad de declaración obligatoria.

La criptosporidiosis es una enfermedad que afecta a todo tipo de personas pero, existen determinados grupos de riesgo como los niños y las personas inmunodeprimidas. En algunos casos puede ser asintomática, normalmente en inmunocompetentes, pero en la mayoría presenta una diarrea abundante y crónica. La diarrea causa entre 5-10 millones de muertes al año a nivel mundial, siendo la criptosporidiosis una de las causas mayoritarias, afectando globalmente a la población y convirtiéndose *Cryptosporidium sp* en un parásito emergente (Fayer, Xiao, 2007).

Aunque, como ya hemos señalado, no afecta de forma exclusiva a ningún grupo específico de personas, sí que se ha demostrado una mayor prevalencia en pacientes VIH positivos encontrándose la presencia del parásito en el 11-21% de los casos (Rodríguez, Royo, 2001), y en niños menores de cinco años dándose un promedio de 3% contra 0,8% con respecto a adultos (Becerril, 2014) (Gállego, 2003).

En cuanto a como afecta la zona geográfica, este parasitismo se da de forma global aunque hay una mayor prevalencia en países subdesarrollados con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua (medio de transmisión muy importante), o que tienen un contacto muy estrecho con animales que podrían servir como reservorios de la enfermedad. Estas características se ven reflejadas en el número de casos dados de habitantes donde se encontró *Cryptosporidium sp* en heces como en el 5% que se reporta en Asia y en el 10% en África (Rodríguez, Royo, 2001).

En Europa, en el año 2012, se reportaron 9.591 casos de los cuales 9.577 fueron confirmados, dándose un incremento con respecto al año 2011 (Tabla 2) (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2014).

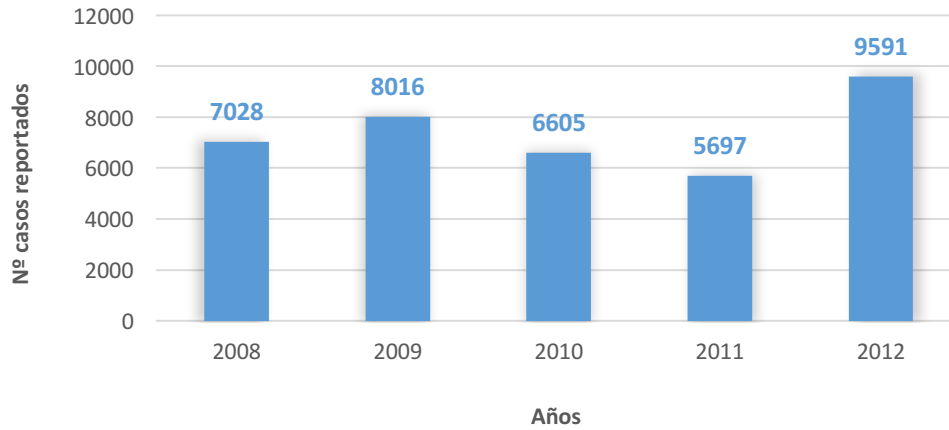


TABLA 2. Nº CASOS REPORTADOS EN EUROPA DESDE EL AÑO 2008 HASTA 2012 (ECDC, 2014) .

Uno de los grupos de riesgo señalado anteriormente son los niños. La prevalencia mayor en este grupo se puede comprobar al ver un estudio con datos que fueron recogidos de veinte países europeos donde se reportaron un mayor número de casos y que, al observar la comparación entre los distintos grupos de edades y géneros, se puede ver como hay mayor prevalencia en unos que en otros (Tabla 3) (ECDC, 2014).

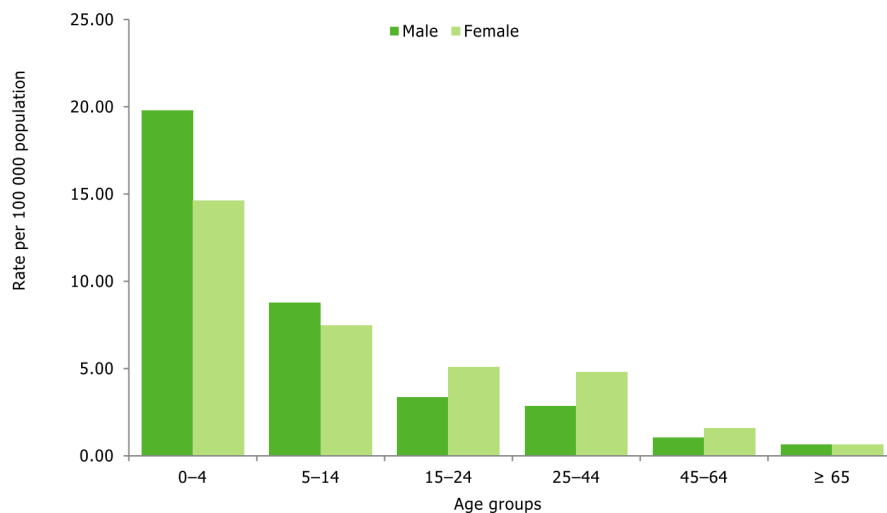


TABLA 3. RATIOS DE CASOS DE CRIPTOSPORIDIOSIS POR GÉNERO Y EDAD EN 2012(ECDC, 2014).

Se puede apreciar como hay un mayor número de casos en pacientes menores de 4 años y, dentro de este grupo, se datan más en niños que en niñas (Pérez, 2006)(Rodríguez, Royo, 2001), de forma contraria a los rangos de edad a partir de 15 años donde esto cambia dándose una mayoría en mujeres.

La infección puede transmitirse de animal a persona, de persona a persona o a través de agua o alimentos que estén contaminados. Está documentada la presencia de este parásito en varias especies de bivalvos donde se pudo constatar que el 53% de las muestras de moluscos examinadas contenía ooquistes viables de *Cryptosporidium sp* (Navarro-i-Martinez y cols., 2011). Tanto *C. hominis* como *C. parvum* afectan al hombre aunque este último también puede infectar a mamíferos, especialmente a animales recién nacidos y es la especie de *Cryptosporidium sp* más implicada en los casos reportados en Europa (García y cols., 2004).

Como ya hemos señalado, el agua es una de las mayores vías de transmisión, los grandes brotes se han asociado al consumo de agua contaminada ya sea bebida o por contacto con aguas de recreo. Debido a que esta enfermedad se puede transmitir a través del agua, hay que tener en cuenta otros factores que favorecen la transmisión de este parasitismo. Uno de ellos es el medioambiental, ya que es importante conocer el origen del agua o si son aguas residuales que puedan estar contaminadas con excrementos de animales, lo cual significaría que tendría una mayor concentración de ooquistes favoreciendo así la diseminación de la enfermedad (García y cols., 2004).

También supone un factor importante el climático, ya que se asocian las temperaturas bajas a una mayor concentración de ooquistes. Por esta razón, se observa una mayor incidencia durante el otoño y el invierno con respecto a la primavera y el verano (Clavel y cols., 1996).

#### SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA EN ESPAÑA

---

En uno de los primeros estudios realizados sobre la prevalencia de parásitos intestinales en población infantil que asistía a guarderías de Canarias, ya se demostraba la presencia de *Cryptosporidium sp* y se relacionaba de manera significativa la presencia del parásito con síntomas diarreicos (Batista y cols., 1992).

El primer caso de contaminación ambiental por *Cryptosporidium sp* fue reportado en 1994 en Salamanca donde se encontraron ooquistes de este parásito en agua de

consumo y en plantas potabilizadoras, ya conociendo la resistencia de este parásito al tratamiento al que se someten este tipo de aguas (Navarro-i-Martinez y cols., 2011).

A partir de este momento se reportan al Sistema de Información Microbiológica (SIM), que cuenta solo con los casos reportados por aproximadamente un 25% de la población, un total de 823 casos desde el año 1995 hasta el 2003, lo que supone una media anual de 103 casos (Red Nacional de Vigilancia epidemiológica, 2003).

Se han estudiado casos en diferentes regiones del país al igual que en diferentes grupos de edad encontrándose un mayor número de casos en niños, al igual que se da a nivel mundial. Algunos de estos estudios son, el realizado en Zaragoza a niños de hasta 14 años donde se observó una mayor prevalencia en aquellos que eran menores de 3 años (Clavel y cols., 1996) o en Salamanca donde también se observaron unos resultados parecidos a los señalados anteriormente (García-Rodríguez y cols., 1989)

A partir del año 2009, la enfermedad se debe declarar de forma obligatoria, por ello se observan un mayor número de casos reportados con respecto a los años anteriores. Los datos más recientes datan del año 2014 donde se dieron un total de 264 infecciones, aumentando con respecto al año anterior (Tabla 4) (Red Nacional de Vigilancia epidemiológica, 2015).

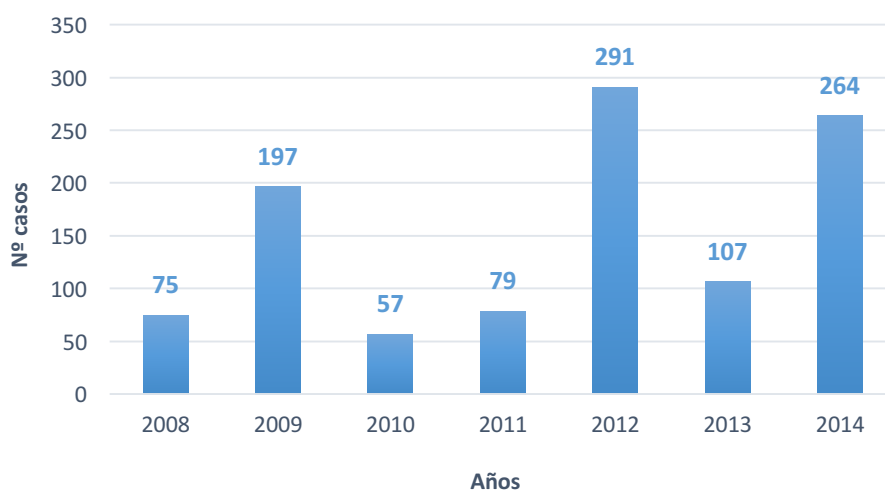


TABLA 4. CASOS DE CRIPTOSPORIDIOSIS REPORTADOS EN ESPAÑA 2008-2014 (ECDC, 2014)(RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2015)

Además de todos estos casos producidos de forma esporádica, en España también se han reportado 11 brotes desde el año 1995 hasta 2007 (Navarro-i-Martinez y cols., 2011). Estos se han dado en diferentes ámbitos mayoritariamente en colegios y hoteles, siendo la contaminación por agua la causa más frecuente (Tabla 5) y demostrándose que esta es la vía de transmisión más importante de este parasitismo.

Año	CC.AA.	Ámbito	Expuestos	Casos	Mes primeros síntomas	Vehículo	Fuente	Observaciones
1997	Andalucía	Colegio	200	66	Octubre	Agua	Red suministro aguas	Avería/obras
1998	Madrid	Colegio	519	62	Abril	Agua		Contaminación instalación
1998*	Andalucía	Hotel	2.500	3	Julio			Turistas
1999	Madrid	Colegio	138	36	Octubre			
2000	Aragón	Poblacional		750	Enero	Agua	Red suministro aguas	Contaminación por aguas superficiales agrícolas
2000	Aragón	Poblacional		100	Mayo	Agua	Red suministro aguas	Insuficiente tratamiento agua
2000*	Baleares	Hotel		25	Mayo	Agua	Piscina	Turistas
2000	Cataluña	Colegio	45	13	Octubre			
2001	Madrid	Picnic	80	5	Julio	Agua	Pozo	Agua no tratada, explotación ganadera
2003*	Baleares	Hotel	2.000	391	Julio	Agua	Piscina	Turistas
2003*	Baleares	Hotel		4	Julio			Turistas

TABLA 5. BROTES DE CRIPTOSPORIDIOSIS EN ESPAÑA DESDE 1995 HASTA 2003 (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2003).

Entre los más significativos destacan uno de los primeros reportados que data del año 1998, donde se dio un caso en Guadarrama en el cual se confirmaron 21 casos de criptosporidiosis, mayoritariamente en niños (Rodríguez-Salinas y cols., 2000); también en niños, aunque en este caso centralizado en una guardería, se dio otro caso en Zaragoza esta vez causado por una contaminación al aparecer por el cambio de pañales (Ortega y cols., 2006), hipótesis derivada de la observación de que a todos los niños se le cambiaba el pañal en la misma sala lo que podría haber causado el origen del brote.

Sin embargo, el brote más significativo se reporta del año 2003 en Mallorca donde se vieron afectadas numerosas personas extranjeras de las cuales se confirmaron 392 casos (Galmes y cols., 2003) y siendo la causa de este hecho la posible contaminación del agua de la piscina del hotel.

---

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

---

Como ya hemos señalado, la criptosporidiosis en humanos es causada por la infección de *Cryptosporidium sp*, la mayor parte por *C. hominis* y *C. parvum*, aunque también hay otras especies que pueden causarla en menor medida (Llorente y cols., 2007).

Para que se inicie un proceso infeccioso se requieren unos 100-130 ooquistes esporulados del parásito y siendo el período de incubación de unos 5-14 días (Becerril, 2014). El síntoma más característico es una diarrea bastante líquida que aparece de forma crónica pudiendo llegar a durar entre 2-26 días o incluso en casos aislados 90 días (Rodríguez & Royo, 2001), y que está causada por la alteración de las vellosidades del intestino donde reside el parásito durante su ciclo vital.

Esta alteración a nivel de los enterocitos provoca atrofia celular e infiltrado inflamatorio que desencadena la liberación de citocinas (Becerril, 2014) potenciando la secreción de agua y generando la diarrea acuosa característica de la enfermedad, que también puede venir dada por una alteración en la digestión o un desarrollo bacteriano excesivo (Cobo, 2006). A parte de esta diarrea, algunos pacientes también pueden presentar otros síntomas estudiados como dolor abdominal en un 60%-90% de los casos, fiebre normalmente leve por debajo de los 39° y náuseas en un 35% de los pacientes (Cacciò, Widmer, 2014). Todos estos síntomas pueden presentarse en cualquier paciente aunque cabe destacar que la enfermedad también puede ser asintomática y no presentar ninguna señal que nos indique su desarrollo.

Por otro lado, se tiene especial cuidado en aquellos grupos de personas que pueden ser más susceptibles a contraer la infección como niños e inmunodeprimidos.

---

## ENFERMEDAD EN INMUNODEPRIMIDOS

---

A diferencia de lo que suele ocurrir en pacientes inmunocompetentes, refiriéndonos a que la enfermedad normalmente es auto limitada y sin mayores complicaciones, en aquellas personas que tienen problemas inmunológicos la patología se presenta de una

forma más severa no solo afectando al tracto gastrointestinal sino diseminándose a otras partes del organismo.

La inmunosupresión de este tipo de pacientes, normalmente VIH positivos, queda patente cuando presentan unos niveles de linfocitos CD4  $< 200$  cél/mm<sup>3</sup> (Cacciò, Widmer, 2014). En estos casos la enfermedad se desarrolla de forma más persistente, donde además de presentar los síntomas típicos anteriormente descritos de forma más duradera y agresiva, también puede implicar la aparición de nuevas patologías. La causa de todo ello viene dada por la auto infestación del paciente ya que, al presentar un número tan bajo de linfocitos, los ooquistes de pared más delgada que resultan del ciclo de vida del parásito pueden volver a actuar invadiendo los enterocitos del intestino, volviendo a empezar el ciclo.

Entre las afecciones que pueden aparecer en este tipo de pacientes podemos encontrar la diarrea característica de este parasitismo pero de una manera más intensa llegando a eliminar más de 10 litros de heces líquidas al día causando tener que llevar a cabo una rehidratación del paciente (Becerril, 2014), también puede aparecer sangre y moco en las heces, problemas nutricionales, dolor abdominal bastante intenso y pérdida de peso notoria (Cobo, 2006).

Por otro lado, también estos pacientes pueden presentar síntomas relacionados con afecciones en el tracto biliar como vómitos, ictericia y en algunos casos fiebre. En un estudio realizado en España a 43 pacientes VIH positivos, 8 de ellos presentaban colangitis esclerosante y colecistitis (López-Vélez y cols., 1995). También puede presentarse infección en los conductos pancreáticos lo que provoca pancreatitis (Becerril, 2014).

Por último, en algunos casos se han presentado problemas pulmonares en ciertos pacientes manifestando tos, ronquera, disnea y sibilancias entre otros. Esta posible afectación puede deberse al aspirado de los microorganismos, o por la presencia de otros agentes infectantes (Cobo, 2006). En el estudio anteriormente mencionado (López-Vélez y cols., 1995) en 7 de los 43 pacientes que presentaban también diarrea, se encontró *Cryptosporidium sp* en el análisis del esputo, aunque no todos ellos presentaban síntomas de afección respiratoria.



Es otro de los grupos más predispuestos a desarrollar la enfermedad de una forma más significativa. Está comprobado en numerosos estudios que los pacientes menores de 5 años tienen una mayor prevalencia en cuanto a la criptosporidiosis se refiere (Bennett y cols., 2014).

Los síntomas que presentan son los que se dan normalmente. La diarrea sigue siendo el principal aunque se han notado algunas diferencias dependiendo de la especie que provoca la infección, siendo *C. hominis* la que provoca diarrea acompañada de vómitos, malestar y una alta excreción de ooquistes por las heces, mientras que *C. parvum* solo provoca diarrea y por lo tanto una infección más leve (Gómez, 2010)(Cacciò, Widmer, 2014). No siempre tienen por que darse diferencias sintomáticas aparentes relacionadas con la especie que provocó la infección, en un estudio realizado en España a niños menores de 7 años que presentaban todos ellos diarrea y malestar, se tomaron 400 muestras resultando 62 de ellas positivas y dentro de esas *C. parvum* estaba en la mitad ellas (50%) y siendo más prevalente en niños que en niñas (Martín-Ampudia y cols., 2012).

Además de estos síntomas también se ha detectado una disminución del peso en niños. En un estudio a niños peruanos se muestra una pérdida de peso durante el primer mes después de la infección (Gómez, 2010)(Huang y cols., 2004), lo que nos lleva a pensar que puede provocar malnutrición en algunos casos, y sumado a todos los síntomas anteriormente descritos, hacen que la enfermedad pueda llegar a ser fatal.

También es común que se den casos en los que los niños presenten otro tipo de patologías como sarampión o rubeola (Becerril, 2014) y eso provoque un estado inmunológico deficiente y se produzca la auto infestación de *Cryptosporidium sp* agravando y alargando aun más la enfermedad y suponiendo un peligro grave para la salud del paciente.

---

## DIAGNÓSTICO

---

A cualquier paciente que presente los síntomas diarreicos y de malestar persistente durante un tiempo considerado, se le debería realizar un estudio específico para valorar la presencia del parásito ya que es una enfermedad emergente, cada vez aparece con más frecuencia y es peligrosa en determinados casos.

El diagnóstico de *Cryptosporidium sp* se puede realizar por diferentes métodos, entre los más usados se encuentran los descritos a continuación:

- **Método de tinción Ziehl-Neelsen modificado o Kinyoun**

Este método de tinción diferencial fue descubierto en 1981 (Henriksen, Pohlenz, 1981) y desde entonces es uno de los más utilizados, sobre todo en laboratorios clínicos donde se necesita un método rápido de diferenciación.

El estudio se realiza sobre muestras de heces conservadas. Se utiliza un colorante específico de Kinyoun y azul de metileno. Al realizar la tinción los ooquistes de *Cryptosporidium sp* deberán observarse al microscopio apareciendo de un color rosa intenso en contraste con el resto de la muestra, que aparece de color azul o violeta azulado. Este método aunque es barato y rápido, tiene varias desventajas como el hecho de ser bastante laborioso y de menor sensibilidad que otros métodos. (Omoruyi y cols., 2014) (Valenzuela y cols., 2014).

- **ELISA**

La detección del antígeno empleando anticuerpos monoclonales, presenta una mayor sensibilidad y mayor especificidad que el método en microscopio anteriormente explicado (Elgun, Koltas, 2011). Por otro lado, presenta una desventaja llamativa ya que a través de este método no podemos saber el estado en el que se encuentra la enfermedad, es decir, si está activa, pasiva o si es de una infección anterior (Omoruyi y cols., 2014).

- **PCR**

Este método de amplificación utiliza cebadores específicos para *Cryptosporidium sp*, lo que lo convierte en otro de los métodos más sensitivos y específicos (Rodríguez, Royo, 2001).

Se utiliza en muchos casos como método para detectar y diferenciar especies de *Cryptosporidium sp* una vez que ya se ha confirmado la presencia del parásito en una muestra pero no ha sido posible la identificación de la especie.

MÉTODO	SENSIBILIDAD*	VENTAJAS	DESVENTAJAS
		Fácil uso y económico	No específico
TINCIÓN Z-N	Baja	Podemos detectar si la infección está activa	No podemos identificar la especie con precisión
		Identificación de otro tipo de parásitos	
ELISA	Alta	Específica y rápida	No distinción entre infección activa o pasiva
PCR	Alta	Detección específica del parásito	Equipamiento caro y proceso largo
		Muy específica y rápida	No distinción entre infección activa o pasiva

\*Sensibilidad basada en varios estudios comparativos de diferentes técnicas de diagnóstico (Sunnotel y cols., 2006) (Omoruyi y cols., 2014).

TABLA 6. COMPARATIVA ENTRE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO(SUNNOTEL Y COLS., 2006)

## TRATAMIENTO

La enfermedad puede cursar de diferentes modos, como ya hemos explicado. Puede ser asintomática, aparecer solo síntomas de diarrea y malestar o puede ser más grave en ciertos casos concretos. Es por todo eso por lo que no siempre se requiere de un tratamiento, y que, cuando se requiere, difiere dependiendo del estado inmunológico en el que se encuentre el paciente. En algunos casos en inmunocompetentes, tanto adultos como niños, si la diarrea es algo más intensa pero no presenta ningún otro síntoma grave, bastaría solo con rehidratación y reposición de electrolitos.

Por el contrario, en el caso de pacientes con una sintomatología más grave o en inmunodeficientes, sí se requiere la administración de un tratamiento farmacológico (Becerril, 2014).

En este aspecto, hay una gran dificultad a la hora de encontrar fármacos eficaces frente a *Cryptosporidium sp* debido a que la vacuola parasitófora que lo engloba durante las primeras etapas de su ciclo de vida, lo protege frente a la acción de antibióticos y antiparasitarios (Gómez, 2010)(Becerril, 2014). Se han realizado estudios de diversas sustancias para comprobar su actividad contra el parásito, pero bien es cierto que no se ha comprobado una eficacia significativamente alta en ninguno de ellos.

La nitazoxanida es la sustancia más eficaz de todas las probadas. Se han realizado estudios en todo tipo de pacientes, en los primeros de ellos si se veía un efecto reductor en cuanto a la duración de la diarrea y la expulsión de ooquistes con respecto a los pacientes que se trataban con placebo (Abubakar y cols., 2008), incluso en algunos casos remitieron los síntomas en su totalidad. La acción de este fármaco consiste en la inhibición de la piruvato sintasa, la cual interviene en el metabolismo anaerobio. También se ha demostrado la actividad del fármaco disminuyendo el crecimiento de los trofozoítos y que, actuando en combinación con otras sustancias como la azitromicina, aumenta aún más su acción con respecto a cuando se usa de forma aislada (Fox, Saravolatz, 2005).

Por otro lado, en estudios más recientes en pacientes VIH positivos no se ha observado esa reducción sintomatológica, por lo que aún se necesita estudiar en mayor profundidad la efectividad del antiparasitario en este tipo de pacientes (Gómez, 2010).

La posología varía en relación a la edad del paciente (Tabla 7).

EDAD	DOSIS	DURACIÓN DEL TRATAMIENTO
12-47 meses	100mg/12h	3 días
4-11 años	200mg/12h	3 días
< 11 años	500mg/12h	3 días

TABLA 7. POSOLOGÍA TRATAMIENTO CON NITAZOXADINA, SEGÚN LA EDAD DEL PACIENTE(FOX, SARAVOLATZ, 2005)

Otra de las sustancias bajo estudio es la paromomicina, que ha demostrado su efectividad frente a las afecciones intestinales. Actúa sobre los ribosomas del parásito deteniendo la síntesis de proteínas. La dosis normal es de 500mg/6 horas durante 14 días, y en pacientes con afección más severa se utiliza en combinación con azitromicina (600 mg) durante 28 días (Rodríguez, Royo, 2001).

Cabe señalar que la paromomicina puede presentar incompatibilidad con otros fármacos por lo que tiene que ser un tratamiento cuidadoso y controlado (Rodríguez, 2013).

---

## PREVENCIÓN

---

Para establecer algunas opciones de prevención y control hay que tener en cuenta ciertos aspectos como la resistencia de los ooquistes en el medio y la baja concentración de ooquistes que se necesita para que la infección se lleve a cabo (Gómez, 2010).

Algunas de las medidas importantes a tener en cuenta (Cobo, 2006)(Becerril, 2014) (García y cols., 2004) :

- Al ser una enfermedad de transmisión fecal-oral hay que ser cuidadoso con la higiene personal, evitar la contaminación con heces tanto humanas como de animales que pueden ser portadores de la enfermedad.
- Hervir el agua durante al menos un minuto antes de consumir y almacenarla en recipientes limpios. Sobre todo si se va tomar cualquier vegetal o moluscos, hervirlo antes en agua.
- Especial cuidado en guarderías donde se puede producir contaminación por el pañal o en sitios donde se trabaje con animales, deben de llevar un riguroso control de la higiene.
- Educación social sobre la importancia de la enfermedad y de las posibles vías de transmisión. Es necesario potenciar la vigilancia de este patógeno impulsando tanto su declaración a través del Sistema de Información Microbiológica como su búsqueda en brotes de etiología desconocida compatibles con criptosporidiosis (García y cols., 2004).

- Utilizar filtros en los grifos caseros. Importante cambiarlos periódicamente.
- Beber agua embotellada que haya sido tratada anteriormente para eliminar los ooquistes.

El agua es uno de los medios de diseminación más importantes, por ello se han estudiado varias intervenciones para reducir la concentración de ooquistes y también distintos métodos de detección de los mismos (García y cols., 2004).

En España no hay una legislación que contemple este aspecto, no hay ninguna normativa establecida sobre los niveles de concentración tolerables para este parásito en agua para consumo humano. De hecho en el año 2010 se realizó un estudio en Galicia donde se analizaron diferentes muestras de agua en las cuales se detectó la presencia de *Cryptosporidium sp* (Castro-Hermida y cols., 2010).

Entre las posibles intervenciones que se pueden realizar se encuentra el tratamiento de agua con cloro (cloración), el más utilizado en España pero que se ha demostrado que no es eficaz frente a los ooquistes de *Cryptosporidium sp* (García y cols., 2004). Otras posibilidades que se han visto que reducen de manera moderada los casos de diarrea provocada por el consumo de agua contaminada, son los sistemas de filtración o la desinfección solar del agua (Clasen y cols., 2008). La filtración elimina las partículas suspendidas en el agua, esta se mezcla con coagulantes que favorezcan la sedimentación y faciliten la filtración de manera que se eliminen más partículas y protozoos. También es útil la ósmosis inversa para la eliminación de ooquistes (García y cols., 2004).

Por último, otro método que se puede usar es la desinfección solar del agua mediante la radiación UV. Es útil para el agua de bebida, es un método rápido y no deja residuos (García y cols., 2004).

## OBJETIVOS

---

- Estudio de la prevalencia de *Cryptosporidium sp* en niños menores de 5 años.
- Ejercicio en el laboratorio sobre el proceso de detección de *Cryptosporidium sp* en distintas muestras de heces.
- Estudio piloto sobre uno de los grupos de riesgo de este parasitismo, niños que acuden a guarderías.

El hecho de que sea una enfermedad emergente y que puede causar síntomas severos hace que sea importante llevar un seguimiento regular, sobre todo en zonas geográficas o sitios específicos donde puede haber un mayor número de casos.

Las guarderías suponen un foco de infección bastante importante ya que hay un gran número de niños y cuidadoras en constante contacto y al ser una enfermedad de transmisión fecal-oral hay que tener especial cuidado en este tipo de circunstancias donde la higiene va a tener un papel bastante importante.

## METODOLOGÍA

---

Al ser los niños uno de los grupos de riesgo de esta enfermedad, para llevar a cabo este estudio se realizó una recogida de muestras en diferentes guarderías de Sevilla, con previa autorización tanto de los progenitores como de las guarderías, obteniéndose en total 112 de ellas con una fecha de recogida que comprende desde Febrero hasta Mayo de 2015. Los únicos datos proporcionados para el análisis fueron los nombres de los sujetos a estudio, la edad, el género y la guardería a la que pertenecían. En ningún caso se especifica si el niño/a presenta algún tipo de síntoma o ha estado expuesto a algún factor fuera de lo normal.

El rango de edad de los niños fue desde 6 meses hasta 5 años de edad y ninguno de ellos presentó algún signo específico que hiciera indicar la presencia de *Cryptosporidium sp*.

Para la recogida de muestras se distribuyeron en las guarderías que participaron en el estudio el envase adecuado para la toma de muestras de heces de cada niño, con su correspondiente etiqueta para identificar a cada uno de ellos y especificar algunos datos relevantes para el análisis de datos posterior. En cada envase repartido se incluyeron unos mililitros de SAF (acetato de sodio, ácido acético y formol) para la correcta conservación de las muestras que después se almacenaron en el laboratorio a temperatura ambiente.

Dos de ellas quedaron descartadas del estudio ya que, aunque se especificaron los datos de los niños, las muestras de heces no fueron remitidas y otras dos muestras más se descartaron por la no obtención de la autorización por parte de la guardería, por lo que al final se obtuvieron los datos de 108 muestras.

Se utilizó el método de tinción de Kinyoun y se realizaron los análisis en baterías de nueve muestras, utilizando en cada una de las veces un control para comprobar que el proceso de la tinción había sido correcto y exitoso.

Para la realización de la tinción se tomó una gota de muestra extendiéndola sobre el portaobjetos y dejándola secar a temperatura ambiente. Posteriormente, una vez seca por completo, se llevó a cabo la tinción utilizando en primer lugar metanol durante 1 minuto para fijar la muestra. A continuación se utiliza el colorante de Kinyoun y se tiñe durante 5 minutos para después lavar la muestra con alcohol al 50% durante 3-5 segundos y lavar con agua abundante. El siguiente paso utilizado fue la adición del ácido sulfúrico que se deja actuar alrededor de dos minutos, para después contra colorear usando azul de metileno durante un minuto. Una vez pasado este tiempo se lava la muestra completamente con agua y se deja secar a temperatura ambiente.

Cuando el proceso de tinción estuvo finalizado se procedió a la observación de las muestras al microscopio, realizando un barrido en cada una de ellas con el objetivo de 10x, después con el de 40x y en algunas ocasiones utilizando también el de 100x para la confirmación de algunas de las muestras.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### RESULTADOS

De las 108 muestras remitidas al Departamento de Parasitología de la facultad y que fueron analizadas, 67 de ellas pertenecían a niños (62,04%) y 41 de ellas a niñas (37,96%), todos ellos por debajo de los 5 años.

En total se observó la presencia de *Cryptosporidium sp* en 22 de las muestras (20,37%) observadas al microscopio y resultaron negativas 86 de ellas (79,63%) encontrando diferencias dependiendo del género, ya que se observa una prevalencia mucho mayor en niños que en niñas (Tabla 8 y Tabla 9). Las muestras que resultaron positivas en niños fueron 19 (17,6%) y en niñas solo 3 (2,8%).

	NIÑOS	NIÑAS	TOTAL
NEGATIVO	48	38	86
POSITIVO	19	3	22
TOTAL	67	41	

TABLA 8. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE *CRYPTOSPORIDIUM SP* MEDIANTE TINCIÓN DE KINYOUN.

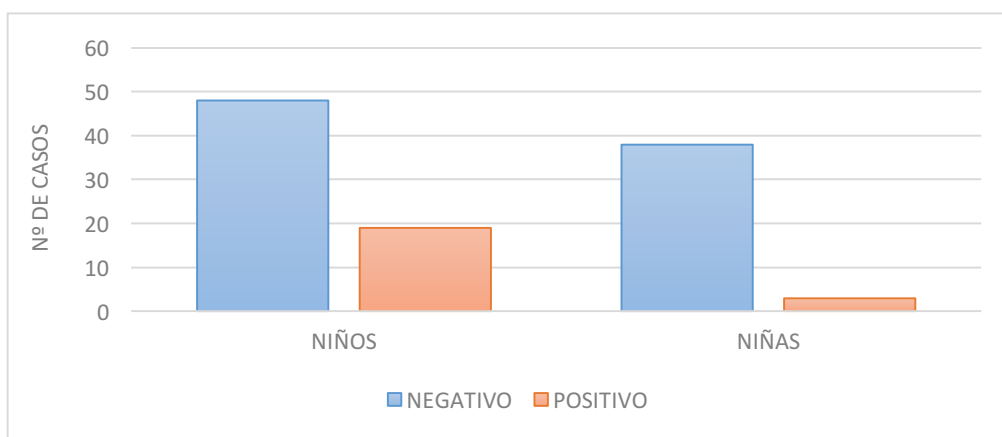


TABLA 9. GRÁFICA CORRESPONDIENTE A LOS DATOS RECOGIDOS EN LA TABLA 7.

Dentro de la cantidad de muestras que se analizaron y se observó la presencia del parásito, se estudió la prevalencia en los distintos grupos edad observándose un mayor número de muestras positivas en niños/as de 24-29 meses, en concreto 11 (50%) casos positivos.

En los demás grupos de edad los datos obtenidos fueron parecidos, en las muestras de niños/as menores de 17 meses se encontró *Cryptosporidium sp* en 6 de ellas (27,3%) y en el rango de 18-23 meses fueron 5 las positivas (22,7%).

En el rango de edad de 30-60 meses no se observó *Cryptosporidium sp* en ninguna de las muestras (Tabla 10).

EDAD(m)	NIÑOS	NIÑAS	TOTAL
0-17	4	2	6
18-23	5	0	5
24-29	10	1	11
30-60	0	0	0

TABLA 10. NÚMERO DE CASOS POSITIVOS EN LOS DIFERENTES RANGOS DE EDAD Y SEXO.

En todos los rangos donde se comparó el número de muestras observadas que fueron positivas, se observó una mayor prevalencia en niños que en niñas sobre todo en el rango de edad donde hay un mayor número de positivas ya que de las 11 que había en total, 10 de ellas pertenecían a niños suponiendo un 90,9% (Tabla 11).

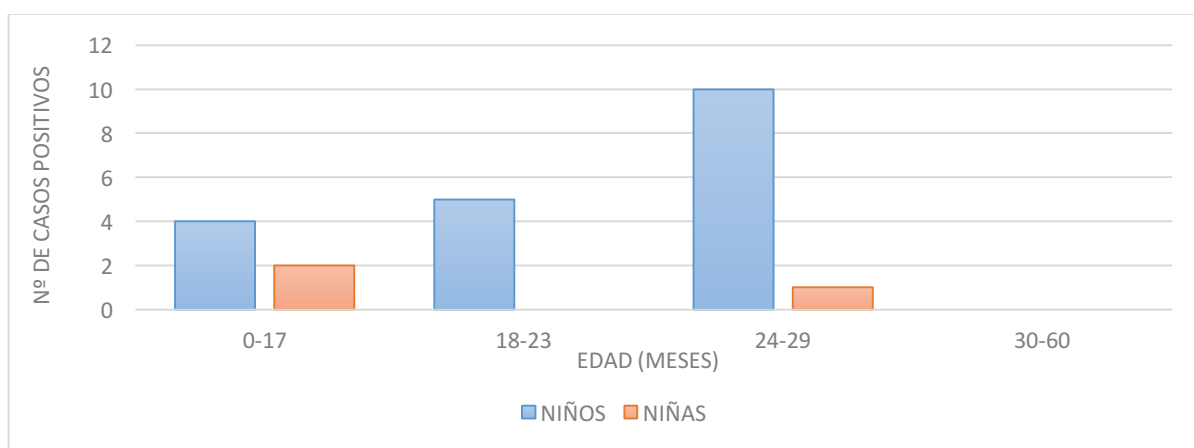


TABLA 11. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE *CRYPTOSPORIDIUM SP* EN DISTINTOS RANGOS DE EDAD Y SEXO.

En cuanto a los resultados obtenidos dependiendo de la guardería donde procedían las muestras, se observaron datos relevantes. Con respecto a la primera guardería, no se detectó *Cryptosporidium sp* en ninguna de las muestras. Por el contrario, en las cuatro guarderías restantes si resultaron positivas algunas de ellas (Ilustración 4).



ILUSTRACIÓN 4. COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS ENTRE LAS DISTINTAS GUARDERÍAS

Dentro de estos datos, también se obtuvieron diferencias entre niños y niñas, en este caso comparando de que guardería provenía cada muestra que se analizó y resultó positiva. Como ocurre con el rango de edad, en todas ellas se da una mayor prevalencia en niños. En la guardería 3 hay una gran diferencia entre géneros obteniéndose un valor de positivos en niños de 11 casos (91,7%) y 1 caso solo en niñas (8,3%). En el resto de guarderías bajo estudio, en la guardería 2 solo se dieron casos positivos en niños y ninguno en niñas, y en las guarderías 4 y 5 los resultados fueron algo más parejos entre niños y niñas (Tabla 12).

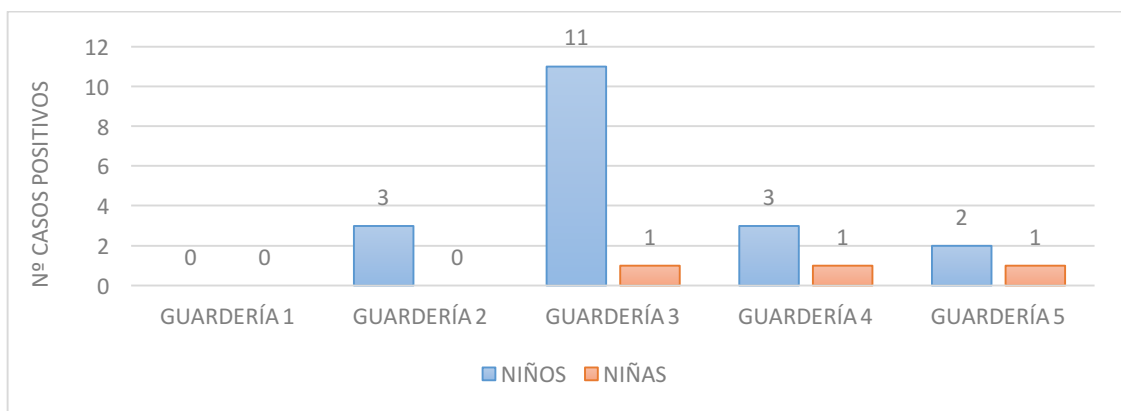


TABLA 12. RESULTADOS SEGÚN GUARDERÍA Y SEXO.

En todas las muestras que fueron positivas, se observaron ooquistes esporulados de *Cryptosporidium sp* que coincidían con el tamaño y la forma característica de este parásito y que aparecían teñidos, gracias a la tinción diferencial, de un rosa intenso que permitía su identificación. No en todas ellas se observó la misma concentración de ooquistes ya que en tres de ellas, pertenecientes a niños entre 18 y 23 meses, había una concentración bastante más elevada con respecto a las demás muestras observadas. Esto puede deberse a que quizás estos niños tenían una diarrea más intensa, ya que se ha demostrado que cuanto más intensa es la diarrea mayor concentración de ooquistes hay (García y cols., 2004).

---

## DISCUSIÓN

---

A raíz de los resultados obtenidos podemos observar como existe una mayor prevalencia en niños menores de 3 años, que se ha demostrado también en otros estudios (Martín-Ampudia y cols., 2012) (García-Rodríguez y cols., 1989) . En el análisis realizado, la prevalencia fue de 20,37%, algo mayor que la que se ha observado en otros estudios (Mateo y cols., 2014) (Navarro-i-Martinez y cols., 2011). Tanto si se comparan los datos obtenidos en las diferentes guarderías donde se obtuvieron las muestras como las diferentes edades de los niños/as bajo estudio, se observa que en niños existe una prevalencia de 86,4% con respecto a niñas que supuso un porcentaje de casos del 13,6%, datos que concuerdan con estudios europeos donde se estudió la prevalencia en individuos de todas las edades y se demostró una prevalencia mayor en niños menores de 4 años , aunque no demostró tanta diferencia entre un género y otro dentro de este rango de edad (ECDC, 2014).

En este estudio, las muestras fueron recogidas durante los meses de Febrero a Mayo con un número de casos positivos de 22 frente a las 108 muestras que fueron analizadas. Este número elevado de positivos, no coincide con otros estudios donde se ha demostrado que durante el otoño-invierno, el número de casos de criptosporidiosis es más elevado que durante la primavera-verano (Clavel y cols., 1996) (ECDC, 2014).

El hecho de que la mayor prevalencia de la enfermedad ocurra en un rango de edad comprendido entre los 24-29 meses, nos hace pensar que el brote pueda estar causado mediante una transmisión persona-persona, ya que si fuera por el consumo de agua contaminada, uno de los mayores causantes de la enfermedad (Dillingham y cols., 2002) (Red Nacional de Vigilancia epidemiológica, 2003) ya que está relacionado con la mayoría de casos de brotes que se han dado en España, no habría una diferencia tan elevada entre los diferentes grupos de edad estudiados.

La transmisión entonces puede ser debida a otro tipo de factores como por ejemplo, por el cambio de pañal en niños que ya se demostró que supuso la causa de un brote en una guardería de Zaragoza (Ortega y cols., 2006) o también por una falta de higiene en la guardería por descuidos de los cuidadores o presencia de portadores asintomáticos.

Cabe destacar también el hecho de que el número de casos positivos se haya dado de forma mayoritaria una de las guarderías, en concreto la número 3, con respecto a las demás. La zona geográfica de todas ellas fue la misma, no encontrándose diferencias que a priori puedan suponer un aumento del riesgo de transmisión, como por ejemplo, el que alguna de ellas se hubiese encontrado en una zona rural, lo cual explicaría la mayor prevalencia que se ha observado, ya que se ha demostrado que *C. parvum* se encuentra en una mayor proporción en zonas rurales donde el contacto con animales puede ser mayor (Llorente y cols., 2007).

Además de todo lo señalado, tampoco fue posible el estudio comparativo entre las dos especies que son responsables de la infección en seres humanos ya que, al realizar el estudio mediante el método de tinción de Ziehl-Neelsen modificado, no es posible la diferenciación entre *C. hominis* y *C. parvum* (Omoruyi y cols., 2014). A pesar de ello, nos basamos en otros estudios que demuestran la mayor prevalencia de *C. hominis* frente a *C. parvum* tanto en diferentes zonas geográficas como en estudios a niños inmunocompetentes que indican también el mayor número de casos provocados por *C. hominis* (Llorente y cols., 2007). Por otro lado, estos datos no necesariamente implican que en este estudio sea esta la especie mayoritaria, ya que para obtener un resultado válido se necesitaría llevar a cabo otro tipo de estudios que puedan diferenciar de forma clara la presencia de una especie u otra, como por ejemplo PCR.

## CONCLUSIONES

---

- Del estudio realizado se concluye que es un buen ejercicio para el desarrollo de un trabajo de laboratorio y para la correcta interpretación de los resultados de métodos de tinción.
- De los resultados obtenidos se puede deducir, de acuerdo con otros autores, que la criptosporidiosis es una parasitosis emergente en nuestro país.
- Independientemente de las limitaciones de este estudio, se podría concluir que la prevalencia detectada es considerablemente más alta que en otras regiones de España.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Abubakar I, Aliyu SH, Arumugam C, Hunter PR UN. Prevención y tratamiento de la criptosporidiosis para pacientes inmunocomprometidos. La Biblioteca Cochrane Plus. 2008 [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.biblioteca-cochrane.com/BCPGetDocument.asp?SessionID=10310629&DocumentID=CD004932>
2. Batista Díaz N, López de Lama MT, Muñoz Hernaz S, Fernández Vera JR, Merino García M, Duque Hernández J. Prevalencia de enteropatógenos en guarderías urbanas. Rev San Hig Púb. 1992;66(5-6):291-8.
3. Becerril Flores MA. Parasitología médica. 4ªed. México ; Madrid [etc.] : McGraw-Hill Interamericana; 2014.
4. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Principles and Practice of Infectious Diseases. 8ªed. Elsevier; 2014. 3173-3182 p.
5. Cacciò SM, Widmer G. *Cryptosporidium*: parasite and disease. Vienna: Springer Vienna; 2014.

6. Castro-Hermida JA, García-Presedo I, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* and Giardia detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Res.* 2010;44(20):5887–96.
7. Centers for disease control and prevention[en línea]. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
8. Clasen T, Roberts I, Rabie T, Schmidt W CS. Intervenciones para mejorar la calidad del agua en la prevención de la diarrea. *La Biblioteca Cochrane Plus.* 2008 [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.biblioteca-cochrane.com/BCPGetDocument.asp?SessionID=10310629&DocumentID=CD004794>
9. Clavel A, Olivares JL, Fleeta J, Castillo J, Varea M, Ramos FJ, et al. Seasonality of cryptosporidiosis in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Springer-Verlag; 1996 Jan;15(1):77–9.
10. Cobo Martínez F. *Medicina tropical y parasitología : Enfermedades infecciosas importadas.* Alcalá la Real : Formación Alcalá; 2006.
11. Elgun G, Koltas IS. Investigation of *Cryptosporidium* spp. antigen by ELISA method in stool specimens obtained from patients with diarrhea. *Parasitol Res.* 2011 Feb;108(2):395–7.
12. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - Health Communication Unit. Annual epidemiological report. Food-and waterborne diseases and zoonoses. *Eurosurveillance.* 2014;29–32.  
[Consultado en Marzo 2016] Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/food-waterborne-diseases-annual-epidemiological-report-2014.pdf>
13. Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2ªed. CRC Press; 2007.
14. Fox LM, Saravolatz LD. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1173–80.

15. Gállego Berenguer J. Manual de parasitología: Morfología y biología de los parásitos. Barcelona: Universidad de Barcelona, 2003. 173-175 p.
16. Galmes A, Nicolau A, Arbona G. Cryptosporidiosis outbreak in British tourists who stayed at a hotel in Mallorca, Spain. Eurosurveillance. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - Health Communication Unit; 2003;7(33).
17. García Tapia AM, Fernández Gutiérrez Del Álamo C, López García C, Martos García P, Marín Casanova P. Brotes epidémicos de Criptosporidiosis [en línea]. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2004 [Consultado Junio 2016]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Brotcripto.pdf>
18. García-Rodríguez JA, Martín Sánchez AM, Canut Blasco A, Cedeño Montaña J, De Pedro MIH. The incidence of cryptosporidiosis in children: A one-year prospective survey in a general hospital in Spain. Eur J Epidemiol. Kluwer Academic Publishers; 1989 Mar;5(1):70–3.
19. Gómez Marín JE. Protozoología médica: Protozoos parásitos en el contexto latinoamericano. Bogotá : Manual Moderno; 2010. 117-128 p.
20. Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. Tropical infectious diseases : Principles, pathogens & practice. Philadelphia : Churchill Livingstone. 2016. 88-1011 p.
21. Henriksen S, Pohlenz J. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl- Neelsen technique. Acta Vet Scand. 1981;22(3-4):594-6.
22. Huang DB, Chappell C, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis in children. Semin Pediatr Infect Dis. 2004 Oct;15(4):253–9.
23. Kehl KS, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. J Clin Microbiol. 1995 Mar;33(2):416–8.



24. Kothavade RJ. Challenges in understanding the immunopathogenesis of *Cryptosporidium* infections in humans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;30:1461-72.
25. Llorente MT, Clavel A, Goñi MP, Varea M, Seral C, Becerril R, et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol Int*. 2007;56(3):201–5.
26. López-Vélez R, Tarazona R, Camacho AG, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V, et al. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995 Aug;14(8):677–81.
27. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 1994 Jul 21;331(3):161–7.
28. Magi B, Canocchi V, Tordini G, Cellesi C, Barberi A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitol Res*. 2006 Jan;98(2):150–2.
29. Martín-Ampudia M, Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Mora L, Fernandez-Crehuet J. Under-notification of cryptosporidiosis by routine clinical and laboratory practices among non-hospitalised children with acute diarrhoea in Southern Spain. *Infection*. 2012 Apr;40(2):113–9.
30. Mateo M, Mateo M, Montoya A, Bailo B, Saugar JM, Aguilera M, et al. Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine (Baltimore)*. 2014 Oct;93(15).
31. Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 1976 Jun;70(6):1156–60.

32. Navarro-i-Martinez L, Del Águila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(2):135–43.
33. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 1976 Apr;70(4):592–8.
34. Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS, Okonkwo FO. Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. *Molecules*. 2014;19(2):2674–83.
35. Ortega MT, Vergara A, Guimbao J, Clavel A, Gavín P, Ruiz A. Brote de diarrea y transmisión de *Cryptosporidium* hominis asociados al uso de pañal en niños. *Med Clin (Barc)*. 2006;127(17):653–6.
36. Ortega-Pierres G, Caccio S, Fayer R. Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease. 2009. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <http://0-site.ebrary.com.fama.us.es/lib/unisev/detail.action?docID=10281497>
37. Pérez Cordon G. La confusa taxonomía de *Cryptosporidium*. *Rev. peru. biol*. 2006; 13(1): 143 - 144
38. Red Nacional de Vigilancia epidemiológica. Boletín epidemiológico semanal. 2003; 11(24): 277-284.
39. Red Nacional de Vigilancia epidemiológica. Boletín epidemiológico semanal. 2015; 23(5): 60–73.
40. Rodriguez JC, Royo G. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2001.
41. Rodríguez Pérez EG. Parasitología médica. 2013. 99-107 p. [en línea]. [Consultado Junio 2016]. Disponible en: <http://0-site.ebrary.com.fama.us.es/lib/unisev/detail.action?docID=10853474>

42. Rodríguez-Salinas Pérez E, Aragón Peña A, Allue Tango M, López Pérez A, Jiménez M, Domínguez Rodríguez MJ. Brote de criptosporidiosis en Guadarrama. Rev. Esp. Salud Pública. 2000; 74(5-6): 527-536.
43. Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JSG, Xiao L, Millar BC, et al. *Cryptosporidium*. Lett Appl Microbiol. 2006 Jul;43(1):7–16.
44. Valenzuela O, Gonzalez-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Children from Mexico. PLoS One. 2014 ;9(4).