



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y  
POTENCIAL ZONÓTICO DE AISLADOS DE  
*CRYPTOSPORIDIUM* EN RUMIANTES  
DOMÉSTICOS Y SU RELACIÓN CON LA  
EDAD**

**Esther Navarro González**

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

LUGO

2017





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Caracterización molecular y potencial zoonótico de aislados de *Cryptosporidium* en rumiantes domésticos y su relación con la edad

D./Dña. Esther Navarro González

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Lugo, 1 de diciembre de 2017*

Fdo. Esther Navarro González



## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Caracterización molecular y potencial zoonótico de aislados de  
*Cryptosporidium* en rumiantes domésticos y su relación con la edad

**D. Pablo Díaz Fernández**  
**Dña. Patrocinio Morrondo Pelayo**  
**D. Pablo Díez Baños**

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Esther Navarro González**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Lugo, 1 de diciembre de 2017*

Fdo. Pablo Díaz

Fdo. Patrocinio Morrondo

Fdo. Pablo Díez



## **FINANCIACIÓN:**

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

**Consejo Nacional de Becas de China (CSC). Convocatoria de Becas del Gobierno Chino 2016-2107. “Programa de Estancia de Investigación (Senior Scholar Program)”.** Convenio Bilateral del Ministerio de Educación de España con el Ministerio de Educación de la República Popular China (01/03/2017- 31/07/2017).

**Diarreas neonatales en rumiantes: nuevas estrategias basadas en avances moleculares y en el análisis integrado de enteropatógenos frecuentes y emergentes” (AGL2016-76034-P).** Ministerio de Economía y Competitividad. Investigador responsable: M<sup>a</sup> Patrocinio Morrondo Pelayo.

**Consolidación e Estructuración. Redes GI-1702 RUMIGAL. Rede de estudo multidisciplinar dos ruminantes en Galicia.** Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (2017-2019). Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

**Ayuda para Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas del Sistema Universitario de Galicia. Grupos de Referencia Competitiva (GR2015/003).** Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (2015-2018). Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

## **PUBLICACIONES:**

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

### *A.- Artículos de investigación:*

- DÍAZ, P.; SOILÁN, M.; NAVARRO, E.; PÉREZ, A.; CABANELAS, E.; PRIETO, A.; DÍAZ, J.M.; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS P. (2014). Criptosporidiosis en rumiantes. *Revista Técnica Ganadera: Ganadería*, **94**: 44-48.
- DÍAZ, P.; QUÍLEZ, J.; PRIETO, A.; NAVARRO, E.; PÉREZ-CREO, A.; FERNÁNDEZ, G.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.M.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO P. (2015). *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitology Research*, **114 (11)**: 4099-4105.
- CABANELAS, E., DÍAZ, P., NAVARRO, E., PÉREZ-CREO, A., PRIETO, A., DÍAZ-CAO, J. M., PANADERO, R., LÓPEZ, C., FERNÁNDEZ, G., DIEZ-BAÑOS, P., MORRONDO, P. (2015). Diarreas de etiología parasitaria en terneros. *Producción Animal*, **289**: 40-45.
- DÍAZ, P.; GÓMEZ-COUSO, H.; NAVARRO, E.; PÉREZ-CREO, A.; REMESAR, S.; PRIETO, A.; LÓPEZ, C.M.; PANADERO, R.; ARES-MAZAS, E.; MORRONDO P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2017). Detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en corzos abatidos en Galicia. *Boletín de la Asociación del Corzo Español*, **15**: 135-140.



B. Artículos de divulgación:

GARCÍA MENIÑO, I.; DÍAZ, P.; GÓMEZ, V.; **NAVARRO, E.**; PÉREZ, A.; CABANELAS, E.; PRIETO, A.; DÍAZ, J.M.; SOILÁN, M.; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORA, A. (2014). Diarreas neonatais en xatos: situación en Galicia. *Revista de la Asociación de Frisona Gallega (AFRIGA)*, **113**: 86-92.

CABANELAS, E., DÍAZ, P., PÉREZ-CREO, A., **NAVARRO, E.**, PRIETO, A., DÍAZ-CAO, J. M., LÓPEZ, C., PANADERO, R., FERNÁNDEZ, G., MORRONDO, P., DIEZ-BAÑOS, P. (2016). Estratexias de control das principais parasitoses do gando vacún. *Revista de la Asociación de Frisona Gallega (AFRIGA)*, **123**: 2-7.

C. Contribuciones a congresos:

MORRONDO PELAYO, P.; **NAVARRO, E.**; DÍAZ, P.; PRIETO, A.; PÉREZ, A.; LÓPEZ, C.M.; FERNÁNDEZ, G.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2014). Identification of species of *Cryptosporidium* in post-weaned calves and adult cattle from NW Spain. *Joint ISP BAVP EVPC Conference*. Dublin, Ireland. 12-13 June 2014.

DÍAZ, P.; **NAVARRO, E.**; PRIETO, A.; PÉREZ, A.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.M.; FERNÁNDEZ, G.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO P. (2015). Infections by *Cryptosporidium* spp. in post-weaned and adult small ruminants. *XXII International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants*. Sassari, Italy. 17-20 June 2015.

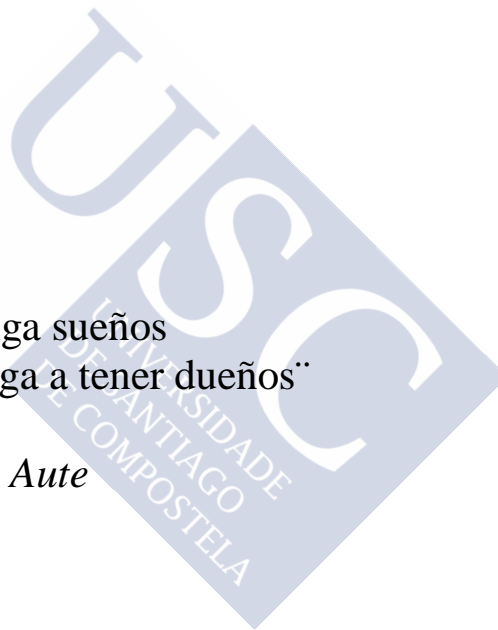
DÍAZ, P.; NAVARRO, E.; PRIETO, A.; PÉREZ-CREO, A.; CABANELAS, E.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.M.; FERNÁNDEZ, G.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO P. (2015). Infections by *Cryptosporidium* spp. in post-weaned and adult domestic ruminants. *25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Liverpool, UK. 16-20 August 2015.

DÍAZ, P.; NAVARRO, E.; PRIETO, A.; PÉREZ-CREO, A.; DÍAZ CAO, J.M.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.M.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2016). Infections by *Cryptosporidium* spp in pre-weaned healthy calves (N.W. Spain). *XXIX Congress SOIPA & European Veterinary Parasitology College*. Bari, Italy. 21-24 June 2016.

DÍAZ, P.; NAVARRO, E.; PRIETO, A.; PÉREZ-CREO, A.; DÍAZ CAO, J.M.; REMESAR, S.; PANADERO, R.; LÓPEZ, C.M.; FERNÁNDEZ, G.; MORRONDO P.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2017). ¿Constituyen los terneros lactantes sin diarrea un riesgo de aparición de brotes de diarrea neonatal por *Cryptosporidium* spp?. *XXII Congreso ANEMBE de Medicina Bovina*. Pamplona. 29-30 de Junio de 2017.

“Quien no tenga sueños  
que se disponga a tener dueños”

*Luis Eduardo Aute*





## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han participado en la realización de este trabajo, y de manera muy especial:

A mis directores, con los que sin ellos esto no sería hoy posible. En primer lugar, al Catedrático de la unidad de Parasitología y Enfermedades parasitarias, el Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por ofrecerme la oportunidad de realizar este gran sueño, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible. Gracias sobre todo por la oportunidad de poner a mi disposición todos los medios necesarios del laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias y tratarme siempre con un respeto inigualable. Gracias por todos estos años de aprendizaje.

En segundo lugar, a la Profa. Dra. M<sup>a</sup> Patrocinio Morrondo Pelayo, por acogerme como una más del nido desde el momento que nos conocimos, por su preocupación y dedicación en todo momento para la consecución de este proyecto conjunto.

Y, en tercer lugar, pero no por ello menos importante, al Prof. Dr. Pablo Díaz, que merece un gracias muy especial en esta Tesis. Gracias por tus horas de trabajo ayudándome y por tu dedicación; por siempre estar dispuesto a echar una mano a pesar de los malos días, por los buenos consejos recibidos, aunque a veces no se vean a primera vista, y sobre todo a tu apoyo incondicional. Gracias por hacer esto posible, porque sin tu ayuda mi sueño nunca se hubiese materializado.

Al Prof. Dr. Ceferino López por aportar sus ejemplares conocimientos estadísticos y de programación informáticos y por su inmejorable buen humor continuo, y a la Profa. Dra. Rosario Panadero por sus amplios conocimientos en Parasitología.

A los Prof. Drs. Rita Sánchez-Andrade, Adolfo Paz Silva y María Sol Arias por su ayuda, por su visión diferente de la ciencia, su compañerismo y humanismo.

A la profesora Dr. Fei Liu, por acogerme en su laboratorio de la Universidad de Nanjing como una más, poner a mi disposición todos

los recursos necesarios del laboratorio y enseñarme todos los entresijos y metodología de la apasionante técnica de la transferencia de energía de resonancia de Förster (smFRET). 感谢中国南京农业大学的刘斐教授在我交换学习期间给予的帮助。感谢他为我提供了开展研究所需要的各种资源，和在smFRET技术方面给予的耐心指导。

Al profesor Longxian Zhang, por acogerme en mi aventura China, abrirme las puertas de su laboratorio en Zhengzhou acogéndome con una amabilidad increíble, y poner a mi disposición tanto sus recursos del Departamento como todos sus estudiantes para que me sintiese como en casa. 感谢中国郑州的张龙现教授，他热情地为我敞开实验室的大门，让我有机会接触到他的学术资源并与他的学生朝夕相处，从而在他们持续开展的研究调查中有所收获。

A Fabián, por todos esos cafés compartidos llenos de historias. Gracias por aportar un rayito de luz en mis días oscuros con tu sonrisa.

A mi trouxiña preferida, Camila, esa brasileira que entró despacito, pero se quedó con fuerza a pesar de la distancia. Un ejemplo de superación a seguir, que sigue luchando por abrirse camino en su vocación.

A los compañeros que me acompañaron durante estos 5 años en algún momento, Rosalía, Iago, Cristiana, José Ángel Malagón y Silvia porque cada uno de vosotros me aportó lo mejor y por eso cada uno de vosotros ha sido especial.

A mis tres grandes tesoros en el departamento: Eva, Ana y Pablo Béjar. Qué decir de Eva, ser especial y único. A ella tengo que darle las gracias por acogerme en su casa cuando empecé esta aventura llamada Tesis. Gracias por todo, sobran las palabras para expresar la admiración que siento por ti. Ana, gallega de alma, gracias por tu enseñanza con el gallego a lo largo de estos años. Gracias por ayudarme con tus conocimientos veterinarios cuando me encontraba perdida y sobre todo gracias por estar siempre ahí. Y Pablo Béjar, por aportar esa parte masculina en medio de tanta mujer y por tus amplios conocimientos en cabras.

A mis otros compañeros escaleras arriba, a Alberto Prieto y José, siempre dispuestos a ayudar en cualquier momento, independientemente de todas sus obligaciones.

A Miguel veterinario de la ADS de ACIVO por tráeme esos "regalitos" que hicieron posible este estudio.

A Andrea, asturiana de pasaporte y gallega de corazón, mi compañera durante 4 años, esa que me vio sufrir y llorar, reír y trabajar durante todo este tiempo. Agradecida de compartir todos estos años contigo. Gracias por frases como "deja el ordenador que te vas a quedar tola y cena". Espero que compartamos muchas más a pesar de la distancia.

A Luana, mi avanzada, y a Pino, sin vosotras mi experiencia de China habría sido imposible, porque sin vosotras aprender chino no habría sido tan divertido y gratificante.

A los caídos, a todos esos compañeros que, por diversos motivos han tenido que abandonar este camino que tanto les apasionaba. Esta tesis va por todos vosotros.

A los de Nanjing, por hacerme ver que la cultura china a pesar de ser una gran desconocida en Europa, tiene mucho de lo que debemos aprender. Gracias a todos aquellos amigos que me ayudaron y me enseñaron a ver a China y a su gente con uno prisma distinto. Gracias en especial a Gloria por su ayuda incondicional tanto en China como por su ayuda en la traducción a chino en esta tesis. 感谢我在南京的所有同事和朋友们与我分享自己对中国文化的认知，他们让我从一个不同的角度欣赏中国。最后，还要特别感谢Gloria，她为我在中国的生活和将此论文的致谢翻译为中文的过程中提供了无私的帮助。

A Mónica, sin ti esta última parte de la tesis no habría sido posible. Gracias por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de demostrar que a pesar de mi formación podía desempeñar el trabajo que me ofrecías. Gracias porque además de encargada sabes que te tengo un cariño especial como persona.

A Samuel, mi consorcio morenito, gracias por estar en esos momentos donde te he necesitado. Un sabio cubano me dijo una vez "lo que se sabe no se pregunta", así que contigo sobran las palabras.

A mis padres, por enseñarme a perseguir y luchar por mis sueños. A ellos les debo todo, desde el más mínimo logro al más grande, como es esta tesis. Gracias por vuestro esfuerzo por hacerme llegar a donde siempre había querido, gracias por impulsarme a superarme día a día,

y por hacerme sentir que, si amaba algo, sería capaz de lograrlo con perseverancia y esfuerzo.

A André, a mi alma compañera, a esa persona que tiene un doctorado en quererme y en apoyarme en las decisiones que tomo. Sabes que sin tu ayuda todo esto nunca hubiese sido posible. Gracias por ser el gran hombre que camina a mi lado.





# Índice

<b>1 ANTECEDENTES DEL TEMA.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. BIOLOGÍA DE <i>Cryptosporidium</i> .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Taxonomía .....	3
1.1.2. Ciclo biológico.....	7
1.1.3. Fuentes de contagio y formas de transmisión .....	10
<b>1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGENIA DE <i>Cryptosporidium</i> EN RUMIANTES DOMÉSTICOS.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>Cryptosporidium</i> .....</b>	<b>18</b>
1.3.1. Técnicas microscópicas .....	18
1.3.2. Técnicas inmunológicas.....	24
1.3.3. Técnicas moleculares.....	27
1.3.3.1. Análisis genotípico.....	28
1.3.3.2. Análisis subtípico.....	30
<b>1.4. INFECCIONES POR <i>Cryptosporidium</i> EN RUMIANTES DOMÉSTICOS .....</b>	<b>32</b>
1.4.1. En ganado vacuno .....	32
1.4.1.1. Especies descritas. ....	34
1.4.1.2. Relación entre la edad de los animales y las especies identificadas .....	39
1.4.1.3. Subtipos de <i>C. parvum</i> en ganado vacuno.....	46
1.4.2. En ganado ovino.....	54
1.4.2.1. Especies descritas .....	55
1.4.2.2. Relación entre la edad de los animales y las especies identificadas .....	61
1.4.3. En ganado caprino .....	64
1.4.3.1. Especies descritas .....	65
1.4.3.2. Relación entre la edad de los animales y las especies identificadas .....	68
1.4.4. Subtipos de <i>C. parvum</i> y <i>C. ubiquitum</i> en pequeños rumiantes .....	70
<b>1.5. REPERCUSIONES ZOONÓICAS EN HUMANOS.....</b>	<b>74</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>81</b>

<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ZONA Y DE LOS ANIMALES .....</b>	<b>87</b>
<b>3.2. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS .....</b>	<b>90</b>
3.2.1. Concentración de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> y extracción de ADN.....	91
3.2.2. Análisis genotípico.....	92
3.2.3. Análisis subtípico.....	93
<b>3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>96</b>
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>4.1. EN GANADO VACUNO.....</b>	<b>99</b>
4.1.1. Prevalencia de infección.....	99
4.1.2. Análisis genotípico: especies de <i>Cryptosporidium</i> .....	105
4.1.3. Relación entre las especies de <i>Cryptosporidium</i> y la edad de los animales .....	116
4.1.4. Análisis subtípico.....	122
<b>4.2. En ganado ovino y caprino .....</b>	<b>126</b>
4.2.1. Prevalencia de infección.....	126
4.2.2. Análisis genotípico: especies de <i>Cryptosporidium</i> .....	132
4.2.3. Especies de <i>Cryptosporidium</i> al considerar la edad de los animales .....	142
4.2.4. Análisis subtípico.....	147
<b>5 CONCLUSIONS/CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>6 SUMMARY/RESUMEN .....</b>	<b>169</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>

# ANTECEDENTES





## 1. Antecedentes del tema

*Cryptosporidium* spp. es una causa frecuente de procesos diarreicos en personas y animales de todo el mundo y, especialmente, en individuos jóvenes o inmunocomprometidos, para los cuales todavía no se dispone de un tratamiento farmacológico eficaz (Bouزيد *et al.*, 2013). Además, este protozoo parásito también puede afectar a individuos aparentemente sanos (Bouزيد *et al.*, 2013; García Meniño, 2013; Valderrey, 2017).

### 1.1. BIOLOGÍA DE *Cryptosporidium*

#### 1.1.1. Taxonomía

Una de las áreas de investigación más confusas y que más cambios ha experimentado en los últimos años es la caracterización taxonómica de las especies de *Cryptosporidium*. Desde el punto de vista clásico, *Cryptosporidium* spp. se sitúa dentro del Phylum Apicomplexa, que también incluye a otros patógenos de importancia médica y veterinaria, como *Eimeria* o *Isospora*. El género *Cryptosporidium* se incluye en la Clase Sporozoasida, Subclase Coccidiasina, Orden Eucoccidiorida, Suborden Eimeriorina, Familia Cryptosporidiidae, que únicamente contiene este género (Sréter y Varga, 2000). Todas las especies conocidas de *Cryptosporidium* son monoxenas y poseen características propias que las diferencian de otros coccidios: (i) ooquistes sin esporocistos y con cuatro esporozoítos; (ii) formación de ooquistes de pared fina que permiten la autoinfección y (iii) presencia de una vacuola parasitófora en la célula hospedadora de localización intracelular, pero extracitoplasmática (Ward y Wang, 2001). Sin embargo, y debido a las similitudes microscópicas, moleculares, genómicas y bioquímicas existentes entre *Cryptosporidium* y las gregarinas, algunos investigadores sugirieron que las especies de este protozoo podrían representar un “eslabón

perdido” entre estas últimas, que son más primitivas, y los coccidios. En este sentido, Cavalier-Smith (2014), tras revisar detenidamente la taxonomía de las gregarinas, concluyó que algunas eugregarinas y todas las neogregarinas están estrechamente relacionadas con *Cryptosporidium*, incluyéndolas en una nueva subclase, la Orthogregarinia; además, propuso incluir el género *Cryptosporidium* dentro de la subclase Cryptogregarina, que agrupa a parásitos epicelulares de vertebrados que poseen un orgánulo alimentador similar al de las gregarinas, pero que carece de apicoplasto. Recientemente, Ryan *et al.* (2016b) confirmaron definitivamente que *Cryptosporidium* es una gregarina.

El género *Cryptosporidium* incluye a varias especies que infectan a numerosos vertebrados, incluyendo mamíferos, aves, peces y reptiles. La criptosporidiosis humana es una infección relativamente común, con tasas de seroprevalencia que oscilan entre el 20-35% en Reino Unido (Millar *et al.*, 2002) y EE.UU. (Chappell y Okhuysen, 2002). La criptosporidiosis se consideró una enfermedad antroponóptica durante algún tiempo, que implicaba principalmente a humanos y rumiantes, con *C. parvum* y *C. hominis* como los únicos responsables de la infección. A pesar de que estas especies causan el 90% de los casos (Cacciò, 2005), también se han descrito infecciones por *C. felis*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus* o el genotipo mono de *Cryptosporidium* (Xiao, 2010). *C. meleagridis* se considera un parásito emergente y se ha descrito tanto en individuos inmunocompetentes como inmunosuprimidos (Cacciò, 2005; Chalmers *et al.*, 2009b). Debido a que la intensidad de las manifestaciones clínicas, la patogenicidad, el grado de excreción de ooquistes, la implicación en brotes hídricos y la incidencia varía entre las distintas especies del protozoo (Xiao y Feng, 2008), es importante una correcta identificación de estas especies para conocer el riesgo que implica para la salud pública, así como la dinámica de transmisión de las especies de *Cryptosporidium* presentes en animales (que pueden actuar como reservorio) y en el medio ambiente.

De modo similar a otros protozoos, la clasificación de las especies de *Cryptosporidium* resulta complicada ya que sus ooquistes son

indistinguibles desde el punto de vista morfológico (Plutzer y Karanis, 2009; Xiao, 2010; Chalmers y Katzer, 2013). Con objeto de mejorar la identificación específica se han desarrollado varias técnicas de biología molecular, y sus resultados se han complementado con la información obtenida mediante estudios morfológicos, histopatológicos y/o de transmisión cruzada –que permiten conocer la especificidad de hospedador. El empleo conjunto de estos métodos, han permitido avanzar y estandarizar la taxonomía de este género, contribuyendo a la validación de diversas especies (Cama, 2006; Xiao, 2010). Sin embargo, todavía existen numerosos genotipos que no se han podido establecer como especies pues, a pesar de diferir de otras por su morfología y composición genética, no se dispone de los datos precisos sobre sus características biológicas (Xiao *et al.*, 2002a). En este sentido, se ha sugerido que el número de genotipos puede triplicar el número de especies. En la Tabla 1.1., se indican las 32 especies consideradas válidas hasta la fecha, habiéndose reconocido aproximadamente unos 70 genotipos (Xiao, 2010). Esta taxonomía, en ocasiones basada en aspectos no bien conocidos, ha supuesto uno de los mayores obstáculos para comprender adecuadamente la epidemiología de las infecciones por *Cryptosporidium* en personas y animales (Cacciò, 2005; Sulaiman *et al.*, 2000). Por ello, el mayor conocimiento de sus relaciones filogenéticas ha permitido avanzar en cuestiones importantes como son el potencial zoonótico de cada especie, su distribución y transmisión entre los animales domésticos, silvestres y el hombre. Además, su inclusión dentro de las gregarinas permitió demostrar su capacidad de desarrollo extracelular y, con ello, su importancia como patógeno ambiental (Jex *et al.*, 2008b; Beck *et al.*, 2009; Thompson y Ash, 2016).

A pesar de todos los avances efectuados, todavía se necesitan nuevos estudios que permitan dar mayor solidez a la taxonomía de *Cryptosporidium*, lo que sin duda implicará una mejor comprensión de su estructura poblacional y de su papel en la Salud Pública (Tibayrenc y Ayala, 2014; Šlapeta, 2009).

Tabla 1.1. Especies de *Cryptosporidium* aceptadas actualmente como válidas y su hospedador tipo

Especies	Hospedador/es principal/es	Referencia
<i>C. andersoni</i>	Bovino	Lindsay <i>et al.</i> , 2000
<i>C. avium</i>	Pájaros	Holobová <i>et al.</i> , 2016
<i>C. baileyi</i>	Gallina	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>C. bovis</i>	Bovino	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>C. canis</i>	Perro	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. cuniculus</i>	Conejo, Humano	Robinson <i>et al.</i> , 2010
<i>C. erinacei</i>	Erizos	Kvác <i>et al.</i> , 2014
<i>C. fayeri</i>	Canguro rojo, otros marsupiales	Ryan <i>et al.</i> , 2008
<i>C. felis</i>	Gatos	Iseki <i>et al.</i> , 1979
<i>C. fragile</i>	Anfibios	Jirku <i>et al.</i> , 2008
<i>C. galli</i>	Aves	Ryan <i>et al.</i> , 2003
<i>C. hominis</i>	hombre	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>C. huwi</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	Ryan <i>et al.</i> , 2015
<i>C. macropodum</i>	Canguro gigante y gris	Power y Ryan, 2008
<i>C. meleagridis</i>	Pavo, hombre	Slavin, 1955
<i>C. molnari</i>	Dorada, Lubina	Alvarez-Pellitero y Sitja-Bobadilla, 2002
<i>C. muris</i>	Ratón	Tyzzler, 1907
<i>C. parvum</i>	Mamíferos	Tyzzler, 1912
<i>C. proliferans</i>	Rata topo de África Oriental	Kvác <i>et al.</i> , 2016
<i>C. ryanae</i>	Bovino	Fayer <i>et al.</i> , 2008
<i>C. rubeyi</i>	Marmotas	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>C. saurophilum</i>	Lagarto	Koudela y Moudri, 1998
<i>C. scophthalmi</i>	Peces	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004
<i>C. scrofarum</i>	Cerdo	Kvác <i>et al.</i> , 2013
<i>C. serpentis</i>	Serpientes	Levine, 1980
<i>C. suis</i>	Cerdo	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>C. tyzzeri</i>	Ratón	Ren <i>et al.</i> , 2012
<i>C. ubiquitousum</i>	Mamíferos	Fayer <i>et al.</i> , 2010
<i>C. viatorum</i>	Hombre	Elwin <i>et al.</i> , 2012b
<i>C. varanii</i>	<i>Varanus prasinus</i>	Pavlašek <i>et al.</i> , 1995
<i>C. wrairi</i>	Cobaya, conejo de indias	Vetterling <i>et al.</i> , 1971
<i>C. xiaoi</i>	Ovino	Fayer y Santín, 2009



### 1.1.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp., así como los diferentes estadios de desarrollo, es semejante al de otros coccidios pertenecientes al suborden Eimeriorina. Es de tipo monoxeno, y todas las fases de multiplicación, tanto sexuales como asexuales, tienen lugar en el mismo hospedador (Smith y Rose, 1998).

El ciclo se inicia con la eliminación de ooquistes esporulados con las heces o secreciones respiratorias del hospedador infectado; éste es el único estadio que se puede encontrar en la fase exógena (Fig. 1.1). Los ooquistes presentan una fuerte pared que permite mantener la viabilidad de los 4 esporozoítos internos en condiciones adversas, constituyendo la fuente para nuevas infecciones. Un hospedador receptivo se infecta fundamentalmente mediante la ingestión de ooquistes presentes en el agua, alimentos o en fómites, aunque también se han descrito infecciones por inhalación de los mismos. A continuación, comienza la fase endógena donde, tras la exposición a enzimas pancreáticas y/o sales biliares del intestino delgado, se liberan los 4 esporozoítos. En condiciones experimentales se ha comprobado que los ooquistes pueden enquistarse en soluciones acuosas templadas como las que se pueden encontrar en la conjuntiva del ojo, tracto respiratorio, nódulos linfáticos, testículos, ovarios y vagina (Fayer *et al.*, 1990; Fleta *et al.*, 1995). Tras la liberación de los cuatro esporozoítos, se produce la adhesión de éstos a la superficie de las células epiteliales del tracto gastrointestinal, aunque algunas especies pueden hallarse en el tracto respiratorio. Esta adhesión de los esporozoítos a la superficie permite que penetren, invadiendo la célula hospedadora y formando dentro de ella una vacuola parasitófora, pero que será extracitoplasmática. Se produce así una diferenciación de los esporozoítos en trofozoítos uninucleados, en un proceso conocido como merogonia o esquizogonia, que se caracteriza por varias divisiones nucleares asexuales que lo convierten en un *meronte tipo I inmaduro* (célula con 6 u 8 merozoítos). Este, después de madurar, da lugar a ocho merozoítos de primera generación (Current, 1999; Sréter y Varga, 2000; Smith *et al.*, 2007; Fayer, 2008; Xiao, 2010). Cada uno de estos merozoítos, después de su liberación al lumen intestinal, invade otra célula epitelial y en ella puede seguir dos caminos: (i)

reiniciar otro ciclo de divisiones nucleares asexuales y convertirse en un meronte tipo I inmaduro que después de madurar, da lugar a otros merozoítos de primera generación, o (ii) realizar dos divisiones nucleares asexuales y convertirse en un *meronte tipo II inmaduro* que, tras su maduración, formará merozoítos de segunda generación.

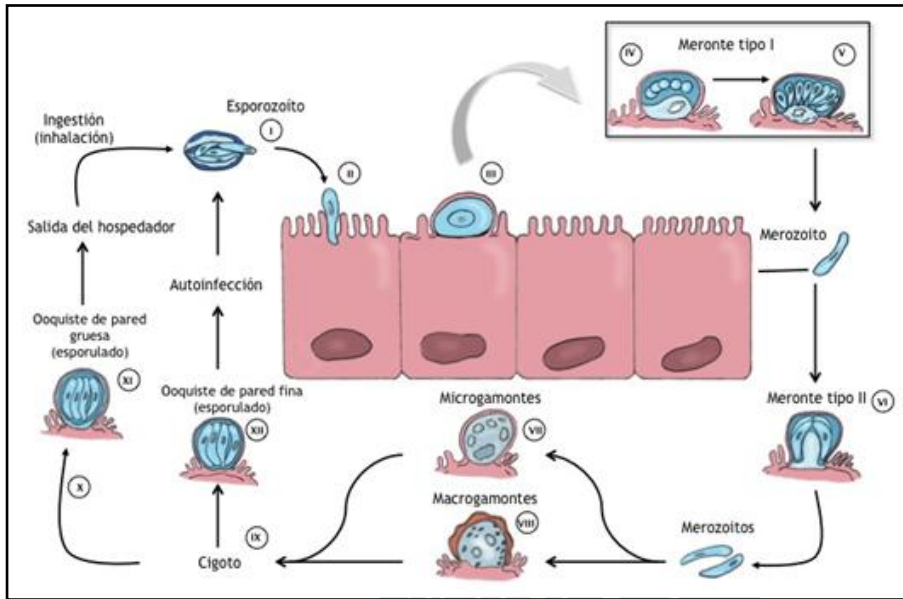


Fig. 1.1. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. (modificado de Bouzid *et al.*, 2013)

Los merozoítos de segunda generación, después de su liberación en el lumen intestinal, invaden otras células epiteliales y en ellas inician la fase sexual del ciclo (gamogonia). El primer paso será la conversión en *macrogametocitos* (estadio femenino) y en *microgametocitos* (estadio masculino). Los primeros, después de importantes cambios, como el desarrollo de cuerpos formadores de pared y la acumulación de nutrientes de reserva, se transforman en *macrogametos*. Los microgametocitos, tras sucesivas divisiones celulares, originarán *microgametos* (entre 14 y 16) que, tras fertilizar a los macrogametos, se convertirán en cigotos (Smith *et al.*, 2007).

La formación de una pared alrededor del cigoto conforma finalmente el ooquiste. Ésta cubierta es el resultado de la unión de los cuerpos formadores de pared que ya están presentes en el macrogameto antes de ser fertilizado. La fertilización puede dar lugar a dos tipos de ooquistes, y ambos esporulan dentro del hospedador (esporogonia), formándose en su interior cuatro esporozoítos. Un elevado porcentaje de ooquistes (aproximadamente el 80%) forman una pared gruesa y resistente, de dos capas, y salen al medio con las heces, siendo altamente resistentes a las condiciones ambientales y a partir de los cuales se puede diseminar la infección (Current, 1999; Sréter y Varga, 2000; Xiao *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007; Xiao y Fayer, 2008). Considerando que la esporulación de los ooquistes se produce en el hospedador, cuando éstos se liberan con las heces ya son infectantes, lo que facilita su capacidad para infectar a nuevos hospedadores. Este hecho los diferencia sustancialmente de los ooquistes de otros coccidios, como por ejemplo *Eimeria*, *Isospora* y *Toxoplasma*, cuyos ooquistes esporulan en el medio exterior, con condiciones diferentes de oxígeno y temperatura, de modo que recién eliminados al ambiente, todavía no son infectantes (Dubey *et al.*, 1990). Por el contrario, otro grupo de ooquistes desarrollan una pared fina, de una sola capa, que suele fragmentarse tan pronto los ooquistes salen de los enterocitos, quedando libres los cuatro esporozoítos, que invadirán nuevas células epiteliales e iniciarán un nuevo ciclo (Current, 1985; Current y Reese, 1986; Current *et al.*, 1988). Lo expuesto anteriormente demuestra la presencia de ciclos de autoinfección, a través de dos vías: (i) por la intervención de merontes tipo I y (ii) mediante ooquistes de pared fina. Estos ciclos explicarían, por un lado, el desarrollo de infecciones intensas en hospedadores expuestos a un pequeño número de ooquistes de pared gruesa y, por otro lado, las infecciones graves y persistentes que afectan a pacientes inmunodeprimidos, aunque no se reinfecten de forma repetida con ooquistes de pared gruesa.

El potencial de infección de las especies de *Cryptosporidium* está relacionado con características como (i) la elevada excreción de ooquistes por los hospedadores infectados, que causa una gran contaminación ambiental; (ii) el tamaño reducido y la baja velocidad

de sedimentación de los ooquistes en el agua, y (iii) por ser ya plenamente infectantes al ser eliminados (Dillinghama *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004). En el caso de *C. parvum*, además de estas características, se deben tener en cuenta (i) la baja dosis necesaria para comenzar la infección (menos de 10 ooquistes para algunas cepas) y (ii) la reducida especificidad por hospedadores mamíferos.

El ciclo interno del parásito puede completarse en sólo 2 días en la mayoría de los hospedadores, y las infecciones pueden ser de corta duración o por el contrario persistir durante varios meses (O'Donoghue, 1995). En estudios experimentales se determinó que el periodo de prepatencia puede variar entre 2-14 días en la mayoría de especies de animales domésticos. Para *C. parvum* oscila entre 4 y 22 días en el hombre (DuPont *et al.*, 1995), 2-7 días en terneros (Tzipori *et al.*, 1983; Fayer *et al.*, 1998) y 10-12 días para *C. bovis* en ganado vacuno (Fayer *et al.*, 2005). En este periodo son muchos los factores que pueden influir en la duración de las infecciones, destacando la inmunocompetencia del hospedador, la especie de *Cryptosporidium* presente y su dosis infectante (Egyed *et al.*, 2003). Por otro lado, el periodo de patencia difiere mucho para las diferentes especies de hospedadores, pudiendo variar desde unos días a varios meses (Tzipori *et al.*, 1981, 1983; Blagburn y Current, 1983; Augustin-Bichl *et al.*, 1984). En *C. parvum* oscila entre 1-12 días en terneros, 1-20 días en los humanos y 18 días para *C. bovis* en ganado vacuno (Fayer *et al.*, 1998).

### **1.1.3. Fuentes de contagio y formas de transmisión**

Se han descrito diversas vías por las que los ooquistes se pueden transmitir desde un hospedador infectado hasta otro receptivo (Figura 1.2.), destacando la vía fecal-oral, considerada el principal mecanismo de transmisión de *Cryptosporidium* spp., que se produce tras la ingestión de ooquistes infectantes eliminados con las heces. Esta posibilidad de transmisión incluye el contacto directo entre hospedadores (animal-animal, animal-persona, persona-persona) y el indirecto a través de aguas destinadas al consumo, recreacionales y/o superficiales, así como mediante alimentos contaminados (Leav *et al.*, 2003; Cacciò, 2005; Nichols, 2007). Otras formas de transmisión,

como la aérea (Martínez-Girón *et al.*, 2008; Chalmers y Davies, 2009a; Shirley *et al.*, 2012) o el transporte mecánico de ooquistes infectantes por moscas y otros insectos, se han demostrado experimentalmente (Graczyk *et al.*, 2000).

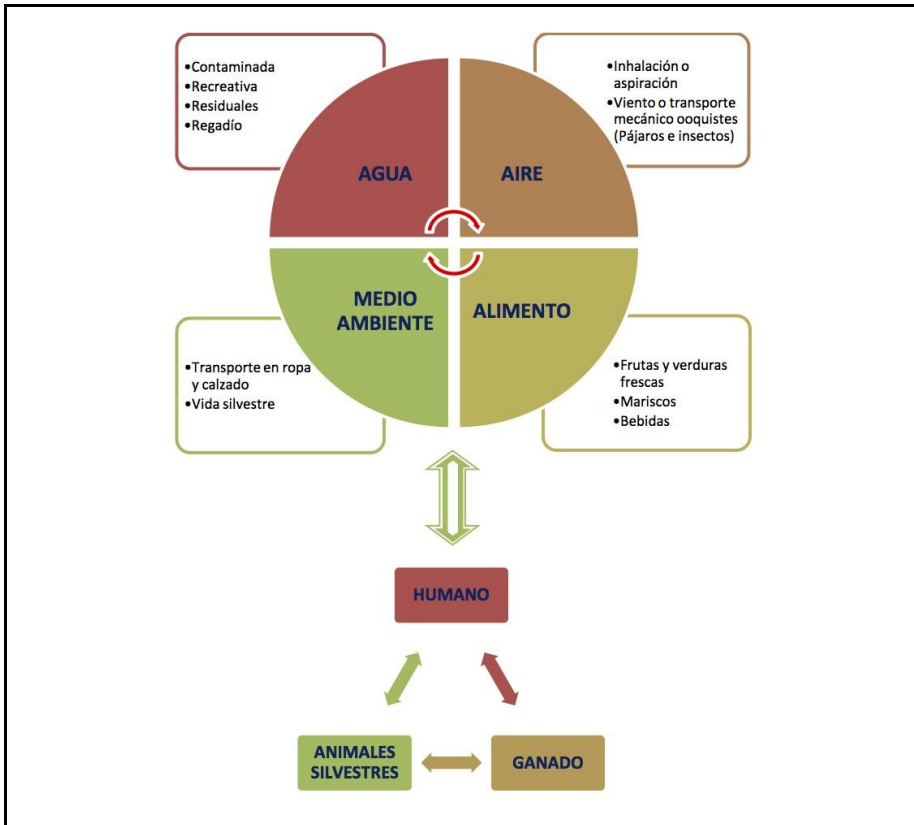


Fig. 1.2. Principales formas de transmisión de *Cryptosporidium* spp.

El análisis de múltiples datos epidemiológicos ha permitido demostrar una estrecha relación entre la aparición de casos en personas y el contacto con animales parasitados (Fayer *et al.*, 2000; Stantic-Pavlinic *et al.*, 2003; Gormley *et al.*, 2011). Así, la cría de animales, sobre todo la de rumiantes domésticos como el ganado bovino (Huetink *et al.*, 2001), se ha relacionado con la aparición de brotes de criptosporidiosis humana (Mahdi y Ali, 2002; Miller *et al.*,

2008; Robertson, 2009). En este sentido, tras la epidemia de fiebre aftosa en ganado vacuno del Reino Unido en 2001, se sacrificaron numerosas reses y se implementaron estrictas restricciones en el movimiento de los animales, lo que se tradujo en una disminución significativa de las infecciones por *Cryptosporidium* spp. en personas, incluyendo casos de criptosporidiosis humana (Smerdon *et al.*, 2003).

Diversas investigaciones sugieren que la contaminación ambiental es la vía indirecta de infección más generalizada, de modo que los hospedadores se infectan fundamentalmente a través de alimentos y agua. Los ooquistes, cuando se eliminan con las heces de los hospedadores, pueden contaminar aguas superficiales o de depósito (Smith, 1993; Frost y Muller, 1999; Machado *et al.*, 2006), que constituyen importantes vehículos de transmisión del protozoo por la posibilidad de alcanzar un gran número y variedad de hospedadores (Laberge *et al.*, 1996); de hecho, *Cryptosporidium* fue el agente etiológico identificado en el 60,3% de las protozoosis transmitidas por agua que se notificaron en todo el mundo entre 2004 y 2010 (Baldurson y Karanis, 2011). Por ello, la Organización Mundial de la Salud clasificó a *Cryptosporidium* como patógeno de referencia para la evaluación de la calidad del agua potable (Medema *et al.*, 2006). Esto se debe a que los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son extremadamente resistentes, incluido el tratamiento con cloro, se propagan con facilidad por el agua y son difíciles de eliminar del agua potable, debiéndose emplear tediosas filtraciones. La importancia de esta vía en la transmisión del protozoo a otros hospedadores queda demostrada al identificarse *Cryptosporidium* spp. como el agente causal de numerosos brotes de gastroenteritis en aguas recreativas y por consumo de agua potable (Rush *et al.*, 1987; Hayes *et al.*, 1989; MacKenzie *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1998; Dziuban *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2006; Baldursson y Karanis, 2011). El mayor brote conocido y transmitido por aguas contaminadas se produjo en Milwaukee (EE.UU.) en 1993, afectando a unas 403.000 personas, causando incluso la muerte de varios pacientes inmunodeprimidos (Mackenzie *et al.*, 1994). La gravedad de las infecciones varía dependiendo de las especies involucradas; para las especies zoonóticas, la dosis requerida para causar una infección en el 50% de los pacientes (ID50) se estima

alrededor de 10-83 ooquistes para *C. hominis* y 132 para *C. parvum* (DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1998; Chappell *et al.*, 2006).

De igual modo, la criptosporidiosis asociada a brotes de origen alimentario se describe desde principios de 1980. *Cryptosporidium* también se identificó en varios productos alimenticios tales como frutas, verduras frescas (Monge *et al.*, 1996) y mariscos (Freire-Santos *et al.*, 2000), ya que estos alimentos se ingieren habitualmente crudos o poco procesados. El agua es una de las fuentes más probables de contaminación de los alimentos, sobre todo durante el riego o durante la preparación de los alimentos, pues si ésta está afectada por alguna contaminación fecal humana o animal, los productos regados o lavados pueden portar ooquistes de *Cryptosporidium* (Peng *et al.*, 1997). Sin embargo, otras fuentes potenciales de contaminación, tales como animales o personas, no pueden descartarse por completo. Los viajes al extranjero también se han identificado como un factor de riesgo para las infecciones por *Cryptosporidium* a través del consumo de alimentos o de agua (Khalakdina *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2004), probablemente debidos a la pobre calidad de los alimentos y del agua en esos países de riesgo (Cartwright, 2003).

Fómites, incluyendo moscas y escarabajos del estiércol (Mathison y Ditrich, 1999; Szostakowska *et al.*, 2004) y nematodos de vida libre (Huamanchay *et al.*, 2004) pueden transportar y depositar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. sobre las superficies vegetales. El viento o el transporte mecánico con el calzado, prendas de vestir, vehículos o herramientas, también pueden contribuir a la contaminación. La fauna silvestre, en particular aves como gaviotas, palomas, etc., también pueden actuar, de forma ocasional, en la transmisión del parásito (Smith *et al.*, 1993).

## **1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGENIA DE *Cryptosporidium* EN RUMIANTES DOMÉSTICOS**

Las infecciones por *Cryptosporidium* spp. se han asociado, en la mayoría de los países del mundo, con la presencia de procesos gastroentéricos en los rumiantes domésticos, especialmente en los neonatos (Muñoz-Fernández *et al.*, 1996; de Graaf *et al.*, 1999).

Además de *Cryptosporidium* spp., en las diarreas neonatales de los rumiantes intervienen otros agentes infecciosos tanto víricos (rotavirus, coronavirus, torovirus, norovirus, nebovirus, etc.) como bacterianos (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., etc.) puesto que son procesos complejos debido a su etiología multifactorial (de la Fuente *et al.*, 1998; de Graaf *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2004); no obstante, actualmente este parásito se considera una de las principales causas de diarrea neonatal en terneros, corderos y cabritos (de Graaf *et al.*, 1999; Lundborg *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2014; García-Meniño *et al.*, 2015).

La principal acción patógena de la mayoría de las especies del género *Cryptosporidium* es consecuencia de su multiplicación activa en las células epiteliales del final del yeyuno y del íleon, que provoca una rápida y numerosa destrucción de las mismas, lo que se traduce en atrofia, fusión y reducción de la longitud de las vellosidades intestinales, quedando la superficie de absorción muy disminuida (Fayer, 2008). En respuesta a la pérdida de enterocitos, en las criptas intestinales se generan nuevas células, pero con escasa capacidad enzimática y de absorción. Estos cambios provocan una deficiencia en el proceso de absorción y digestión de nutrientes que finaliza con la aparición de diarrea, que varía desde moderada hasta aguda y que conlleva deshidratación (Anderson, 1981; Fayer y Ungar, 1986; Díaz *et al.*, 2014; Certad *et al.*, 2017). Entre los signos que también se asocian a la infección por el protozoo se incluyen anorexia, dolor abdominal, apatía, depresión y pérdida de peso (Casey, 1991; De Graaf *et al.*, 1999; Lefay *et al.*, 2001), aunque también se han descrito casos de infección asintomática (Anderson, 1989; Ongerth y Stibbs, 1989; McCluskey *et al.*, 1995). Los casos más graves se caracterizan por una pérdida excesiva de líquidos y electrolitos que produce una acidosis metabólica, que puede resultar fatal en algunas circunstancias (De Graaf *et al.*, 1999). La enfermedad dura aproximadamente entre 3 y 12 días y se caracteriza por la eliminación de numerosos ooquistes (Casemore *et al.*, 1997).

La criptosporidiosis produce notables pérdidas económicas en las explotaciones. Además de las pérdidas directas, relacionadas con la mortalidad de los animales, se producen otras pérdidas indirectas



como retraso en el crecimiento y debilidad de los animales que superan la enfermedad, a las que hay que añadir el coste de los tratamientos y atención veterinaria (Díaz *et al.*, 2014; García-Meniño *et al.*, 2015).

Todos los microorganismos asociados con la aparición de diarrea en rumiantes neonatos se pueden encontrar también en animales sanos. Que el animal muestre sintomatología clínica depende de diferentes circunstancias (Figura 1.3.), como la presencia de factores intrínsecos del animal muy relacionados con su estado inmunitario (edad, el estado nutricional, etc.) y otros factores ligados a las condiciones medioambientales y de manejo de las explotaciones (Morin *et al.*, 1976; Moon *et al.*, 1978; Acres *et al.*, 1979; Radostits y Acres, 1983; Waltner-Toews *et al.*, 1986a-d).

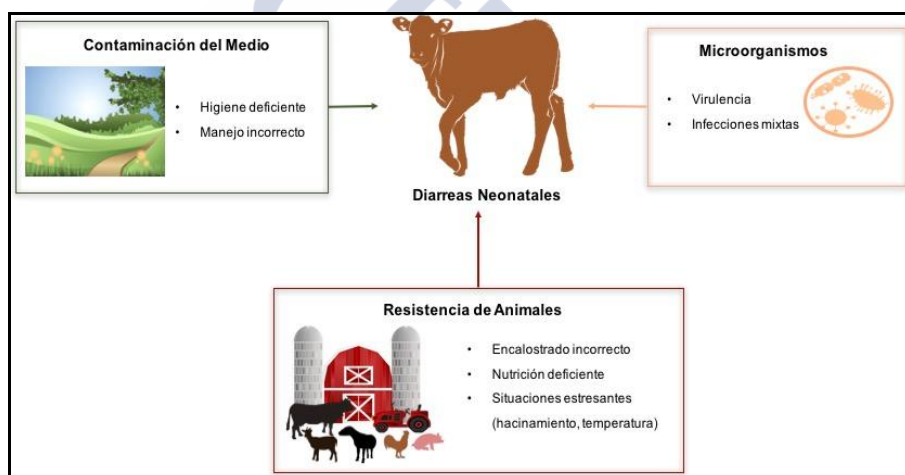


Figura 1.3. Principales factores que influyen en las diarreas neonatales en rumiantes neonatos

La contaminación del medio constituye uno de los factores más importantes que incrementan la frecuencia de infección en los rumiantes (Díaz *et al.*, 2014). En este sentido es necesario tener en cuenta que los animales infectados eliminan un elevado número de ooquistes con las heces, y que éstos son muy resistentes a factores ambientales (Díaz *et al.*, 2014). Así, los terneros infectados pueden llegar a eliminar hasta 10 millones de ooquistes por gramo de heces

durante la fase aguda de la enfermedad, constituyendo la principal fuente de contagio en las explotaciones ganaderas, circunstancia que unida a la baja dosis infectante (10-100 ooquistes), facilita la difusión y perpetuación de la enfermedad (Vergara y Quílez, 2004; Díaz *et al.*, 2014). La extrema resistencia de los ooquistes a las condiciones adversas del ambiente es otro factor de gran interés en la epidemiología. Los ooquistes son capaces de mantenerse infectantes en el ambiente durante 2-6 meses a 4°C, y hasta tres meses a temperaturas de 25-30°C, seis meses a 20° C o siete meses a 15°C (Anderson, 1985; Fayer *et al.*, 1998); sin embargo, son muy sensibles a desecación, a la congelación (-18°C durante 24 horas) y a altas temperaturas, como 70°C (5 segundos) (Fujino *et al.*, 2002; Vergara y Quílez, 2004; García-Sánchez *et al.*, 2014). Además, los ooquistes resisten bien la desinfección química y no se inactivan con la mayoría de los desinfectantes de uso doméstico e industrial, como cloro, yodóforos al 4 %, cloruro de benzalconio al 10 % o cresoles al 5 % (Xiao *et al.*, 2004). Por el contrario, se ha comprobado que la formalina al 10%, así como los compuestos a base de peróxido o hidróxido de amonio al 5%, empleados durante 18-24 horas, eliminan o reducen de manera notable la capacidad infectante de los ooquistes (Quílez *et al.*, 2005; Fayer *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2014; García-Sánchez *et al.*, 2014). Recientemente se ha observado que el tratamiento de agua con ozono o con luz ultravioleta puede inactivar los ooquistes del parásito, aunque no se permite su uso a gran escala (Fontán-Sainz, 2011; Gómez-Couso *et al.*, 2012).

Por todo ello, se ha comprobado que la presencia de *Cryptosporidium* spp. está directamente relacionada con una higiene deficiente de las instalaciones y con un manejo incorrecto de los animales. En este sentido, varios estudios han señalado que los suelos fáciles de limpiar (cemento o emparrillado), el uso diario de desinfectantes adecuados en las instalaciones, el mantenimiento de la zona de paridera convenientemente limpio y el empleo de cubículos individuales para los recién nacidos, suponen un menor riesgo de criptosporidiosis (Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Vergara y Quílez, 2004; Díaz *et al.*, 2010c; García-Meniño *et al.*, 2014). El tamaño del rebaño también condiciona mucho la presentación de la infección,

existiendo mayor frecuencia en los más grandes, probablemente por la mayor densidad de animales, mayor carga de patógenos y menor posibilidad de realizar vaciado sanitario, aunque dependiendo del manejo, esta situación puede empeorar en granjas pequeñas (Díaz *et al.*, 2014). Además, un elevado número de nacimientos en un corto periodo de tiempo favorece el hacinamiento y un aumento de la presión de infección (Vergara y Quílez, 2004; Díaz *et al.*, 2014; García-Meniño *et al.*, 2014).

Por otra parte, todos aquellos factores que reduzcan la resistencia del animal a la infección favorecerán la aparición de criptosporidiosis. Los animales recién nacidos son los más receptivos a la infección por *Cryptosporidium* spp., posiblemente debido a que su sistema inmunitario es todavía inmaduro (Ortega-Mora y Wright, 1994; Santín *et al.*, 2004; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2006). Se ha comprobado que los anticuerpos calostrales, aunque no protegen completamente frente a la infección en rumiantes neonatos, reducen la gravedad de los signos clínicos e incrementan la resistencia de los animales a otros patógenos entéricos (Fayer *et al.*, 2008). Así, se ha observado mayor morbilidad y cuadros más graves cuando la toma de calostro es insuficiente, incorrecta o de mala calidad; esta situación es muy frecuente en terneros procedentes de novillas de primer parto, pues suelen producir menor cantidad de calostro y de baja calidad, por lo que sus terneros tendrán más posibilidades de adquirir la infección y presentar la consiguiente diarrea (Kelly y Coutts, 2000; Díaz *et al.*, 2014; García-Meniño *et al.*, 2014; Arsenopoulos *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2017; Gelsinger y Heinrichs, 2017; Novo *et al.*, 2017). Además, todas aquellas condiciones y situaciones estresantes, como son una alimentación inadecuada, el hacinamiento o el mantenimiento de los animales en instalaciones poco ventiladas y húmedas, también aumentan notablemente el riesgo de padecer la enfermedad (Díaz *et al.*, 2014).

Por último, en la aparición de la diarrea hay factores que están relacionados con los enteropatógenos. Así, es importante señalar que algunas cepas de estos microorganismos poseen una mayor virulencia y causan procesos más graves. Además, las infecciones múltiples son

muy frecuentes y están asociadas, generalmente, a procesos más graves (García-Meniño *et al.*, 2014, 2015).

### **1.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *Cryptosporidium***

Se han descrito una gran variedad de métodos para la detección de *Cryptosporidium* spp., entre los que se incluyen técnicas microscópicas, inmunológicas y moleculares. Las técnicas microscópicas se utilizan para identificar al parásito tanto en tejidos como en heces, y destacan por su bajo coste, aunque se debe elegir cuidadosamente el método de tinción y visualización (Checkley *et al.*, 2015). Las técnicas inmunológicas y moleculares son complejas y suponen un mayor coste, aunque ofrecen mejores valores de sensibilidad y especificidad (Siddons *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1998). Sin embargo, el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. continúa presentando numerosos desafíos. El uso de diferentes métodos de diagnóstico y la aplicación de determinadas técnicas de tipificación pueden dificultar y/o imposibilitar las comparaciones directas entre ensayos clínicos, veterinarios y medioambientales, o entre distintas regiones y países (Chalmers y Katzer, 2013).

#### **1.3.1. Técnicas microscópicas**

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

En cualquier caso, las muestras tisulares que se examinen deben fijarse, tan pronto como sea posible, para evitar la autólisis de las células epiteliales. Al examinar microscópicamente cortes de intestino teñidos con hematoxilina/eosina, las fases evolutivas del parásito

aparecen como pequeños cuerpos basófilos esféricos (de 2 a 5  $\mu\text{m}$ ) en el borde apical de la mucosa (Lamps, 2009), aunque por su tamaño pueden pasar inadvertidas. Sin embargo, para observar las características ultraestructurales y su localización dentro de la vacuola parasitófora es necesario recurrir al microscopio electrónico (O'Donoghue, 1995).

La detección de *Cryptosporidium* spp. en los laboratorios de patología clínica se basa principalmente en la identificación microscópica de ooquistes mediante tinciones y/o anticuerpos fluorescentes (Chalmers y Katzer, 2013). La microscopía presenta una serie de ventajas e inconvenientes a tener en cuenta. Entre sus ventajas cabe destacar el bajo coste de los reactivos y su sencillez, mientras que entre sus inconvenientes se encuentra los bajos valores de especificidad y sensibilidad de la mayoría de estos métodos (Casemore, 1991), así como la necesidad de emplear mano de obra cualificada para identificar correctamente el parásito y no confundirlo con los artefactos que aparecen en las muestras de heces (Kettelhunt *et al.*, 2003). Además, otra importante limitación en el diagnóstico de este parásito es que, al existir especies cuyos ooquistes son morfológicamente idénticos, como *C. parvum* y *C. hominis*, nunca se puede alcanzar la identificación específica.

Se han descrito un gran número de técnicas para la identificación de ooquistes de este protozoo en las heces, con valores de sensibilidad muy diversos, entre las que se encuentran la tinción con carbolfucsina o tinción negativa de Heine (Heine, 1982), la tinción de Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen y Pohlenz *et al.*, 1981), la tinción de Kinyoun (Ma y Soave, 1983), con safranina-azul de metileno (Baxby *et al.*, 1984), con verde malaquita (Elliot *et al.*, 1999), la inmunofluorescencia directa (Bialek *et al.*, 2002), la tinción de hematoxilina-eosina y la tinción con auramina.

Las técnicas más comúnmente utilizadas son:

- *Tinción de Heine*: descrita por Heine en el año 1982, se basa en el uso de fucsina básica fenicada, que tiñe los detritus fecales, destacando los ooquistes refringentes no coloreados (Figura 1.4.). Entre sus ventajas destacan su rapidez, sencillez y bajo coste, por

lo que se considera un buen método para realizar un cribado inicial (Villacorta, 1989; García-Meniño, 2013); además, tiene una buena concordancia con otras técnicas más sensibles. García-Meniño (2013) verificó que, en heces procedentes de terneros con diarrea, los resultados obtenidos con la técnica de Heine mostraban una buena concordancia con los observados con la tinción de auramina ( $\kappa= 0,707$ ) y ELISA directo ( $\kappa= 0,705$ ). Por el contrario, en muestras de animales sin diarrea, la concordancia era moderada.

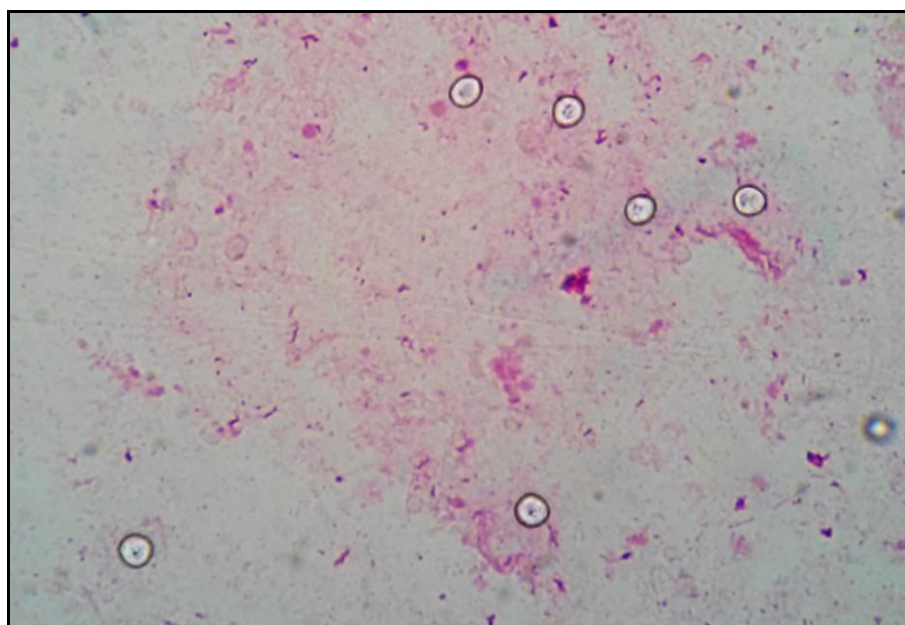


Figura 1.4. Tinción de Heine

Entre los inconvenientes de esta técnica cabe destacar que las preparaciones teñidas con esta tinción no son permanentes y deben examinarse durante los primeros 15 minutos tras su realización, ya que posteriormente los ooquistes son más difíciles de identificar (Potters y Van Esbroeck, 2010). Además, los ooquistes, por su tamaño y forma, pueden confundirse con levaduras u otros artefactos presentes en la materia fecal; en este sentido, y debido a las escasas diferencias morfológicas de los

ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Fall et al., 2003; Checkley et al., 2015), se necesitan técnicas de tinción diferencial, como las usadas para teñir organismos ácido-alcohol resistentes, debido a que la pared de los ooquistes del parásito resiste la decoloración con alcohol-ácido. Existen otras técnicas similares que pueden emplearse en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., como la tinción negativa con verde malaquita, en la cual éstos se observan como estructuras brillantes, envueltas por un fondo verde (Elliot et al., 1999).

- *Tinción Ziehl-Neelsen*: es una tinción permanente que permite detectar ooquistes del protozoo, que se observan de un color rojo brillante sobre un fondo verde-azulado (Figura 1.5.).

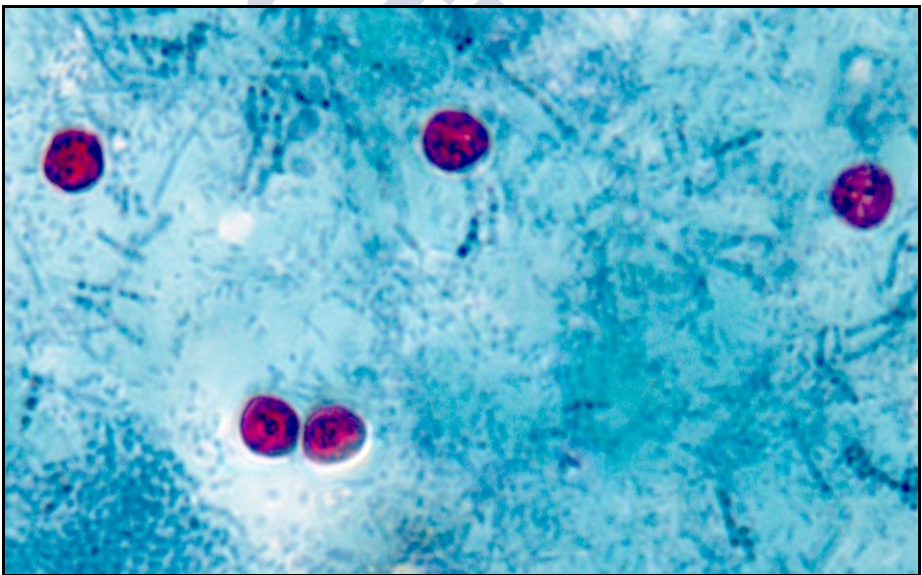


Figura 1.5. Tinción Ziehl-Neelsen

Este método fue modificado posteriormente permitiendo realizarlo en frío, convirtiéndose en el más utilizado para la tinción de ooquistes en muestras de heces (Casemore, 1991), por lo que se consideró como el “gold-standard”. Esta técnica presenta una serie de inconvenientes a tener en cuenta, (i) su largo

tiempo de ejecución, unos 30-45 minutos (Mtambo *et al.*, 1992; Chartier *et al.*, 2002); (ii) la aparición de falsos positivos, ya que algunas levaduras y restos fecales pueden adquirir una coloración rojo pálido, pudiendo dar lugar a confusión. La diferenciación de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. con respecto a otros objetos esféricos de tamaño similar puede conllevar cierta dificultad para una persona poco entrenada, sobre todo en muestras que presentan un reducido número de ooquistes (Smith, 2008); (iii) aparición de falsos negativos, debido a que cuando se sobrepasa el tiempo óptimo de decoloración, los ooquistes pueden aparecer poco teñidos. Por este motivo, algunos autores recomiendan utilizar tinciones que incorporen safranina, tales como la técnica de Köster modificada (safranina y potasa/verde malaquita) o la de Baxby (safranina/azul de metileno) que tiñe los ooquistes de un rosa anaranjado (Villacorta, 1989).

- *Tinción de Kinyoun*: se utiliza para organismos ácido-alcohol resistentes, por lo que mediante esta técnica se consigue una excelente visualización de los estadios evolutivos de *Cryptosporidium* en heces y/o tejidos. Los ooquistes presentan una coloración rosácea y roja, que destaca sobre un fondo verde (Ma y Soave, 1983; Latimer *et al.*, 1988). La tinción de Kinyoun es muy similar a la de Ziehl-Neelsen, diferenciándose en que: (i) el ácido usado para decolorar es más débil; (ii) no se decolora con alcohol. Aunque ambas tinciones tienen la misma sensibilidad, especificidad y contraste, la de Kinyoun requiere menos tiempo y su ejecución es más sencilla (Velazco, 1995).
- *Visualización microscópica en contraste de fase*: esta técnica de centrifugación-flotación en solución de sacarosa de Sheather se utiliza para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. a partir de muestras fecales por presentar un bajo coste (Current, 1990). Las muestras deben examinarse rápidamente, ya que si los ooquistes se exponen a soluciones de alta densidad durante un tiempo prolongado pueden distorsionarse o romperse, obteniendo resultados erróneos. Para la visualización de los ooquistes, puede utilizarse un microscopio óptico de campo claro o de contraste de



fase (Xiao y Feng, 2008). Con contraste de fase, los ooquistes se visualizan como cuerpos brillantes conteniendo gránulos negros; en el microscopio de campo claro, aparecen translúcidos, muchas veces como estructuras levemente rosáceas, conteniendo gránulos en su interior. La diferenciación con respecto a levaduras es fácil, debido a que no van a presentar esa coloración rosácea típica de *Cryptosporidium* spp. ni se observan gránulos interiores (Current, 1999; Sréter y Varga, 2000).

- *Tinción con auramina*: con esta técnica se aumenta la sensibilidad, debido a la captación de un fluorocromo por parte de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp.; para ello se utiliza una solución fenólica de auramina, que tiñe tanto la pared externa del ooquiste como las estructuras internas (Figura 1.6).

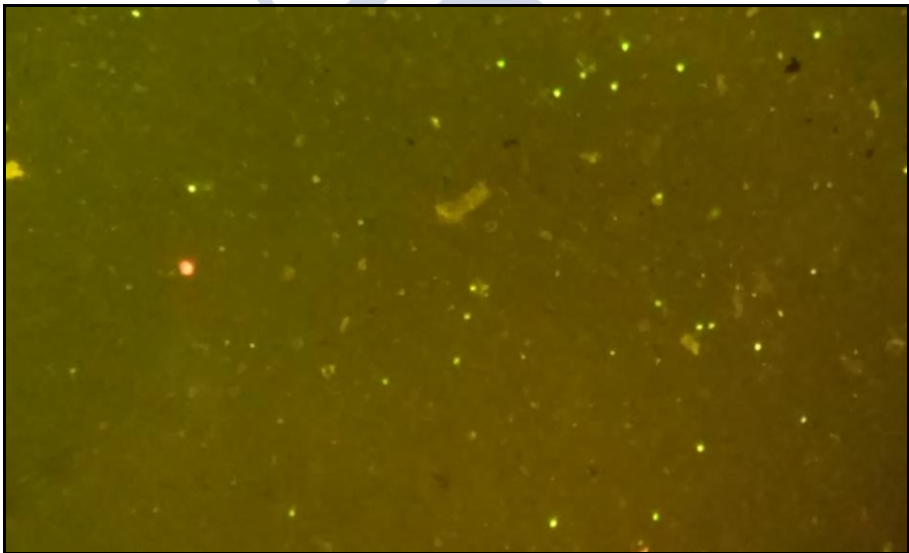


Figura 1.6. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. teñidos con auramina

Existen varias variantes, usando además de la auramina, rodamina (García *et al.*, 1987), fucsina básica fenicada (Casemore *et al.*, 1985a), naranja de acridina (García *et al.*, 1983), mepracina (Ungureanu y Dontu, 1992) o permanganato potásico (Fleck y Moody, 1988). Es una técnica relativamente fácil, rápida y barata,

aunque su mayor inconveniente reside en la necesidad de poseer un microscopio de fluorescencia (Chalmers y Katzer, 2013). La identificación de los ooquistes es menos subjetiva y permite la observación de la muestra empleando un menor aumento (x200).

### 1.3.2. Técnicas inmunológicas

Existen dos tipos de técnicas inmunológicas: las indirectas, que detectan anticuerpos, y las directas que detectan antígenos parasitarios. Las técnicas inmunológicas indirectas, como el ELISA, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o el Western-blotting (WB), pueden utilizarse como un método de diagnóstico alternativo debido a que, en la mayoría de los individuos, la excreción de ooquistes y antígenos del protozoo en heces es intermitente; de este modo, estas técnicas son útiles para determinar la exposición a *Cryptosporidium* spp. y detectar portadores asintomáticos. Además, permiten identificar infecciones recientes, observándose una seroconversión que se manifiesta aproximadamente a las dos semanas de haberse producido la infección. En este sentido, Tzipori y Campbell (1981) y Hill *et al.* (1990) indicaron que, en corderos, la respuesta inmunitaria frente al protozoo se detecta a los 7-14 días post-infección, mientras que en terneros los anticuerpos aparecen entre los 6 y los 21 días (Tzipori y Campbell, 1981; Williams y Burden, 1987; Harp *et al.*, 1990; Whitmire y Harp, 1991). No obstante, estas técnicas presentan una serie de inconvenientes por los cuales no son útiles para el diagnóstico de infecciones activas: (i) los anticuerpos específicos no se detectan hasta que finaliza la eliminación de ooquistes en heces (Koch *et al.*, 1985; Sterling y Arrowood, 1986; Casemore, 1987; Current y Snyder, 1988; Mead *et al.*, 1988; Hill, 1990); (ii) son poco específicas, ya que existen antígenos comunes entre *Cryptosporidium* spp. y *Eimeria* spp., que dan lugar a falsos positivos debido a la presencia de reacciones cruzadas (Ortega-Mora *et al.*, 1992; Lorenzo-Lorenzo *et al.*, 1993); (iii) los anticuerpos calostrales en el recién nacido puede dificultar la detección de anticuerpos desarrollados por el propio individuo (Mann *et al.*, 1987; Ortega-Mora, 1993). Además, el elevado coste de adquisición de los kits comerciales de ELISA y de IFI hacen poco viables su uso en la rutina de laboratorio (García y Shimizu, 1997;

Bialek *et al.*, 2002), lo que conlleva que los métodos de microscopía tradicional sean los más utilizados para la detección del parásito en muestras fecales (Magi *et al.*, 2006; Weitzel *et al.*, 2006).

- *Inmunofluorescencia*: existen 2 variantes, la indirecta o IFI (detección de anticuerpos) y la directa o IFAT (detecta antígenos). En ambos casos la reacción finaliza con la adición de un anticuerpo conjugado a una sustancia fluorescente (Cañavate *et al.*, 2009). Estas pruebas son muy sensibles pero su interpretación, especialmente en la IFI, es poco objetiva. La IFAT (Figura 1.7.) presenta valores de sensibilidad y especificidad superiores a los métodos de tinción convencionales, sobre todo en muestras con pocos ooquistes y muchos detritus fecales (Crawford y Vermund, 1988; Arrowood y Sterling, 1989; Grigoriew *et al.*, 1994; Clavel *et al.*, 1996; Quílez *et al.*, 1996b). En la actualidad se dispone de kits comerciales de IFAT que emplean anticuerpos monoclonales anti-*Cryptosporidium* marcados con isotiocianato de fluoresceína (Bialek *et al.*, 2002). En muestras fecales, estos test reemplazaron al análisis microscópico tradicional para la búsqueda de ooquistes, obteniéndose buenos resultados de sensibilidad y de especificidad (Arrowood y Sterling, 1989; Zimmerman y Needham, 1995; Johnston *et al.*, 2003). Cada uno de estos test utiliza un determinado anticuerpo monoclonal que reconoce ciertos antígenos de la superficie del ooquiste (Smith y Ronald, 2001). Por este motivo, la intensidad de la fluorescencia puede variar dependiendo del anticuerpo monoclonal del kit comercial que se emplee, así como de la especie de *Cryptosporidium* presente. La mayoría de los anticuerpos monoclonales se desarrollaron frente a epítomos presentes en ooquistes de *C. parvum*. Debido a esto, como la expresión de un determinado epítomo puede variar dentro del género *Cryptosporidium*, es muy probable que los ooquistes de diferentes especies y genotipos, así como de determinados subtipos, puedan mostrar una fluorescencia menos intensa.

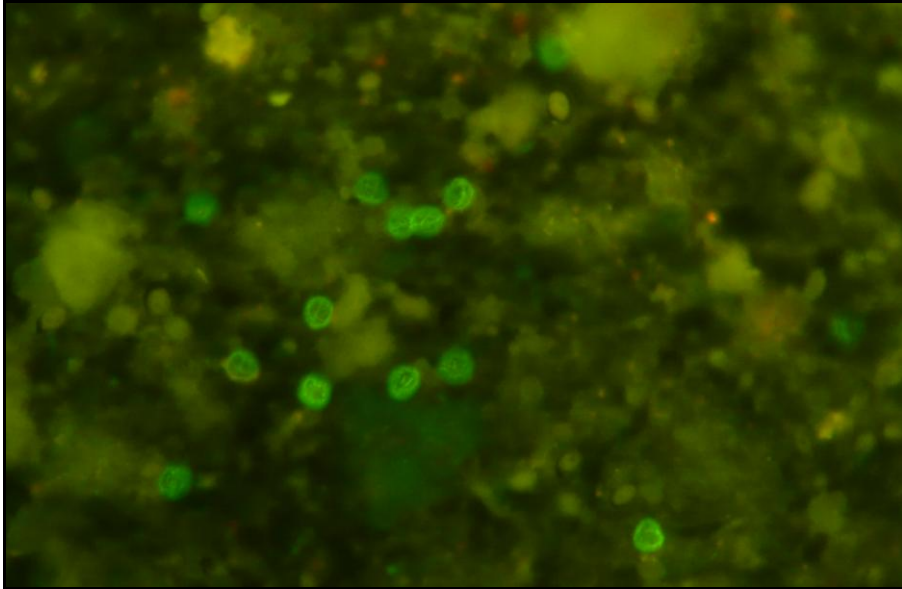


Figura 1.7. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. teñidos con una técnica IFAT comercial

- *ELISA directo*: el empleo de anticuerpos monoclonales permite detectar copro-antígenos de *Cryptosporidium* spp., por lo que algunos autores han sugerido su empleo en lugar de las técnicas microscópicas convencionales (Anusz *et al.*, 1990; Robert *et al.*, 1990; Siddons *et al.*, 1992). Entre las ventajas del ELISA directo respecto a las microscópicas destacan su facilidad de realización y que no requiere de técnicos experimentados para la realización de los análisis (Smith, 2008). Además, la especificidad del ELISA directo es muy elevada, oscilando entre el 98-100% (Smith, 2008). Según algunos autores (Kehl *et al.*, 1995; Graczyk *et al.*, 1996) su sensibilidad es similar a la de la inmunofluorescencia directa, una de las técnicas más sensibles; por el contrario, otros autores indicaron una mayor sensibilidad de la inmunofluorescencia (Anusz *et al.*, 1990; You *et al.*, 1996). A pesar de que este método no permite la identificación de las especies de *Cryptosporidium*, en la última década, el ELISA directo se ha convertido en la técnica de elección para el

diagnóstico de criptosporidiosis en humanos (Chalmers y Katzer, 2013).

- *Inmunocromatografía*: es una técnica sencilla, rápida y cualitativa, ya que las reacciones positivas se observan como una banda de color en una localización específica del kit. Este método se puede emplear para realizar análisis en el campo, lo que permite instaurar rápidamente las medidas de tratamiento y control más adecuadas. Al igual que el ELISA directo, su especificidad es elevada y próxima al 100%. En cuanto a su sensibilidad, varios autores han indicado valores inferiores a los del ELISA directo (Chalmers y Katzer, 2013) o a los de las técnicas microscópicas (Johnston *et al.*, 2003; Weitzel *et al.*, 2006), mientras que Chan *et al.* (2000) señalaron que los porcentajes de sensibilidad eran mejores que mediante microscopía.

### 1.3.3. Técnicas moleculares

Una de las limitaciones asociadas a los métodos de diagnóstico microscópicos convencionales es que mediante el análisis morfométrico de los ooquistes es imposible realizar su identificación específica (Morgan y Thompson, 1998). Esto se debe al pequeño tamaño de los ooquistes (4-8  $\mu\text{m}$ ) y a la ausencia de estructuras y variaciones morfológicas evidentes entre las especies (Morgan *et al.*, 1999; Fayer *et al.*, 2000). Así mismo, tampoco es posible la diferenciación específica del protozoo mediante técnicas inmunológicas debido a que todas las especies del género *Cryptosporidium* presentan antígenos conservados en la pared del ooquiste (Fayer *et al.*, 2000). Por el contrario, se han desarrollado diversas técnicas moleculares que permiten la identificación de las diferentes especies de *Cryptosporidium* así como su variación intraespecífica, pudiendo discriminar si se trata de especies antropónicas o zoonóticas (Sargent *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1999; Sréter y Varga, 2000; Jex *et al.*, 2008). Además, las técnicas moleculares presentan una alta sensibilidad y especificidad (Balatbat *et al.*, 1996; Morgan y Thompson, 1998; Jex *et al.*, 2008), siendo superiores (Morgan *et al.*, 1998) o similares a las obtenidas con otros

métodos inmunológicos o microscópicos (Bialek *et al.*, 2002). Cabe señalar que los valores de sensibilidad y especificidad de estas técnicas pueden variar dependiendo del método de extracción de ADN empleado, el gen utilizado, el protocolo de la reacción y la presencia de inhibidores en la muestra (Magi *et al.*, 2006).

Para el diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* en muestras de heces (Laxer *et al.*, 1991) la mayoría de las técnicas se basan en la amplificación de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente, se han desarrollado diversas modificaciones para detectar el parásito en muestras ambientales, incluyendo agua y alimentos (Egyed *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006). Entre las diferentes técnicas moleculares disponibles para realizar el genotipado y subtipado de *Cryptosporidium* se encuentran la PCR simple, semianidada y anidada, el análisis de polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD-PCR) y la PCR a tiempo real (qPCR); esta última técnica puede emplearse como un método alternativo a la PCR convencional, destacando por su mayor rapidez y la ausencia de procedimientos tras la amplificación del ADN, lo que disminuye el riesgo de contaminación del laboratorio, y permitiendo, además, la visualización de resultados preliminares antes del término de la reacción. La identificación de la especie/genotipo y del subtipo se realiza fundamentalmente mediante el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), el análisis de polimorfismo de conformaciones monocatenarias (SSCP) o secuenciación (Egyed *et al.*, 2003).

#### 1.3.3.1. Análisis genotípico

Actualmente, la mayoría de los métodos moleculares para la detección y genotipado de *Cryptosporidium* spp. en muestras procedentes de humanos, animales o del medio ambiente se basan en el estudio del gen que codifica para la subunidad ribosómica pequeña 18S (SSU rRNA), debido a la presencia de regiones semiconservadas intercaladas con otras hipervariables, y a que existen 5 copias del gen en el genoma del parásito; así, es el locus de elección para identificar especies o genotipos aún sin clasificar debido a que es un gen muy conservado y presenta un menor polimorfismo (Morgan *et al.*, 2000;

Spano *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999 a, b; 2000; 2004). Una de las técnicas más empleadas es la PCR-RFLP que amplifica un fragmento de aproximadamente 850 pares de bases (pb) del gen 18S, utilizando posteriormente las endonucleasas *SspI* y *VspI* para realizar el genotipado mediante el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (Xiao *et al.*, 1999a, 2001a); el empleo adicional de la endonucleasa *MboII* permite diferenciar fácilmente tres especies muy frecuentes en ganado vacuno (*C. parvum*, *C. bovis* y *C. ryanae*) que presentan un patrón de restricción muy similar al emplear únicamente *SspI* y *VspI* (Feng *et al.*, 2007; Xiao y Ryan, 2008; Xiao, 2010).

Otros locus empleados para realizar análisis genotípicos son los correspondientes a los genes que codifican para la actina (Sulaiman *et al.*, 2002), la proteína de choque térmico de 70 kDa (*heat shock protein* - Hsp70; Morgan *et al.*, 1999b) y la proteína de la pared del ooquiste (COWP; Xiao *et al.*, 2000), que presentan un mayor polimorfismo y, por tanto, permiten una mayor discriminación entre especies o genotipos genéticamente similares (Xiao *et al.*, 2004). Aunque estas técnicas fueron muy utilizadas hace unos años, actualmente su empleo para el genotipado de *Cryptosporidium* spp. se ha reducido notablemente (Xiao, 2010).

Además, se han desarrollado diferentes protocolos de qPCR para el diagnóstico y diferenciación de especies de *Cryptosporidium*, como *C. parvum* y *C. hominis*, que suelen mostrar una mayor sensibilidad (Stroup *et al.*, 2006; Jothikumar *et al.*, 2008; Hadfield *et al.*, 2011). Así, Homem *et al.* (2012) observaron un mayor porcentaje de terneros positivos a *C. parvum* empleando una qPCR (73,2%; 153/209) que con una PCR convencional (56,5%; 118/209). Además, se han descrito qPCR que permiten identificar varias especies de *Cryptosporidium* mediante el posterior análisis de la curva de fusión (Lalonde *et al.*, 2011).

Para incrementar la precisión de los resultados, Cacciò *et al.* (2005) señalaron que el análisis genotípico debería realizarse en, al menos, dos genes diana, siendo uno de ellos el 18S, y seleccionando el segundo de manera que permitiera llevar a cabo tanto un análisis genotípico como subtípico.

### 1.3.3.2. Análisis subtípico

El empleo de loci altamente polimórficos, que permiten obtener una mayor discriminación, ha resultado de especial interés en el estudio de la variación intraespecífica de algunas especies de *Cryptosporidium*, fundamentalmente *C. parvum* y *C. hominis*, conduciendo a un notable progreso del conocimiento de la epidemiología del protozoo. Entre estos genes cabe destacar el que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (GP60, antiguamente denominado gp40), así como varias regiones microsatélite y minisatélite y espaciadores internos transcritos (ITS-2) del ARNr (Gasser *et al.*, 2003; Xiao 2010; Xiao *et al.*, 2001b).

Actualmente, la mayoría de los estudios de subtipado se basan en el estudio de la secuencia del gen de la GP60, ya que es el marcador individual más polimórfico identificado hasta el momento en el genoma de *Cryptosporidium* spp. (Robinson y Chalmers, 2012). Sin embargo, los cebadores descritos hasta el momento sólo permiten amplificar determinadas especies, como *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. fayeri*, *C. cuniculus*, *C. wrairi*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum* o *C. erinacei* (Xiao, 2010; Soilán, 2014). El análisis del gen de la GP60 permite clasificar los diferentes subtipos de *C. parvum* y *C. hominis* dentro de familias alélicas; esto es debido que este gen posee una secuencia microsatélite que codifica para la serina constituida por un número variable de repeticiones en tándem de los trinucleótidos TCA/TCG/TCT en el extremo 5', así como diferencias en las regiones no repetitivas del gen (Xiao, 2010). Así, en la actualidad se han identificado 14 familias alélicas de *C. parvum* en humanos y animales (IIa-IIo), que se basan en los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) y en la secuencia microsatélite. Algunos subtipos, especialmente el IIc, sólo se han detectado en humanos. Por el contrario, otros como el IId, y en particular el IIa, se han señalado como los más comunes en los animales; la mayoría de los subtipos pertenecientes a las familias IIa y IId se han identificado también en humanos, por lo que presentan potencial zoonótico (Xiao, 2010; Wang *et al.*, 2014). Además, cada familia de subtipos GP60 está asociada con ciertas características biológicas del parásito, lo que permite relacionarlas con las presentaciones clínicas (Soilán, 2014).



Aquellos estudios de subtipado que requieren una mayor poder discriminatorio se basan en el estudio de regiones con mayor variabilidad como microsátélites y/o minisatélites, que permiten identificar aislados individuales o líneas clonales (Cacciò *et al.*, 2005). Los microsátélites (MS) y minisatélites (MN) se pueden hallar en el genoma de todos los seres eucariotas y son secuencias de ADN que consisten en la repetición en tándem de 1-5 o 10-100 pares de bases, respectivamente. Estos MS y MN presentan polimorfismos de tamaño (variaciones en el número de repeticiones en tándem - VNTR), que son consecuencia de errores que suceden durante la replicación del ADN, lo que se traduce en la ganancia o pérdida de unidades de repetición (Feng *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2003; Mallon *et al.*, 2003a, b; Tanriverdi y Widmer, 2006; Tanriverdi *et al.*, 2006). En consecuencia, los alelos para los loci MS y MN suelen presentar polimorfismos de tamaño. Además, los MS y MN también pueden presentar SNPs, además de las variaciones en el número de repeticiones en tándem (Sulaiman *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2003; Gatei *et al.*, 2006, 2007).

Los estudios basados en el análisis conjunto de varios locus (análisis multilocus) se utilizan cada vez con más frecuencia en el tipado de aislados de *Cryptosporidium* spp. de animales y humanos, permitiendo determinar su estructura poblacional. Estos análisis se pueden basar en la variación de longitud de las secuencias microsátelite y minisátelite, lo que se conoce como tipificación multilocus (MLT) (Feng *et al.*, 2000; Tanriverdi *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2003; Mallon *et al.*, 2003a, b; Tanriverdi y Widmer, 2006; Ngouanesavanh *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2012), o en la variación de la heterogeneidad genética de la secuencia, que se denomina tipificación multilocus de secuencias (MLST), que además permite detectar los SNPs (Glaberman *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2001; Gatei *et al.*, 2007).

En definitiva, los test de diagnóstico tienen cada cual sus limitaciones tanto en coste, importancia clínica y valoración o evaluación de coinfecciones con otros patógenos. Por este motivo, es necesario desarrollar nuevas estrategias para mejorar la interpretación de los resultados en las infecciones mixtas, la relevancia del subtipado

de especies y la vigilancia de los estudios, y así mejorar la detección e interpretación de los resultados (Ryan *et al.*, 2016).

#### **1.4. INFECCIONES POR *Cryptosporidium* spp. EN RUMIANTES DOMÉSTICOS**

*Cryptosporidium* spp. es un parásito muy común en los rumiantes en todo el mundo, pero las tasas de prevalencia observadas varían ampliamente de unas especies de rumiantes a otras, de las condiciones de manejo y de otra serie de factores, entre los que destacan la edad del hospedador, su estado inmunitario, así como de la especie/genotipo del parásito y su virulencia, que viene determinada genéticamente.

##### **1.4.1. En ganado vacuno**

El primer estudio sobre criptosporidiosis bovina se publicó en 1971, cuando se identificó este protozoo en una novilla de 8 meses con diarrea crónica (Panciera *et al.*, 1971). En un principio *Cryptosporidium* spp. se consideró un agente oportunista; su papel como enteropatógeno primario en las diarreas neonatales del vacuno se descubrió cuando Tzipori *et al.* (1980) atribuyeron por primera vez un brote de diarrea neonatal a la infección exclusiva por este protozoo. Posteriormente, y mediante infecciones experimentales, se demostró que *Cryptosporidium* spp. es capaz de causar diarrea clínica en terneros (Tzipori *et al.*, 1983; Heine *et al.*, 1984). Desde entonces se ha descrito su intervención en procesos gastroentéricos en los bovinos de la mayoría de los países del mundo (Fayer y Xiao, 2007).

Debido a que el ganado vacuno es la especie animal donde la criptosporidiosis tiene una mayor importancia (Santín *et al.*, 2008), en estos animales se han llevado a cabo numerosos estudios transversales que demuestran que este protozoo es muy prevalente en bóvidos, independientemente de su aptitud (lechera o cárnica); así, se han señalado valores de prevalencia individual muy variables que oscilan entre el 0% y el 100%, aunque la mayoría muestran porcentajes del 3-75% (Santín *et al.*, 2008; Feng y Xiao, 2011; Imre y Dărăbuș, 2011). Estas diferencias tan evidentes son el resultado del empleo de varias

técnicas de diagnóstico con diferente sensibilidad (Santín *et al.*, 2008), aunque también se ha comprobado que otros factores, como el sistema de manejo, la época del año, las condiciones ambientales, la edad de los animales, la densidad de ejemplares en la granja, la limpieza de las instalaciones o el diseño del estudio, influyen en el porcentaje de animales infectados en un rebaño (Garber *et al.*, 1994; Atwill *et al.*, 1999; Mohammed *et al.*, 1999; Castro-Hermida *et al.*, 2002a; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2007; Navarro-i-Martínez *et al.*, 2011; Carmena *et al.*, 2012; Abeywardena *et al.*, 2013a). Sin embargo, cabe destacar que los estudios donde se analiza una única muestra por animal suelen subestimar la prevalencia real, pues la eliminación es, en muchos casos, intermitente (Robertson *et al.*, 2014). En este sentido, los resultados de varios estudios longitudinales realizados en rebaños positivos a *Cryptosporidium* spp., muestran que todos los terneros eliminan ooquistes en algún momento durante sus primeros meses de vida (O’Handley *et al.*, 1999; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Santín *et al.*, 2008).

En ganado vacuno explotado en España fueron Juste *et al.* (1987) los que describieron el primer caso de criptosporidiosis. En nuestro país, las investigaciones realizadas hasta el momento muestran que este protozoo está implicado frecuentemente en la aparición de brotes de diarrea neonatal en granjas de bovino (Tabla 1.2), con prevalencias que varían entre el 35,7% y el 76%.

**Tabla 1.2. Prevalencias de infección por *Cryptosporidium* spp. en terneros lactantes con diarrea neonatal en España**

Zona	Prevalencia	Autores
Galicia	52,5%	Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2002a
	49%	Díaz <i>et al.</i> , 2010a
	76%	García-Meniño, 2013
	70%	García-Meniño <i>et al.</i> , 2014
Norte de España	57,8%	Quílez <i>et al.</i> , 2008a
Castilla-León	35,7%	Martín-Gómez <i>et al.</i> , 1995a
Centro de España	52,3%	De la Fuente <i>et al.</i> , 1998
Aragón	64,7%	Quílez <i>et al.</i> , 1996a

Además, los estudios que analizan la presencia de *Cryptosporidium* spp. en bovinos asintomáticos en España señalan porcentajes de infección del 22,7- 44% en terneros (Castro-Hermida *et*

*al.*, 2002a; García-Meniño *et al.*, 2013) y del 8,4%-14,2% en adultos (Castro-Hermida *et al.*, 2006b, 2007; Cardona *et al.*, 2015).

#### 1.4.1.1. Especies descritas

Numerosos estudios demuestran que el ganado vacuno puede estar afectado por un elevado número de especies y genotipos de *Cryptosporidium*, aunque *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. parvum* y *C. ryanae* son las más frecuentes y con una distribución geográfica más amplia (Tabla 1.3).

No obstante, también se ha identificado la presencia, tanto de forma natural como experimental, de otras especies y/o genotipos en los bovinos (Tabla 1.3.), aunque la información obtenida hasta el momento sugiere que estas infecciones son esporádicas y de escasa importancia clínica (Bornay-Llinares *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2005; Geurden *et al.*, 2006; Fayer *et al.*, 2006; Langkjaer *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010; Xiao, 2010). De hecho, se necesitan nuevos estudios que permitan determinar si estas especies afectan verdaderamente al ganado vacuno o si únicamente son transeúntes intestinales (Robertson *et al.*, 2014).

De todas las especies que afectan al ganado bovino, *C. parvum* parece ser la especie más cosmopolita, debido a que se ha identificado en un mayor número de países (Xiao, 2010; Ryan *et al.*, 2014;). Los ooquistes de *C. parvum* son indistinguibles morfológicamente de los de otras especies de *Cryptosporidium*, por lo que es necesario recurrir a técnicas de biología molecular para identificar las diversas especies; por ello, los primeros estudios moleculares utilizaron los términos *C. parvum* genotipo bovino, genotipo II y genotipo B para distinguir esta especie de *C. hominis*. *C. parvum* presenta un amplio rango de hospedadores vertebrados, principalmente mamíferos, entre los que se encuentran los rumiantes domésticos y las personas, por lo que tiene un indudable interés zoonótico (Casemore *et al.*, 1997; Sischo *et al.*, 2000; Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Joachim *et al.*, 2003; Xiao y Ryan, 2008; Fayer, 2010; Díaz *et al.*, 2014). De hecho se considera, junto a *C. hominis*, una de las especies más comunes en brotes de criptosporidiosis humana, tanto en personas inmunodeprimidas como

inmunocompetentes (Vergara y Quílez, 2004; Xiao y Feng, 2008; Chalmers y Katzer, 2013; Šlapeta, 2013).

**Tabla 1.3. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* identificados en ganado vacuno**

Especies	Distribución	Referencias
<i>C. parvum</i>	Mundial	Al Mawly <i>et al.</i> , 2015; Cul <i>et al.</i> , 2014; Helmy <i>et al.</i> , 2013; Meireles <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2010; Santín y Trout, 2008
<i>C. bovis</i>	Mundial	Abeywardena <i>et al.</i> , 2013; Budu-Amoako <i>et al.</i> , 2012a, b; Follet <i>et al.</i> , 2011; Maikai <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2011b; Silverlas <i>et al.</i> , 2010b, 2009b; Fayer <i>et al.</i> , 2006
<i>C. ryanae</i>	Mundial	Mahfouz <i>et al.</i> , 2014; Budu-Amoako <i>et al.</i> , 2012a, b; Meireles <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2011b; Santín <i>et al.</i> , 2008; Halim <i>et al.</i> , 2008; Plutzer y Karanis, 2007
<i>C. andersoni</i>	Mundial	Mahfouz <i>et al.</i> , 2014; Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2011b; Ralston <i>et al.</i> , 2010; Santín y Trout, 2008
<i>C. suis</i>	Bélgica, EE. UU, Dinamarca, Sri Lanka, Zambia, Madagascar	Bodager <i>et al.</i> , 2015; Abeywardena <i>et al.</i> , 2014; Fayer <i>et al.</i> , 2006; Geurden <i>et al.</i> , 2006; Xiao y Cama., 2006; Enemark <i>et al.</i> , 2003
<i>C. hominis</i>	Escocia, China, Corea, Kenia, India, Nueva Zelanda, Malawi	Abeywardena <i>et al.</i> , 2012; Chen y Huang, 2012; Kangéthe <i>et al.</i> , 2012; Roy <i>et al.</i> , 2010; Banda <i>et al.</i> , 2009; Feng <i>et al.</i> , 2007b; Park <i>et al.</i> , 2006; Smith <i>et al.</i> , 2005
<i>C. scrofarum</i>	Dinamarca	Langkjær <i>et al.</i> , 2007
<i>C. serpentis</i>	Irán, China	Chen y Huang, 2012; Azami <i>et al.</i> , 2007
<i>C. felis</i>	Polonia, España	Cardona <i>et al.</i> , 2015; Bornay-Llinares <i>et al.</i> , 1999
<i>C. canis</i>	EE. UU	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. meleagridis</i>	China, Portugal	Zhang <i>et al.</i> , 2013; Mendoca <i>et al.</i> , 2007
<i>C. wairi</i>	Irán	Azami <i>et al.</i> , 2007; Chrisp <i>et al.</i> , 1992
<i>C. baileyi</i>	Irán	Azami <i>et al.</i> , 2007
<i>C. ubiquitum</i>	Francia, Italia, Suecia, China	Björkman <i>et al.</i> , 2015; Ma <i>et al.</i> , 2014; Di Piazza <i>et al.</i> , 2013; Follet <i>et al.</i> , 2011
<i>C. tyzzeri</i>	China	Chen y Huang, 2012
<i>C. suis-like</i>	Dinamarca, India, China, Taiwán, Bélgica, Australia, Reino Unido	Ma <i>et al.</i> , 2015; Abeywardena <i>et al.</i> , 2013 a, b; Robinson <i>et al.</i> , 2011; Khan <i>et al.</i> , 2010; Geurden <i>et al.</i> , 2007; Langkjær <i>et al.</i> , 2007; Watanabe <i>et al.</i> , 2005
<i>C. parvum-like</i>	Nueva Zelanda, Kenia, EE. UU, Canadá	Shrestha <i>et al.</i> , 2014; Kang'ethe <i>et al.</i> , 2012; Lu <i>et al.</i> , 2008; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Starkey <i>et al.</i> , 2006; Yang <i>et al.</i> , 2004; Heitman <i>et al.</i> , 2002
<i>C. xiaoi</i>	Jordania, Irlanda, China, Taiwán	Hijjawi <i>et al.</i> , 2016; Mirhashemi <i>et al.</i> , 2016; Ma <i>et al.</i> , 2014; Watanabe <i>et al.</i> , 2005

Además, *C. parvum* se considera la especie más patógena en rumiantes domésticos, pues es la principal responsable de la aparición de importantes brotes de diarrea neonatal (Santín *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006; Santín y Trout, 2008; Amer *et al.*, 2013, Díaz *et al.*, 2014). Por ello, es la especie predominante en aquellos estudios de casos clínicos (Quílez *et al.*, 2008a; Díaz *et al.*, 2010a; Imre *et al.*, 2011), aunque también se ha identificado como la especie más frecuente o incluso la única presente en vacuno con o sin diarrea (Learmonth *et al.*, 2003; Santín *et al.*, 2004; Castro-Hermida *et al.*, 2006a,b, 2007, 2011; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Fayer *et al.*, 2007; Karanis, 2007; Brook *et al.*, 2009; Duranti *et al.*, 2009; Amer *et al.*, 2010; Maurya *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014; Wells *et al.*, 2015; dos Santos Toledo *et al.*, 2017).

Los ooquistes de *C. bovis* (Xiao *et al.*, 2002b; Santín *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2005) son morfológicamente indistinguibles de los de *C. parvum*; por ello, Fayer *et al.* (2005) renombró esta especie tras caracterizarla molecularmente para los genes de la SSU rRNA, la Hsp70 y la actina. *C. bovis* tiene un rango de hospedadores limitado, siendo una especie bien adaptada al ganado vacuno y menos patógena que *C. parvum*, ya que su infección suele cursar de forma asintomática (Feng *et al.*, 2007a; Silverlås *et al.*, 2010 a, b); sin embargo, se han hallado casos de animales diarreicos que eliminaban ooquistes de esta especie (Lee *et al.*, 2016). *C. bovis* es una especie cosmopolita, pues se ha identificado en ganado vacuno de todo el mundo (Xiao *et al.*, 2002b, 2006, 2007, Geurden *et al.*, 2006, Langkjær *et al.*, 2007, Coklin *et al.*, 2007, Feng *et al.*, 2007a; Siwila *et al.*, 2007, Thomaz *et al.*, 2007, Thompson *et al.*, 2007, Feltus *et al.*, 2008). Además, diversas investigaciones han resaltado la importancia de esta especie en el ganado bovino, al reconocerla como la especie predominante en países como Australia (Abeywardena *et al.*, 2013a), China (Zhang *et al.*, 2015), Dinamarca (Langkjær *et al.*, 2007), Francia (Rieux *et al.*, 2013), India (Feng *et al.*, 2007a; Khan *et al.*, 2010), Japón (Murakoshi *et al.*, 2012), Nigeria (Maikai *et al.*, 2011; Ayinmode *et al.*, 2010), República Checa (Ondráčková *et al.*, 2009), Suecia (Silverlås *et al.*, 2010b) y EE.UU. (Santín *et al.*, 2004, 2008; Fayer *et al.*, 2006, 2007). Por el contrario, los casos de infecciones por *C. bovis* en seres

humanos son esporádicos y se han detectado en países como Australia (Ng *et al.*, 2012), Egipto (Helmy *et al.*, 2013) o la India (Khan *et al.*, 2010).

*C. ryanae* se nombró en un principio como genotipo “deer-like” debido a que su secuencia 18S rRNA era muy similar a un genotipo hallado en ciervos, a pesar de que nunca se detectó en estos hospedadores (Xiao *et al.*, 2002a). Basándose en estudios genéticos, así como en la morfología y en su forma de transmisión, se le consideró una nueva especie (Fayer *et al.*, 2008). Según Santín *et al.* (2008) y Silverlås *et al.* (2010 a, b), el hospedador primario de *C. ryanae* es el ganado bovino, aunque también se ha hallado en yaks (Ma *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2015 a; Li *et al.*, 2016), corzos (García-Prevedo *et al.*, 2013), ciervos de cola blanca (Santín y Fayer, 2015), zorros (Sturdee *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2004; Hammes *et al.*, 2007; Nagano *et al.*, 2007; Beck *et al.*, 2011a; Ravaszová *et al.*, 2012), cebúes y búfalos (Abeywardena *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2012; Amer *et al.*, 2013; Bhat *et al.*, 2013; Inpankaew *et al.*, 2014; Aquino *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016; Swain, 2016; Hingole *et al.*, 2017). Actualmente se considera poco prevalente en ganado vacuno; de hecho, solo en un estudio se ha identificado como la especie predominante (Nguyen *et al.*, 2012). Sin embargo, presenta una amplia distribución geográfica, pues se ha identificado en los cinco continentes (Santín *et al.*, 2004, 2008; Fayer *et al.*, 2006; Plutzer y Karanis, 2007; Halim *et al.*, 2008; Follet *et al.*, 2011; Meireles *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011b; Budu- Amoako *et al.*, 2012a, b; Abeywardena *et al.*, 2013a; Mahfouz *et al.*, 2014). Los bovinos infectados con esta especie no presentan, por lo general, signos clínicos compatibles con criptosporidiosis (Fayer, 2010); además, no es zoonótica, por lo que carece de interés en salud pública (Šlapeta, 2013).

En los rumiantes, *C. andersoni* se describió originalmente como *C. muris* genotipo A o *C. muris* genotipo bovino basándose en el tamaño de su ooquistes, ya que morfológicamente son similares a los de esta especie (Šlapeta, 2013). Posteriormente, mediante técnicas moleculares se comprobó que presenta una secuencia única del gen SSU rRNA (Morgan *et al.*, 2000). A diferencia de *C. muris*, esta

especie posee un estrecho rango de hospedadores, fundamentalmente bovinos, aunque también se ha identificado en otros rumiantes como ovejas, cabras y camellos (Guyot *et al.*, 2001; Enemark *et al.*, 2002; Koyama *et al.*, 2005; Matsubayashi *et al.*, 2005; Fayer *et al.*, 2006; Kvac *et al.*, 2006; Leoni *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2006; Morse *et al.*, 2007; Waldron *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011b; Agholi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014). En el ganado vacuno, esta especie muestra una distribución mundial, aunque es especialmente frecuente en China, donde numerosos estudios la han identificado como la especie predominante (Liu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011b; Zhao *et al.*, 2013, 2014; Ma *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2015b); también fue la especie más frecuentemente identificada en otros países como Canadá (Dixon *et al.*, 2011) y la India (Paul *et al.*, 2009). Muestra una localización abomasal, y generalmente su presencia no está asociada a la aparición de signos clínicos (Kváč y Vítovec, 2003), aunque se han señalado algunos casos de animales infectados con esta especie que presentaban diarrea (Kváč *et al.*, 2011). Además, esta especie no se considera zoonótica (Santín *et al.*, 2004; Šlapeta, 2013), aunque se ha identificado esporádicamente en personas en Francia (Guyot *et al.*, 2001), la India (Hussain *et al.*, 2017), Malawi (Morse *et al.*, 2007) y el Reino Unido (Leoni *et al.*, 2006).

A pesar de que las cuatro especies de *Cryptosporidium* más frecuentes en el ganado vacuno presentan una distribución mundial, los resultados moleculares obtenidos hasta el momento sugieren que su importancia varía al considerar la zona geográfica, existiendo notables diferencias regionales (Wang *et al.*, 2011b). Así, en Europa, *C. parvum* es la especie más frecuente en los bovinos (Díaz *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2010; Göhring *et al.*, 2014), mientras que *C. bovis* es la especie predominante en países como China, Australia, India y EE. UU, así como en algunos países europeos (Santín *et al.*, 2004, 2008; Khan *et al.*, 2010; Silverlas *et al.*, 2010b; Wang *et al.*, 2011b; Abeywardena *et al.*, 2013; Rieux *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Por otro lado, *C. ryanae* a pesar de su amplia distribución geográfica, sólo se ha encontrado como la especie predominante en un estudio realizado en Vietnam (Nguyen *et al.*, 2012). Asimismo, *C. andersoni* es especialmente frecuente en algunos países de Asia y América,



como China, Brasil y Canadá (Zhou *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Sevá *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014).

#### 1.4.1.2. Relación entre la edad de los animales y las especies identificadas

Respecto a la posible relación entre la edad de los animales y los porcentajes de infección por *Cryptosporidium* spp., la mayoría de los estudios coinciden en que la prevalencia está inversamente relacionada con la edad, de modo que los animales más jóvenes presentan los porcentajes de infección más elevados (Santín *et al.*, 2004; Santín y Trout, 2008; Keshavarz *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Maikai *et al.*, 2011; Muhid *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2014). Así, en ganado vacuno de EE.UU., Santín *et al.* (2008), observaron que el 45,8% de los animales de 1-8 semanas de edad eran positivos, mientras que únicamente el 18,5% de los de 3-12 meses de edad y el 2,2% de los 12-24 meses de edad eliminaban ooquistes del protozoo. En la India, Khan *et al.* (2010) apreciaron una prevalencia significativamente superior en terneros neonatos (20%) que en adultos (4,4%). En el mismo sentido, Gong *et al.* (2017) en China, apreciaron los porcentajes de infección más elevados en terneros neonatos (19,5%) mientras que los más reducidos se hallaron en los adultos (4,9%), siendo estas diferencias significativas. En Galicia, Castro-Hermida *et al.* (2006a) observaron un patrón similar, pues la prevalencia fue significativamente más elevada en los menores de un mes (58,5%), descendiendo hasta el 7,9% en los animales adultos. Todos estos datos confirman que los terneros neonatos son los más receptivos a la infección por *Cryptosporidium* spp., y por ello los animales de 1 a 3 semanas de edad muestran los porcentajes de infección más elevados (Ortega-Mora y Wright, 1994; Quílez *et al.*, 1996a; De la Fuente *et al.*, 1999; Causapé *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2002b, 2006a; Santín *et al.*, 2004; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2006; Soilán, 2014). De hecho, los terneros que adquieren la infección poco después de nacer suelen mostrar los primeros signos clínicos entre los 3 y 5 días de edad, siendo especialmente frecuentes entre los 8 y los 12 días (Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Soilán, 2014). La receptividad

disminuye considerablemente con la edad, lo que se traduce en prevalencias mucho más bajas en animales adultos, generalmente inferiores al 10%; por ello, varios autores defienden que los animales de más edad pueden desempeñar un papel importante en la transmisión del protozoo al actuar como portadores asintomáticos, eliminando un número reducido de ooquistes de forma periódica e intermitente, aunque suficiente para infectar a los animales recién nacidos, muy sensibles (Vergara y Quílez, 2004; Díaz *et al.*, 2014; Robertson *et al.*, 2014; García-Meniño *et al.*, 2015; dos Santos Toledo *et al.*, 2017); esta situación se produce sobre todo en el periparto como consecuencia de la inmunodepresión que originan los cambios hormonales durante el parto y la lactación (Ortega-Mora *et al.*, 1999; Santín *et al.*, 2004; Vergara y Quílez, 2004; García-Meniño *et al.*, 2015). Por el contrario, los resultados de algunas investigaciones señalan menores prevalencias de infección por el protozoo en los animales más jóvenes (Fiuza *et al.*, 2011; do Couto *et al.*, 2014), sugiriendo que este patrón podría deberse al manejo empleado en las granjas estudiadas.

Al estudiar la posible relación de *Cryptosporidium* spp. con la edad de los bovinos, la mayoría de las investigaciones señalan que la presencia de las especies de *Cryptosporidium* más frecuentes en este ganado (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni*) está relacionada con la edad (Peng *et al.*, 2003; Santín *et al.*, 2004, 2008; Fayer *et al.*, 2006, 2008; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Coklin *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2007; Plutzer y Karanis, 2007; Thompson *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2014). Así, se aprecia una secuencia cronológica de aparición de las especies de *Cryptosporidium* desde el nacimiento de los animales hasta la edad adulta. Los terneros lactantes menores de 8 semanas son más receptivos a la infección por *C. parvum*, que es responsable en gran medida de la aparición de importantes brotes de diarrea neonatal en granjas de ganado vacuno (Kvác *et al.*, 2006; Plutzer y Karanis, 2007; Thompson *et al.*, 2007; Quílez *et al.*, 2008a; Santín y Trout, 2008; Díaz *et al.*, 2010a; Navarro-i-Martinez *et al.*, 2011; Rieux *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2014); por ello, los terneros lactantes se consideran el reservorio más importante de *C. parvum* para el ser humano (Wang *et al.*, 2011). También se han hallado en

estos animales lactantes, aunque con menor prevalencia, otras especies como *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni*, siendo especialmente frecuentes en animales sin diarrea (Feng *et al.*, 2007a; Silverlås *et al.*, 2010a; Kvac *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2014; Robertson *et al.*, 2014); esto podría deberse a que, en áreas donde *C. parvum* es endémico, la alta tasa de infección y la intensidad de eliminación de esta especie en terneros lactantes probablemente enmascare la coinfección con esas especies del protozoo (Feng *et al.*, 2007a).

Por el contrario, los animales de mayor edad están parasitados por especies más adaptadas al ganado vacuno y menos patógenas que *C. parvum*, aunque esta especie puede aparecer en un pequeño porcentaje de estos bovinos; en este sentido, Santín *et al.* (2008) observaron que *C. parvum* estaba presente en el 97% de los terneros lactantes infectados, pero únicamente en el 4% de los terneros destetados y en ninguna novilla. Por todo ello, la existencia de manifestaciones clínicas relacionadas con el protozoo es poco frecuente en estos animales. En bovinos de entre 2-11 meses, las especies predominantes son *C. bovis* y *C. ryanae*, mientras que *C. andersoni* es la especie más importante en vacas mayores de 1 año (Kvác y Vítovec, 2003; Sturdee *et al.*, 2003; Santín *et al.*, 2004, 2008; Fayer *et al.*, 2005, 2006, 2007; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007b; Thompson *et al.*, 2007; Thomaz *et al.*, 2007; Broglia *et al.*, 2008; Feltus *et al.*, 2008; Meireles *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2014). No obstante, Follet *et al.* (2011) comprobaron que un mismo animal podía infectarse de forma sucesiva con *C. parvum*, *C. ryanae* y *C. bovis*. Estos resultados sugieren que, tras el destete, los terneros, novillas y bovinos adultos no poseerían una gran importancia como reservorios de la infección para los terneros más jóvenes al no ser portadores de *C. parvum*.

Sin embargo, los resultados de numerosos estudios no coinciden completamente con el patrón “clásico” descrito anteriormente; varios autores sugieren que estas diferencias se deben principalmente a la zona geográfica, aunque también podrían relacionarse con el manejo de los animales (Fayer *et al.*, 2007; Murakoshi *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2015b).

Las diferencias más evidentes se observan en ganado vacuno de Brasil y China, donde la mayoría de los estudios realizados muestran una distribución de especies única, señalando prevalencias muy elevadas de *C. andersoni* que es, en muchos casos, la especie más frecuente en todos los grupos de edad; es especialmente llamativa la predominancia de esta especie en los terneros más jóvenes, incluso en los lactantes, donde *C. parvum* suele ser la más común. En China los resultados son consistentes debido al gran número de muestras analizadas en los diferentes estudios realizados. En general, los resultados muestran que *C. parvum* es poco prevalente en el ganado vacuno chino, aunque se detectó esporádicamente en terneros lactantes, donde predominan *C. bovis* y *C. ryanae*; por el contrario, *C. andersoni*, aunque está presente en todos los grupos de edad, es claramente la especie predominante a partir de los 3 meses (Zhou *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2013, 2015; Zhao *et al.*, 2013, 2014; Huang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2015b, 2016; Gong *et al.*, 2017). De todos modos, se observan patrones diferentes al considerar la zona estudiada, que podrían deberse a diferencias geográficas (Qi *et al.*, 2016) o a un número demasiado reducido de muestras analizadas en determinados grupos de edad (Huang *et al.*, 2014). Así, varias investigaciones señalan a *C. andersoni* como la especie más frecuente en todos los grupos de edad, incluidos los más jóvenes, aunque las mayores prevalencias se hallaron tras el destete (Zhao *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2016). Otros estudios chinos también señalan a *C. andersoni* como la especie más común en el ganado bovino tras el destete, aunque difieren con los anteriores en que *C. bovis* (Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013, 2015; Qi *et al.*, 2015a) o *C. parvum* (Wang *et al.*, 2011b; Huang *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2015b; Li *et al.*, 2016) es la predominante en los animales lactantes. Por el contrario, Ma *et al.* (2015) observaron que la especie más común en los terneros lactantes y destetados era *C. bovis*, mientras que la presencia de *C. andersoni* se incrementaba gradualmente con la edad de los animales, siendo la especie predominante en las novillas y bovinos adultos.

Además, las investigaciones realizadas en Brasil muestran resultados similares a los obtenidos en China, aunque por lo general,

analizan un reducido número de animales, por lo que el número de aislados identificados es escaso; aun así, Paz e Silva *et al.* (2014) hallaron que *C. andersoni* predominaba en todos los grupos de edad estudiados, mientras que *C. bovis* solo se detectó en un limitado número de muestras procedentes de animales menores de 4 meses, y *C. parvum* en terneros de 2-3 meses. Otros trabajos parecen confirmar este patrón; así, Sevá *et al.* (2010), tras analizar muestras fecales de 197 animales, sólo identificaron *C. andersoni* en 6 terneros menores de 3 meses, mientras que Fiuza *et al.* (2011) únicamente detectaron esta especie en 4 muestras pertenecientes a animales de aproximadamente 7 meses de edad. Otros trabajos realizados en Brasil también señalan a *C. andersoni* como la especie más frecuente en el ganado vacuno, aunque a partir de los 3-6 meses de edad, mientras que en los animales más jóvenes predomina *C. parvum* (do Couto *et al.*, 2014) o *C. ryanae* (Lima *et al.*, 2013). Además, dos investigaciones realizadas en terneros menores de 2 meses muestran que *C. parvum* es la especie predominante en ese rango de edad, aunque el número de aislados identificados es reducido (Huber *et al.*, 2007; Meireles *et al.*, 2011); es interesante señalar que estos autores también identificaron otras especies del protozoo, como *C. andersoni* o *C. ryanae*, en estos terneros lactantes, lo que podría ser indicativo del incremento de su importancia en los animales de mayor edad.

Aunque la predominancia de *C. andersoni* en los bovinos mayores de 2 meses es muy común en ganado vacuno de Brasil y China, también se ha hallado en otros países asiáticos y africanos, como Egipto (Amer *et al.*, 2013), India (Paul *et al.*, 2009), Irán (Keshavarz *et al.*, 2009) o Mongolia (Burenbaatar *et al.*, 2008), así como en algunos países europeos (Robinson *et al.*, 2006; Ondrácková *et al.*, 2009). Los resultados de todos estos estudios demuestran que *C. andersoni* no infecta específicamente al ganado vacuno adulto, si no que los bovinos de cualquier edad pueden ser receptivos a la infección por esta especie, especialmente en Brasil y China. Además, en el ganado vacuno de estos países, *C. parvum* parece poco importante, ya que su aparición se restringe principalmente a un reducido número de terneros lactantes; por ello, los bovinos estarían infectados principalmente por especies del protozoo muy específicas de

hospedador y sin potencial zoonótico, por lo que no supondrían un riesgo para la Salud Pública.

Algunas investigaciones, aunque escasas, han señalado a *C. parvum* como la especie predominante en todos los grupos de edad. Así, Wells *et al.* (2015), en Escocia, observaron que todos los terneros (36) y vacas adultas (23) positivas eliminaban ooquistes de *C. parvum*, observando infecciones mixtas con *C. bovis* y *C. ryanae* en 5 de los más jóvenes, y con *C. bovis* y *C. andersoni* en 2 adultos. En el mismo sentido, dos Santos Toledo *et al.* (2017), en granjas de ganado vacuno de Brasil, observaron que *C. parvum* era la especie más frecuentemente identificada en todos los grupos de edad, constituyendo el 100% de las especies identificadas en los animales de 0-2 meses, el 58,7% en los de 2-4 meses, el 66,7% en los de 4-6 meses y en los de 6-12 meses y el 55,6% de los de más de 2 años. Estos resultados también coinciden con los hallados por Castro-Hermida *et al.* (2006b, 2007) en bovinos de Galicia, pues sólo detectaron la presencia de *C. parvum* en 41 novillas y en 10 animales de entre 3 y 13 años de edad. Sin embargo, en un trabajo posterior realizado en la misma área de estudio, comprobaron que *C. parvum* era también la especie predominante en terneros neonatos (100% de los positivos) y en novillas (13 *C. parvum* y 10 *C. andersoni*), mientras que en las vacas adultas *C. andersoni* se identificó en un mayor número de muestras (7) que *C. parvum* (3) (Castro-Hermida *et al.*, 2011). Estos estudios sugieren que, en ciertas zonas, el ganado vacuno, incluso aquellos animales de mayor edad, son importantes portadores de especies zoonóticas y, por tanto, pueden constituir una fuente de infección para las personas. Además, los animales adultos actuarían como reservorios de la infección para los terneros más jóvenes, incrementando la contaminación ambiental con ooquistes de *C. parvum* y, en consecuencia, contribuyendo a la infección de los terneros recién nacidos y a la aparición de brotes de diarrea neonatal en las granjas (Martins-Vieira *et al.*, 2009).

Otra de las variaciones al “patrón clásico” anteriormente descrito es la ausencia o baja presencia de *C. parvum* en los terneros sin destetar, en los que predomina *C. bovis* y en menor medida *C. ryanae* que, además, son las especies más frecuentes en los terneros

destetados. Esta distribución de especies se ha hallado en países de los cinco continentes, como Australia, Canadá, China, Francia, India, Japón, Malasia, Nigeria, Sri Lanka, Suecia o Zambia (Geurden *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007b, 2012; Feltus *et al.*, 2008; Ayinmode *et al.*, 2010; Fayer *et al.*, 2010; Silverlås *et al.*, 2010a; Maikai *et al.*, 2011; Muhid *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011b; Budu-Amoako *et al.*, 2012a; Murakoshi *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2012; Rieux *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Abeywardena *et al.*, 2014). En este sentido, Silverlås *et al.* (2009b; 2010b) en Suecia, no hallaron ningún animal infectado con *C. parvum*, comprobando que *C. bovis* era la especie más prevalente tanto en terneros como en bovinos jóvenes, así como la única hallada en adultos; además *C. ryanae* se detectó en terneros y jóvenes (6,8% y 11,8% respectivamente). Estos estudios indican que, en ciertas zonas, el ganado vacuno podría no constituir un importante riesgo zoonótico para el ser humano. La razón por la que, en estos estudios, *C. bovis* predomina claramente sobre *C. parvum* no está totalmente aclarada, aunque varios autores sugieren que puede responder al método empleado para realizar el análisis genotípico; así, el estudio de las secuencias obtenidas mediante PCR no es una técnica útil para la detección de infecciones por varias especies del protozoo, debido a la copia exponencial de las cadenas de ADN (Feng *et al.*, 2007b; Qi *et al.*, 2015b). Por ello, esta técnica podría enmascarar infecciones por *C. parvum* cuando ésta no es la especie predominante. Qi *et al.* (2015b) señalan que el empleo de otras técnicas, como la PCR-RFLP, el análisis del gen GP60 o el clonado de los productos de PCR podrían ayudar a detectar la presencia de infecciones mixtas.

En algunos trabajos realizados en la República Checa se observó la presencia de las especies más frecuentes en el ganado vacuno, a excepción de *C. ryanae* (Ondráčková *et al.*, 2009; Kvac *et al.*, 2011). Finalmente, en Nueva Zelanda, Abeywardena *et al.* (2012) observaron un patrón extraño, donde *C. hominis* representó el 80% de los aislados positivos identificados tanto en los terneros lactantes como en los destetados; estos resultados podrían deberse al pequeño tamaño de la muestra ( $n= 180$ ) empleado en este estudio y al reducido número de aislados caracterizados molecularmente (15).

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

Actualmente, las técnicas moleculares dirigidas al gen de la glicoproteína de 60 kDa (GP60) han incrementado notablemente la capacidad de identificar y diferenciar los genotipos y subtipos zoonóticos de *Cryptosporidium* (Strong *et al.*, 2000; Jex y Gasser, 2010; Rieux *et al.*, 2013a). Estas técnicas pueden emplearse para investigar la distribución de las variantes de determinadas especies de *Cryptosporidium* en animales y en humanos en diferentes regiones geográficas (Robertson *et al.*, 2014). Debido a que *C. parvum* es la especie zoonótica identificada con mayor frecuencia en el ganado vacuno, los análisis subgenotípicos se han centrado en el estudio de esta especie. En base a los datos proporcionados por estas técnicas, se han identificado más de 80 subtipos diferentes de *C. parvum* pertenecientes a cuatro familias alélicas (IIa, IIc, IIj y III) (Tabla 1.4.). De todas ellas, la familia alélica IIa de *C. parvum* parece ser la más frecuente y ampliamente distribuida en el ganado vacuno (Jex y Gasser, 2010), con más de 60 subtipos diferentes (Tabla 1.4.); sin embargo, es interesante destacar que en el ganado vacuno de China se ha observado que esta familia alélica no es la más común (Wang *et al.*, 2014). Aunque para identificar el subtipo GP60 se emplea fundamentalmente la secuenciación, este método sólo permite detectar el alelo más frecuente en la muestra, impidiendo la evaluación de cualquier diversidad alélica y, consecuentemente, la presencia de infecciones mixtas (Grinberg *et al.*, 2013; Quinones-Mateu *et al.*, 2014); sin embargo, diversos autores sí han señalado la presencia de varios subtipos en una misma granja, y empleando otra metodología, también los han hallado en un mismo animal (Thompson *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007; Quílez *et al.*, 2008a).

Muchos de los subtipos pertenecientes a la familia IIa detectados en el ganado vacuno tienen potencial zoonótico, pudiendo afectar también a los seres humanos; de hecho, en varios estudios se han aislado los mismos subtipos de *C. parvum* en muestras de bovinos y personas procedentes de la misma región (Alves *et al.*, 2006a; Geurden *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2008; Wielinga *et al.*, 2008; Xiao y Fayer, 2008; Budu-Amoako *et al.*, 2012b; Rahmouni *et al.*, 2014; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016).



Tabla 1.4. Subtipos de *C. parvum* identificados en muestras de ganado bovino

Subtipo	Lugar	Referencia
IlaA10G1R1	Eslovenia	Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IlaA11G2R1	España	Soilán, 2014
IlaA13R1	Eslovenia	Soba y Logar, 2008
IlaA13G1R1	España, Suecia,	Díaz <i>et al.</i> , 2010a; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Soilán, 2014
IlaA13G1R2	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA13G2R1	Argelia, Bélgica, Canadá, España, Holanda, Turquía	Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2006; Geurden <i>et al.</i> , 2007; Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Soilán, 2014; Taylan-Ozkan <i>et al.</i> , 2016; Benhouda <i>et al.</i> , 2017
IlaA14R1	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA14G2R1	Alemania, Bélgica, Brasil, China	Geurden <i>et al.</i> , 2007; Broglia <i>et al.</i> , 2008; Mi <i>et al.</i> , 2013; Heckler <i>et al.</i> , 2015
IlaA14G1R1	China, Polonia	Mi <i>et al.</i> , 2013; Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IlaA14G1R1b	Egipto, Suecia,	Amer <i>et al.</i> , 2013; Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA14G1R1r1b	Egipto	Amer <i>et al.</i> , 2013
IlaA14G2R2	Brasil	do Couto <i>et al.</i> , 2014
IlaA15G2R1	Mundial	Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2006; O'Brien <i>et al.</i> , 2008; Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Díaz <i>et al.</i> , 2010a, 2012; Budu-Amoako <i>et al.</i> , 2012a; Mi <i>et al.</i> , 2013; Silva <i>et al.</i> , 2013; Rahmouni <i>et al.</i> , 2014; Smith <i>et al.</i> , 2014; Soilán, 2014; Aita <i>et al.</i> , 2015; Ichikawa-Seki <i>et al.</i> , 2015; Ramo <i>et al.</i> , 2015; Danisova <i>et al.</i> , 2016; Murakoshi <i>et al.</i> , 2016; Matsura <i>et al.</i> , 2017
IlaA15G2R2	EE. UU, Inglaterra y Gales, República Checa	Xiao <i>et al.</i> , 2007; Kvac <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2014
IlaA15G1R1	Brasil, China, Egipto	Amer <i>et al.</i> , 2013; Helmy <i>et al.</i> , 2013; Silva <i>et al.</i> , 2013; Mahfouz <i>et al.</i> , 2014; Feng <i>et al.</i> , 2017
IlaA15G4R1	Chile	Mercado <i>et al.</i> , 2015
IlaA16G1R1	Mundial	Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2006; Mistic y Abe, 2007; Plutzer y Karanis, 2007; Broglia <i>et al.</i> , 2008; Soba y Logar, 2008; Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Ondráčková <i>et al.</i> , 2009; Silverlås, <i>et al.</i> , 2010b, 2013; Imre <i>et al.</i> , 2011, 2013; Kváč <i>et al.</i> , 2011; Insulander <i>et al.</i> , 2013; del Coco <i>et al.</i> , 2014; Lassen <i>et al.</i> , 2014; Soilán, 2014; Björkman <i>et al.</i> , 2015; Vieira <i>et al.</i> , 2015
IlaA16G1R1b	Belgrado, Polonia, Suecia, Serbia y Montenegro	Mistic y Abe, 2007; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IlaA16G2R1	Bélgica, Canadá, China, España, Portugal	Alves <i>et al.</i> , 2006a; Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2006; Geurden <i>et al.</i> , 2007; Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Budu-Amoako <i>et al.</i> , 2012a; Mi <i>et al.</i> , 2013; Soilán, 2014

Tabla 1.4. (continuación)

Subtipo	Lugar	Referencia
IlaA16G3R1	Australia, Canadá, China, Corea, EE. UU, España, Inglaterra, Irlanda del Norte, Irán, Nueva Zelanda, Polonia	Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2006; Xiao <i>et al.</i> , 2007; Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Nolan <i>et al.</i> , 2009; Díaz <i>et al.</i> , 2010a, 2012; Xiao, 2010; Nazemalhosseini-Mojarad <i>et al.</i> , 2011; Budu- Amoako <i>et al.</i> , 2012a; Mi <i>et al.</i> , 2013; Shrestha <i>et al.</i> , 2014; Soilán, 2014; Kaupke <i>et al.</i> , 2015; Lee <i>et al.</i> , 2016
IlaA16G3R2	Brasil	do Couto <i>et al.</i> , 2014
IlaA16G4R1	Chile	Mercado <i>et al.</i> , 2015
IlaA16R1	Eslovenia	Soba y Logar, 2008
IlaA16G1	Túnez	Rahmouni <i>et al.</i> , 2014
IlaA16GR1	Argentina, Jordania, Rumania, Suecia,	Silverlas <i>et al.</i> , 2010b, 2013; Imre <i>et al.</i> , 2013; Insulander <i>et al.</i> , 2013; del Coco <i>et al.</i> , 2014; Kinross <i>et al.</i> , 2015; Hijjawi <i>et al.</i> , 2016
IlaA17G1R1	Argentina, Holanda, Inglaterra y Gales, Polonia, Suecia,	Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Tomazic <i>et al.</i> , 2013; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Smith <i>et al.</i> , 2014; Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IlaA17G1R1c	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA17R1	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA17G1R2	Inglaterra y Gales	Smith <i>et al.</i> , 2014
IlaA17G2R1	Alemania, Australia, Brasil, Canadá, EE. UU, Eslovaquia, España, Inglaterra, Irlanda del Norte, Italia, Malasia, Polonia	Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2006; Thompson <i>et al.</i> , 2007; Xiao <i>et al.</i> , 2007; Broglia <i>et al.</i> , 2008; Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Duranti <i>et al.</i> , 2009; Nolan <i>et al.</i> , 2009; Muhid <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2014; Kaupke <i>et al.</i> , 2015; Danisova <i>et al.</i> , 2016; dos Santos Toledo <i>et al.</i> , 2017
IlaA17G4R1	Chile	Mercado <i>et al.</i> , 2015
IlaA18G1R1	Argentina, Belgrado, Brasil, Francia, Holanda, Hungría, Inglaterra, Republica Checa, Serbia y Montenegro, Suecia	Feltus <i>et al.</i> , 2006; Mistic y Abe, 2007; Plutzer y Karanis, 2007; Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Brook <i>et al.</i> , 2009; Silverlas <i>et al.</i> , 2010b, 2013; Kvac <i>et al.</i> , 2011; del Coco <i>et al.</i> , 2012, 2014; Tomazic <i>et al.</i> , 2013; do Couto <i>et al.</i> , 2014; Rieux <i>et al.</i> , 2014
IlaA18G2R1	Alemania, Francia, Eslovaquia, Hungría, Suecia,	Plutzer y Karanis, 2007; Broglia <i>et al.</i> , 2008; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Rieux <i>et al.</i> , 2014; Danisova <i>et al.</i> , 2016
IlaA18G2R1a	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009
IlaA18G2R1b	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009
IlaA18G1R1c	Polonia, Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IlaA18G1R1d	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA18G2R2	Brasil	do Couto <i>et al.</i> , 2014
IlaA18G3R1	Australia, Canadá, Corea, España, Gales, Inglaterra, Irlanda del Norte	Trotz-Williams <i>et al.</i> , 2006; Thompson <i>et al.</i> , 2007, 2008; O'Brien <i>et al.</i> , 2008; Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Ng <i>et al.</i> , 2012; Abeywardena <i>et al.</i> , 2013; Soilán, 2014; Lee <i>et al.</i> , 2016; Zahedi <i>et al.</i> , 2016a
IlaA18G4R1	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009
IlaA18A3R1	Malasia	Muhid <i>et al.</i> , 2011

Tabla 1.4. (continuación)

Subtipo	Lugar	Referencia
IlaA19G1R1	Argentina, Irlanda del Norte, Polonia	Thompson <i>et al.</i> , 2007; Xiao <i>et al.</i> , 2007; Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Ng <i>et al.</i> , 2012; del Coco <i>et al.</i> , 2014; do Couto <i>et al.</i> , 2014; Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IlaA19G2R1	Australia, Brasil, Francia, Holanda, Inglaterra, Jordania, Norte América,	Xiao <i>et al.</i> , 2007; Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Brook <i>et al.</i> , 2009; Ng <i>et al.</i> , 2012; Rieux <i>et al.</i> , 2013a; do Couto <i>et al.</i> , 2014; Hijjawi <i>et al.</i> , 2016
IlaA19G2R2	Brasil	do Couto <i>et al.</i> , 2014
IlaA19G3R1	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008a
IlaA19G3R1a	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009;
IlaA19G3R1b	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009
IlaA19G4R1	Nueva Zelanda	Shrestha <i>et al.</i> , 2014
IlaA20G1R1	Argentina, Belgrado, Serbia y Montenegro, Suecia	Misic y Abe, 2007; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Tomazic <i>et al.</i> , 2013; del Coco <i>et al.</i> , 2014
IlaA20G2R1	Australia, Brasil	Nolan <i>et al.</i> , 2009; do Couto <i>et al.</i> , 2014
IlaA20G2R2	Brasil	do Couto <i>et al.</i> , 2014
IlaA20G3R1	Australia, Inglaterra	Nolan <i>et al.</i> , 2009; Smith <i>et al.</i> , 2014
IlaA20G4R1	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009
IlaA21G0R1	Alemania	Broglia <i>et al.</i> , 2008
IlaA21G1R1	Argentina, Suecia	Del Coco <i>et al.</i> , 2012, 2014; Tomazic <i>et al.</i> , 2013; Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA21G1R1b	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IlaA21G3R1	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009
IlaA22G1R1	Alemania, Argentina, República Checa, Suecia	Broglia <i>et al.</i> , 2008; Kvac <i>et al.</i> , 2011; Tomazic <i>et al.</i> , 2013; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; del Coco <i>et al.</i> , 2014
IlaA23G1R1	Argentina	del Coco <i>et al.</i> , 2012, 2014; Tomazic <i>et al.</i> , 2013
IlaA23G3R1	Australia	Nolan <i>et al.</i> , 2009;
IIdA14G1	China	Qi <i>et al.</i> , 2015;
IIdA15G1	China, España, Holanda, Irán, Malasia, Turquía	Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Lv <i>et al.</i> , 2009; Nazemalhosseini-Mojarad <i>et al.</i> , 2011; Muhid <i>et al.</i> , 2011; Arslan y Ekinci, 2012; Zhang <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2016
IIdA16G1	Holanda, Túnez	Wielinga <i>et al.</i> 2008; Rahmouni <i>et al.</i> , 2014
IIdA17G1	China, España, Portugal,	Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Silverlas <i>et al.</i> , 2013a; Li <i>et al.</i> , 2016
IIdA17G1d	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IIdA18G1	China, Holanda, Turquía, Sudán	Wielinga <i>et al.</i> , 2008; Qi <i>et al.</i> , 2015; Taylan-Ozkan <i>et al.</i> , 2016; Taha <i>et al.</i> , 2017
IIdA18G1b	Belgrado, Serbia y Montenegro	Misic y Abe, 2007
IIdA19G1	China, Hungría Suecia, Sudán	Plutzer y Karanis, 2007; Wang <i>et al.</i> , 2011a, b, 2013; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Zhao <i>et al.</i> , 2014; Li <i>et al.</i> , 2016; Feng <i>et al.</i> , 2017; Taha <i>et al.</i> , 2017

Tabla 1.4. (continuación)

Subtipo	Lugar	Referencia
IIdA20G1	Egipto	Amer <i>et al.</i> , 2010,2013; Helmy <i>et al.</i> , 2013; Mahfouz <i>et al.</i> , 2014; Ibrahim <i>et al.</i> , 2016; Feng <i>et al.</i> , 2017
IIdA20G1b	Egipto, Turquía	Amer <i>et al.</i> , 2013; Taylan-Ozkan <i>et al.</i> , 2016
IIdA20G1e	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IIdA21G1a	Rumania	Vieira <i>et al.</i> , 2015
IIdA22G1	Alemania, Bélgica, Rumania, Suecia,	Geurden <i>et al.</i> , 2007; Broglia <i>et al.</i> , 2008; Silverlas <i>et al.</i> , 2013; Vieira <i>et al.</i> , 2015
IIdA22G1b	Polonia	Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IIdA22G1c	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013
IIdA23G1	España, Polonia, Suecia	Quílez <i>et al.</i> , 2008a; Silverlas <i>et al.</i> , 2013a; Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IIdA24G1c	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013a; Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IIdA25G1	Rumania	Vieira <i>et al.</i> , 2015;
IIdA26G1b	Suecia	Silverlas <i>et al.</i> , 2013a
IIdA27G1	Rumania, Suecia,	Björkman <i>et al.</i> , 2015; Vieira <i>et al.</i> , 2015
IIjA16R2	Belgrado, Serbia y Montenegro	Misic y Abe, 2007
IIjA17R2	Belgrado, Serbia y Montenegro	Misic y Abe, 2007
IIIA16R2	Eslovenia, Serbia y Montenegro	Misic y Abe, 2007; Soba y Logar, 2008
IIIA17R2	Serbia y Montenegro	Misic y Abe, 2007
IIIA18R2	Eslovenia	Soba y Logar, 2008
IIIA19R3	Polonia	Kaupke <i>et al.</i> , 2015
IIIA24R2	Lituania	Wielinga <i>et al.</i> , 2008

El subtipo IIdA15G2R1 de *C. parvum* se considera el más prevalente en terneros de todos los continentes, especialmente en naciones industrializadas (Trotz-Williams *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008a; Santín *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2010a, 2012; Silva *et al.*, 2013; Rahmouni *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2014; Soilán, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016; Ramo *et al.*, 2016; Matsura *et al.*, 2017); debido a que también es uno de los más frecuentes en los seres humanos, se considera el principal responsable de la criptosporidiosis zoonótica (Feltus *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Wielinga *et al.*, 2008; Xiao y Ryan, 2008; Díaz *et al.*, 2010a; Xiao, 2010; Silva *et al.*, 2013). Sin embargo, este subtipo no se ha identificado como el predominante en todos los países, pues en diversas regiones del Reino Unido (Inglaterra, Irlanda del Norte), así como en Australia y Nueva Zelanda, el IIdA18G3R1 fue el más común (Thompson *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2012; Abeywardena *et al.*,

2013b; Al Mawly *et al.*, 2015; Zahedi *et al.*, 2016a). Estudios recientes revelan que en Nueva Zelanda predomina el subtipo IIAA19G4R1 (Al Mawly *et al.*, 2015; Shrestha *et al.*, 2014). Por el contrario, en ganado vacuno de Argentina no se ha detectado el subtipo IIAA15G2R1, siendo especialmente frecuentes el IIAA20G1R1, el IIAA21G1R1 y el IIAA22G1R1 (Del Coco *et al.*, 2012, 2014). Otro subtipo muy común en bovinos es el IIAA16G1R1, siendo frecuente en el continente europeo, especialmente en los países del centro de Europa (Tabla 1.4), aunque también se ha identificado en algunos países americanos como Argentina (del Coco *et al.*, 2014), Brasil (dos Santos Toledo *et al.*, 2017), EE.UU. (Xiao *et al.*, 2007) y Canadá (Trotz-Williams *et al.*, 2006), así como en Australia (Nolan *et al.*, 2009) e Irán (Nazemalhosseini-Mojarad *et al.*, 2011),

La familia IId es la segunda más importante en ganado vacuno, tanto por su amplia distribución (se ha detectado en bovinos de todos los continentes, excepto en América) y frecuencia, como por su variabilidad genética, ya que hasta el momento se han identificado al menos 20 subtipos diferentes (Tabla 1.4). Además, la IId se incluye entre las familias zoonóticas de *C. parvum* más importantes, siendo junto a la IIA, las principales responsables de la criptosporidiosis zoonótica (Quílez *et al.*, 2008b; Amer *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2014; Björkman *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016). Así, los subtipos predominantes de esta familia subtípica son el IIdA15G1 y el IIdA18G1, que también se han detectado en personas en Asia (India, Irán, Jordania, Kuwait y Malasia), Europa (Holanda, Reino Unido) y Oceanía (Australia) (Tabla 1.4). De igual modo, se han identificado subtipos de la familia III en terneros de Eslovenia, Lituania, Polonia y Serbia y Montenegro, aunque restringidos a un pequeño número de aislados (Misic y Abe, 2007; Soba y Logar, 2008; Wielinga *et al.*, 2008; Kaupke *et al.*, 2015). La familia IIj únicamente se ha identificado en Belgrado, Serbia y Montenegro (Misic y Abe, 2007). Sin embargo, la familia IIc es antroponótica, y hasta ahora solo se ha encontrado en seres humanos, estando ausente en el ganado vacuno (Alves *et al.*, 2003, 2006; Xiao *et al.*, 2004b; Xiao y Ryan, 2004; Thompson *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2014).

También es interesante destacar que la mayoría de los subtipos

GP60 descritos en el ganado vacuno sólo presentan una copia de la secuencia ACATCA (R1), aunque ocasionalmente se han identificado algunos subtipos con dos copias de esta secuencia (R2) en Suecia y el Reino Unido (Inglaterra y Gales), así como en Norteamérica y Brasil (Feltus *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007; Silverlas *et al.*, 2013; do Couto *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2014).

En el ganado bovino en España, se han identificado principalmente 2 familias alélicas, la IIa y la IIId; la heterogeneidad de los aislados de *C. parvum* para este locus en España se puede considerar moderada pues se han detectado aproximadamente unos 10 subtipos, siendo los más frecuentes el IIaA15G1R1, IIaA16G3R1 y IIaA13G1R1 (Quílez *et al.*, 2008a; Soilán, 2014). En otras áreas geográficas, como Argentina, Bélgica, EE.UU. o Rumanía, se identificaron entre 5 y 7 subtipos en el ganado bovino (Xiao *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; Imre *et al.*, 2013; Del Coco *et al.*, 2014), mientras que en otros estudios realizados en Europa, se describieron un mayor número de subtipos GP60, alcanzando los 18 (Thompson *et al.*, 2007; Wielinga *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en España hasta el momento revelan que los terneros menores de 1 mes con diarrea deben considerarse un importante reservorio zoonótico (Quílez *et al.* 2008a; Soilán, 2014). Así, Quílez *et al.* (2008a) realizaron un estudio sobre la caracterización subgenotípica (GP60) de aislados de *Cryptosporidium* spp. procedentes de terneros menores de 21 días del norte de España, observando la presencia de dos familias alélicas (IIa y IIId), siendo el subtipo más frecuente el IIaA15G2R1 (75,7%) y, en menor proporción, se identificaron IIaA16G3R1 (10,0%), IIaA16G2R1 (2,8%), IIaA17G2R1 (2,8%), IIaA18G3R1 (5,7%), IIaA19G3R1 (1,4%) y IIIdA23G1 (1,4%). En este mismo sentido, Díaz *et al.* (2010a) en un estudio realizado en terneros diarreicos de hasta 21 días de edad en granjas de Galicia, observan solo la presencia de la familia alélica IIa, con el subtipo IIaA15G2R1 como el más común y ampliamente distribuido en terneros, identificándose en 26 aislados (96,3%), distribuidos a lo largo de 15 explotaciones; además identificaron en el resto de terneros el nuevo subtipo IIaA13G1R1. Posteriormente, Díaz *et al.* (2012) en terneros de la misma edad y de la misma zona geográfica comprobaron que predominaba el subtipo

IaA15G2R1 (78,3%) y en menor proporción el subtipo IaA13G1R1 (18,9%). Asimismo, Soilán (2014) en esta misma zona geográfica muestra la existencia de 8 subtipos diferentes pertenecientes a la familia alélica Ia. Al analizar la presencia de más de un subtipo GP60 en las explotaciones donde se identificaron varios aislados de *C. parvum*, detectaron que en la mayoría de las granjas aparecía un único alelo. Sin embargo, en 5 rebaños se observaron dos subtipos diferentes. En todos estos casos estuvo presente el subtipo IaA15G2R1 (76%), junto con el IaA16G3R1 (13%), y en menor proporción el subtipo IaA18G3R1 (2,5%), IaA13G1R1 y IaA16G2R1 (1,9%), IaA11G2R1 y IaA13G2R1 (1,2%) y IaA16G1R1 (0,6%). Algunos de los subtipos que se han encontrado en el ganado en Galicia (IaA13G1R1, IaA15G2R1, IaA16G3R1 y IaA18G3R1), habían sido previamente detectados en humanos de la misma zona, lo que indica que tienen potencial zoonótico (Navarro-i-Martínez *et al.*, 2003, 2010; Vergara y Quílez, 2004; Quílez *et al.*, 2008b; Soilán, 2014; Abal-Fabeiro *et al.*, 2015). El subtipo IaA15G2R1 está considerado como uno de los principales subtipos responsables de la criptosporidiosis en humanos (Glaberman *et al.*, 2002; Chalmers *et al.*, 2005; Sulaiman *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006). Por el contrario, los subtipos IaA16G3R1 y IaA13G1R1 poseen potencial zoonótico y se han detectado previamente en humanos en casos esporádicos y en un número reducido de aislados (Jex *et al.*, 2008; Soba y Logar, 2008; Zintl *et al.*, 2009, 2011; Ng *et al.*, 2011; De Chierico *et al.*, 2011; Waldron *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2012; del Coco *et al.*, 2014; Koehler *et al.*, 2014; Lassen *et al.*, 2014; Lobo *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2014). Quílez *et al.* (2008a) y Soilán (2014) observaron que el subtipo IaA18G3R1 presentaba una escasa importancia en el ganado vacuno de España, aunque era el más prevalente en ganado vacuno en Irlanda, Australia, Nueva Zelanda, aumentando el porcentaje de infección en humanos de estos países (Thompson *et al.*, 2007; Jex *et al.*, 2008; Zintl *et al.*, 2009, 2011; Waldron *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2012; Abeywardena *et al.*, 2013. Shrestha *et al.*, 2014).

### 1.4.2. En ganado ovino

La criptosporidiosis se describió por primera vez en estos rumiantes en Australia, concretamente, en corderos de entre 1 y 3 semanas de edad que presentaban diarrea (Barker y Carbonell, 1974). No obstante, el papel de *Cryptosporidium* spp. como agente etiológico primario que ocasiona diarrea en los ovinos se confirmó a principios de los años 80, tras la realización de infecciones experimentales con este protozoo en ausencia de otros enteropatógenos (Angus *et al.*, 1982a; Snodgrass *et al.*, 1984); desde entonces, su importancia como causante de diarreas neonatales en corderos se ha incrementado de forma progresiva. Así, en la actualidad se asocia con una alta morbilidad y baja mortalidad, aunque dependiendo de las condiciones ambientales y de la presencia de otros patógenos intestinales, estos procesos pueden ser fatales (Angus, 1990; Matos-Fernández *et al.*, 1994; Muñoz- Fernández *et al.*, 1996).

Según Robertson (2009) la prevalencia individual de *Cryptosporidium* spp. en ganado ovino, a nivel mundial, se aproxima al 30%, aunque varía de forma considerable entre los diferentes estudios realizados, oscilando entre el 5 y el 70%; esta variación depende de varios factores, entre los que destacan el manejo de los animales, la técnica de diagnóstico empleada, el número de muestras recogidas por animal, la edad de los animales o la presencia de sintomatología clínica. La mayoría de los estudios recientes señalan prevalencias inferiores al 15% en animales sanos (Majewska *et al.*, 2000; Sturdee *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Tzanidakis *et al.*, 2014), aunque también se han señalado prevalencias del 15% al 40% (Ryan *et al.*, 2005; Pritchard *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2009; Sari *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Los estudios longitudinales muestran que el porcentaje de ovejas que, durante su vida, se infectan con *Cryptosporidium* spp. es muy elevado; así, en dos granjas de ovino de Australia, y recogiendo 5 muestras por animal, Sweeny *et al.* (2011) apreciaron una prevalencia individual que osciló entre el 71,4% y el 81,3%; estos autores, además, comprobaron que varios animales eran positivos en todos los muestreos, lo que puede reflejar



constantes reinfecciones o la imposibilidad de eliminar de forma natural las infecciones por *Cryptosporidium* spp.

En España, el primer brote de criptosporidiosis en corderos con diarrea fue descrito por Rojo *et al.* (1985). Posteriormente, diversos autores han puesto de manifiesto la importancia de las infecciones por *Cryptosporidium* spp. en granjas de ovino con brotes de diarrea neonatal (Tabla 1.5).

**Tabla 1.5. Prevalencia de infección por *Cryptosporidium* spp. en ovinos con diarrea neonatal en España**

Zona	Prevalencia	Autores
Aragón	90,0%	Clavel <i>et al.</i> (1989)
Aragón	79,4%	Causapé <i>et al.</i> (2002)
León	70,8%	Martín-Gómez <i>et al.</i> (1995b)
Castilla-León	44,8%	Muñoz <i>et al.</i> (1996)
Castilla-León	40,2%	Pilar-Izquierdo <i>et al.</i> (1993)
Galicia	31,6%	Díaz <i>et al.</i> (2015)
Galicia	30,7%	Díaz <i>et al.</i> (2010a)

Este parásito es también frecuente en aquellos rebaños ovinos sin problemas de diarreas en corderos, pues se hallaron prevalencias de infección individuales que oscilaron entre el 14,7% y el 28,0% (Clavel *et al.*, 1989; Matos-Fernández *et al.*, 1993; Martín-Gómez *et al.*, 1995b; Causapé *et al.*, 2002); Además, *Cryptosporidium* spp está ampliamente distribuido en las granjas ovinas, pues el porcentaje de rebaños con al menos un animal positivo oscila entre el 46,7% y el 73% (Pilar-Izquierdo *et al.*, 1993; Martín-Gómez *et al.*, 1995b).

#### 1.4.2.1. Especies descritas

En ganado ovino se han publicado numerosas investigaciones sobre las infecciones por *Cryptosporidium* spp., aunque únicamente un reducido porcentaje de ellos incluyen datos moleculares que, por lo general, están limitados a un escaso número de aislados del protozoo. Aún así, el número de especies y genotipos encontrado en ovejas, aunque inferior al hallado en ganado vacuno, es considerable e incluye *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. fayeri*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C.*

*parvum*, *C. ryanae*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. ubiquitum* y *C. xiaoi*, así como el genotipo oveja I (Tabla 1.6). Aunque la mayoría son hallazgos ocasionales, destacan, por el número de aislados identificados, *C. xiaoi*, así como las especies zoonóticas *C. parvum* y *C. ubiquitum*.

**Tabla 1.6. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* descritos en ganado ovino**

País	<i>C. parvum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. xiaoi</i>	Otros	Referencia
Europa	636	131	127	42 <i>C. hominis</i> , 9 <i>C. ryanae</i> , 14 <i>C. bovis</i>	
Bélgica	1	9			Geurden <i>et al.</i> (2008)
España			1		Navarro-i-Martinez <i>et al.</i> (2007)
España	137*				Quilez <i>et al.</i> (2008b)
España	14*	9*			Díaz <i>et al.</i> (2010a)
España	27				Castro-Hermida <i>et al.</i> (2011)
España	11*	5*			Díaz <i>et al.</i> (2015)
España	119*				Ramo <i>et al.</i> (2016b)
Grecia	7	3			Tzanidakis <i>et al.</i> (2014)
Irlanda	14	7	10	9 <i>C. ryanae</i> , 1 <i>C. bovis</i>	Mirhashemi <i>et al.</i> (2016)
Italia	26				Paoletti <i>et al.</i> (2009)
Italia	5*				Cacciò <i>et al.</i> (2013)
Italia	21*				Drumo <i>et al.</i> (2012)
Noruega		35	7		Robertson <i>et al.</i> (2010)
Noruega	2		1		Lange <i>et al.</i> (2013)
Polonia	2				Majewska <i>et al.</i> (2000)
Polonia	2	3	33	9 <i>C. bovis</i> , 1 <i>C. hominis</i>	Kaupke <i>et al.</i> (2017)
Portugal	2				Alves <i>et al.</i> (2006a)
R. Unido	16				McLauchlin <i>et al.</i> (2000)
R. Unido	4				Leoni <i>et al.</i> (2007)
R. Unido	16				Pritchard <i>et al.</i> (2007)
R. Unido	43		4	1 <i>C. hominis</i>	Pritchard <i>et al.</i> (2008)
R. Unido	9*	26	9		Elwin y Chalmers (2008)
R. Unido	52*	1	5		Mueller-Doblies <i>et al.</i> (2008)
R. Unido				1 <i>C. hominis</i>	Giles <i>et al.</i> (2009)
R. Unido	26		3		Smith <i>et al.</i> , 2010
R. Unido	42	30	47	39 <i>C. hominis</i>	Connelly <i>et al.</i> (2013)
R. Unido	16	1	5		Wells <i>et al.</i> (2015)
R. Unido				4 <i>C. bovis</i>	Smith <i>et al.</i> (2014)
R. Unido	2				Utsi <i>et al.</i> (2016)
Rumanía	20*	2*	2*		Imre <i>et al.</i> (2013)
América	17	53	25	1 <i>C. meleagridis</i>	
Brasil		2			Fiuza <i>et al.</i> (2011)
Brasil	3	19			Paz e Silva <i>et al.</i> (2014)
Brasil		3	15	1 <i>C. meleagridis</i>	Zucatto <i>et al.</i> , (2015)
Brasil		1	1		Snak <i>et al.</i> (2017)
EE.UU.	2	28	4		Santin <i>et al.</i> (2007)

\* Estudios de casos clínicos

Tabla 1.6. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* descritos en ganado ovino

País	<i>C. parvum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. xiaoi</i>	Otros	Referencia
América	17	53	25	1 <i>C. meleagridis</i>	
EE.UU.	12		5		Fayer y Santin (2009)
África	8	8	13	1 <i>C. andersoni</i> , 1 <i>C. suis</i>	
Egipto			3		Mahfouz <i>et al.</i> (2014)
Etiopía		8			Wegayehu <i>et al.</i> (2017)
Jordania	3		5	1 <i>C. andersoni</i>	Hijawi <i>et al.</i> (2016)
Tanzania			2		Parsons <i>et al.</i> (2015)
Túnez			3		Soltane <i>et al.</i> (2007)
Zambia	5			1 <i>C. suis</i>	Goma <i>et al.</i> (2007)
Asia	2	99	74	4 <i>C. andersoni</i>	
China		74	4	4 <i>C. andersoni</i>	Wang <i>et al.</i> (2010)
China		4			Shen <i>et al.</i> (2011)
China	1	17	31		Ye <i>et al.</i> (2013)
China		4	39		Li <i>et al.</i> (2016)
Omán	1				Johnson <i>et al.</i> (1999)
Oceanía	216	235	804	7 <i>C. andersoni</i> , 9 <i>C. scrofarum</i> , 4 <i>C. fayeri</i> , 2 <i>C. suis</i> , 1 <i>C. hominis</i> , 8 gt oveja	
Australia		33	14	1 <i>C. andersoni</i> , 4 <i>C. scrofarum</i> , 4 <i>C. fayeri</i> , 2 <i>C. suis</i> , 1 <i>C. hominis</i> , 1 gt oveja	Ryan <i>et al.</i> (2005)
Australia	65	10	52		Yang <i>et al.</i> (2009)
Australia	54	39	329	4 <i>C. andersoni</i> , 6 gt oveja	Sweeny <i>et al.</i> (2011)
Australia	28	53	41		Sweeny <i>et al.</i> (2012)
Australia	61	88	357	4 <i>C. scrofarum</i> , 1 <i>C. andersoni</i> , 1 gt oveja	Yang <i>et al.</i> (2014), Jacobson <i>et al.</i> (2016)
Australia	4	9	11		Yang <i>et al.</i> (2015)
Australia		3			Zahedi <i>et al.</i> (2016b)
P. N. Guinea	4			1 <i>C. scrofarum</i> , 1 <i>C. andersoni</i>	Koinari <i>et al.</i> (2014)
TOTAL	879	526	1043	12 <i>C. andersoni</i> , 9 <i>C. scrofarum</i> , 4 <i>C. fayeri</i> , 3 <i>C. suis</i> , 43 <i>C. hominis</i> , 9 <i>C. ryanae</i> , 14 <i>C. bovis</i> , 1 <i>C. meleagridis</i> , 8 gt oveja	

\* Estudios de casos clínicos

*C. parvum* es una especie cosmopolita que presenta una reducida especificidad de hospedador, pudiendo infectar a un elevado número

de mamíferos domésticos y silvestres (Xiao, 2010; Ryan *et al.*, 2014; Abeywardena *et al.*, 2015). Los resultados de numerosos estudios confirman que es la principal especie zoonótica en todo el mundo y que junto con *C. hominis*, está implicada en la criptosporidiosis humana, por lo que tiene una gran importancia en Salud Pública (Xiao, 2010; Šlapeta, 2013). Varias investigaciones han señalado a *C. parvum* como la especie dominante en el ganado ovino, especialmente en los más jóvenes (Majewska *et al.*, 2000; McLauchlin *et al.*, 2000; Pritchard *et al.*, 2007, 2008; Paoletti *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Koinari *et al.*, 2014), considerándose la principal responsable de brotes de diarrea en granjas de ovejas (Chalmers *et al.*, 2002; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010a, 2015; Cacciò *et al.*, 2013; Imre *et al.*, 2013). Por el contrario, otros autores (Ryan *et al.*, 2005b; Santín *et al.*, 2007; Soltane *et al.*, 2007; Elwin y Chalmers, 2008; Geurden *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Sweeny *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013; Paz e Silva *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014) han señalado que la presencia de *C. parvum* en ganado ovino es baja, sugiriendo que estos animales no juegan un papel importante como reservorios zoonóticos para el ser humano. Sin embargo, se deben considerar los resultados de un estudio realizado en Australia (Yang *et al.*, 2009), en el que se demostró que el diagnóstico molecular basado en un único gen no permite identificar *C. parvum* en heces de ovejas debido a que, en aquellas muestras que presentan poblaciones mixtas de *Cryptosporidium*, únicamente detectan la especie dominante; así, estos autores, empleando una PCR con cebadores específicos para *C. parvum*, el número de aislados identificados aumentó desde 2 a 63.

*C. ubiquitum*, anteriormente denominado *Cryptosporidium genotipo cervino*, es una especie cosmopolita que se considera “generalista”, pues se ha identificado en muestras procedentes de un elevado número de mamíferos domésticos y silvestres, incluyendo el ser humano (Šlapeta, 2013). Aunque presenta una amplia distribución, su rango de hospedadores todavía no se conoce completamente (Santín *et al.*, 2007; Fayer *et al.*, 2010). No obstante, el elevado número de aislados identificados en ganado ovino sugiere que este pequeño rumiante podría ser el “hospedador tipo” de esta especie; de

hecho, en varios estudios se ha identificado como la especie predominante en rebaños de ovejas (Ryan *et al.*, 2005b; Santín *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Fiuza *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2011; Sweeny *et al.*, 2012). Con respecto a su patogenicidad, *C. ubiquitum* se ha aislado en muestras fecales procedentes de varias especies animales, como ovejas, cabras o puercoespines, que presentaban diarrea (Díaz *et al.*, 2010a, 2015; Šlapeta, 2013); sin embargo, de forma experimental, ninguna de las especies animales estudiadas, mostraron signos clínicos (Fayer *et al.*, 2010). Además, aunque esta especie posee potencial zoonótico y se considera emergente, los casos señalados en personas son escasos, por lo que actualmente se considera que su importancia en Salud Pública es reducida (Santín *et al.*, 2007; Chalmers *et al.*, 2009a; Šlapeta, 2013). La vía principal de transmisión a las personas todavía se desconoce; en este sentido, hay que tener en cuenta que el aumento del número de ovejas positivas a *C. ubiquitum* no se ha correspondido con un incremento de la aparición de brotes de origen zoonótico (Ryan *et al.*, 2005), por lo que otros autores han sugerido una transmisión directa entre personas (Fayer *et al.*, 2010).

*C. xiaoi* es una especie descrita recientemente por Fayer y Santín en el año 2009, presentando una secuencia del gen SSUrRNA muy similar a la de *C. bovis*, por lo que antes de realizarse los estudios morfológicos y biológicos, se conocía como *Cryptosporidium* genotipo *bovis*-like. Esta gran similitud ha llevado a varios autores a cometer errores de identificación; de hecho, se ha confirmado que, en diferentes estudios, los *C. bovis* aislados en ganado ovino eran realmente *C. xiaoi* (Elwin y Chalmers, 2008; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009). Sin embargo, las secuencias de los genes de la actina y Hsp70 muestran diferencias más amplias entre ambas especies (Fayer y Santín, 2009; Díaz *et al.*, 2010b; Šlapeta, 2013). De hecho, en ciertas publicaciones donde solo se emplea el gen 18S para realizar el análisis genotípico, debido a las escasas diferencias observadas entre ambas especies, los aislados se identifican como *C. bovis/xiaoi* (Mirhashemi *et al.*, 2016). Su rango de hospedadores no se conoce todavía con exactitud, pero se supone que es muy reducido y que engloba principalmente rumiantes domésticos y silvestres, pues

hasta el momento sólo se ha detectado en ganado ovino y caprino en todo el mundo (Šlapeta, 2013; Díaz *et al.*, 2015), así como en yaks en China (Karanis *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2014) y en bueyes almizcleros en Noruega (Davidson *et al.*, 2014). Curiosamente, también se ha identificado esta especie en un pez (*Sillago vittata*) perteneciente al Orden de los Perciformes, posiblemente debido a la contaminación del ambiente marino con efluentes de origen agrícola (Reid *et al.*, 2010). Empleando ooquistes eliminados por ovejas, Fayer y Santín (2009) consiguieron infectar con éxito a varios corderos, que excretaron ooquistes durante 14-15 días, aunque no fueron capaces de infectar experimentalmente a terneros. Sin embargo, todavía no se han obtenido datos sólidos que excluyan totalmente la transmisión cruzada entre grandes y pequeños rumiantes. Varias investigaciones han puesto de manifiesto la importancia de esta especie de *Cryptosporidium* en las ovejas, al identificarla como la más frecuente en rebaños ovinos (Sweeny *et al.*, 2011; Connelly *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Mi *et al.*, 2015; Parsons *et al.*, 2015). Aunque esta especie se considera no patógena, se ha identificado en cabritos con diarrea neonatal en España y Francia (Díaz *et al.*, 2010b; Rieux *et al.*, 2013b), si bien en estos estudios no se estudió la posible presencia de otros enteropatógenos asociados a *C. xiaoi*. Hasta el momento solo se ha identificado en dos personas inmunodeprimidas en Etiopía (Adamu *et al.*, 2014), por lo que se supone que su potencial zoonótico es muy escaso y, por tanto, no es importante desde el punto de vista de la Salud Pública.

Aunque las tres especies de *Cryptosporidium* más frecuentes en el ganado ovino tienen una distribución mundial, los estudios moleculares realizados en estos rumiantes sugieren, hasta el momento, la existencia de importantes diferencias geográficas en su distribución (Šlapeta, 2013; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016; Kaupke *et al.*, 2017); así, *C. xiaoi* es la especie predominante en África y Oceanía y *C. ubiquitum* es la más abundante en ovinos procedentes de los continentes americano y asiático (Ye *et al.*, 2013), como se puede observar en la Tabla 1.6. En Europa, *C. parvum* es la especie más frecuentemente identificada, aunque estos datos pueden responder a un mayor número de investigaciones en animales con diarrea, donde

predominan las infecciones por esta especie (Chalmers *et al.*, 2002; Mueller-Doblies *et al.*, 2008); por ello, Taylan-Ozkan *et al.* (2016) sugirieron que *C. parvum* era la especie más común en aquellos rebaños ovinos de Europa donde los animales se manejasen de forma más intensiva.

#### 1.4.2.2. Relación entre la edad de los animales y las especies identificadas

Varias investigaciones han determinado que la edad de los animales es un factor que influye de forma significativa en la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (de Graaf *et al.*, 1999a). Así, se ha comprobado que los porcentajes de infección por este parásito son superiores en los corderos lactantes (Xiao *et al.*, 1993; Causapé *et al.*, 2002; Majewska *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2007), ya que son los más susceptibles a la infección con el parásito y los que tienen una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad clínica (de Graaf *et al.*, 1999a; Mueller Doblies *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2010a, 2015). Varias investigaciones han señalado que el porcentaje de infección es más elevado en los corderos menores de 2 semanas (Xiao *et al.*, 1993; Abd-El-Wahed, 1999; Causapé *et al.*, 2002); sin embargo, Santín *et al.* (2007), tras incrementar la sensibilidad de la técnica recogiendo 3 muestras de cada animal, observaron la máxima prevalencia en los corderos de 3 semanas (61,3%), aunque los porcentajes en los animales de 1 (22,6%) y de 2 (48,4%) semanas de edad también fueron muy elevados y notablemente superiores a los de 2-6 meses (2,2%). En este sentido, en ganado ovino de Australia, Sweeny *et al.* (2011) apreciaron que el porcentaje de animales positivos a *Cryptosporidium* spp. era ligeramente superior en los animales de 2 semanas (8,3%) que en los de 4 meses (6,3%).

Los resultados de numerosos estudios demuestran que la prevalencia de infección está relacionada negativamente con la edad, de modo que los animales de mayor edad suelen presentar porcentajes de infección más bajos, lo que probablemente se deba a la mejor condición corporal de los ovinos adultos o al desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora tras la exposición a reinfecciones repetidas con el parásito (Wang *et al.*, 2009). Así, en Galicia, Castro-

Hermida *et al.* (2011) apreciaron una prevalencia significativamente más elevada en corderos neonatos (37,1%) que en ovejas adultas (5,2%). En rebaños de ovejas de EE.UU., Santín *et al.* (2007) observaron que la prevalencia en los corderos era del 77,4%, siendo ésta muy superior (25,0%) a la hallada en sus madres. En el mismo sentido, Sweeny *et al.* (2011) señalaron que el porcentaje de infección en los corderos (24,7%-40,7%) era significativamente más elevado que en las hembras gestantes (7,3%). Wang *et al.* (2009), en ganado ovino de China, comprobaron que el porcentaje de animales que eliminaban ooquistes del protozoo era significativamente superior en los corderos lactantes (10,8%) y en los destetados (4,3%) que en las hembras adultas (2,1-2,5%). Así mismo, en rebaños de ovejas de China, Ye *et al.* (2013) apreciaron mayores prevalencias en corderos de 3-15 semanas (22,2%) que en sus madres (6,1%) y, además, observaron que el porcentaje de ovejas que eliminaban ooquistes del protozoo en el momento del parto (7,8%) era superior al de las hembras una semana después de parir (1,7%), lo que confirma el incremento de la excreción de ooquistes durante el periparto.

En el ganado ovino, el estudio de la posible relación entre la edad y la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium* conlleva grandes dificultades debido a las limitaciones de los estudios disponibles hasta el momento. Así, la mayoría de las investigaciones sobre *Cryptosporidium* spp. en ovejas se centran en animales sin destetar, donde *C. parvum* es la principal especie identificada tanto en brotes de diarrea neonatal (Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Robertson, 2009; Díaz *et al.*, 2010a, 2015; Cacciò *et al.*, 2013; Imre *et al.*, 2013) como en corderos sanos (Pritchard *et al.*, 2007; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Las infecciones con criptosporidios en los ovinos de mayor edad (corderos destetados y adultos) suelen ser asintomáticas (Santín *et al.*, 2007), por lo que cabría suponer que estos animales estarían infectados por especies más específicas de hospedador y menos patógenas, como *C. ubiquitum* o *C. xiaoi*. Sin embargo, la información disponible sobre las infecciones por *Cryptosporidium* spp. en estos animales es todavía insuficiente debido al limitado número de aislados identificados. No obstante, esta información sería de gran interés, pues permitiría



conocer los grupos de edad con un mayor riesgo zoonótico o que podrían actuar como fuente de infección para los corderos neonatos.

Los resultados de algunos estudios epidemiológicos moleculares longitudinales sugieren que, al igual que sucede en el ganado bovino, es probable que exista una relación entre la edad de las ovejas y las especies de *Cryptosporidium* que presentan. En China, Wang *et al.* (2010) analizaron muestras fecales de 1.701 ovejas de diferentes edades, observando que *C. ubiquitum* era la especie más frecuente en todos los grupos de edad, identificándose en el 90,2% de los animales positivos. *C. xiaoi* y *C. andersoni* sólo se detectaron en corderos y en hembras adultas, respectivamente, pero en mucha menor proporción. Por el contrario, en otro estudio más reciente realizado en el mismo país, Ye *et al.* (2013) apreciaron que *C. xiaoi* era la especie predominante tanto en las madres (10/13) como en corderos (21/36), especialmente en aquellos de 3-4 semanas de edad (15/16). *C. ubiquitum* también se encontró en ambos grupos de edad en menor proporción, aunque fue la especie más frecuente en los corderos de 15-16 semanas (14/20). *C. parvum* únicamente se identificó en un cordero menor de un mes (1/36). Todos estos resultados sugieren que las madres pueden transmitir *C. xiaoi* a los corderos en el periparto (Ye *et al.*, 2013). En este sentido, un estudio longitudinal realizado en ovino de aptitud cárnica en Australia (Sweeny *et al.*, 2011) también mostró que *C. xiaoi* era la especie más frecuente en los corderos desde las 2 semanas de vida hasta los 9 meses de edad (315/387), así como la única identificada en los animales adultos (14/14). *C. ubiquitum* sólo se detectó en corderos, siendo más frecuente en los menores de 2 meses. Además, la presencia de *C. parvum* fue similar en todos los grupos de corderos, formando parte en numerosas ocasiones de infecciones mixtas con *C. xiaoi*, aunque esta última especie no se identificó en ovinos adultos (Sweeny *et al.*, 2011). Por el contrario, los resultados de otros estudios no han permitido apreciar diferencias entre los diferentes grupos de edad. Así, en EE.UU., Santín *et al.* (2007) hallaron que *C. ubiquitum* era la especie predominante tanto en los corderos (22 *C. ubiquitum*, 3 *C. xiaoi* y 1 *C. parvum*) como en los animales adultos (6 *C. ubiquitum*, 1 *C. xiaoi* y 1 *C. parvum*). Además, en 377 ovejas de granjas gallegas, Castro-Hermida *et al.* (2011) sólo

identificaron *C. parvum* tanto en 18 corderos neonatos como en 9 ovejas adultas; en este sentido, Smith *et al.* (2010) observaron que, en rebaños ovinos del Reino Unido, *C. parvum* era también la especie predominante en todos los grupos de edad, hallando *C. bovis* (posiblemente *C. xiaoi*) sólo en un pequeño porcentaje de corderos lactantes. Estas notables discrepancias entre los estudios podrían ser un reflejo de las importantes diferencias geográficas en la distribución de las diversas especies de *Cryptosporidium* en el ganado ovino, lo que haría necesario estudiar la posible presencia de asociaciones en cada una de las zonas descritas anteriormente (Europa, Australia y América-Asia).

### 1.4.3. En ganado caprino

La infección por *Cryptosporidium* spp. en cabras se describió por primera vez en Australia en un cabrito de 2 semanas de edad con diarrea (Mason *et al.*, 1981). Desde entonces, este protozoo se ha identificado en brotes de diarrea neonatal en granjas de ganado caprino de todo el mundo (Polack *et al.*, 1983; Nagy *et al.*, 1984; Matos-Fernández *et al.*, 1993; Santín, 2013), considerándose actualmente como el enteropatógeno más común en cabritos con diarrea (Muñoz-Fernández *et al.*, 1996).

Los porcentajes de parasitación por *Cryptosporidium* spp. en ganado caprino son muy variables, estimándose que, de media, aproximadamente el 15% de las cabras están infectadas (Robertson, 2009), aunque este porcentaje oscila entre el 3,5% y el 72,5% (Wang *et al.*, 2014; Romero-Salas *et al.*, 2016; Kaupke *et al.*, 2017). Estas variaciones en la prevalencia se deben a las diferencias geográficas y estacionales y a las características intrínsecas y extrínsecas de la población estudiada (Geurden *et al.*, 2008; Mahfouz *et al.*, 2014).

En España son escasos los estudios realizados sobre el porcentaje de infección por *Cryptosporidium* spp. en cabras, aunque demuestran que es un parásito muy prevalente en cabritos con diarrea (Tabla 1.7.). Por el contrario, en ganado caprino sano, las prevalencias son mucho más bajas, oscilando entre el 11,0%-19,1% de los animales y el 30,0%-35,5% de las granjas (Matos-Fernández *et al.*, 1993; Martín-

Gómez *et al.*, 1995b; Muñoz *et al.*, 1996; Castro-Hermida *et al.*, 2007; Sanz-Ceballos *et al.*, 2009).

**Tabla 1.7. Prevalencia de infección individual por *Cryptosporidium* spp. en ganado caprino en España**

Zona	Prevalencia	Autores
Aragón	55,7%	Quílez <i>et al.</i> (2001)
Castilla-León	41,7%	Muñoz <i>et al.</i> (1996)
Galicia	62,7%	Díaz <i>et al.</i> (2015)

#### 1.4.3.1. Especies descritas

Los estudios sobre la caracterización molecular de especies y/o genotipos de *Cryptosporidium* realizados en cabras son todavía escasos respecto a los realizados en ganado vacuno y ovino. Como se refleja en la Tabla 1.8., se han identificado 5 especies y dos genotipos del protozoo y, al igual que en el ganado ovino, las especies de *Cryptosporidium* más prevalentes en las cabras son *C. parvum*, *C. ubiquitum* y *C. xiaoi* (Rieux *et al.*, 2013b; Koinari *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2014; Tzanidakis *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2015; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016); con menor frecuencia se han hallado *C. hominis* y *C. andersoni*. Además, cabe señalar la importancia que *C. parvum*, *C. hominis* y *C. ubiquitum* tienen en Salud Pública, debido a que estas especies poseen potencial zoonótico y se han hallado en reservas y suministros de agua (Robertson, 2009; Ryan *et al.*, 2014).

En el ganado caprino, establecer posibles diferencias geográficas en la distribución de especies y genotipos de *Cryptosporidium* conlleva notables complicaciones debido al escaso número de animales analizados, procedentes, en muchas ocasiones, de unas pocas granjas localizadas en zonas muy concretas (Wang *et al.*, 2014). De todos modos, si se excluyen los estudios de casos clínicos y una investigación realizada en Malasia que incluye, aproximadamente, la mitad de los aislados identificados como *C. parvum* en cabras (Mat Yusof *et al.*, 2017), *C. xiaoi* parece ser la especie del protozoo predominante en el ganado caprino en todos los continentes.

*C. parvum* es la especie con una distribución geográfica más amplia en el ganado caprino, ya que se ha detectado en un mayor número de países, aunque todavía no se ha detectado en el continente

americano (Tabla 1.8). Además, es la especie que se ha identificado en un mayor número de muestras procedentes de cabras, aunque su prevalencia no es siempre la más elevada en los rebaños (Tzanidakis *et al.*, 2014; Kaupke *et al.*, 2017). Como en el resto de rumiantes domésticos, es la principal especie asociada a la aparición de cuadros diarreicos, especialmente en los cabritos neonatos (Chalmers *et al.*, 2002; Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2015), aunque su impacto sobre la salud de los animales parece ser menos importante que en otros rumiantes domésticos, como en los bóvidos (Kaupke *et al.*, 2017). Así mismo, las numerosas descripciones de casos clínicos en animales neonatos han contribuido a que el número de aislados de esta especie sea especialmente elevado.

*C. xiaoi* está ampliamente distribuida en ganado caprino de los 5 continentes (Tabla 1.8.), siendo la especie que predomina en cabras en Australia (Al-Habsi *et al.*, 2017), China (Mi *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2016), Francia (Rieux *et al.*, 2013), Grecia (Tzanidakis *et al.*, 2014), Jordania (Hijawi *et al.*, 2016) o Polonia (Kaupke *et al.*, 2017). Se cree que es una especie poco patógena para el ganado caprino, puesto que se ha identificado fundamentalmente en animales sanos (Rieux *et al.*, 2013; Mahfouz *et al.*, 2014), aunque también se ha hallado en un reducido número de muestras procedentes de cabritos con diarrea (Díaz *et al.* 2010b, 2015).

*C. ubiquitum* es la tercera especie más frecuentemente hallada en cabras, aunque el número de aislados identificados es muy inferior a la de las dos especies anteriormente citadas; sin embargo, es la especie predominante en algunos estudios realizados en China (Wang *et al.*, 2014) y Francia (Paraud *et al.*, 2014). Hasta el momento, esta especie sólo se ha identificado en animales asintomáticos, lo que refleja su escasa patogenicidad para el ganado caprino. No obstante, se considera una especie emergente con implicaciones en Salud Pública debido a su potencial zoonótico.

Las cabras también pueden presentar infecciones por otras especies del protozoo con un rango de hospedadores restringido, como *C. hominis* y *C. andersoni*, así como por algunos genotipos.

Tabla 1.8. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* identificados en ganado caprino

Pais	<i>C. parvum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. xiaoi</i>	Otros	Referencia
<b>Europa</b>	143	21	62	1 <i>C. hominis</i>	
Bélgica	11				Geurden <i>et al.</i> (2008)
España*	17*				Quilez <i>et al.</i> (2008b)
España*			2*		Díaz <i>et al.</i> (2010b)
España*	61*		5*		Díaz <i>et al.</i> (2015)
Francia	7				Ngouanesavanh <i>et al.</i> (2006)
Francia	1		18		Rieux <i>et al.</i> (2013b)
Francia		16			Paraud <i>et al.</i> (2014)
Grecia	2	5	7		Tzanidakis <i>et al.</i> (2014)
ND, I, CZE*	15				Cacciò <i>et al.</i> (2000)
Italia	21*				Drumo <i>et al.</i> (2012)
Noruega	4		1		Lange <i>et al.</i> (2014)
Polonia	1		29		Kaupke <i>et al.</i> (2017)
R. Unido*	2*				Chalmers <i>et al.</i> (2002)
R. Unido				1 <i>C. hominis</i>	Giles <i>et al.</i> (2009)
R. Checa	1				Hajůšek <i>et al.</i> (2004)
<b>América</b>			4		
EE.UU.			4		Fayer <i>et al.</i> (2010)
<b>África</b>			5		
Egipto	¿?				Shoukry <i>et al.</i> (2009)
Tanzania			5		Parsons <i>et al.</i> (2015)
Zambia	1				Goma <i>et al.</i> (2007)
<b>Asia</b>	274	36	149	16 <i>C. andersoni</i> 3 <i>C. hominis</i> 1 nuevo gt	
Bangladesh			3		Siddiki <i>et al.</i> (2015)
China			1	1 nuevo gt	Karanis <i>et al.</i> (2007)
China		24	4	16 <i>C. andersoni</i>	Wang <i>et al.</i> (2014)
China	14	10	45		Mi <i>et al.</i> (2015)
China	8	2	94		Peng <i>et al.</i> (2016)
Corea Sur				3 <i>C. hominis</i>	Park <i>et al.</i> (2006)
Filipinas	30				Domingo <i>et al.</i> (2012)
India	4				Maurya <i>et al.</i> (2013)
Jordania			2		Hijawi <i>et al.</i> (2016)
Malasia	207				Mat Yusof <i>et al.</i> (2017)
Omán*	1				Johnson <i>et al.</i> (1999)
Sri Lanka	1				Noordeen <i>et al.</i> (2002)
Turquía*	9*				Taylan-Ozkan <i>et al.</i> (2016)
<b>Oceanía</b>	6	8	18	6 <i>C. hominis</i> 1 gt rata II	
Australia	4	8	17		Al-Habsi <i>et al.</i> (2017)
PN Guinea	2		1	6 <i>C. hominis</i> 1 gt rata II	Koinari <i>et al.</i> (2014)
<b>TOTAL</b>	<b>424</b>	<b>65</b>	<b>238</b>	<b>16 <i>C. andersoni</i></b> <b>10 <i>C. hominis</i></b> <b>1 gt rata II</b> <b>1 nuevo gt</b>	

\* identificados a partir de muestras de cabritos con diarrea

Estas infecciones se consideran esporádicas, ya que el número de aislados identificado es muy pequeño y solo se han hallado en determinadas granjas.

#### 1.4.3.2. Relación entre la edad de los animales y las especies identificadas

Al estudiar la variación de la prevalencia por *Cryptosporidium* spp. al considerar la edad de los animales, la mayoría de los estudios coinciden con los resultados obtenidos en otras especies animales, señalando que el porcentaje de infección disminuye con la edad. Así, Mi *et al.* (2014), en rebaños de ganado caprino de China, observaron que los valores más elevados correspondieron a los corderos lactantes (20%) y destetados (15%), mientras que los porcentajes fueron significativamente más reducidos en cabras de un año (7,5%) y adultas (6,3%). En el mismo sentido, y tras analizar un número considerable de muestras fecales ( $n= 1.265$ ) de cabras en China, Wang *et al.* (2014) apreciaron los porcentajes de infección más elevados en los cabritos destetados (4,6%) y en los lactantes (2,1%), mientras que los más reducidos se hallaron en los adultos (1,9%), siendo estas diferencias significativas. Otros autores como Noordeen *et al.* (2001) o Peng *et al.* (2016) también comprobaron que los animales jóvenes son los más sensibles a la infección por este parásito, aunque se ha observado que cuando los animales no presentan un cuadro clínico, los porcentajes de infección son más elevados en los cabritos de entre 3 y 9 semanas (44,4%) que en los menores de 21 días (26,2%) (Kaupke *et al.*, 2017). Según de Graaf *et al.* (1999), las infecciones naturales por *Cryptosporidium* spp. en cabras afectan sobre todo a los neonatos, pudiendo causar cambios patológicos en el intestino que ocasionan una diarrea acuosa autolimitante, pérdida de peso y elevada mortalidad. Sin embargo, aunque un elevado porcentaje de cabras adultas (incluso más del 25%) pueden eliminar ooquistes del protozoo de forma crónica (Noordeen *et al.*, 2001), las criptosporidiosis clínicas son infrecuentes a partir del mes de vida (Delafosse *et al.*, 2006; O'Handley y Olson 2006; Santín, 2013), manifestándose sobre todo con retraso en el crecimiento, reducción de la ganancia media diaria y pérdida de peso (Karanis *et al.*, 2007; Sweeny *et al.*, 2011; Jacobson *et*

*al.*, 2016); por ello, lo más frecuente es que estos animales permanezcan como portadores asintomáticos, debido al desarrollo en mayor o menor grado de una inmunidad protectora asociada a la edad, a una mejor condición física de los animales adultos o a una variación en la infectividad y virulencia de las cepas que afectan a estas cabras (Karanis *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014; Kaupke *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha señalado que durante el periparto el porcentaje de hembras que eliminan ooquistes del protozoo se incrementa de forma considerable, pudiendo ser similar al de los corderos más jóvenes (Wang *et al.*, 2014).

Aunque en ganado vacuno se ha demostrado la existencia de una relación entre la edad y la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium*, resulta difícil llegar a una conclusión en el ganado caprino debido al reducido número de aislados identificados en estos animales, y a que muy pocas investigaciones incluyen una caracterización molecular de aislados procedentes de diferentes grupos de edad. De hecho, sólo tres estudios realizados en China (Mi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2016) presentan datos completos. Así, Mi *et al.* (2014) observaron que *C. xiaoi*, y *C. parvum* se observaban en los grupos de animales menores de dos años, mientras que *C. ubiquitum* se halló en todos los grupos de edad, a excepción de los cabritos lactantes. El porcentaje de aislados positivos a *C. xiaoi* y *C. parvum* fue mayor en los cabritos destetados (48,9% y 80%, respectivamente); por el contrario, el número de aislados identificados como *C. parvum* fue similar en los tres grupos de edad. Los resultados obtenidos posteriormente por Peng *et al.* (2016) son muy similares a los del estudio anterior, aunque la estratificación de edades resultó un poco diferente; así, *C. xiaoi* fue también la especie más frecuentemente identificada en todos los grupos de edad; *C. parvum* también se encontró en las cabras de todas las edades, pero en baja proporción. Por el contrario, *C. ubiquitum* solo se identificó de forma esporádica en una muestra procedente de un cordero lactante y en otra de un animal adulto. En el mismo sentido, Rieux *et al.* (2013b) apreciaron que la mayoría (18/19) de los cabritos sin destetar estudiados eliminaban ooquistes de *C. xiaoi*. Estos resultados sugieren

una posible transmisión de *C. xiaoi* en el periparto, similar a lo observado en ganado ovino (Ye *et al.*, 2013).

En contraste con los estudios anteriores, Wang *et al.* (2014) observaron que *C. ubiquitum* era la especie predominante en todos los grupos de edad, a excepción del grupo de los corderos destetados, donde *C. andersoni* fue la especie identificada con mayor frecuencia; esta última especie se halló en una única granja, aunque se detectó en 4 grupos de edad. Sin embargo, la importancia de *C. xiaoi* fue menor, identificándose solo en cabritos y en hembras gestantes.

#### **1.4.4. Subtipos de *C. parvum* y *C. ubiquitum* en pequeños rumiantes**

El gen GP60 es, actualmente, el marcador genético empleado con mayor frecuencia para el subtipado de aislados pertenecientes a diferentes especies de *Cryptosporidium*, incluyendo algunas de gran importancia en humanos, como *C. parvum* y *C. hominis*, y otras de menor relevancia (*C. meleagridis*, *C. cuniculus*, etc.).

Respecto a los subtipos GP60 de *C. parvum*, aunque se han publicado numerosos trabajos relativos tanto a los seres humanos como al ganado vacuno, en pequeños rumiantes éstos son escasos; así, tanto en ganado ovino como en caprino únicamente se han identificado subtipos de las familias alélicas IIa y IIc que tienen potencial zoonótico (Tablas 1.9 y 1.10). Además de los subtipos recogidos en estas Tablas, en pequeños rumiantes también se han detectado el IIcA4G2T14 y IIcA4G3T13, aunque no se han incluido debido a que no se indica ni el número de aislados de cada uno de ellos ni la especie donde se hallaron (Tzanidakis *et al.*, 2014).

En ovinos, al contrario de lo observado en caprino, el número de subtipos de *C. parvum* pertenecientes a la familia IIc es muy superior a la de subtipos IIa, aunque esto puede deberse al menor número de aislados identificados en estos últimos. Ambas familias poseen potencial zoonótico, aunque los datos obtenidos hasta el momento sugieren que los subtipos pertenecientes a la familia IIa son los más comunes en las infecciones por *C. parvum* en personas (Xiao, 2010).



Tabla 1.9. Subtipos de *C. parvum* identificados en muestras de ganado

Subtipo	Nº aislados	Lugar	Referencia
IlaA13G1R1	1	España	Díaz <i>et al.</i> , 2015
IlaA14G2R1	1	España	Díaz <i>et al.</i> , 2015
IlaA15G2R1	42	Bélgica, Brasil, China, España, Italia, Papúa N. Guinea, Reino Unido	Geurden <i>et al.</i> , 2008; Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Díaz <i>et al.</i> , 2010a, 2015; Smith <i>et al.</i> , 2010; Cacciò <i>et al.</i> , 2013; Ye <i>et al.</i> , 2013; Koinari <i>et al.</i> , 2014; Paz e Silva, 2014; Yang <i>et al.</i> , 2014; Wells <i>et al.</i> , 2015
IlaA16G1R1	2	Jordania, Rumanía	Imre <i>et al.</i> , 2013; Hijjawi <i>et al.</i> , 2016
IlaA16G3R1	15	España	Díaz <i>et al.</i> , 2010a, 2015
IlaA17G1R1	12	Polonia, Reino Unido, Rumanía	Smith <i>et al.</i> , 2010; Imre <i>et al.</i> , 2013; Kaupke <i>et al.</i> , 2017
IlaA17G2R1	1	Reino Unido	Smith <i>et al.</i> , 2010
IlaA18G2R1	1	Reino Unido	Wells <i>et al.</i> , 2015
IlaA18G3R1	1	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IlaA19G1R1	3	Reino Unido	Connelly <i>et al.</i> , 2013; Utsi <i>et al.</i> , 2016
IlaA19G2R1	7	Jordania, Reino Unido	Wells <i>et al.</i> , 2015; Hijjawi <i>et al.</i> , 2016
IlaA19G4R1	1	Papúa N. Guinea	Koinari <i>et al.</i> , 2014
IlaA20G2R1	3	Italia	Cacciò <i>et al.</i> , 2013
<b>TOTAL Ila</b>	<b>90</b>		
IIdA14G1	2	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA15G1	3	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA17G1	70	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA18G1	42	Australia, China, España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Yang <i>et al.</i> , 2014, 2015
IIdA19G1	43	China y España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Yang <i>et al.</i> , 2014
IIdA20G1	1	Rumanía	Imre <i>et al.</i> , 2013
IIdA21G1	1	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA22G1	2	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA22G2R1	1	Rumanía	Imre <i>et al.</i> , 2013
IIdA24G1	3	España y Rumanía	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Imre <i>et al.</i> , 2013
<b>TOTAL IId</b>	<b>168</b>		

Si bien es cierto que, en pequeños rumiantes, un amplio número de estudios únicamente han detectado subtipos pertenecientes a la familia Ila (Geurden *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Connelly *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Lange *et al.*, 2014; Paz e Silva, 2014; Yang *et al.*, 2014; Hijjawi *et al.*, 2016; Utsi *et al.*, 2016; Al-Habsi *et al.*, 2017), cabe destacar que el número de aislados identificados en cada una de estas investigaciones fue, generalmente, reducido. La diversidad genética de *C. parvum* observada en estos pequeños rumiantes es menor a la detectada en ganado vacuno, y refleja el escaso número de aislados identificados. Por el mismo motivo, el número de subtipos detectados en el ovinos es mayor que en caprinos (Tablas 1.9 y 1.10); no obstante, si se considera el total de aislados identificados hasta el

momento, la diversidad genética de *C. parvum* parece superior en las cabras.

**Tabla 1.10. Subtipos gp60 de *C. parvum* identificados en muestras de ganado caprino**

Subtipo	Nº aislados	Lugar	Referencia
IlaA13G1R1	5	España	Díaz <i>et al.</i> , 2015
IlaA13G2R1	3	Turquía	Taylan-Ozkan <i>et al.</i> , 2016
IlaA14G2R1	2	China, España	Mi <i>et al.</i> , 2014; Díaz <i>et al.</i> , 2015
IlaA15G1R1	3	China, Turquía	Mi <i>et al.</i> , 2014; Taylan-Ozkan <i>et al.</i> , 2016
IlaA15G2R1	43	Bélgica, China, España, Papúa N. Guinea,	Geurden <i>et al.</i> , 2008; Koinari <i>et al.</i> , 2014; Mi <i>et al.</i> , 2014; Díaz <i>et al.</i> , 2015
IlaA16G3R1	11	España	Díaz <i>et al.</i> , 2015
IlaA17G2R1	2	Australia, China	Mi <i>et al.</i> , 2014; Al-Habsi <i>et al.</i> , 2017
IlaA17G4R1	3	Australia	Al-Habsi <i>et al.</i> , 2017
IlaA19G4R1	1	Papúa N. Guinea	Koinari <i>et al.</i> , 2014
<b>TOTAL Ila</b>	<b>73</b>		
IIdA17G1	11	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Díaz <i>et al.</i> , 2015
IIdA18G1	1	Turquía	Taylan-Ozkan <i>et al.</i> , 2016
IIdA19G1	12	China, España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b; Mi <i>et al.</i> , 2014
IIdA22G1	10	Bélgica, Turquía	Geurden <i>et al.</i> , 2008; Taylan-Ozkan <i>et al.</i> , 2016
IIdA23G1	1	Polonia	Kaupke <i>et al.</i> , 2017
IIdA25G1	2	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
IIdA26G1	3	España	Quílez <i>et al.</i> , 2008b
<b>TOTAL IId</b>	<b>40</b>		

Al analizar los subtipos de *C. parvum* que predominan en ganado ovino y caprino, se observa que, en ambos, el IlaA15G2R1 es el significativamente más frecuente dentro de la familia alélica Ila, mientras que en la IId destaca el subtipo IIdA17G1 (Tablas 1.9 y 1.10). Los resultados de algunos estudios sugieren que, cuando en una determinada zona coexisten poblaciones de *C. parvum* pertenecientes a las familias Ila y IId, los subtipos Ila son más frecuentes en el ganado vacuno y los IId en los pequeños rumiantes (Xiao, 2010). Así, el 98% de los aislados de *C. parvum* identificados en terneros del norte de España pertenecían a la familia Ila (IlaA15G2R1, IlaA16G3R1, IlaA16G2R1, IlaA17G2R1, IlaA18G3R1 y IlaA19G3R1), mientras que únicamente 2 muestras se identificaron como IIdA23G1 (Quílez *et al.*, 2008a); por el contrario, en explotaciones de pequeños rumiantes de Aragón, Quílez *et al.* (2008b)

apreciaron que la mayoría de los subtipos identificados en corderos (98%) y cabritos (100%) pertenecían a la familia subgenotípica IId (IIdA17G1, IIdA19G1, IIdA18G1, IIdA14G1, IIdA15G1, IIdA21G1, IIdA22G1, IIdA24G1, IIdA25G1, IIdA26G1, IIdA15G2R1 y IIdA18G3R1). Estos resultados contrastan con los obtenidos en rumiantes domésticos de Galicia por Díaz *et al.* (2010a, 2015), donde los subtipos IId, especialmente el IIdA15G2R1 y el IIdA16G3R1, predominaron tanto en ganado vacuno como en ovejas y cabras, lo que podría deberse a un estrecho contacto de estas especies en rebaños mixtos, que son bastante frecuentes en esta región.

En cuanto a *C. ubiquitum*, la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de 60 kDa muestra importantes diferencias con respecto a la que presenta *C. parvum* y otras especies relacionadas; por ello, los cebadores empleados para caracterizar estas especies no eran válidos para *C. ubiquitum*. Recientemente Li *et al.* (2014) desarrollaron una técnica para caracterizar molecularmente el gen GP60 de este protozoo en muestras procedentes de personas y de varias especies animales, así como en muestras ambientales. Se han identificado 6 familias alélicas dentro de esta especie, que se nombraron de la XIIa a la XIIIf. El gen GP60 de *C. ubiquitum* no presenta repeticiones de trinucleótidos, por lo que los subtipos se nombran con el nombre de la familia alélica.

Hasta el momento, el número de estudios realizados en animales sobre los subtipos de *C. ubiquitum* son escasos. Los datos publicados en los últimos años indican que el subtipo XIIa es el predominante en ovejas y cabras a nivel mundial, confirmando la buena adaptación de esta especie a diferentes hospedadores (Li *et al.*, 2014). De hecho, se ha identificado en 57 muestras de ganado ovino de América (EE.UU., Perú, Brasil), Asia (China, Turquía), Europa (España, Reino Unido) y Oceanía (Australia) (Li *et al.*, 2014; Zahedi *et al.*, 2016a), así como en 34 aislados procedentes de cabras de Argelia, China y Australia (Li *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Al-Habsi *et al.*, 2017). En ovejas de Australia, Yang *et al.* (2015) detectaron 9 *C. ubiquitum* pertenecientes al subtipo XIIId. Cabe destacar que todos estos subtipos tienen potencial zoonótico, pues en humanos se han identificado aislados pertenecientes a las familias XIIa-XIIId (Li *et al.*, 2014); de

hecho, estos autores sugieren que el ganado ovino, tanto por contacto directo como mediante la contaminación de acuíferos, representa una importante fuente de infección para los humanos.

### **1.5. REPERCUSIONES ZONÓTICAS EN HUMANOS**

Los primeros casos de criptosporidiosis en personas se detectaron a mediados de la década de los 70 (Meisel *et al.*, 1976; Nime *et al.*, 1976), teniendo mayor relevancia estos estudios a partir de la década de los 80, debido a la detección de numerosos casos de criptosporidiosis en individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Ma y Soave, 1983; Navin y Juranek, 1984; Pitlik *et al.*, 1983; Soave *et al.*, 1984).

La criptosporidiosis afecta a todos los grupos de edad, pero especialmente tiene un gran impacto en niños y en poblaciones inmunodeprimidas (VIH, cáncer o trasplantados). La enfermedad se detecta principalmente en niños menores de 2 años (Fayer y Ungar, 1986; Current y García, 1991) y ancianos (Jaggi *et al.*, 1994; Neil *et al.*, 1996), así como en personas que estuvieron en contacto con niños y/o animales jóvenes o que consumieron agua de baja calidad higiénica (Xiao y Ryan, 2008; Chalmers *et al.*, 2009b).

Los pacientes inmunodeprimidos son especialmente sensibles a la infección (Gentile *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 2007) pudiendo ser fatal (Chalmers y Davies, 2010) debido a la deshidratación causada por la diarrea crónica (Cacciò, 2005; Chen *et al.*, 2005; Bouzid *et al.*, 2013). En algunos casos, se describe la extensión de la infección hacia zonas extraintestinales como los conductos biliares e hígado (Denkinger *et al.*, 2008; Wolska- Kusnierz *et al.*, 2007) o los pulmones (Meynard *et al.*, 1996; Kibbler *et al.*, 1987). La criptosporidiosis es uno de los principales diagnósticos secundarios en personas con VIH y está asociado con un mayor riesgo de muerte en estos pacientes (Peng *et al.*, 1997). Aunque en adultos inmunocompetentes no se observaron diferencias en la sintomatología derivada de las infecciones por *C. parvum*, *C. hominis* o *C. meleagridis* (Chappell *et al.*, 2011), por el contrario, en niños y pacientes inmunodeprimidos se describen importantes diferencias en las manifestaciones clínicas dependiendo

de la especie/subtipo implicado de *Cryptosporidium*, siendo el proceso causado por *C. hominis*, en especial con algunos subtipos, más grave que el ocasionado por *C. parvum* (Xiao, 2010).

En personas inmunocompetentes el proceso es autolimitante y la infección cursa, en la mayoría de los casos de forma asintomática. En el caso de aparecer, los signos clínicos pueden ser de grado variable. Tras un periodo de incubación aproximado de 3-12 días, aparece un periodo de diarrea acuosa que puede durar entre 6 y 14 días, aunque se describen casos donde han llegado hasta 1 mes. Además, los pacientes pueden presentar fatiga, pérdida de apetito, vómitos y dolor abdominal (MacKenzie *et al.*, 1994; Mathiu *et al.*, 2004; Bushen *et al.*, 2007). Otros síntomas que también se observaron son la aparición de dolor articular y ocular, jaquecas recurrentes, mareos y fatiga, mucho más frecuentes en las infecciones por *C. hominis* que en las causadas por *C. parvum* (Hunter *et al.*, 2004).

La patogenicidad, el grado de excreción de los ooquistes, la intensidad de las manifestaciones clínicas y la incidencia varía entre las distintas especies de *Cryptosporidium* que afectan a las personas (Fayer, 1997; McLauchlin *et al.*, 1999). Por consiguiente, para identificar el riesgo para la salud pública de la criptosporidiosis es importante la apropiada identificación de especies y genotipos, en muestras humanas o ambientales, y en otros tipos de animales, siendo imprescindible el uso de técnicas de biología molecular (Morgan *et al.*, 1999b). Todos estos hechos ponen de manifiesto la necesidad de utilizar marcadores moleculares hipervariables que permitan un mejor conocimiento de los subtipos y familias circulantes de *Cryptosporidium*, facilitando la determinación de la importancia epidemiológica y el riesgo para la salud pública que este género supone a nivel mundial. De hecho, las técnicas de biología molecular se han utilizado como una herramienta para realizar la taxonomía de las especies de *Cryptosporidium* (Monis y Thompson, 2003; Thompson y Monisde, 2004; Xiao *et al.*, 2004; Caccio *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2016a); así como, para determinar el potencial zoonótico de las mismas (Xiao y Ryan, 2004; Cacio, 2005) y establecer las vías de transmisión.

En la actualidad, el papel que juegan algunos animales de renta y de compañía en la transmisión de la criptosporidiosis humana todavía no está totalmente aclarado (Navarro-i- Martínez *et al.*, 2012). Diversos estudios de subgenotipado sugieren que algunas de las infecciones por *C. parvum* tienen su origen en los propios humanos, mientras que otras especies y/o genotipos frecuentes en los animales afectan en menor medida a las personas, tanto inmunodeprimidas como inmunocompetentes (Xiao *et al.*, 2004; Xiao y Feng, 2008). En determinados países en vías de desarrollo, algunas especies de *Cryptosporidium* poco frecuentes, sin embargo, ocasionan hasta el 20% de los casos humanos estudiados (Xiao y Feng, 2008).

Al menos 17 de las 26 especies reconocidas de *Cryptosporidium* (*C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. erinacei*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. viatorum*, *C. xiaoi*), y 4 de los más de 40 genotipos (*C. hominis* genotipo mono, y los genotipos ardilla I, caballo, y mofeta) se han identificado en humanos, aunque algunos de ellos sólo son hallazgos ocasionales (Chalmers y Katzer, 2013; Ryan *et al.*, 2014).

Actualmente *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis* y *C. canis* se consideran patógenas para las personas (Chalmers y Katzer, 2013), aunque las tres últimas se han identificado de manera ocasional; sin embargo, se debe destacar que la infección con especies y genotipos de *Cryptosporidium* poco comunes puede presentarse tanto en pacientes inmunodeprimidos como inmunocompetentes (Cama *et al.*, 2008).

La mayoría de los casos de criptosporidiosis en humanos están ocasionados por *C. hominis* y *C. parvum*. Los resultados de recientes estudios moleculares concluyen que, aparte de denuncias ocasionales en ganado, la transmisión de *C. hominis* es fundamentalmente antroponótica, mientras que la de *C. parvum* es zoonótica (Chalmers y Katzer, 2013). La importancia y distribución de cada una de estas especies depende de la situación geográfica. *C. hominis* es más prevalente (62%) en América, Australia y África, mientras que *C. parvum* es la responsable de un elevado número de casos en Europa (57%), especialmente en el Reino Unido (Cacciò *et al.*, 2005).

Además, mientras que en áreas urbanas predominan los casos por *C. hominis*, las personas que viven en áreas rurales, sobre todo niños, tienen mayores tasas de infección por *C. parvum*, lo que probablemente guarde relación con un mayor contacto con animales (Llorente *et al.*, 2007; Essid *et al.*, 2008).

En ganado vacuno de Galicia, en especial en terneros sin destetar, se han identificado 10 subtipos de *C. parvum* pertenecientes a las familias alélicas IIa y IIb (Díaz *et al.*, 2010a; Soilán, 2014) que son potencialmente zoonóticas, por lo que se considera que, en esta zona, los terneros son un importante reservorio de esta especie que, junto a *C. hominis*, es una de las especies más comunes en brotes de criptosporidiosis humana, tanto en personas inmunodeprimidas como inmunocompetentes (Vergara y Quílez, 2004, Šlapeta, 2013; Chalmers y Kutzer, 2013).

La especie *C. meleagridis* se describió por primera vez (Slavin, 1955) en pavos silvestres (*Meleagris gallopavo*), observándose posteriormente que era común en un amplio rango de hospedadores. Xiao *et al.* (2004) y posteriormente Elwin *et al.* (2012a) confirmaron que *C. meleagridis* es la tercera especie más importante detectada en humanos, ya que se describe tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunodeprimidos, considerándose actualmente como una infección emergente. No obstante, el riesgo de que las personas adquieran la criptosporidiosis por *C. felis* se considera relativamente bajo y la mayoría de los casos se observaron en pacientes inmunocomprometidos, sugiriéndose tanto rutas de transmisión antroponótica como zoonóticas (Beser *et al.*, 2015).

*Cryptosporidium cuniculus* (Inman y Takeuchi, 1979), cuyo principal hospedador es el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), se identificó por primera vez en EE.UU. en conejos de laboratorio clínicamente sanos (Rehg *et al.*, 1979). Esta especie está genéticamente muy relacionada con *C. hominis* (Robinson *et al.*, 2010) y debido a que se identificó en un brote producido a través del agua corriente en el verano de 2008 en el Reino Unido, se considera que tiene una importancia moderada en Salud Pública (Chalmers *et al.*, 2009b, 2011; Robinson *et al.*, 2010).

Las infecciones humanas causadas por *C. felis* se han detectado en muchos lugares, mostrando una mayor frecuencia en los países en desarrollo que en las naciones industrializadas (Raccurt, 2007; Lucio-Forster *et al.*, 2010). Diversos estudios llevados a cabo en Europa identificaron un número variable de casos producidos por *C. felis* (Morgan *et al.*, 2000; Pedraza-Díaz *et al.*, 2001; Leoni *et al.*, 2006; ANOFEL, 2010; Elwin *et al.*, 2012a; Insulander *et al.*, 2013). Asimismo, se encontraron muestras positivas para esta especie en humanos de África y del Norte y Sur de América (Pieniasek *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2000; Pedraza-Díaz *et al.*, 2001).

*Cryptosporidium canis* infecta a perros domésticos (*Canis familiaris*) de todo el mundo. Aún se conoce muy poco sobre esta especie y la enfermedad que causa en estos animales domésticos. Esta especie también se ha detectado (Trout *et al.*, 2006) en coyotes (*Canis latrans*), en zorros rojos (*Vulpes vulpes*) (Nolan *et al.*, 2013) y ocasionalmente en humanos.

En los últimos años, *C. ubiquitum*, anteriormente conocido como "genotipo cervino o genotipo 3", emerge como otra importante especie zoonótica que infecta a humanos (Fayer *et al.*, 2010). Se ha encontrado en personas de todo el mundo, principalmente en naciones industrializadas (Chalmers y Katzer, 2013). De hecho, en el Reino Unido, se han atribuido más casos humanos de criptosporidiosis a *C. ubiquitum* que a *C. canis* (Elwin *et al.*, 2012a). El reciente reconocimiento de *C. ubiquitum* como un patógeno zoonótico emergente tiene una elevada importancia en la salud pública debido a su amplia distribución geográfica y al amplio rango de hospedadores que tiene (Fayer *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Esta especie se ha detectado en corderos en Galicia (Soilán, 2014; Díaz *et al.*, 2015), en rumiantes silvestres, en roedores, en carnívoros (mapaches) en lémures y en humanos (Feng *et al.*, 2007; Ziegler *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2003; Elwin y Chalmers, 2008; Fayer *et al.*, 2010). También se ha hallado en fuentes de agua potable, aguas pluviales y aguas residuales en varias ubicaciones geográficas (Zhou *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Jellison *et al.*, 2009; Nichols *et al.*, 2010; Van Dyke *et al.*, 2012).



En España esta enfermedad es de declaración obligatoria desde el año 2009, pero las pruebas de rutina no se llevan a cabo y en muchos casos puede pasar inadvertida (Martín-Ampudia *et al.*, 2012). No obstante, la identidad de las especies y genotipos de *Cryptosporidium* que infectan a las personas en nuestro país no está bien definida y se encuentran disponibles pocos datos sobre la diversidad intraespecífica de este protozoo. La mayoría de los estudios se realizaron en poblaciones en riesgo con sintomatología o donde ya se sospechaba de la existencia de la infección. Se publicaron estudios en población adulta y en niños (tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos), sobre todo VIH-positivos en diversas regiones como Galicia (Abal-Fabeiro *et al.*, 2015), Cádiz (García *et al.*, 1989; Díaz *et al.*, 1990), Madrid (Alonso-Sanz *et al.*, 1995; del Águila *et al.*, 1997), Salamanca (García-Rodríguez *et al.*, 1990; Rodríguez-Hernández *et al.*, 1996), Zaragoza (Moles *et al.*, 1998; Ramo *et al.*, 2015), Islas Canarias (Abreu-Acosta *et al.*, 2007) o Barcelona (Segura *et al.*, 2015). A través de estudios moleculares se demuestra que en España circulan 4 especies de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* y *C. felis*) importantes en la epidemiología de la criptosporidiosis humana (Quílez *et al.*, 2008b; Navarro-i-Martínez *et al.*, 2003, 2010). De hecho, los casos de criptosporidiosis humana ocasionados por *C. hominis* son más prevalentes que los de *C. parvum* (Llorente *et al.*, 2007; Navarro-i-Martínez *et al.*, 2012). En este sentido, en los niños de áreas urbanas predominaban las infecciones por *C. hominis*, mientras que, en los de áreas rurales eran más prevalentes las infecciones por *C. parvum*. Esto coincide con lo señalado por diversos autores (Llorente *et al.*, 2007; Essid *et al.*, 2008; Zintl *et al.*, 2009; Xiao, 2010; Navarro-i-Martínez *et al.*, 2012) quienes indicaron que sobre la distribución geográfica de *C. parvum* y de *C. hominis* influye el hábitat en el que viven las personas. No obstante, cabe señalar que, aunque *C. hominis* y *C. parvum* son responsables de la mayoría de las infecciones, también hay que prestar atención a las criptosporidiosis ocasionadas por *C. meleagridis*, *C. felis* y *C. ubiquitum*, ya que también se han descrito casos esporádicos (Llorente *et al.*, 2007; Martín-Ampudia *et al.*, 2012), especialmente en niños (Llorente *et al.*, 2007; Cardona *et al.*, 2011).

Otros estudios sugieren la existencia de poblaciones de *C. parvum* específicas de humanos (Cacciò, 2005); este genotipo se caracterizó bien y se detecta en numerosos brotes de criptosporidiosis teniendo como fuente principal de transmisión el agua de bebida o destinada a usos recreativos (MacKenzie *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 1999; Sulaiman *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2001; Glaberman *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2005; Baldursson y Karanis, 2011). Además, hay que tener en cuenta, que *Cryptosporidium* puede ser resistente a los diferentes métodos para el tratamiento de aguas, por lo que la criptosporidiosis representa el principal problema de salud pública de los servicios de suministro de agua potable en los países desarrollados (Fayer *et al.*, 2000; Chalmers y Katzer, 2013).

También se ha detectado la presencia de *Cryptosporidium* spp. en verduras frescas (Monge *et al.*, 1996), en sidra de manzana (Millard *et al.*, 1994; Driedger *et al.*, 2001; Blackburn *et al.*, 2006) o en bivalvos (Freire-Santos *et al.*, 2000). Puntualmente, se han descrito casos de infección respiratoria por inhalación o aspiración (Shirley *et al.*, 2012).



# OBJETIVOS





## 2. Objetivos

Basándonos en los antecedentes expuestos, nos planteamos los siguientes objetivos:

1º.- Determinar la prevalencia de infección por *Cryptosporidium* spp. en rumiantes domésticos sin diarrea, en Galicia.

2º.- Identificar las especies y genotipos presentes en ganado vacuno, ovino y caprino de esta región española.

3º.- Conocer las asociaciones de las especies/genotipos de *Cryptosporidium* más frecuentes en las granjas de rumiantes domésticos en Galicia.

4º.- Determinar la frecuencia de las especies/genotipos de *Cryptosporidium* en relación con la edad de los animales.

5º.- Analizar si los animales sin diarrea pueden originar brotes de diarrea neonatal en las explotaciones de rumiantes domésticos.

6º.- Investigar si las especies/genotipos de *Cryptosporidium* halladas en los rumiantes objeto de estudio, son potencialmente zoonóticas.



# MATERIAL Y MÉTODOS







### 3. Materiales y métodos

En este apartado se describen las características generales de la zona y de los animales objeto de este estudio, así como las técnicas moleculares empleadas para detectar la presencia de *Cryptosporidium* spp. y para genotipar y/o subtipar los aislados del protozoo.

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ZONA Y DE LOS ANIMALES

Galicia es una región esencialmente ganadera situada en el noroeste de España (43°47'-41°49' N; 6°42'-9°18' W). El ganado vacuno de aptitud lechera y cárnica son los principales activos del sector ganadero en Galicia, siendo Lugo y A Coruña las provincias con un mayor censo de bovinos, con 451.970 y 335.654 cabezas de ganado, respectivamente (MAGRAMA, 2015). En los últimos años, debido fundamentalmente al cierre de las explotaciones de pequeño tamaño, en esta Comunidad Autónoma se ha reducido significativamente el número de granjas (de 49.355 en el 2008 a 39.479 en 2014), aunque ha aumentado el número de vacas por rebaño (Instituto Galego de Estatística, 2017), conduciendo a un mayor grado de intensificación (mayor producción) y tecnificación (uso de maquinaria más moderna, mejores instalaciones) de las granjas, especialmente de ganado vacuno lechero. Sin embargo, el aumento de animales estabulados, si las medidas higiénico-sanitarias no son las adecuadas, conlleva un incremento del riesgo de contagio con algunos patógenos, como los protozoos intestinales (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Giardia* spp., etc.). Este riesgo es menor en las explotaciones de carne, pues la mayoría de las explotaciones gallegas de vacuno de carne se caracterizan por ser pequeñas empresas familiares, que sirven de complemento a su economía, y por ello la mayoría se manejan en régimen semi-extensivo. El tiempo de pastoreo depende de las condiciones meteorológicas; así, por ejemplo, en primavera y otoño, las vacas permanecen todo el día en los pastos,

mientras que en invierno y verano se estabulan cuando las condiciones son adversas (Díaz, 2006). La alimentación está constituida por pasto que se complementa con heno/ensilado en invierno o cuando la hierba escasea. A pesar de esto, un pequeño porcentaje de los rebaños de vacuno de carne de Galicia se explotan en régimen extensivo (pastos de montaña) o intensivo (cebaderos).

La importancia de otras especies de rumiantes domésticos, como ovejas y cabras, está incrementándose progresivamente en Galicia, debido a la mayor rentabilidad y menor necesidad de mano de obra en estas explotaciones en comparación con la cría de otro tipo de ganado (Pérez-Creo, 2015). La mayoría del ganado ovino y caprino explotado en Galicia es el producto del cruce de diferentes razas, que se crían fundamentalmente en granjas de pequeño tamaño y carácter familiar, orientadas al autoconsumo, y que **recurren a un manejo tradicional**. Una característica diferencial de las granjas de esta Comunidad Autónoma es la presencia de un importante número de rebaños mixtos ( $n= 3.028$  sobre un total de 23.210), integrados por cabras y ovejas; estas explotaciones suponen el 14,8% de las granjas de ganado ovino y el 52,5% de las de caprino (Consellería do Medio Rural, 2011).

Entre 2013 y 2016 se tomaron un total de 1.113 muestras fecales de rumiantes domésticos que, en el momento de la recogida no presentaban diarrea, pertenecientes a 180 explotaciones situadas en diferentes municipios gallegos (Fig. 3.1). Además, todos los rebaños incluidos en el estudio no habían presentado brotes de diarreas neonatales en el año anterior al muestreo. Todas las explotaciones de pequeños rumiantes muestreadas ( $n= 31$ , cuatro de ellas mixtas) pertenecían a la Asociación de Defensa Sanitaria de Ovino y Caprino de Galicia “ACIVO”, que engloba rebaños tanto semiprofesionales como profesionales que tienen, por lo general, más de 100 cabezas.

En la Tabla 3.1 se **indica**, en cada provincia, el número de animales muestreados de las 3 especies de rumiantes, así como el número de explotaciones. Se recogieron 555 muestras fecales para el ganado vacuno, procedentes de 148 explotaciones ubicadas en las provincias de Lugo y A Coruña, que son las que tienen mayor censo de vacuno, y una localizada en Ourense. En cada granja se tomaron muestras de 1 a 26 animales, siendo la media de 3,7 muestras/granja.

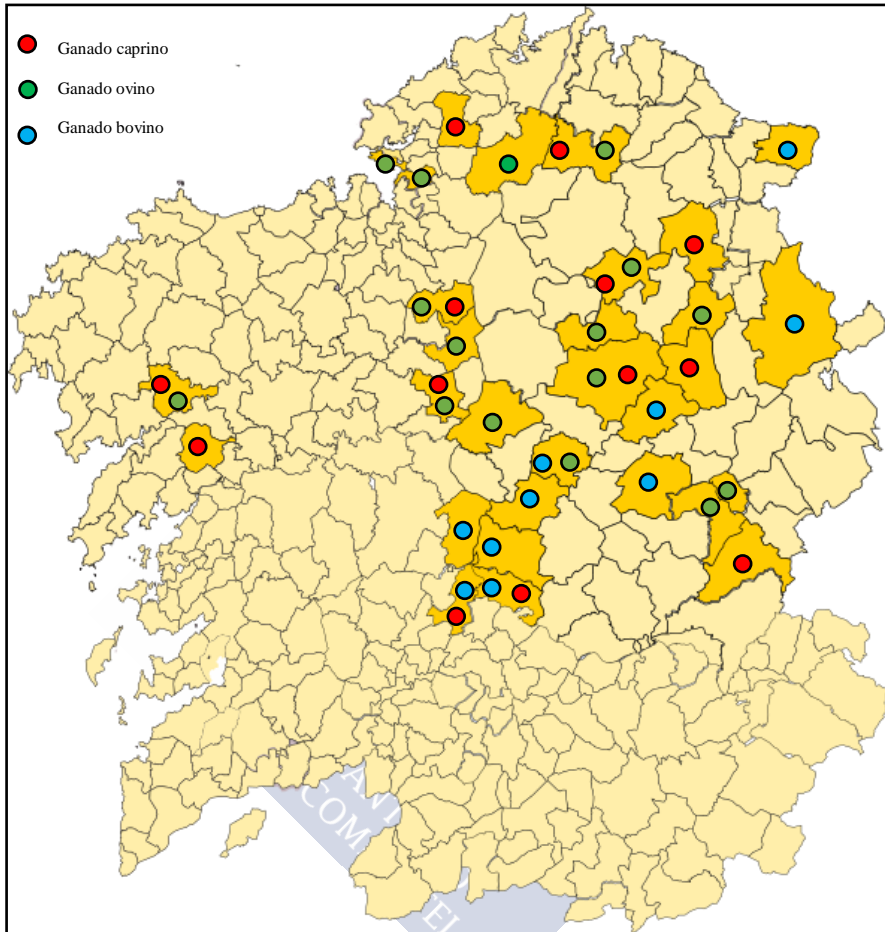


Figura 3.1. Municipios donde se recogieron las muestras de rumiantes domésticos examinados

Se muestrearon 19 explotaciones de ganado ovino de las provincias de A Coruña y Lugo, analizándose un total de 324 animales, siendo el número medio de muestras por granja de 17,1 (oscilación de 1-65 muestras). Además, se tomaron muestras de 234 cabras de aptitud cárnica pertenecientes a 16 explotaciones de las provincias de A Coruña, Lugo y Ourense, analizándose una media de 14,6 muestras por explotación (oscilación de 1-33 muestras).

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

Especie animal	Provincia	Granjas	Animales	Municipios
Vacuno	Lugo	111	486	8
	Ourense	1	2	1
	Pontevedra	37	67	1
	<b>TOTAL</b>	<b>149</b>	<b>555</b>	<b>10</b>
Ovino	A Coruña	9	129	7
	Lugo	10	195	8
	<b>TOTAL</b>	<b>19</b>	<b>324</b>	<b>15</b>
Caprino	A Coruña	5	87	5
	Lugo	9	119	8
	Ourense	2	28	2
	<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>234</b>	<b>15</b>

Simultáneamente a la toma de muestras, en cada explotación se anotó la edad de los animales muestreados. En el ganado vacuno se consideraron 4 grupos de edad: (G1) terneros lactantes menores de 2 meses; (G2) terneros destetados de entre 2-12 meses; (G3) novillas entre 12-24 meses y (G4) adultos mayores de 24 meses. El número de animales examinados del G1, G2, G3 y G4 fue de 133, 90, 126 y 206, respectivamente.

En el ganado ovino y caprino no se recogieron heces de animales lactantes (menores de 2 meses), pues los propietarios eran, por lo general, reacios a facilitar los muestreos durante el período de paridera. Además, al concentrarse los partos y registrarse un elevado número de nacimientos en poco tiempo, los ganaderos no son capaces de señalar con exactitud la fecha de nacimiento, pudiendo provocar errores en la clasificación de los animales. Por todas estas razones, estas explotaciones se muestrearon dos meses después del final de la paridera, considerándose únicamente 2 grupos: (G1) corderos y cabritos de entre 2 y 12 meses y (G2) adultos mayores de 12 meses. Se analizaron 84 y 63 muestras de corderos y cabritos del G1, así como 240 y 171 heces de ovejas y cabras del G2, respectivamente.

### 3.2. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las heces se tomaron directamente del recto con guantes de plástico, y posteriormente se introdujeron en frascos estériles de

plástico; estas muestras se conservaron a 4°C hasta su procesamiento, que se realizó antes de que transcurriesen 48 horas desde la recogida.

### **3.2.1. Concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* y extracción de ADN**

Una característica de las infecciones subclínicas con *Cryptosporidium* spp. es la eliminación intermitente de un reducido número de ooquistes, lo que sin duda dificulta su diagnóstico; estas infecciones asintomáticas son especialmente importantes en animales de más de dos meses (del Coco *et al.*, 2008). De esta manera, si la intensidad de eliminación de ooquistes de la muestra es baja, un examen directo puede proporcionar falsos negativos, al ser el número de ooquistes excretados inferior al límite de detección de la técnica. Por este motivo, y para incrementar la sensibilidad de este estudio, los ooquistes se concentraron inicialmente mediante un método de sedimentación difásica con agua destilada y acetato de etilo, que se basa en la afinidad de los restos fecales por un solvente polar como el acetato de etilo, mientras que los elementos parasitarios se concentran por sedimentación. Entre las ventajas que presenta este método se incluyen su sencillez y bajo coste.

Para realizar esta técnica, se tomaron 2 gramos de heces, que se homogenizaron con 20 ml de agua destilada (1:10) y se filtraron a través de una malla de 40 µm de diámetro de poro. El filtrado resultante se centrifugó a 2.205 x g en una centrífuga Allegra 21R Centrifuge (Beckman Coulter, Pasadena, California, EE.UU.) durante 5 minutos. Tras desechar el sobrenadante, se añadieron 8 ml de agua destilada y 2 ml de acetato de etilo al sedimento, que se homogeneizó con ayuda de un vórtex; después se repitió el paso de centrifugación durante 5 minutos a 2.205 x g. Finalmente, se desecharon las 3 capas superiores (acetato de etilo, restos de grasa y agua) y el sedimento con los ooquistes se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Posteriormente, el ADN del protozoo se extrajo a partir de 200 µl/mg del sedimento que contenía los ooquistes de *Cryptosporidium*. Para incrementar el rendimiento del proceso de extracción, los ooquistes se rompieron mediante un proceso de tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido (-196°C durante 1 minuto) y descongelación (100°C

durante 5 minutos). El ADN se purificó mediante un kit comercial específico para la extracción de ADN genómico procedente de muestras fecales (Realpure Spin Food-Stool Kit; *Real, Valencia, España*), que elimina los inhibidores y contaminantes de la PCR que contienen este tipo de muestras fecales. El protocolo empleado fue el especificado por el fabricante, y el ADN obtenido se mantuvo a  $-28^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.2.2. Análisis genotípico

Para la identificación de las especies y genotipos de *Cryptosporidium* se utilizó una técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosómica pequeña (SSU rRNA), empleando los cebadores y el protocolo descritos por Jiang *et al.* (2005). Esta PCR se realizó en dos etapas (anidada), donde cada reacción es independiente una de otra, incluyéndose controles positivos y negativos en todos los ensayos. En la primera reacción se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.325 pares de bases (pb) empleando 5  $\mu\text{l}$  de ADN purificado,  $\text{MgCl}_2$  6mM, tampón de PCR 1x, 200  $\mu\text{M}$  de cada desoxirribonucleótido (*dNTPs MIX, NZYTech, Lisboa, Portugal*), 0,2  $\mu\text{M}$  de cada cebador 18S1F y 18S1R (Tabla 3.2), y 2,5 unidades de Taq polimerasa (*NZYTaq DNA polymerase, NZYTech, Lisboa, Portugal*) en un volumen final de reacción de 50  $\mu\text{l}$ . La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler (*Biorad, Hércules, California, EE.UU.*), sometiendo la mezcla a una desnaturalización inicial de  $94^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$  (desnaturalización), 45 segundos a  $55^{\circ}\text{C}$  (hibridación) y 60 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$  (extensión) y una extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  durante 7 minutos. Para la segunda reacción se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  del producto de la primera reacción de PCR y los cebadores 18S2F y 18S2R (Tabla 3.2), amplificando un fragmento interno de aproximadamente 840 pb. La composición de esta segunda reacción y el programa del termociclador usado fue idéntico al usado en la primera reacción de PCR, variando únicamente la concentración de  $\text{MgCl}_2$ , que en este caso fue de 3 mM.

Los productos obtenidos de la PCR se sometieron a una electroforesis -100V durante 40 minutos en tampón TAE 1x (*Appliechem GmbH, Darmstadt, Alemania*)- en gel de agarosa al 1% (p/v) conteniendo un sustituto de bromuro de etidio 1x (*RedSafe, INTRON biotecnology, Gyeonggi, Corea del Sur*), y posteriormente se observaron en un analizador de imagen (*Fluor-S Multimager, Bio-Rad, Hércules, California, EE. UU.*).

**Tabla 3.2. Cebadores usados en la amplificación del gen que codifica para la SSU rRNA**

Cebador	Secuencia (5´-3´)
18S 1F (SSU-F2)	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG
18S 1R (SSU-R2)	CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA
18S 2F (SSU-F3)	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG
18S 2R (SSU-R4)	CTCATAAGG TGCTGAAGGAGTA

Para determinar la especie y/o genotipo presente en las muestras analizadas se llevó a cabo un análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Para realizar este análisis, el producto de la segunda reacción de la PCR se sometió a una digestión con las endonucleasas SspI, VspI y MboII (*New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.*) siguiendo el protocolo recogido en la Tabla 3.3., en un volumen total de 20 µl. El volumen de producto de la segunda PCR a digerir cambió dependiendo de la cantidad de ADN obtenido en la PCR anidada, que se valoró mediante la observación de la intensidad de las bandas. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37°C durante, al menos, 2 horas.

**Tabla 3.3. Protocolo utilizado para realizar la digestión de los productos de PCR con las enzimas Sspl, Vspl y Mboll**

	Bandas intensas	Bandas moderadas	Bandas tenues
Endonucleasas	10U	10U	10U
Buffer	1x	1x	1x
Producto PCR	2µl	10µl	17µl

Los fragmentos de restricción se sometieron a una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1x teñidos con un sustituto de bromuro de etidio (*RedSafe, INTRON biotecnology,*

Gyeonggi, Corea del Sur) aplicando un voltaje de 110V durante 70 minutos. A continuación, se visualizaron en un analizador de imagen. Las especies y/o genotipos de *Cryptosporidium* se identificaron comparando los patrones de restricción obtenidos con los recogidos en varios trabajos (Feng *et al.*, 2007; Xiao y Ryan, 2008), y que se resumen en la Tabla 3.4. Un número representativo de los aislados cuyo patrón de restricción no coincidió con el de *C. parvum* se secuenciaron con objeto de confirmar los resultados de la RFLP.

**Tabla 3.4. Patrones de restricción para las especies de *Cryptosporidium* más frecuentes en rumiantes domésticos al considerar la enzima usada**

	Sspl	Vspl	Mboll
<i>C. andersoni</i>	448, 397	730, 115	769, 76
<i>C. bovis</i>	432, 267, 103, 34	617, 115, 104	412, 185, 162, 76
<i>C. parvum</i>	450, 267, 108, 12, 11	629, 115, 104	771, 76
<i>C. ryanae</i>	432, 267, 103, 34	616, 115, 104	574, 185, 76
<i>C. ubiquitum</i>	454, 384, 11	461, 169, 115, 104	-
<i>C. xiaoi</i>	413, 267, 103, 34, 19	617, 115, 104	-

### 3.2.3. Análisis subtípico

Los aislados identificados como *C. parvum* y *C. ubiquitum* en la RFLP, se subtiparon mediante el análisis de la secuencia de un fragmento (800-850 y 950 pb, respectivamente) del gen que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (GP60), empleando PCRs anidadas descritas previamente por Alves *et al.* (2003) y Li *et al.* (2014), respectivamente.

En el caso de la PCR anidada para subtipar *C. parvum*, en ambas reacciones se empleó 1 µl de ADN (ADN patrón para la primera reacción y producto de la primera PCR para la segunda reacción), que se añadió a una mezcla compuesta por tampón de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada cebador (Tabla 3.5) y 5 U de Taq polimerasa, en un volumen total de 50 µl. Las muestras se sometieron a 40 ciclos de 45'' a 95°C, 45'' a 52°C y un minuto a 72°C; también se incluyó un paso de desnaturalización inicial (3 minutos a 95°C) y otro de extensión final (10 minutos a 72°C).



**Tabla 3.5. Cebadores usados en la amplificación de los genes que codifican para la GP60**

	Cebador	Secuencia (5´-3´)
<i>C. parvum</i>	GP601F (AL 3531)	ATA GTC TCC GCT GTA TTC
	GP601R (AL 3535)	GGA AGG AAC GAT GTA TCT
	GP602F (AL 3532)	TCC GCT GTA TTC TCA GCC
	GP602F (AL 3534)	GCA GAG GAA CCA GCA TC
<i>C. ubiquitum</i>	Ubi-18S-F1	TTTACCCACACATCTGTAGCGTCG
	Ubi-18S-R1	ACGGACGGAATGATGTATCTGA
	Ubi-18S-F2	ATAGGTGATAATTAGTCAGTCTTTAAT
	Ubi-18S-R2	TCCAAAAGCGGCTGAGTCAGCATC

Para amplificar un fragmento del gen gp60 de *C. ubiquitum* se empleó 1 µl de ADN patrón para la primera reacción y 2 µl del producto de la primera PCR para la segunda. Ambas reacciones se realizaron en un volumen total de 50 µl, conteniendo 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampón de PCR 1x, 200 µM de cada dNTP, 0,25 µM de los cebadores Ubi-18S-F1 y Ubi-18S-R1 o 0,5 µM de los Ubi-18S-F2 and Ubi-18S-R2 (Tabla 3.5) y 1,25 unidades de Taq polimerasa. En la primera PCR también se incluyeron 400 ng/µl de seroalbúmina bovina (*Sigma, S. Luis, Montana, EE.UU.*). El protocolo consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 45'' a 94°C, 45'' a 58° C (primera PCR) o a 55°C (segunda PCR), 1' a 72°C y una extensión final de 7' a 72°C.

En ambos casos, los productos de PCR obtenidos se visualizaron en un analizador de imagen tras someterlos a una electroforesis, empleando el mismo protocolo que en la PCR del SSU rRNA. Para identificar los subtipos presentes, se determinó la secuencia de nucleótidos utilizando el procedimiento citado anteriormente, y las secuencias consenso se compararon con las depositadas en el GenBank. En *C. parvum*, el fragmento amplificado del gen de la GP60 posee en el extremo 5' una región integrada por repeticiones de los trinucleótidos TCA/TCG/TCT que codifican para la serina. Teniendo en cuenta esta característica, los subtipos se nombraron considerando el número de repeticiones de TCA y TCG en la región repetitiva y de las mutaciones presentes en la zona sin repeticiones, así como del número de copias de la secuencia ACATCA localizadas al final de la zona repetitiva en aquellos subtipos pertenecientes a la familia IIa (Sulaiman *et al.*, 2005).

### 3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel 2007 y su análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics para Windows, versión 20.0. (IBM Corporation, Chicago (IL), EE.UU.). Para comprobar la posible influencia de diferentes parámetros (edad, provincia, especie animal, especie de *Cryptosporidium*, ...) sobre el porcentaje de infección individual se empleó el test Chi-cuadrado. Se consideró que las diferencias eran significativas cuando el p-valor fue menor de 0,05.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN





## 4. Resultados y discusión

En este apartado se analiza la prevalencia de infección por *Cryptosporidium* spp. en tres especies de rumiantes domésticos a nivel individual, de explotación y al considerar la edad de los animales. Además, se han determinado las especies de este parásito y su prevalencia en los diferentes grupos de edad y se han establecido cuales son los subtipos más frecuentes en el ganado vacuno y en el ovino y el caprino.

### 4.1. EN GANADO VACUNO

#### 4.1.1. Prevalencia de infección

Como ya se señaló en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos, en primer lugar los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. presentes en las muestras de heces se concentraron, empleando este concentrado para realizar la extracción del ADN parasitario. Posteriormente, y mediante una PCR anidada, se amplificó un fragmento de aproximadamente 850 pares de bases (pb) del gen que codifica para la subunidad 18S del ARNr de este parásito (Figura 4.1.). Así, se detectó la presencia de ADN de *Cryptosporidium* spp. en 91 muestras de las 555 analizadas, lo que supone una prevalencia de infección individual del 16,4%. Al considerar la localización de las explotaciones, el porcentaje de animales positivos fue significativamente ( $\chi^2= 4,409$ ;  $p= 0,036$ ) superior en Pontevedra (25,4%) que en Lugo (15,2%); en la provincia de Ourense no se detectaron animales positivos.

Se debe señalar que en el presente estudio sólo se pudo disponer de una muestra por animal; teniendo en cuenta que las infecciones asintomáticas por este protozoo se caracterizan por una eliminación intermitente de ooquistes, el análisis de una única muestra puede dar lugar a falsos negativos, por lo que nuestros resultados podrían estar

subestimando la prevalencia real de *Cryptosporidium* spp. en el ganado vacuno sin diarrea (O’Handley *et al.*, 1999; Fayer *et al.*, 1998; Castro-Hermida *et al.*, 2002, 2006; Robertson *et al.*, 2014; Cardona *et al.*, 2015). Algunas investigaciones sugieren que casi la totalidad de los animales se infectan con el protozoo durante el primer mes de vida; en este sentido, Villacorta *et al.* (1991) hallaron una prevalencia de infección del 93% en terneros neonatos cuando, al realizar un seguimiento individual durante un mes, se analizaron dos muestras semanales.

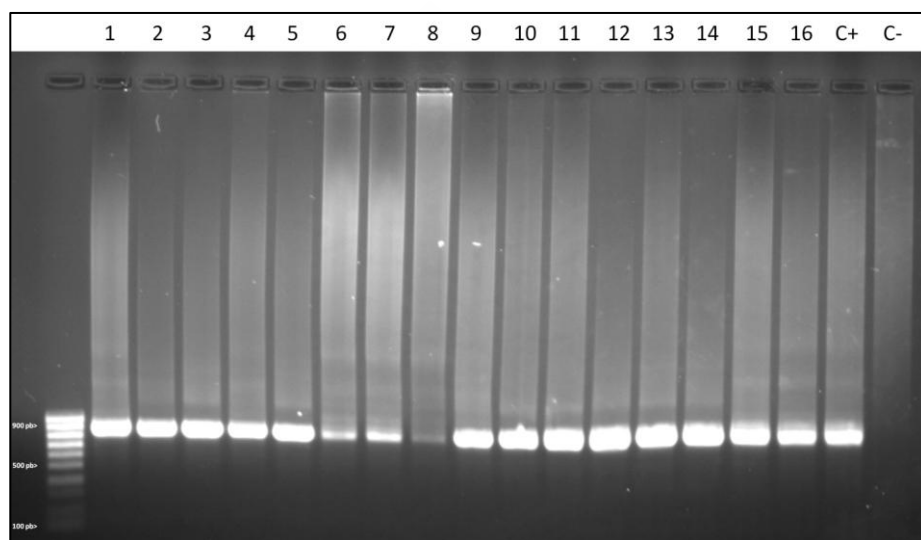


Figura 4.1. Muestras positivas (calles 1-16) mediante PCR del gen que codifica para la subunidad ribosómica 18S del ARNr (fragmento de aproximadamente 850 pb)

El porcentaje de infección individual detectado en el presente estudio resultó, por lo general, ligeramente más elevado que los señalados previamente en ganado vacuno de Galicia por Castro Hermida *et al.* (2006, 2007, 2009, 2011), con valores que oscilaron entre el 6,4% y el 14,2%. En otras regiones de España se hallaron prevalencias similares a las obtenidas en nuestro estudio, como en Aragón (19,7%; Quílez *et al.*, 1996a); por el contrario, en un estudio realizado en Álava, Cardona *et al.* (2011), solo hallaron un 3% de bovinos positivos. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos

en ganado bovino de otros países, como Bélgica, Brasil, Canadá, Egipto, la India, Noruega o Reino Unido, se hallaron porcentajes similares o ligeramente inferiores (Geurden *et al.*, 2007; Langkjaer *et al.* 2007; Khan *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2011; Amer *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014). Sin embargo, en algunos países asiáticos y en EE.UU. se observaron valores más elevados que oscilaron entre el 20% y el 40% (Santín *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2007; Muhid *et al.*, 2011; Murakoshi *et al.*, 2012), lo que puede deberse a la influencia de ciertos factores como el tamaño y manejo del rebaño, número de granjas y animales muestreados, condiciones higiénicas de las instalaciones, edad de los animales y año o temporada en la que se realizó el muestreo (Sturdee *et al.*, 2003; Hamnes *et al.*, 2006; Imre y Dărăbuș, 2011; Feng y Xiao, 2011).

Con respecto a la prevalencia por explotación, el 41,6% (62/149) de las granjas poseían al menos un animal positivo a *Cryptosporidium* spp. Con respecto a su localización, 48 de estas granjas estaban ubicadas en la provincia de Lugo y 14 en Pontevedra; no se hallaron explotaciones positivas en Ourense. El porcentaje de rebaños positivos fue superior en Lugo (43,2%) que en Pontevedra (37,8%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 0,186$ ;  $p = 0,66$ ). Nuestros resultados son similares a los hallados previamente por Valderrey (2017) en explotaciones gallegas donde se estudiaron terneros sin destetar que no presentaban signos de diarrea neonatal (38,5%). Asimismo, al estudiar la presencia del protozoo en bovinos mayores de 3 años, Castro-Hermida *et al.* (2007) observaron que un 48,3% de los rebaños poseían al menos un animal positivo a *Cryptosporidium* spp. Por el contrario, en otros estudios realizados también en Galicia, pero en granjas en las que había animales con diarrea neonatal, Díaz *et al.* (2010) y Soilán (2014) señalaron prevalencias de infección del 60-63%. No obstante, en todos los casos, los resultados de estos estudios ponen en evidencia que *Cryptosporidium* es un parásito con una amplia distribución en las granjas de ganado vacuno en Galicia. Varios estudios han demostrado que la presencia de este protozoo en las granjas está asociada a condiciones higiénicas deficientes y a un manejo incorrecto de los animales (de Graaf *et al.*, 1999; Castro-Hermida *et al.*, 2002; Díaz *et*

*al.*, 2010c); en Galicia son todavía muy comunes las explotaciones de pequeño tamaño y manejo tradicional, menos profesionalizadas, donde la higiene y las instalaciones suelen ser peores y que favorecen la contaminación del medio con ooquistes y, por ello, la transmisión del parásito (Castro-Hermida *et al.*, 2002), lo que explicaría los porcentajes tan elevados hallados en rebaños bovinos de esta Comunidad. Por el contrario, en otros países donde la producción de vacuno está más profesionalizada se ha apreciado la existencia de una relación positiva entre el tamaño de la explotación y el riesgo de infección, debida principalmente a la elevada densidad de animales (Garber *et al.*, 1994; Quigley *et al.*, 1994).

Al analizar la influencia de la edad de los animales sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., se observó la existencia de una relación inversa; así, los terneros menores de 2 meses mostraron un porcentaje de infección significativamente ( $\chi^2= 22.004$ ;  $p < 0,001$ ) más elevado (28,6%) que los de más edad (Figura 4.2.). Las diferencias observadas entre los diferentes grupos de animales de más de dos meses de edad no fueron estadísticamente significativas en ningún caso ( $p > 0,05$ ).

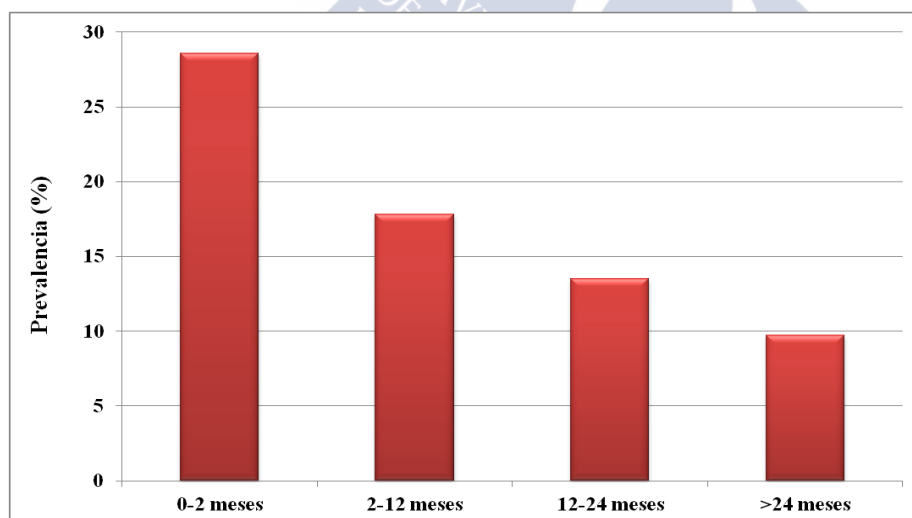


Figura 4.2. Porcentaje de infección por *Cryptosporidium* spp. en ganado vacuno de Galicia al considerar la edad de los animales



Estos resultados coinciden con los obtenidos en la mayoría de investigaciones, en las que las prevalencias más elevadas se observaban en los animales más jóvenes, más receptivos, que suelen infectarse poco tiempo después de nacer (Castro-Hermida *et al.*, 2006a; Santín *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010; Muhid *et al.*, 2011; dos Santos Toledo *et al.*, 2017; Gong *et al.*, 2017). La prevalencia observada en los terneros lactantes sin diarrea, un 28,6%, coincidió con la de otros estudios previos realizados en la misma área de estudio, donde se señalaron porcentajes del 22,7-27% (Castro-Hermida *et al.*, 2002; Valderrey, 2017). Por el contrario, García Meniño (2013) halló que un 44% de los terneros sin diarrea en Galicia eliminaban ooquistes del protozoo. Sin embargo, todos estos resultados resultaron mucho más reducidos que los señalados en terneros con diarrea neonatal. Así, en Galicia, Díaz *et al.* (2010) y Soilán (2014) observaron que el 49,2% y el 53,4% de los animales estudiados, respectivamente, eran positivos mediante técnicas microscópicas; estos resultados coinciden con los señalados en terneros menores de 45 días explotados en Aragón (53,8%; Quílez *et al.*, 1996), así como en el Centro (50%; De la Fuente *et al.*, 1998) y en el Norte (57,8% Quílez *et al.*, 2008) de España. En Galicia, García-Meniño (2013) encontró una prevalencia de infección mucho más elevada (76%), aunque estos resultados pueden deberse al reducido número de muestras analizadas. Todos estos datos confirman que *Cryptosporidium* spp. es un parásito muy prevalente tanto en terneros sanos como con diarrea, aunque las prevalencias de infección son siempre superiores en animales que presentan sintomatología clínica (García-Meniño *et al.*, 2015).

Los terneros de entre 2-12 meses y las novillas presentaron unas prevalencias de 17,8% y 13,5 %, respectivamente, que fueron significativamente más reducidas que las de los terneros lactantes ( $\chi^2=3,4077$ ;  $p= 0,049$  y  $\chi^2=8,796$ ;  $p= 0,003$ , respectivamente). La mayoría de los estudios realizados en bovinos muestran porcentajes de infección por el protozoo que oscilan entre el 10 y el 20% en terneros destetados; así, Quílez *et al.* (1996a) observaron que los animales de 1,5-4 meses de edad mostraban una prevalencia del 14%, mientras que sólo el 7,7% de los de 4-24 meses eran positivos. Del mismo modo, en

ganado vacuno de EE.UU., Santín *et al.* (2008) observaron que el 18,5% de los animales de 3-12 meses y el 2,2% de los de entre 12-24 meses eliminaban ooquistes de *Cryptosporidium* spp., mientras que en la India, Khan *et al.* (2010) apreciaron una prevalencia del 13,9% en terneros de 3-12 meses y del 4,4% en mayores de 12 meses.

Los resultados obtenidos en los animales adultos mayores de 2 años coinciden con los señalados en la mayoría de los estudios, en los que se observa que son los que suelen presentar los porcentajes de infección más reducidos y, por lo general, inferiores al 10% (Causapé *et al.*, 2002; Castro-Hermida *et al.*, 2005, 2007). Varios autores han sugerido que la disminución de los porcentajes de infección a medida de aumenta la edad de los animales está relacionada con el desarrollo de una respuesta inmunitaria parcialmente protectora en los adultos tras sucesivas infecciones con el parásito (Tzipori y Campbell, 1981; Current y García, 1991; Lorenzo Lorenzo *et al.*, 1993; Ares-Mazás *et al.*, 1999). No obstante, y aunque las cifras de prevalencia fueron inferiores en los animales de mayor edad, cabe destacar que un importante número de animales adultos eliminaron ooquistes del parásito. Debido a que los terneros sin destetar, especialmente durante las dos primeras semanas de vida, son los más sensibles a presentar una criptosporidiosis clínica, varios autores afirman que los bovinos adultos con infecciones asintomáticas pueden desempeñar un importante papel en la epidemiología del protozoo al actuar como reservorios, eliminando un pequeño número de ooquistes en sus heces de manera periódica e intermitente, pero suficiente para infectar a animales neonatos (Santín *et al.*, 2004; Vergara y Quílez, 2004; García-Meniño *et al.*, 2015; dos Santos Toledo *et al.*, 2017). En este sentido debería considerarse que los animales adultos suponen el grupo de edad más numeroso en las granjas, generando un gran volumen de heces, por lo que incluso una intensidad de eliminación reducida derivaría en una importante contaminación del ambiente; además, el incremento de la excreción de ooquistes por parte de las vacas adultas durante el parto favorecería que los terneros neonatos adquieran la infección poco tiempo tras el parto (Quílez *et al.*, 1996; Castro-Hermida *et al.*, 2006).

Aunque la mayoría de los autores señalan una reducción de la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. con la edad, en algunas investigaciones realizadas en Brasil se hallaron menores porcentajes de infección en los animales más jóvenes, sugiriendo que podrían deberse al manejo empleado en las granjas estudiadas (Fiuza *et al.*, 2011; do Couto *et al.*, 2014).

#### **4.1.2. Análisis genotípico: especies de *Cryptosporidium***

Gracias a la aplicación de las técnicas moleculares para el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. se ha comprobado que el ganado vacuno puede estar parasitado por un elevado número de especies y genotipos del protozoo. Debido al impacto económico negativo de la criptosporidiosis en las granjas de bovino, un porcentaje importante de las investigaciones realizadas en estas explotaciones son estudios de brotes de diarrea neonatal, lo que ha permitido establecer a *C. parvum* como la principal especie implicada en procesos clínicos (Santín *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2010; Amer *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta la elevada patogenicidad de esta especie, resulta sorprendente que en algunas investigaciones *C. parvum* sea también la especie identificada con mayor frecuencia en bovinos sin diarrea, incluso en adultos asintomáticos (Fayer *et al.*, 2002b; Castro-Hermida *et al.*, 2006b, 2007; Cardona *et al.*, 2015; Wells *et al.*, 2015).

El análisis del patrón de bandas obtenido tras la digestión de las muestras positivas a la PCR de la 18S con las endonucleasas *SspI*, *VspI* y *MboII* permitió identificar 4 especies de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni*) y un genotipo (*Cryptosporidium* genotipo *suis-like*). Al considerar únicamente los 91 aislados positivos, y como se aprecia en la Figura 4.3., *C. parvum* fue la especie más frecuentemente identificada (35/91), seguida por *C. bovis* (34/91); estas dos especies fueron significativamente más prevalentes (Tabla 4.3) que *C. ryanae* (8/91), *C. suis-like* (7/91) y *C. andersoni* (2/91), que únicamente se hallaron en un reducido número de muestras. Cinco aislados (5,5%; 5/91) fueron positivos a PCR, pero las bandas obtenidas fueron muy débiles, de manera que el producto

de PCR no fue suficiente para el análisis RFLP o para su secuenciación.

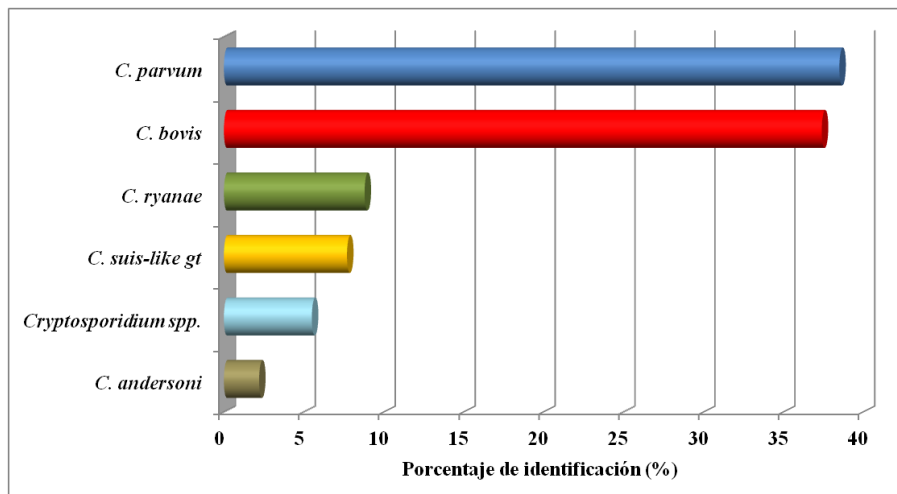


Figura 4.3. Porcentaje de identificación de cada una de las especies de *Cryptosporidium* identificadas en ganado vacuno de granjas gallegas

Al calcular la prevalencia de cada una de las especies se observó que el porcentaje de infección por *C. parvum* (35/555; 6,3%) y de *C. bovis* (34/555; 6,1%) fue muy similar. En menor proporción se hallaron *C. ryanae* (8/555; 1,4%) y el genotipo *suis-like* (7/555; 1,3%), mientras que *C. andersoni* solo se identificó en dos animales (2/555 0,3%).

Tabla 4.1. Valores de Chi-cuadrado y p al comparar el porcentaje de infección al considerar la especie de *Cryptosporidium* identificada

	<i>C. andersoni</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. ryanae</i>	<i>C. suis-like gt</i>
<i>C. andersoni</i>	-	29,398; p< 0,001	30,447; p< 0,001	3,634; p= 0,057	2,800; p= 0,094
<i>C. bovis</i>		-	0,016; p= 0,901	16,728; p< 0,001	18,462; p< 0,001
<i>C. parvum</i>			-	17,637; p< 0,001	19,401; p< 0,001
<i>C. ryanae</i>				-	0,068; p= 0,795

Para confirmar los resultados obtenidos en la PCR-RFLP se secuenció un número representativo de aislados de cada una de las especies cuyo patrón de restricción fue diferente al de *C. parvum*, comparándolas con las incluidas en la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Todos los aislados identificados como *C. andersoni* fueron idénticos a la secuencia de referencia KT922228, identificado por Wegayehu *et al.* (2017) en terneros de Etiopía. En el caso de *C. ryanae*, se identificaron dos secuencias diferentes (Figura 4.4); la mayoría de los aislados mostraron una homología del 100% con la secuencia de referencia KT922234, obtenida previamente en terneros de Etiopía (Wegayehu *et al.*, 2017), mientras que la muestra B11/12 fue idéntica a la KY711520, obtenida en vacuno de China por Cai *et al.* (2017). Entre ambas secuencias sólo se halló una única diferencia: una delección de un nucleótido (A) en la posición 435 (Figura 4.4).

	10	20	30	40	50
<i>C. ryanae</i> B05/11	CGGATCACAC	TATGTGACAT	ATCATTCAAG	TTTCTGACCT	ATCAGCTTTA
<i>C. ryanae</i> B11/12	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. andersoni</i> B11/19	..C...T..-T G...C.....	.....	.....	.....	.....
	60	70	80	90	100
<i>C. ryanae</i> B05/11	GACGGTAGGG	TATTGGCCTA	CCGTGGCTAT	GACGGGTAAC	GGGAATTAG
<i>C. ryanae</i> B11/12	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. andersoni</i> B11/19	.....	.....	.....	.....	.....
	110	120	130	140	150
<i>C. ryanae</i> B05/11	GGTTCGATTC	CGGAGAGGGA	GCCTGAGAAA	CGGCTACCAC	ATCTAAGGAA
<i>C. ryanae</i> B11/12	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. andersoni</i> B11/19	.....	.....	.....	.....	.....
	160	170	180	190	200
<i>C. ryanae</i> B05/11	GGCAGCAGGC	GCGCAAATTA	CCCAATCCTA	ATACAGGGAG	GTAGTGACAA
<i>C. ryanae</i> B11/12	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. andersoni</i> B11/19	.....	.....	.....G..C.....	.....	.....
	210	220	230	240	250
<i>C. ryanae</i> B05/11	GAAATAACAA	TACAGAGCCT	TACGGTTTTC	TAATTGGAAT	GAGTTAAGTA
<i>C. ryanae</i> B11/12	.....	.....	.....	.....	.....
<i>C. andersoni</i> B11/19	.....G.....A.....C.....G.....	.....	.....	.....	.....

Figura 4.4. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen SSU rRNA de diversos aislados representativos de *C. ryanae* y *C. andersoni* identificados en ganado vacuno. Los puntos indican nucleótidos idénticos al del aislado B05/11 y los guiones señalan delecciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo.

```

                260       270       280       290       300
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  TAAACCCCTT AACAAGTATC AATTGGAGGG CAAGTCTGGT GCCAGCAGCC
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|.....|.....|
                310       320       330       340       350
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT AAAGTTGTTG CAGTTAAAAA
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|.....|.....|
                360       370       380       390       400
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  GCTCGTAGTT AATTTCTGT  TAATTTTAT  ATA-CAATGC TACGGTATTT
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|.....|.....|
                410       420       430       440       450
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  AT-ATAAAT  TAACATAATT CATATTACTT TTTA-GTATA T--GAAACTT
C. andersoni B11/19 ..T...T... C...CC... C...TA... C...AA... .AG...T..
                460       470       480       490       500
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  TACTTTGAGA AAATTAGAGT GCTTAAAGCA GGCTATTGCC TTGAATACTC
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|.....|.....|
                510       520       530       540       550
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  CAGCATGGAA TAATAT-TAA GGATTTTAT  TCTTCTTATT GGTCTAGAA
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|.....|.....|
                560       570       580       590       600
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  TAAAAATAAT GATTAATAGG GACAGTTGGG GGCATTTGTA TTTAACAGTC
C. andersoni B11/19 C...G... .G... ..C... ..C... ..C...
                610       620       630       640       650
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  AGAGGTGAAA TTCTTAGATT TGTTAAAGAC AAACACTACTGC GAAAGCATTT
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|.....|.....|
                660       670       680       690       700
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  GCCAAGGATG TTTTCATTAA TCAAGAACGA AAGTTAGGGG ATCGAAGACG
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|.....|.....|
                710
C. ryanae B05/11  .....|.....|.....|
C. ryanae B11/12  ATCAGATACC GTCGTA
C. andersoni B11/19 .....|.....|.....|

```

Figura 4.4. (Continuación)

Todos los aislados identificados como *Cryptosporidium* genotipo *suis-like* fueron idénticos entre sí. Cuando se comparó la secuencia de mayor tamaño con las depositadas en el Genbank, se observó que mostraba una homología del 100% con los aislados HQ822146 (Figura 4.5.) y HQ822134 de *Cryptosporidium* spp. identificados por Robinson *et al.* (2011) en heces de personas y bovinos del Reino Unido, respectivamente, aunque estas secuencias eran de menor tamaño (803 y 789 pb) y únicamente cubrían el 95-97% de la longitud de nuestros aislados (824 pb).

En el Genbank se hallaron otras dos secuencias de menor tamaño pero que también fueron idénticas a las observadas en el presente estudio, la GQ345008 (Khan *et al.*, 2010) y la DQ182599 (Langkjaer *et al.*, 2007), ambas obtenidas en ganado vacuno, identificando los aislados como “*Cryptosporidium* spp. similar to *C. suis*” y “*Cryptosporidium suis-like*”.

Al considerar los aislados que cubrían el 100% de la longitud de nuestras secuencias, se observó una homología del 99% con varios aislados de *C. suis*; en todos los casos hubo diferencias de 2 pb (una transversión T x A en la posición 335 y una delección de una T en la 338; Figura 4.5.). Robinson *et al.* (2011) señalaron que los aislados no deberían considerarse *C. suis-like* ni *C. suis* ya que, aunque la secuencia es muy similar a la de *C. suis* para el gen 18S, es significativamente diferente para los genes de la actina y la HSP70.

Para confirmar la presencia de estas diferencias, estos aislados se analizaron para estos dos genes, pero las PCRs resultaron negativas.

Por todo ello, se necesitan nuevas investigaciones, incluyendo estudios morfométricos, biológicos y moleculares, para determinar si estos aislados pertenecen a una nueva especie del protozoo.

```

          10          20          30          40          50
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
GAGTAAGGAA CAACCTCCAA TCTCTAGTTG GCATAGTTTA TGGTTAAGAC
C. spp HQ822146    -----
C. suis JQ936502   .....

          60          70          80          90         100
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
TACGACGGTA TCTGATCGTC TTCGATCCCC TAACTTTCGT TCTTGATTAA
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....

          110         120         130         140         150
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
TGAAAACATC CTTGGCAAAT GCTTTCGCAC TAGTTTGTCT TTAACAAATC
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....

          160         170         180         190         200
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
TAAGAATTC ACCTCTGACT GTTAAATACA AATGCCCCCA ACTGTCCCTA
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....

          210         220         230         240         250
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
TTAATCATT ATTTTATCTT AGAACCAATA AAAAAGATAA AAATCTTTTA
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....

          260         270         280         290         300
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
TATTATCCA TGCTGGAGTA TTCAAGGCAT ATGCCTGCTT TAAGCACTCT
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....

          310         320         330         340         350
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
AATTTTCTCA AAGTAAATT TCATATACTA ATAATAA-TA TAGTAATATG
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....
                                     A T

          360         370         380         390         400
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
AATTATGTTA ATATTATATA AATATTAAAA ATATTATATA TAAATTATTA
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....

          410         420         430         440         450
C. suis-like B14/87  ....|....|....|....|....|....|
ACAGAAATCC AACTACGAGC TTTTFACTG CAACAACCTT AATATACGCT
C. spp HQ822146    .....
C. suis JQ936502   .....

```

Figura 4.5. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen SSU rRNA, incluyendo un aislado representativo de *C. suis-like* identificado en ganado vacuno de Galicia y *Cryptosporidium* spp. (HQ822146) y *C. suis* (JQ936502). Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado B14/87 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo.



	460	470	480	490	500
C. suis-like B14/87	ATGGAGCTG	GAATTACCGC	GGCTGCTGGC	ACCAGACTTG	CCCTCCAATT
C. spp HQ822146	.....	.....	.....	.....	.....
C. suis JQ936502	.....	.....	.....	.....	.....
	510	520	530	540	550
C. suis-like B14/87	GATACCTGTA	AAGGGGTTTA	TACTTAACTC	ATCCAATTA	CAAACTAAA
C. spp HQ822146	.....	.....	.....	.....	.....
C. suis JQ936502	.....	.....	.....	.....	.....
	560	570	580	590	600
C. suis-like B14/87	AAAGTCCTGT	ATTGTTATTT	CTTGCTACTA	CCTCCCTGTA	TTAGGATGG
C. spp HQ822146	.....	.....	.....	.....	.....
C. suis JQ936502	.....	.....	.....	.....	.....
	610	620	630	640	650
C. suis-like B14/87	GTAATTGCG	CGCCTGCTGC	CTTCCTTAGA	TGTGGTAGCC	TTTTCTCAGG
C. spp HQ822146	.....	.....	.....	.....	.....
C. suis JQ936502	.....	.....	.....	.....	.....
	660	670	680	690	700
C. suis-like B14/87	CTCCCTCTCC	GGAATCGAAC	CCTAATPCCC	CGTTACCCGT	CATTGCCACG
C. spp HQ822146	.....	.....	.....	.....	.....
C. suis JQ936502	.....	.....	.....	.....	.....
	710	720	730	740	750
C. suis-like B14/87	GTAGGCCAAT	ACCCTACCGT	CTAAAGCTGA	TAGGTCAGAA	ACTTGAATGA
C. spp HQ822146	.....	.....	.....	.....	.....
C. suis JQ936502	.....	.....	.....	.....	.....
	760	770	780	790	800
C. suis-like B14/87	TATGTCACAT	TAAAAATGTG	ATCCGTAAAG	TTATTATGAA	TCACCAAATT
C. spp HQ822146	.....	.....	.....	.....	.....
C. suis JQ936502	.....	.....	.....	.....	.....
	810	820			
C. suis-like B14/87	ATATTGGTTC	TTTATCTAAT	AAAT		
C. spp HQ822146	.....	.....	.....		
C. suis JQ936502	.....	.....	.....		

Figura 4.5. (Continuación)

La mayoría de los aislados identificados como *C. bovis* fueron idénticos a la secuencia de referencia MF074602, obtenida en ganado vacuno de China (Cai *et al.*, 2017). El resto mostraron una delección de una timina en la posición 718 (Figura 4.6.), mostrando una homología del 100% con el aislado KC618608 detectado por Rzezutza y Kaupke (2013) en bovinos de Polonia.

```

          10      20      30      40      50
C. bovis_B05/23  TTACGGATCA CATTATGTGA CATATCATT C AAGTTTCTGA CCTATCAGCT
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          60      70      80      90     100
C. bovis_B05/23  TTAGACGGTA GGGTATTGGC CTACCGTGGC TATGACGGGT AACGGGGAAT
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          110     120     130     140     150
C. bovis_B05/23  TAGGGTTCGA TTCCGGAGAG GGAGCCTGAG AAACGGCTAC CACATCTAAG
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          160     170     180     190     200
C. bovis_B05/23  GAAGGCAGCA GCGCGCAA TTACCCAATC CTAATACAGG GAGGTAGTGA
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          210     220     230     240     250
C. bovis_B05/23  CAAGAAATAA CAATACAGAA CCTTACGGTT TTGTAATTGG AATGAGTTAA
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          260     270     280     290     300
C. bovis_B05/23  GTATAAACCC CTTAACAGT ATCAATTGGA GGGCAAGTCT GGTGCCAGCA
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          310     320     330     340     350
C. bovis_B05/23  GCCGCGGTAA TTCCAGCTCC AATAGCGTAT ATTAAAGTTG TTGCAGTTAA
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          360     370     380     390     400
C. bovis_B05/23  AAAGCTCGTA GTTAATCTTC TGTTAATTTT TATATATAAT ATCACGATAT
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

          410     420     430     440     450
C. bovis_B05/23  TTATATAATA TTAACATAAT TCATATTACT TTTTAGTATA TGAAACTTTA
C. bovis_B08/15  .....
C. xiaoi_B14/110 .....

```

Figura 4.6. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen SSU rRNA de aislados representativos de *C. bovis* y *C. xiaoi* identificados en ganado vacuno de Galicia. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado B05/23 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo.

	460	470	480	490	500	
C. bovis B05/23	..... ..... ..... ..... ..... .....	CTTTGAGAAA	ATTAGAGTGC	TAAAGCAGG	CTATTGCCTT	GAATACTCCA
C. bovis B08/15	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
C. xiaoi B14/110	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
	510	520	530	540	550	
C. bovis B05/23	..... ..... ..... ..... ..... .....	GCATGGAATA	ATATTAAGGA	TTTTTATTCT	TCTTATTGGT	TCTAGAATAA
C. bovis B08/15	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
C. xiaoi B14/110	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
	560	570	580	590	600	
C. bovis B05/23	..... ..... ..... ..... ..... .....	AAATGATGAT	TAATAGGGAC	AGTTGGGGGC	ATTGTATTTT	AACAGTCAGA
C. bovis B08/15	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
C. xiaoi B14/110	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	A.	.....	.....	.....
	610	620	630	640	650	
C. bovis B05/23	..... ..... ..... ..... ..... .....	GGTGAAATTC	TTAGATTGTT	TAAAGACAAA	CTACTGCCGAA	AGCATTGACC
C. bovis B08/15	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
C. xiaoi B14/110	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
	660	670	680	690	700	
C. bovis B05/23	..... ..... ..... ..... ..... .....	AAGGATGTTT	TCATTAATCA	AGAACGAAAG	TTAGGGGATC	GAAGACGATC
C. bovis B08/15	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
C. xiaoi B14/110	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
	710	720	730	740		
C. bovis B05/23	..... ..... ..... ..... ..... .....	AGATACCGTC	GTAGTCTTAA	CCATAAACTA	TGCCAACTAG	A
C. bovis B08/15	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....
C. xiaoi B14/110	..... ..... ..... ..... ..... .....	.....	.....	.....	.....	.....

Figura 4.6. (Continuación)

Por último, un único aislado (B14/110) mostró una transición (G x A en la posición 568; Figura 4.6.), resultando idéntico a varios aislados identificados como *C. xiaoi*, entre ellos el KY055405 (Kaupke *et al.*, 2017). También coincidió al 100% con otras secuencias de *C. bovis*, pero curiosamente todas ellas procedían de pequeños rumiantes domésticos. *C. bovis* y *C. xiaoi* presentan una secuencia muy similar para el 18S; de hecho, hay estudios donde, al emplear únicamente este gen para el análisis genotípico, denominan a los aislados *C. bovis/C. xiaoi* (Mirhashemi *et al.*, 2016). Por ello, en este caso, sería también interesante caracterizar este aislado para los genes de la actina y la Hsp70, donde las diferencias son más acusadas (Díaz *et al.*, 2010b). Sin embargo este análisis no se pudo realizar porque todo el ADN de esta muestra se había utilizado anteriormente.

Todos estos resultados nos indican que el ganado vacuno gallego está infectado por las cuatro especies principales de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni*) que afectan a los bovinos, puesto que, a nivel mundial, son las especies predominantes en el ganado vacuno (Peng *et al.*, 2003; Santín *et al.*, 2004; Langkjaer *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Fayer *et al.*, 2007; Xiao, 2010; Chalmers y Katzer, 2013). La mayor prevalencia observada para *C. parvum* en el presente estudio coincide con numerosas investigaciones realizadas en ganado vacuno de Europa, que la consideran la especie más frecuente en estos animales, afectando principalmente a los más jóvenes, aunque varios autores han confirmado que puede afectar a bovinos de todas las edades (Díaz *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2010; Göhring *et al.*, 2014). *C. bovis* fue muy prevalente en el ganado bovino gallego y, de hecho, estudios realizados en China, Australia, India y EE.UU., así como en varios países europeos, la han señalado como la especie predominante (Santín *et al.*, 2004, 2008; Khan *et al.*, 2010; Silverlas *et al.*, 2010b; Wang *et al.*, 2011b; Abeywardena *et al.*, 2013b; Rieux *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Por el contrario, el porcentaje de animales positivos a *C. andersoni* fue muy reducido, aunque en algunos países de Asia y América, como China, Brasil y Canadá, es la especie predominante (Zhou *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Sevá *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2011; Paz e Silva *et al.*, 2014).

En el ganado vacuno también se han identificado, aunque de forma esporádica, otras especies como *C. felis*, *C. hominis* o *C. suis*, así como algunos genotipos, incluido el *suis*-like (Bornay-Llinares *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2005; Fayer *et al.*, 2006; Langayan *et al.*, 2006). Es interesante destacar que, en nuestro estudio, se han hallado un número considerable de aislados identificados como genotipo *suis*-like que, aunque se ha encontrado en varias muestras procedentes de bovinos, en general se considera un hallazgo ocasional, limitado a un número escaso de aislados (Fayer *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007 a; Khan *et al.*, 2010; Xiao, 2010; Šlapeta, 2013); de hecho, su prevalencia fue muy superior a la de *C. andersoni*, una de las especies más frecuentes en animales adultos (Santín *et al.*, 2004; Santín y Trout, 2008; Fayer *et al.*, 2010a; Wang *et al.*, 2011; Šlapeta, 2013;

Smith *et al.*, 2014). Aunque *C. suis* se considera una especie específica del ganado porcino, se ha identificado en muestras de ganado vacuno de aptitud cárnica y lechera, así como en personas (Xiao *et al.*, 2002 a; Fayer *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2006; Leoni *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013b). El genotipo *suis*-like también se ha hallado en ganado porcino (Langkjaer *et al.*, 2007), así como en otros hospedadores, como roedores (Ng-Hublin *et al.*, 2013), pero la mayoría de los aislados identificados proceden de bovinos (Khan *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2017). Este genotipo es muy similar a *C. suis* en el gen 18S, pero en otros locus, como la actina y el *hsp70*, las diferencias son significativas (Robinson *et al.*, 2011). Por ello, es posible que el ganado porcino no sea el hospedador tipo; de hecho, se ha identificado en ganado vacuno de Australia, Dinamarca, la India y Reino Unido que no habían tenido contacto con el ganado porcino (Langkjaer *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2011; Abeywardena *et al.*, 2013a, b). Aunque en el pasado la cría de varias especies animales, compartiendo instalaciones, era algo muy común en Galicia, lo que favorecería la aparición de especies del protozoo en hospedadores poco adecuados, en la actualidad esto no es frecuente, pudiendo encontrarse únicamente en algunas granjas tradicionales, de pequeño tamaño. De hecho, las granjas positivas al genotipo *suis*-like eran explotaciones profesionales, donde los bovinos no compartían instalaciones con otras especies animales.

Nuestros resultados son también importantes desde el punto de vista de Salud Pública, ya que *C. parvum*, que es la especie más frecuentemente identificada en el presente estudio, es la más importante para el ser humano desde el punto de vista zoonótico; de hecho, esta especie se ha considerado, junto a *C. hominis*, responsable de la mayoría de los brotes de criptosporidiosis humana (Xiao y Feng, 2008; Xiao, 2010). Aunque se desconoce su patogenicidad, el genotipo *suis*-like también se ha detectado de forma esporádica en muestras fecales procedentes de personas en Canadá y el Reino Unido (Ong *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2011). Así mismo, *C. andersoni* se ha identificado esporádicamente en personas en Francia, India Malawi y el Reino Unido (Guyot *et al.*, 2001; Leoni *et al.*, 2006; Morse *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2017), a pesar de que no se considera una especie

importante desde el punto de vista zoonótico (Santín *et al.*, 2004; Šlapeta, 2013).

En la mayoría de las granjas sólo se halló un único animal positivo a *Cryptosporidium* spp. (Tabla 4.1.). En quince explotaciones se detectaron varios animales que eliminaban ooquistes del parásito; en estos casos se analizó la posible presencia de diferentes especies del protozoo. En la mayoría de estas granjas sólo se identificó una única especie del protozoo en todos los bovinos positivos, predominando *C. parvum* (Tabla 4.1.). En el 40% de los rebaños con más de un animal positivo se identificaron 2 especies, siendo especialmente frecuente la presencia *C. parvum* y *C. bovis* (Tabla 4.1.). Por último, sólo en dos granjas (13,3%; 2/15) se hallaron 3 especies diferentes; en una se halló la combinación *C. parvum*+ *C. bovis*+ *C. ryanae*, mientras que en la otra se observó *C. ryanae*+ *C. bovis*+ *C. andersoni* (Tabla 4.1.).

Tabla 4.1. Infecciones mixtas por *Cryptosporidium* spp. en explotaciones de ganado vacuno en Galicia

Especies identificadas		Porcentaje
Granjas con 1 animal positivo		47/62 (75,8%)
Granjas con al menos 2 animales positivos		15/62 (24,2%)
1 especie		7/15 (46,7%)
	<i>C. parvum</i>	6/7 (85,7%)
	<i>C. bovis</i>	1/7 (14,3%)
2 especies		6/15 (40,0%)
	<i>C. bovis</i> + <i>C. parvum</i>	3/6 (50,0%)
	<i>C. bovis</i> + <i>C. ryanae</i>	2/6 (33,3%)
	<i>C. bovis</i> + <i>C. suis-like</i> gt	1/6 (16,7%)
3 especies		2/15 (13,3%)
	<i>C. bovis</i> + <i>C. ryanae</i> + <i>C. parvum</i>	1/2 (50%)
	<i>C. bovis</i> + <i>C. ryanae</i> + <i>C. andersoni</i>	1/2 (50%)

#### 4.1.3. Relación entre las especies de *Cryptosporidium* y la edad de los animales

Para analizar la posible relación sobre la asociación de determinados grupos de edad con diferentes especies de *Cryptosporidium*, como se señaló en el correspondiente apartado de

Materiales y Métodos, se consideraron 4 grupos de edad: G1: terneros lactantes menores de 2 meses, G2: terneros destetados de entre 2-12 meses, G3: novillas entre 12-24 meses y G4: adultos mayores de 24 meses.

En los terneros más jóvenes se hallaron tres especies: *C. parvum*, *C. bovis* y *C. ryanae* (Figura 4.7.), siendo la primera la especie dominante en este grupo de edad. En los animales de mayor edad predominan otras especies, siendo *C. bovis* la más frecuentemente identificada en todos los grupos de bovinos de más de dos meses (Fig. 4.7.).

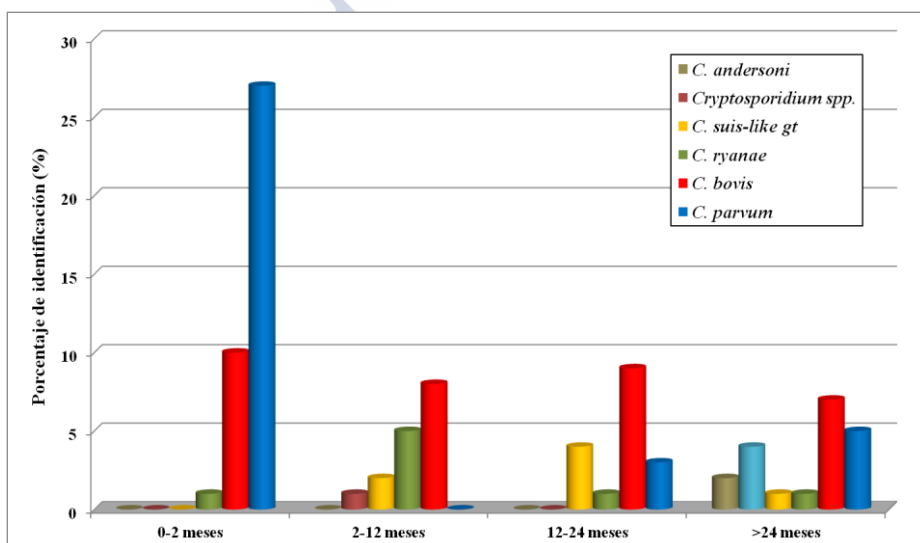


Figura 4.7. Porcentaje de identificación de *Cryptosporidium* spp. en ganado vacuno de Galicia al considerar la edad de los animales

A medida que aumentó la edad de los animales, se encontró una mayor variedad de especies y genotipos del parásito; así, en los terneros de 2-12 meses se identificaron dos especies (*C. bovis* y *C. ryanae*) y un genotipo (*C. genotipo suis-like*), en las novillas se hallaron las anteriores y *C. parvum*, y finalmente, en los bovinos adultos se encontraron todas las especies y genotipos identificados en este estudio (Figura 4.7.). Es interesante señalar que la presencia de *C. andersoni* estuvo restringida a este último grupo.

Cuando se analizó la variación de los valores de prevalencia de cada una de las especies de *Cryptosporidium* identificadas, se observó que el porcentaje de infección por *C. parvum* fue del 20,3% en los terneros de menos de 2 meses, disminuyendo a un 2,4% en los animales mayores de 24 meses; cabe destacar que esta especie no se halló en terneros de 2-12 meses. *C. bovis* y *C. ryanae* se identificaron en todos los rangos de edad, experimentando una variación en la prevalencia muy similar; así, en los terneros lactantes los porcentajes de infección (7,5% y 0,8%, respectivamente) fueron inferiores a los hallados en los terneros de 2-12 meses, donde se observaron los valores más elevados (8,9% y 5,6%, respectivamente). A partir de esa edad, la prevalencia disminuyó progresivamente (*C. bovis*= 7,1% y *C. ryanae*= 0,8% en las novillas), alcanzando los valores más reducidos en los bovinos de mayor edad (3,4% y 0,5%, respectivamente). La prevalencia de *Cryptosporidium* genotipo *suis-like* fue del 2,2% en los terneros de 2-12 meses, del 3,2% en los animales de 12-24 meses de edad y del 0,5% en los mayores de 24 meses. *C. andersoni* únicamente se identificó en el 1% de los animales mayores de 24 meses, estando ausente en el resto de grupos de edad.

Los datos obtenidos en este estudio muestran que ciertas especies de *Cryptosporidium* presentan una asociación con determinados grupos de edad, siendo más similares al “patrón clásico” establecido en números estudios previos (Feng *et al.*, 2007; Santín y Trout, 2008; Xiao, 2010), aunque con algunas diferencias significativas. Así, nuestros resultados coinciden con el “patrón clásico” en que los terneros menores de 2 meses son los más sensibles a la infección por *C. parvum*, que es la especie predominante en este grupo de edad, aunque también se han descrito infecciones por *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni* con una menor prevalencia, siendo especialmente frecuentes en animales sin diarrea (Wang *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2014; Robertson *et al.*, 2014). Asimismo, los datos obtenidos en los bovinos de más edad también coinciden, en general, con este “patrón clásico”, que señala que estos animales están parasitados por especies más adaptadas al ganado vacuno y menos patógenas que *C. parvum*, que puede aparecer con una menor prevalencia que en los terneros lactantes (Santín *et al.*, 2008); el “patrón clásico” también señala a *C.*



*bovis* y *C. ryanae* como las especies predominantes en bovinos de 2-12 meses, mientras que *C. andersoni* es la más común en ganado bovino adulto mayor de 1 año.

En los animales sin destetar la especie dominante fue *C. parvum*, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente en terneros neonatos sin diarrea en Galicia (Castro-Hermida *et al.*, 2002; García Meniño, 2013). Valderrey (2017) observó que un importante porcentaje de terneros lactantes sanos era positivo a *Cryptosporidium* spp., siendo *C. parvum* la especie más prevalente hasta la 4<sup>a</sup> semana de vida. Además, esta especie también es la más frecuente en terneros con diarrea en España, especialmente durante las dos primeras semanas de vida, donde su prevalencia es más elevada (Castro-Hermida *et al.*, 2002b; Quílez *et al.*, 2008a; Díaz *et al.*, 2010a; Soilán, 2014). Un análisis conjunto de todos estos resultados indica que los terneros lactantes asintomáticos, especialmente aquellos con edades comprendidas entre las 3 y 4 semanas de vida, poseen una gran importancia epidemiológica, pues actúan frecuentemente como reservorios de *C. parvum*, contaminando el medio con ooquistes y, por tanto, constituyendo una fuente de infección para otros terneros neonatos, más receptivos a la infección con esta especie y a presentar criptosporidiosis clínica (Huetink *et al.*, 2001; Castro-Hermida *et al.*, 2002; Fayer *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2007; Xiao, 2010; Silverlas *et al.* 2009b, 2010b). La aparición de los procesos diarreicos en los rebaños estaría relacionado con unas condiciones higiénicas deficientes en las explotaciones, y facilitados por el manejo tradicional de los animales (Díaz *et al.*, 2014). Además, *C. parvum* es importante desde el punto de vista de la Salud Pública, ya que esta especie junto con *C. hominis*, son responsables de la mayoría de los brotes de criptosporidiosis en humanos a través de productos alimenticios, el agua o el contacto directo con ellos (Santín *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2007; Fayer, 2008; Xiao, 2010; Chalmers y Katzer, 2013). Por lo tanto, sí se tienen en cuenta los porcentajes de infección observados en este estudio, los terneros menores de 2 meses en Galicia poseen una gran importancia como portadores y diseminadores de especies del parásito con potencial zoonótico, por lo que las personas que tengan un contacto directo con estos animales deben tomar precauciones para

evitar adquirir y/o diseminar la infección.

Aunque *C. parvum* no se identificó en terneros destetados, lo que coincide con lo observado por Ayimonde *et al.* (2010) y Maikai *et al.* (2011), su presencia fue notable en los animales de más de 1 año de edad, constituyendo la segunda especie más importante en los animales de más de 2 años. La presencia de *C. parvum* en el ganado vacuno adulto está poco documentada en la literatura (Smith *et al.*, 2014; Wells *et al.*, 2015). La importante presencia de esta especie altamente patógena en individuos sanos podría estar relacionado con el rápido desarrollo de una inmunidad parcialmente protectora a una edad temprana, consecuencia de un correcto encalostrado y, sobre todo, a una infección progresiva con un reducido número de ooquistes facilitada por la aplicación de correctas medidas higiénicas (Rieux *et al.*, 2013; Robertson *et al.*, 2014). Sin embargo, la presencia de *C. parvum* en todos los grupos de edad, incluso en los más mayores, tiene importantes repercusiones desde el punto de vista epidemiológico, ya que los animales de cualquier edad, especialmente los terneros neonatos y las vacas adultas, podrían actuar como portadores asintomáticos de esta especie, eliminando ooquistes de *C. parvum* de manera intermitente y contaminando el medio, y por tanto incrementando el riesgo de infección para los terneros neonatos que son los más sensibles (Huetink *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2010a), lo que favorecería la aparición de brotes de diarreas neonatales en las granjas (Vieira *et al.*, 2009). Por todo ello, en las granjas de ganado vacuno de Galicia sería recomendable mantener a los neonatos en cubículos individuales y separados de los animales adultos, para evitar así la aparición de brotes de diarrea neonatal en las explotaciones.

*C. bovis* y *C. ryanae* fueron las únicas especies que se identificaron en todos los grupos de edad, aunque su prevalencia fue más elevada en los animales de entre 2 y 24 meses, siendo similar a lo observado por Feng *et al.* (2007) y Cai *et al.* (2017) y coincidiendo con el “patrón clásico” (Santín *et al.*, 2004, 2008; Langkjaer *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010; Hingole *et al.*, 2017). *C. bovis* se considera una de las especies más importantes en el ganado vacuno (Santín *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2006; Langkjær *et al.*, 2006); de hecho, en nuestro estudio fue la especie más prevalente en todos los grupos de

edad tras el destete; estos resultados difieren ligeramente con los del “patrón clásico”, que señala a *C. andersoni* como la especie predominante en los animales de mayor edad (Santín *et al.*, 2004; Santín y Trout, 2008; Fayer *et al.*, 2010a; Smith *et al.*, 2014), aunque muchas veces se acompaña de porcentajes notables de *C. bovis* (Santín *et al.*, 2004, 2008; Fayer *et al.*, 2006, 2007; Budu-Amoako *et al.*, 2012a).

La escasa importancia de *C. bovis* y *C. ryanae* en los terneros lactantes coincide con la señalada en numerosos trabajos (Santín *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2007; Xiao, 2010; Meireles *et al.*, 2011); los reducidos porcentajes de identificación observados durante la lactancia podrían ser indicativos del incremento de su importancia en los animales de mayor edad. Sin embargo, varios autores han detectado a *C. bovis* como la especie más frecuente en terneros lactantes sin diarrea (Feng *et al.*, 2007; Maikai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Rieux *et al.*, 2014). Varias investigaciones han demostrado que estas especies están más adaptadas al ganado vacuno y por lo tanto son menos patógenas, por lo que son más frecuentes en animales que no muestran sintomatología clínica (Santín *et al.*, 2004; Fayer, 2008; Quílez *et al.*, 2008a; Silverlas *et al.*, 2010a; Wang *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2014). De hecho, en un trabajo previo realizado en terneros con diarrea neonatal de Galicia, Soilán (2014) únicamente identificó *C. bovis* en dos muestras, aunque en ambos casos las infecciones fueron mixtas, hallándose también *C. parvum*.

En este estudio se observó la presencia de *C.* genotipo *suis*-like en todos los grupos de edad, excepto en los terneros lactantes, siendo más prevalente en el rango de edad de 12-24 meses de edad. Estos resultados coinciden con los hallados en la mayoría de las investigaciones donde se identificó este genotipo, pues predominó en animales de 3-12 meses o mayores de 24 meses (Ma *et al.*, 2015; Abeywardena *et al.*, 2013a, b; Robinson *et al.*, 2011; Geurden *et al.*, 2007; Langkjaer *et al.*, 2007). Por el contrario, en un estudio realizado en la India, Khan *et al.* (2010) observaron que este genotipo era más prevalente en los terneros menores de 2 meses.

Numerosos estudios realizados en ganado vacuno a nivel mundial señalan a *C. andersoni* como la especie más prevalente en los

animales adultos, muchas veces restringida a los animales de mayor edad (Enemark *et al.*, 2002b; Kvac y Vitotec, 2003; Olson *et al.*, 2004; Santín *et al.*, 2004, 2008; Kvac *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2006; Thomaz *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2009; Ondracova *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011 a; Smith *et al.*, 2014); no obstante, se ha demostrado que puede infectar a todos los rangos de edad (Huber *et al.*, 2007; Kvac *et al.*, 2008; Meireles *et al.*, 2011; Paz e Silva *et al.*, 2013) causando pocos o ningún signo clínico (Santín y Trout, 2007). Aunque nuestros resultados coinciden con los del “patrón clásico” en que *C. andersoni* se halló en los animales de más edad, su importancia en este grupo de edad fue muy reducida (1%), siendo su prevalencia menor a las observadas para *C. bovis* (3,4%) y *C. parvum* (2,4%). Estas prevalencias tan bajas ya habían sido halladas en estudios realizados en EE.UU. y Japón (Santín *et al.*, 2004; Feltus *et al.*, 2008; Amer *et al.*, 2009).

#### 4.1.4. Análisis subtípico

Para la mayoría de las especies de *Cryptosporidium*, al análisis del gen de la glicoproteína de 60 kDa (GP60) es una herramienta de subtipado muy útil y estandarizada, que ha permitido incrementar notablemente la capacidad de diferenciar aquellos subtipos con potencial zoonótico, especialmente en *C. parvum* (Strong *et al.*, 2000; Jex y Gasser, 2010; Rieux *et al.*, 2013a). Actualmente se dispone de un buen conjunto de subtipos GP60 descritos en el ganado vacuno, más de 80 diferentes, pertenecientes principalmente a las familias alélicas IIa y IIc.

Todos los aislados procedentes de ganado vacuno identificados como *C. parvum* (35) mediante RFLP y secuenciación se analizaron también para el locus que codifica para la GP60. Sin embargo, sólo se obtuvieron bandas del tamaño esperado ( $\approx 850$  pb) en el 74,3% (26/35) de las muestras, aunque 2 de éstas muestras mostraron bandas débiles y, por consiguiente, no se pudieron secuenciar; las 9 muestras restantes resultaron negativas. El análisis de las secuencias obtenidas reveló la presencia de 2 subtipos pertenecientes a la familia alélica IIa, IIaA15G2R1 (83,3%; 20/24) y IIaA16G3R1 (16,7%; 4/24), cuyas secuencias se representan en la Figura 4.8. Todas las secuencias GP60

procedentes de muestras de ganado vacuno mostraron una homología del 100% con los aislados de referencia procedentes de animales o de humanos depositados en el GenBank. Así, las secuencias del subtipo IIaA15G2R1 fueron idénticas a la de los aislados AB514090 y JF727755 procedentes de bovinos y personas, respectivamente (Amer *et al.*, 2010; Waldron *et al.*, 2011), mientras que las del subtipo IIaA16G3R1 coincidieron con las de los aislados de origen bovino DQ192506 (Trotz-Williams *et al.*, 2006) y humano HQ005741 (Chalmers *et al.*, 2011).

```

          10      20      30      40      50
IIaA15G2R1 B14/35  TTAAGGATG TTCTGTGA GGCATCA TCATCATCG- ----TCATC
IIaA16G3R1 B80      ..... T CATCG.....

          60      70      80      90      100
IIaA15G2R1 B14/35  ATCATCATCA TCATCATCAT CATCATCATC AACATCAACC GTCGCACCAG
IIaA16G3R1 B80      .....

          110     120     130     140     150
IIaA15G2R1 B14/35  CAAATAAGGC AAGAACTGGA GAAGACGAG AAGGCAGTCA AGATTCTAGT
IIaA16G3R1 B80      .....

          160     170     180     190     200
IIaA15G2R1 B14/35  GGTACTGAAG CTCTGTGTAG CCAGGTTTCT GAAGAGGAAG GTAGTGAAGA
IIaA16G3R1 B80      .....

          210     220     230     240     250
IIaA15G2R1 B14/35  CGATGGCCAA ACTAGTGCTG CTCCCAACC CACTACTCCA GCTCAAAGTG
IIaA16G3R1 B80      .....

          260     270     280     290     300
IIaA15G2R1 B14/35  AAGGCGCAAC TACCGAAACC ATAGAAGCTA CTCCAAAAGA AGAATGCGGC
IIaA16G3R1 B80      .....

          310     320     330     340     350
IIaA15G2R1 B14/35  ACTTCATTTG TAATGTGGTT CGGAGAAGGT ACCCCAGCTG CGACATGAA
IIaA16G3R1 B80      .....

          360     370     380     390     400
IIaA15G2R1 B14/35  GTGTGGTGCC TACACTATCG TCTATGCACC TATAAAAGAC CAAACAGATC
IIaA16G3R1 B80      .....

```

Figura 4.8. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen gp60 de diversos aislados representativos de *C. parvum* identificados en ganado vacuno de Galicia. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado B14/35 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo.

```

                410      420      430      440      450
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CGGCACCAAG ATATATCTCT GGTGAAGTTA CATCTGTAAC CTTTGAAAAG
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

                460      470      480      490      500
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AGTGATAATA CAGTTAAAAT CAAGGTTAAC GGTGAGGATT TCAGCACTCT
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

                510      520      530      540      550
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CTCTGCTAAT TCAAGTAGTC CAACTGAAAA TGGCGGATCT GCGGGTCAGG
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

                560      570      580      590      600
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CTTCATCAAG ATCAAGAAGA TCACTCTCAG AGGAAACCAG TGAAGCTGCT
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

                610      620      630      640      650
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GCAACCGTCG ATTTGTTTGC CTTTACCCTT GATGGTGTA AAAGAATGA
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

                660      670      680      690      700
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AGTGGCTGTA CCAAACGTCG AAGATGCATC TAAAAGAGAC AAGTACGTT
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

                710      720      730      740      750
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TGGTTGCAGA CGATAAACCT TTCTATACCG GGCCAAACAG CGGCACTACC
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

                760      770      780
IIaA15G2R1 B14/35  ....|....| ....|....| ....|....|
AATGGTGTCT ACAGGTTGAA TGAGAACGGA GACT
IIaA16G3R1 B80    ....|....| ....|....| ....|....|

```

Figura 4.8. (Continuación)

Al analizar los resultados considerando los grupos de edad (Tabla 4.3) se observó que en los terneros menores de 2 meses amplificaron 22 (81,5%) de las 27 muestras positivas a *C. parvum* mediante PCR-RFLP del gen 18S; tras el análisis de la secuencia se comprobó que 18 pertenecían al subtipo IIaA15G2R1 (81,8%) y 4 al subtipo IIaA16G3R1 (18,2%), detectados previamente en terneros con diarrea en la misma área de estudios (Díaz *et al.*, 2010a; Soilán, 2014). En las novillas de 12-24 meses de edad, sólo amplificaron 2 de las 3 muestras positivas al 18S; todas pertenecieron al subtipo IIaA15G2R1. Finalmente, de las 5 muestras positivas a *C. parvum* detectadas en animales adultos, sólo se obtuvieron bandas muy débiles

en dos, que impidieron su secuenciación; por esta razón, en este grupo de edad no se pudieron identificar los subtipos.

**Tabla 4.3. Subtipos GP60 de *C. parvum* identificados en ganado bovino procedentes de rebaños gallegos, al considerar la edad**

Grupos de edad	Positivos GP60	Subtipos GP60
G1: < 2 meses	22/27	IlaA15G2R1 (18/22) IlaA16G3R1 (4/22)
G3: 12-24 meses	2/3	IlaA15G2R1 (2/2)
G4: >24 meses	2/5	-

Los resultados obtenidos muestran que todos los aislados identificados pertenecían a la familia Ila, coincidiendo con lo observado en la gran mayoría de los estudios realizados en ganado vacuno (Jex y Gasser, 2010; Xiao, 2010). Todo ello confirma que, globalmente, estos animales se infectan principalmente por *C. parvum* pertenecientes a la familia alélica Ila, especialmente el IlaA15G2R1, aunque también se han hallado un número importante de subtipos IId en los bovinos (Xiao, 2010); la identificación en el vacuno de subtipos de *C. parvum* pertenecientes a otras familias alélicas es ocasional (Xiao, 2010). Además, se debe destacar que la familia Ila se considera la más importante desde el punto de vista de la Salud Pública, siendo la principal responsable de la aparición de casos de criptosporidiosis humana de origen zoonótico (Amer *et al.*, 2010; Xiao, 2010; Cui *et al.*, 2014; Björkman *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2015; Ibrahim *et al.*, 2016).

Hasta el momento, en España sólo se ha analizado la variabilidad intraespecífica de *C. parvum* en ruminantes domésticos con diarrea neonatal; en terneros se han identificado numerosos subtipos pertenecientes a 2 familias alélicas, la Ila y la IId (Quílez *et al.*, 2008a; Díaz *et al.*, 2010a; Soilán, 2014). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en estos trabajos previos, que señalaron que el IlaA15G1R1 y el IlaA16G3R1 eran los más frecuentes. Así, Quílez *et al.* (2008a) señalaron que el subtipo más frecuente en terneros menores de 21 días procedentes del norte de España era el IlaA15G2R1 (75,7%), mientras que el subtipo IlaA16G3R1 se identificó en menor proporción (10,0%). Posteriormente, Díaz *et al.* (2010a) observaron solo la presencia de la familia alélica Ila en

terneros menores de tres semanas con diarrea en Galicia, siendo el subtipo IIaA15G2R1 el más común y ampliamente distribuido en terneros, identificándose en 26 aislados (96,3%). Asimismo, Soilán (2014), en terneros con diarrea procedentes de esta misma zona geográfica, señaló la predominancia de los subtipos IIaA15G2R1 (76%) y IIaA16G3R1 (13%).

La variabilidad genética de *C. parvum* observada en el presente estudio fue muy reducida, pues solo se identificaron 2 subtipos, similar a los 3 detectados por Díaz *et al.*, (2010a) en terneros lactantes de Galicia. En el norte de España, Quílez *et al.* (2008a) hallaron un mayor número de subtipos en terneros (6), mientras que Soilán (2014) identificó 8, aunque esta mayor variabilidad puede obedecer a un mayor número de aislados identificados.

Los subtipos IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1 encontrados en el ganado vacuno en Galicia habían sido previamente detectados en humanos, lo que indica que tienen potencial zoonótico (Navarro-i-Martínez *et al.*, 2003, 2010; Vergara y Quílez, 2004; Quílez *et al.*, 2008b; Soilán, 2014; Abal-Fabeiro *et al.*, 2015). El subtipo IIaA15G2R1 está considerado como uno de los principales subtipos responsables de criptosporidiosis humana (Glberman *et al.*, 2002; Chalmers *et al.*, 2005; Sulaiman *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006). Por el contrario, el subtipo IIaA16G3R1, que también posee potencial zoonótico, se ha detectado esporádicamente en casos humanos (Trotz-Williams *et al.*, 2006; Zintl *et al.*, 2009; Nazemalhosseini-Mojarad *et al.*, 2011).

## 4.2. En ganado ovino y caprino

### 4.2.1. Prevalencia de infección

Al analizar la prevalencia individual, se observó que el 5,9% de los pequeños ruminantes eran positivos a *Cryptosporidium* spp. Además, se apreció que los porcentajes de infección fueron similares en las ovejas (5,9%; 19/324) y en las cabras (6,0%; 14/234), por lo que no se constataron diferencias significativas entre ambas especies animales ( $\chi^2 = 0,003$ ;  $p = 0,953$ ). Sin embargo, el porcentaje de



infección hallado en el ganado bovino fue significativamente superior al hallado tanto en el ovino ( $\chi^2 = 22,389$ ;  $p < 0,001$ ) como en el caprino ( $\chi^2 = 16,717$ ;  $p < 0,001$ ). En ambas especies de pequeños rumiantes se comprobó que la prevalencia individual era superior en los animales procedentes de explotaciones de Lugo (7,2% ov.; 7,6% cap.) que en los de A Coruña (3,9% ov.; 5,7% cap.); ninguna de las cabras explotadas en la provincia de Ourense resultaron positivas. Con Chi-cuadrado se constató que estas diferencias no eran significativas ( $p > 0,05$ ).

La similitud observada en la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ovejas y cabras de Galicia contrasta con los de una revisión publicada por Robertson (2009), quien señaló un mayor porcentaje de infección en el ganado ovino ( $\approx 30\%$ ) que en el caprino ( $\approx 15\%$ ). Estos resultados concuerdan con los observados en ovejas (5,1-5,4%) y cabras (7,7%) adultas de Galicia (Castro-Hermida *et al.*, 2007, 2011), así como con la mayoría de los estudios realizados en pequeños rumiantes sanos, donde el porcentaje de animales positivos no suele superar el 8% (Majewska *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010; Koinari *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2015; Kaupke *et al.*, 2017). No obstante, se debe tener en cuenta que, en nuestro estudio, solo se recogió y procesó una única muestra fecal por animal, por lo que el porcentaje de infección observado podría estar subestimado, ya que se ha demostrado que la mayoría de los pequeños rumiantes adultos, y que no presentan diarrea, son portadores asintomáticos que eliminan un reducido número de ooquistes de forma intermitente (Karanis *et al.*, 2007; Santín *et al.*, 2007); además, el muestreo no se realizó durante la época de paridera, donde el incremento de la excreción de ooquistes en las hembras podría facilitar la detección de los animales positivos (Paraud *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, también se debe señalar que, las muestras sólo se procesaron mediante técnicas moleculares que, según varios autores, son las que presentan los mejores valores de rendimiento diagnóstico, siendo más sensibles que las técnicas microscópicas (Ryan *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014).

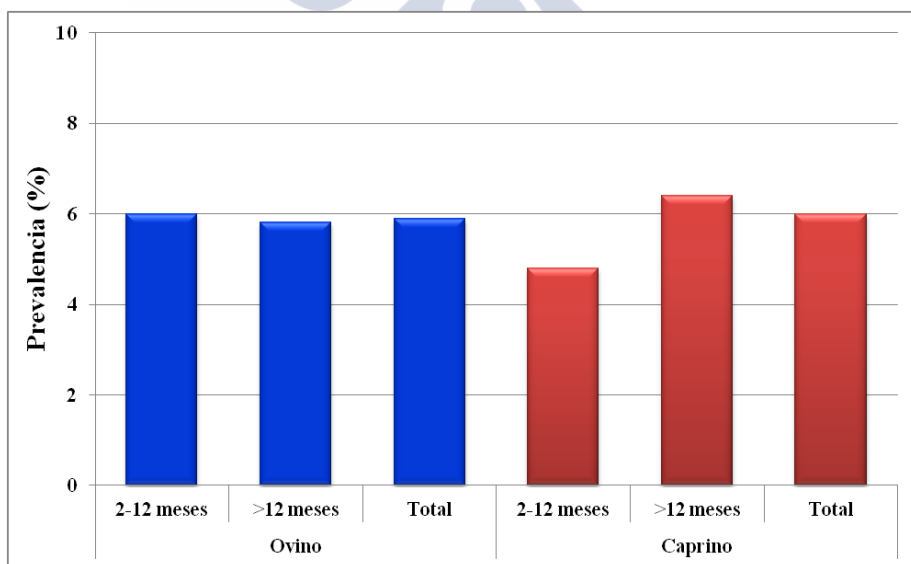
Por el contrario, la prevalencia de infección hallada en nuestro estudio resultó inferior a la observada (40%) en pequeños rumiantes por otros autores (Majewska *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2005; Pritchard *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2009; Sari *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). En este sentido, las variaciones detectadas entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios pueden deberse a diferencias geográficas y estacionales, así como a la presencia de varios factores intrínsecos y extrínsecos de la población estudiada, entre los que destacan el manejo de los animales, la técnica de diagnóstico empleada, el número de muestras recogidas por animal, la edad de los animales o la presencia de sintomatología clínica (Geurden *et al.*, 2008; Mahfouz *et al.*, 2014).

La prevalencia por explotaciones fue prácticamente idéntica en las granjas de ovejas (47,4%; 9/19) y en las de cabras (50,0%; 8/16), por lo que las diferencias no fueron significativas ( $\chi^2 = 0,024$ ;  $p = 0,877$ ). Al considerar la localización de los rebaños de ovino se observó que el 33,3% (3/9) de los localizados en A Coruña y el 70% (7/10) de los de Lugo fueron positivos; de igual modo, se apreció que el 80,0% (4/5) las granjas de ganado caprino de A Coruña y el 44,4% (4/9) de las de Lugo mostraron al menos un animal positivo. Sin embargo, en ningún caso estas diferencias fueron significativas ( $p > 0,05$ ). Estos resultados demuestran que, aunque el porcentaje de pequeños rumiantes destetados y adultos que eliminan ooquistes de *Cryptosporidium* spp. es bajo, sin embargo, este parásito está ampliamente distribuido en los rebaños de ovino y de caprino de Galicia, coincidiendo con los resultados señalados previamente en la misma zona de estudio por Castro-Hermida *et al.* (2007), quienes observaron que en el 34,2% de las explotaciones de ovejas y en el 30,0% de las de cabras había por lo menos un animal que eliminaba ooquistes de este protozoo. Así mismo, en explotaciones gallegas de pequeños rumiantes en los que había animales con diarrea neonatal, Díaz *et al.* (2015) observaron que el 54,1% de las granjas de ovino y el 65,2% de las de caprino había animales positivos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son de gran interés debido a que, aunque en las explotaciones no se habían observado brotes de diarrea neonatal en el último año, la distribución

de *Cryptosporidium* spp. en las granjas gallegas de pequeños rumiantes es amplia; además, la existencia de portadores asintomáticos unido a la presencia de factores de riesgo (mala higiene, épocas de paridera, instalaciones, manejo inadecuado, hacinamiento, etc.), muy frecuentes en las granjas de pequeños rumiantes de Galicia, pueden favorecer la aparición de brotes de diarrea neonatal ocasionados por este parásito y ocasionar importantes pérdidas económicas (de Graaf *et al.*, 1999; Soilán, 2014).

Al considerar la edad de los animales se observó que la prevalencia individual por *Cryptosporidium* spp. fue muy similar en los corderos destetados y en las ovejas adultas, mientras que, en ganado caprino, el porcentaje de adultos que eliminaron ooquistes del parásito fue ligeramente superior al de los cabritos destetados (Figura 4.9); no obstante, estas diferencias no fueron significativas en ninguna de las dos especies ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4.9. Porcentaje de infección por *Cryptosporidium* spp. en pequeños rumiantes al considerar la edad de los animales**

Estos resultados contrastan con los obtenidos en varias investigaciones que señalan que la prevalencia de infección por *Cryptosporidium* spp. presenta una relación inversa con la edad de los

animales, de modo que los animales de más edad muestran los porcentajes de infección más reducidos, aunque en algunos casos estas diferencias no fueron significativas (Majewska *et al.*, 2000; Noordeen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009, 2014; Castro-Hermida *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2013; Mi *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2016). La menor prevalencia de infección en los animales de mayor edad podría estar relacionada con una mejor condición corporal de estos o con su mayor respuesta inmunitaria, ya que las reinfecciones repetidas con el protozoo favorecen el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora frente al parásito (Wang *et al.*, 2014).

Debido a que los trabajos sobre las infecciones por *Cryptosporidium* spp. en pequeños rumiantes son escasos y emplean metodologías muy diferentes, las discrepancias observadas entre nuestros datos y los de otras investigaciones pueden obedecer a diferentes factores relacionados con el diseño del estudio que afecten a la exactitud de los resultados, entre los que destacan:

- a) el número de animales muestreados; cuando los casos son reducidos impiden estimar la prevalencia con una precisión aceptable (Majewska *et al.*, 2000; Noordeen *et al.*, 2001). Por ejemplo, Castro-Hermida *et al.* (2011), en Galicia, analizaron muestras de 136 ovinos, así como de otras especies animales, si bien el objetivo del trabajo no consistió en estimar la prevalencia en diferentes grupos de edad.
- b) el número de grupos de edad estudiados no coincide exactamente con el de otros trabajos, aunque, en general, en la mayoría los animales se clasifican según su edad en lactantes, destetados y adultos: No obstante, hay autores que, dentro de los animales de mayor edad, separan los de 12 a 24 meses y los de más de 24 meses (Mi *et al.*, 2014) y dentro de los adultos se separan las hembras durante el parto (Wang *et al.*, 2014). Otros autores, como Peng *et al.* (2016) consideran grupos de 0-2 meses, 3-6 meses, 7-12 meses y más de 12 meses; sin embargo, esta división puede derivar en la aparición de grupos con un número muy reducido de animales, lo que, como se comentó anteriormente, puede conllevar una menor precisión

en los resultados obtenidos. En este sentido, Mi *et al.* (2014) analizaron muestras de 604 animales, pero únicamente 16 tenían más de 12 meses de edad.

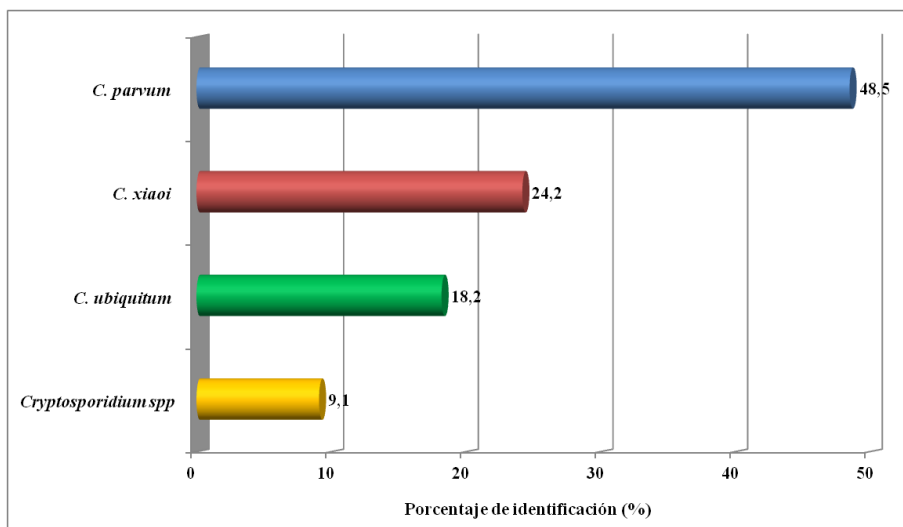
- c) también deben considerarse el número de granjas muestreadas, pues si recogen muestras en un pequeño número de ellas, la presencia de una explotación con una elevada prevalencia intra-rebaño puede alterar de forma significativa los resultados obtenidos, sobre todo si en cada granja el número de animales estudiados por grupo de edad no es similar. Así, en las investigaciones más completas realizadas hasta el momento en las que se analiza la influencia de la edad sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., el número de granjas es muy reducido e inferior a 7 (Ye *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010, 2014), y no suelen superar las 18 (Mi *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2016). Por ejemplo, en el estudio realizado por Wang *et al.* (2014) se analizaron 1.265 cabras de 7 explotaciones en China, y el número de muestras por rebaño osciló entre 24 y 790.
- d) el método de identificación de *Cryptosporidium* spp. también es de gran interés, pues el empleo de técnicas con reducidos valores de rendimiento diagnóstico puede alterar de forma significativa los resultados. En este sentido, debido a que los adultos eliminan, por lo general, un menor número de ooquistes por gramo de heces que los jóvenes (Karanis *et al.*, 2007), los estudios que utilizan métodos microscópicos y, por tanto, menos sensibles que los moleculares (Ryan *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014), subestiman la prevalencia de infección en los animales de mayor edad ya que detectan un menor número de animales positivos y, consecuentemente, el número de falsos negativos se incrementará con la edad de los animales.

#### 4.2.2. Análisis genotípico: especies de *Cryptosporidium*

Debido a que la mayoría de las investigaciones realizadas en granjas de ovino y caprino son estudios de brotes de diarrea neonatal, se ha comprobado que *C. parvum* es la principal especie de *Cryptosporidium* implicada en estos brotes (Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Pritchard *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2010, 2015; Imre *et al.*, 2013). En corderos y cabritos destetados y en animales adultos que no muestran sintomatología clínica, los estudios sobre las especies de *Cryptosporidium* son limitados, ya que en la mayoría no se realiza la caracterización molecular de los aislados, por lo que no se identifican las especies y genotipos, ni su potencial zoonótico, al tiempo que es escasa la información sobre algunos factores epidemiológicos importantes, como la edad de los animales y la consistencia de las heces (Robertson, 2009).

El análisis del patrón de bandas obtenido, tras la digestión de las muestras positivas a la PCR de la 18S con las endonucleasas *SspI*, *VspI* y *MboII*, permitió identificar 3 especies de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. ubiquitum* y *C. xiaoi*) tanto en los rebaños de ovino como en los de caprino; estas especies ya se habían identificado previamente en corderos y cabritos lactantes con diarrea de la misma área de estudio (Díaz *et al.*, 2010, 2015). Al considerar ambas especies de pequeños rumiantes en conjunto, y como se aprecia en la Figura 4.10., *C. parvum* fue la especie más frecuentemente identificada (16/33), seguida por *C. xiaoi* (8/33) y *C. ubiquitum* (6/33). Tres muestras (9,1%), dos procedentes de ovejas y una de cabra, fueron positivas a PCR, pero las bandas fueron muy débiles, de manera que el producto obtenido no fue suficiente para realizar un análisis RFLP.

Para confirmar los resultados obtenidos en la PCR-RFLP, tanto para las cabras como para las ovejas, se secuenció un número representativo de aislados de cada una de las especies de *Cryptosporidium* cuyo patrón de restricción fue diferente al de *C. parvum* y se compararon con las incluidas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information); así, se observaron tres secuencias diferentes (Figura 4.11.).



**Figura 4.10.** Porcentaje de identificación de cada una de las especies de *Cryptosporidium* identificadas en pequeños rumiantes de granjas gallegas

Todos los aislados identificados como *C. ubiquitum*, procedentes tanto de ovino como de caprino, fueron idénticos a la del genotipo 1 (EF362479), detectado por Santín *et al.* (2007) en ovinos de Maryland (EE.UU.), y hallado previamente en corderos con diarrea en Galicia (Soilán, 2014; Díaz *et al.*, 2015). En el caso de *C. xiaoi*, se identificaron dos secuencias diferentes (Figura 4.11.); cabe destacar que, los aislados procedentes de ganado caprino mostraron una homología del 100% con la secuencia de referencia KY055376, obtenida en ovejas de Polonia (Kaupke *et al.*, 2017), mientras que las de ovino fueron idénticas a la KY055407, obtenidas en caprino por los mismos autores. Entre ambas secuencias sólo se hallaron dos mutaciones: una transición de un nucleótido (C por T) en la posición 399 y una transversión (T por A) en la posición 406 (Figura 4.11.).

Estos resultados coinciden con la mayoría de los escasos estudios moleculares realizados previamente en ganado ovino y caprino, y permiten confirmar que *C. parvum*, *C. ubiquitum* y *C. xiaoi* son las especies de *Cryptosporidium* predominantes en los pequeños rumiantes a nivel mundial (Chalmers *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2007; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Rieux *et al.*, 2013; Tzanidakis *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010, 2014;

Mi *et al.*, 2015). De hecho, el resto de especies del protozoo identificadas en estos animales son hallazgos ocasionales y, a excepción de *C. hominis* en ganado ovino, no superan la veintena de aislados.

```

          10          20          30          40          50
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
18S_L11/21  ATAACTTTAC GGATCACATT ---ATGTGAC ATATCATTCA AGTTTCTGAC
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
18S_L11/21  CTATCAGCTT TAGACGGTAG GGTATTGGCC TACCGTGGCT ATGACGGGTA
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
18S_L11/21  CTATCAGCTT TAGACGGTAG GGTATTGGCC TACCGTGGCT ATGACGGGTA
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
18S_L11/21  ACGGGGAATT AGGGTTCGAT TCCGGAGAGG GAGCCTGAGA AACGGCTACC
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
18S_L11/21  ACGGGGAATT AGGGTTCGAT TCCGGAGAGG GAGCCTGAGA AACGGCTACC
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
18S_L11/21  ACATCTAAGG AAGGCAGCAG GCGCGCAAAT TACCCAATCC TAATACAGGG
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
18S_L11/21  ACATCTAAGG AAGGCAGCAG GCGCGCAAAT TACCCAATCC TAATACAGGG
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
18S_L11/21  AGGTAGTGAC AAGAAATAAC AATACAGAAC CTTA--CGGT TTTGTAATTG
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
18S_L11/21  AGGTAGTGAC AAGAAATAAC AATACAGAAC CTTA--CGGT TTTGTAATTG
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
18S_L11/21  GAATGAGTTA AGTATAAACC CCTTACAAG TATCAATTGG AGGGCAAGTC
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
18S_L11/21  GAATGAGTTA AGTATAAACC CCTTACAAG TATCAATTGG AGGGCAAGTC
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
18S_L11/21  TGGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATTCCAGCTC CAATAGCGTA TATTAAAGTT
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
18S_L11/21  TGGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATTCCAGCTC CAATAGCGTA TATTAAAGTT
18S_L17/29  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
18S_L12/14  .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

```

Figura 4.11. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen SSU rRNA de diversos aislados representativos de *C. ubiquitum* (L12/14, genotipo 1) y *C. xiaoi* (L11/21, *C. xiaoi* origen ovino; L17/29, *C. xiaoi* origen caprino) identificados en pequeños rumiantes. Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado L291 y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo.



```

          360      370      380      390      400
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  GTTGCAGTTA AAAAGCTCGT AGTTAATCTT CTGTTAAAT- TTTATATATA
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          410      420      430      440      450
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  ATATCTCG-- -ATATTTATA TAATATTAAC ATAATTCATA TTACT-----
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          460      470      480      490      500
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  TTTTAGTATA TGAAACTTTA CTTTGAGAAA ATTAGAGTGC TTAAGCAGG
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          510      520      530      540      550
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  CTATTGCCTT GAATACTCCA GCATGGAATA ATATTAAGGA TTTTATCTT
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          560      570      580      590      600
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  TCTTATTGGT TCTAGAATAA AAATGATGAT TAATAGGAAC AGTTGGGGGC
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          610      620      630      640      650
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  ATTTGTATTT AACAGTCAGA GGTGAAATTC TTAGATTTGT TAAAGCAAA
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          660      670      680      690      700
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  CTACTGCGAA AGCATTGGCC AAGGATGTTT TCATTAATCA AGAACGAAAG
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          710      720      730      740
18S_L11/21  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
18S_L17/29  TTAGGGGATC GAAGACGATC AGATACCGTC GTAGCTTAA CCATAA
18S_L12/14  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

```

Figura 4.11. (Continuación)

Estos resultados son también importantes desde el punto de vista de la Salud Pública, ya que dos (*C. parvum* y *C. ubiquitum*) de las tres especies identificadas en ambos rumiantes domésticos poseen potencial zoonótico, especialmente *C. parvum*, que junto con *C. hominis* es la especie más frecuentemente implicada en brotes de criptosporidiosis humana (Xiao, 2010). *C. ubiquitum* se ha identificado en un número suficiente de personas, tanto

inmunodeprimidas como inmunocompetentes, como para ser considerada zoonótica, y actualmente se considera una especie emergente (Šlapeta, 2013). Respecto a *C. xiaoi*, aunque recientemente se ha identificado en dos personas infectadas con VIH en Etiopía, no parece poseer un importante potencial zoonótico (Aramu *et al.*, 2014).

Al considerar cada una de las especies de pequeños rumiantes por separado, en los **ovinos** se observó (Figura 4.12.) que *C. parvum* predominaba significativamente (13/19) sobre *C. xiaoi* (3/19,  $\chi^2=6,408$ ;  $p=0,011$ ) y *C. ubiquitum* (1/19,  $\chi^2=10,513$ ;  $p=0,001$ ), lo que se tradujo en unos porcentajes de infección individuales de 4,0%, 0,9% y 0,3%, respectivamente. Cabe destacar que las diferencias observadas entre *C. xiaoi* y *C. ubiquitum* no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2=1,006$ ;  $p=0,316$ ). Además, las bandas obtenidas en dos muestras fueron muy débiles, impidiendo su correcta identificación mediante RFLP o secuenciación.

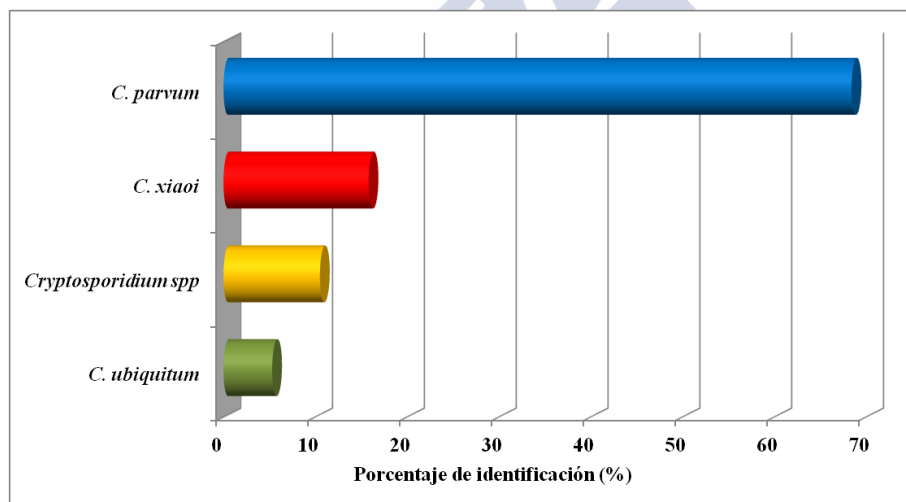


Figura 4.12. Porcentaje de especies de *Cryptosporidium* identificadas en ovinos de granjas gallegas

Al considerar las **explotaciones**, *C. parvum* se identificó en el 26,3% (5/19) de las granjas de ovejas, seguido por *C. xiaoi* (15,8%; 3/19) y por *C. ubiquitum* (5,3%; 1/19). En la mayoría de las

explotaciones sólo se identificó una única especie de *Cryptosporidium* (94,7%). Además, se detectaron infecciones mixtas por *C. parvum* y *C. xiaoi* en una granja (5,3%).

Los resultados obtenidos en el presente estudio no respaldan la hipótesis que defiende que los corderos con sintomatología clínica tienen más probabilidades de estar infectados con *C. parvum*, mientras que los ovinos sanos deberían estar infectados con otras especies más adaptadas a estos hospedadores y, por tanto, menos patógenas, como *C. ubiquitum* o *C. xiaoi* (Chalmers *et al.*, 2002; Elwin y Chalmers 2008; Mueller-Doblies *et al.*, 2008). En nuestro estudio, *C. parvum* fue la especie más frecuentemente identificada en los ovinos sanos de más de 2 meses de edad, lo que coincide con lo observado en otras investigaciones realizadas en ovejas aparentemente sanas (Majewska *et al.*, 2000; McLauchlin *et al.*, 2000; Pritchard *et al.*, 2007, 2008; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2009; Robertson, 2009; Yang *et al.*, 2009; Koinari *et al.*, 2014). *C. ubiquitum* y *C. xiaoi* también se han identificado en heces de corderos con diarrea (Navarro-i-Martínez *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2010, 2015), aunque generalmente su frecuencia es menor que la de *C. parvum*; no obstante, se debe señalar que en esos estudios no se pudo determinar con exactitud si la presencia de esas especies de *Cryptosporidium* fueron la causa de la aparición de la diarrea, ya que no descartó la presencia de otros enteropatógenos.

Además, nuestros resultados parecen confirmar las observaciones de diversos autores que, basándose en la identificación molecular de las especies de *Cryptosporidium*, sugirieron la existencia de notables diferencias geográficas en su distribución (Šlapeta, 2013; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016; Kaupke *et al.*, 2017); así, en general, *C. ubiquitum* predomina en Asia y América (Santín *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Fiuza *et al.*, 2011; Paz e Silva *et al.*, 2014), mientras que *C. xiaoi* es más frecuente en Australia y África (Soltane *et al.*, 2007; Sweeny *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014; Parsons *et al.*, 2015). En Europa, la mayoría de las investigaciones realizadas señalan a *C. parvum* como la especie más frecuente en el ganado ovino de este continente (Majewska *et al.*, 2000; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Pritchard *et al.*, 2008; Paoletti *et al.*, 2009; Robertson, 2009; Castro-

Hermida *et al.*, 2011; Tzanidakis *et al.*, 2014), lo que coincide con los resultados observados en Galicia. Sin embargo, recientemente, Kaupke *et al.* (2017) basándose en los resultados obtenidos en el Reino Unido (Elwin y Chalmers, 2008; Robertson *et al.* 2010; Connelly *et al.* 2013) y en Bélgica (Geurden *et al.*, 2008) justificaban que *C. ubiquitum* fuera considerada la especie más común en el ovino europeo. En este sentido, Taylan-Ozkan *et al.* (2016), en un intento de explicar todos estos resultados, afirmaron que *C. parvum* era la especie predominante en aquellos países europeos donde el manejo de las ovejas era más intensivo. Sin embargo, nuestros resultados no respaldan esta teoría, ya que los animales muestreados, normalmente, salían al pasto a diario. En este sentido, la predominancia de *C. parvum* en el ganado ovino gallego podría estar relacionada con el sistema de manejo tradicional llevado a cabo en esta región, donde los adultos se encuentran en estrecho contacto con los animales más jóvenes. Así, se ha observado que las diarreas neonatales son frecuentes en los rebaños ovinos gallegos, y que *C. parvum* está involucrado en un alto porcentaje de estos brotes (Díaz *et al.*, 2010a, 2015). No obstante, debemos señalar que, tanto en las granjas con brotes de diarrea neonatal como en las que no los hubo (como las incluidas en este estudio), los animales más jóvenes serían los principales responsables de la contaminación del medio, pues son los que eliminan un mayor número de ooquistes por gramo de heces (Castro-Hermida *et al.*, 2011), lo que facilita la infección de los de mayor edad, que permanecerían como portadores asintomáticos debido a la presencia de una inmunidad protectora asociada a la edad o a una mejor condición física (Wang *et al.*, 2014). El hecho de que en las granjas estudiadas no hubiese brotes de diarrea neonatal en el último año quizás pueda deberse a una menor infectividad y virulencia de las cepas que afectan a los animales (Karanis *et al.*, 2007; Kaupke *et al.*, 2017).

También se ha señalado que el contacto estrecho entre diferentes hospedadores puede ser la causa de la aparición de infecciones con especies de *Cryptosporidium* menos frecuentes en un hospedador determinado; así, en pequeños rumiantes de Papúa Nueva Guinea, Koinari *et al.* (2014) identificaron *C. hominis*, *C. scrofarum* y el

genotipo rata de *Cryptosporidium*, que son especies más típicas de otras especies animales con las que compartían instalaciones. En este sentido, se debe señalar que debido a que Galicia no tiene una amplia tradición de cría de ganado ovino, que la mayoría de las explotaciones no son de tipo profesional y que los rebaños son de pequeño tamaño y principalmente para el autoconsumo, en muchos casos los ovinos comparten instalaciones con otras especies domésticas, especialmente con el ganado vacuno; por lo que, si se tiene en cuenta que los bovinos se consideran el reservorio más importante de *C. parvum*, es posible que este contacto estrecho entre ambas especies haya favorecido el predominio de esta especie en los ovinos gallegos. Además, los subtipos de *C. parvum* encontrados en corderos con criptosporidiosis en Galicia pertenecen al subtipo IIa (Díaz *et al.*, 2010a, 2015), que es el más frecuente en el ganado vacuno; por el contrario, en otras regiones de España, donde la cría del ganado vacuno y del ovino está claramente diferenciada, predomina el subtipo IID de *C. parvum* (Quílez *et al.*, 2008b).

En las **cabras**, como se observa en la Figura 4.13., el número de aislados de *C. xiaoi* (5/14) y *C. ubiquitum* (5/14) fue ligeramente superior a los de *C. parvum* (3/14), lo que se tradujo en un porcentaje de infección individual del 2,1%, 2,1% y 1,3%, respectivamente. Con Chi-cuadrado se comprobó que, en ningún caso, estas diferencias eran significativas ( $p > 0,05$ ).

En cuanto a la **prevalencia por granja**, y al igual que los porcentajes de infección individuales, se observó que *C. xiaoi* fue la especie del protozoo más común en las explotaciones de caprino de Galicia (25,0%; 4/16), mientras que *C. parvum* y *C. ubiquitum* se identificaron, cada una, en el 12,5% (2/16) de los rebaños. Sólo se identificó una única especie de *Cryptosporidium* en las granjas positivas, a excepción de un rebaño donde se detectaron animales eliminando ooquistes de *C. parvum* y *C. ubiquitum*.

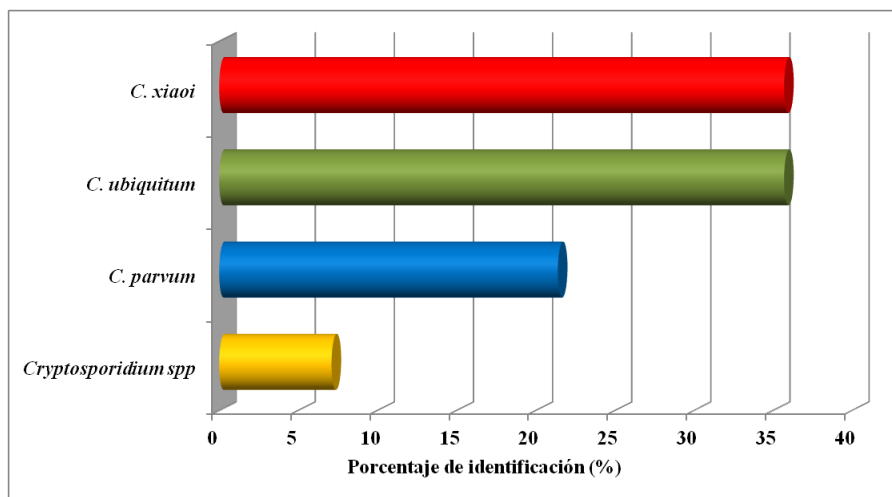


Figura 4.13. Porcentaje de identificación de cada una de las especies de *Cryptosporidium* identificadas en granjas gallegas de ganado caprino

Actualmente todavía no se dispone de datos consistentes acerca de las especies de *Cryptosporidium* que afectan a las cabras de más de 2 meses de edad sin sintomatología gastrointestinal, debido a que los estudios moleculares son todavía muy escasos y limitados a un reducido número de muestras. De todos modos, y teniendo en cuenta el reducido número de aislados identificados, en Galicia hemos encontrado 3 de las 5 especies detectadas en el ganado caprino. Nuestros resultados y los obtenidos hasta el momento, nos permiten confirmar que, a nivel mundial, las cabras se infectan principalmente por *C. parvum*, *C. ubiquitum* y *C. xiaoi* (Rieux *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2014; Tzanidakis *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2015; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016) y son, por tanto, hospedadores competentes de estas especies. Aunque dos de las tres especies identificadas en cabras poseen potencial zoonótico (Robertson, 2009; Ryan *et al.*, 2014), este pequeño rumiante tiene una menor importancia en la Salud Pública que las ovejas, pues el porcentaje de animales que eliminaron ooquistes de especies zoonóticas fue más reducido; de todos modos, el riesgo existe, por lo que no debería subestimarse la aparición de brotes de criptosporidiosis humana cuyo origen sea el ganado caprino. Sin embargo, en este punto también debe considerarse un estudio reciente que sugiere que

*C. xiaoi* puede poseer potencial zoonótico, al identificarse esa especie en dos pacientes inmunodeprimidos en Etiopía (Aramu *et al.*, 2014).

El reducido número de estudios moleculares llevados a cabo en el ganado caprino dificulta el poder estimar la existencia de un patrón geográfico de distribución de las diferentes especies de *Cryptosporidium*, como se observó en el ganado ovino. Si se tienen en cuenta todas las investigaciones moleculares realizadas sobre *Cryptosporidium* en cabras, *C. parvum* es la especie más frecuente en Asia y en Europa, que son los continentes donde se han llevado a cabo un mayor número de estudios (Johnson *et al.*, 1999; Cacciò *et al.*, 2000; Chalmers *et al.*, 2002; Nordeen *et al.*, 2002; Hadjušek *et al.*, 2004; Ngouanesavanh *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010b, 2015; Domingo *et al.*, 2012; Drumo *et al.*, 2012; Maurya *et al.*, 2013; Lange *et al.*, 2014; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016; Mat Yusof *et al.*, 2017). En el resto de continentes únicamente hay seis estudios, lo que complica extraer alguna conclusión. Sin embargo, si se excluyen los estudios de casos clínicos (Tabla 1.8.) es *C. xiaoi* la especie más frecuente en el ganado caprino en todos los continentes, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. De hecho, un importante número de estudios cita a *C. xiaoi* como la especie más frecuente en cabras, tanto jóvenes como adultas (Karanis *et al.*, 20007; Rieux *et al.*, 2013; Tzanidakis *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2015; Parsons *et al.*, 2015). En este sentido, según Wang *et al.* (2010), *C. xiaoi* tiene mayor importancia en el ganado caprino que en el ovino y, por tanto, las cabras podrían ser el hospedador tipo de esta especie, lo que contrasta con lo observado por Fayer *et al.* (2010), quienes señalaron que las infecciones por *C. xiaoi* estaban restringidas al ganado ovino.

*C. ubiquitum*, por el contrario, se ha identificado en muy pocos trabajos realizados en ganado caprino (Tzanidakis *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2016; Al-Habsi *et al.*, 2017), aunque algunos autores la identificaron como la especie más frecuente (Paraud *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014); por lo que, los datos obtenidos hasta el momento permiten demostrar que es la menos importante de las tres especies de *Cryptosporidium* predominantes en cabras. No obstante, son necesarios realizar más estudios moleculares sobre

*Cryptosporidium* spp. en el ganado caprino para poder determinar con exactitud cuál es la especie predominante en estos animales, la posible existencia de un patrón geográfico y, además, su importancia desde el punto de vista de la Salud Pública.

#### **4.2.3. Especies de *Cryptosporidium* al considerar la edad de los pequeños rumiantes**

El reducido número de estudios moleculares llevados a cabo en rebaños ovinos y caprinos ha impedido confirmar la posible existencia de una relación entre las diferentes especies de *Cryptosporidium* y algunos grupos de edad, tal y como se ha observado en el ganado vacuno (Santín *et al.*, 2004). No obstante, su determinación sería de gran utilidad, ya que permitiría conocer cuáles son los rangos de edad en los que los pequeños rumiantes tienen una mayor probabilidad de eliminar *C. parvum* y, por tanto, suponer un mayor riesgo para la aparición de brotes de diarrea neonatal en las granjas y, consecuentemente, adoptar las correspondientes medidas de prevención y control. Además, conocer a qué edad los animales eliminan ooquistes de especies con potencial zoonótico sería de gran utilidad para la Salud Pública.

En el ganado ovino se detectaron animales infectados con *C. parvum* y *C. xiaoi* en los dos grupos de edad (Figura 4.14.). *C. parvum* fue la especie predominante tanto en los corderos destetados como en las ovejas adultas, aunque el porcentaje de identificación fue superior en los animales de mayor edad (Figura 4.14.); así, su prevalencia se incrementó desde el 3,6% en corderos de 2 a 12 meses al 4,2% en los de más de 12 meses. Por el contrario, la importancia de *C. xiaoi* disminuyó con la edad (Figura 4.14.), ya que los porcentajes de infección individuales se redujeron desde el 2,4% en los corderos destetados hasta el 0,4% en los adultos. Finalmente, *C. ubiquitum* fue la especie menos frecuente en los ovinos, siendo identificada únicamente en el 1,3% de las ovejas adultas, aunque en este grupo constituyó la segunda especie más importante, después de *C. parvum* (Figura 4.14.).



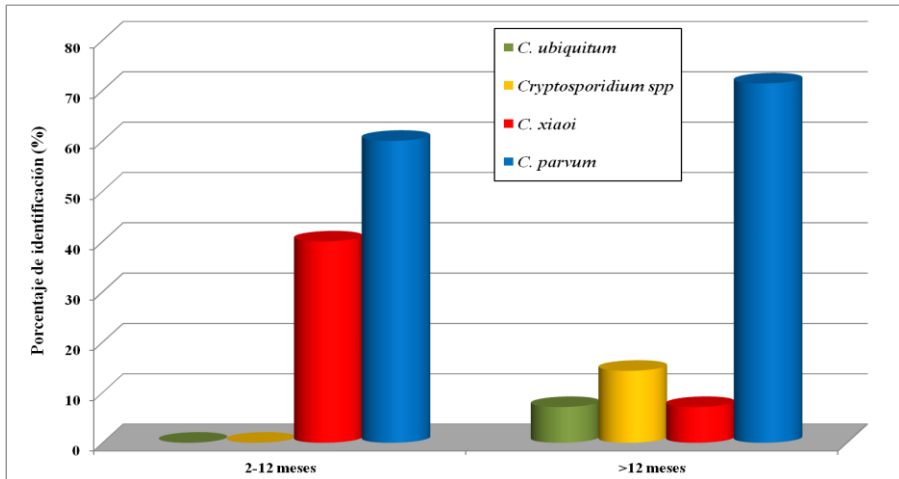


Figura 4.14. Porcentaje de identificación de cada una de las especies de *Cryptosporidium* detectadas en ovinos al considerar su edad.

En este estudio hemos observado que existe una asociación de especies de *Cryptosporidium* con respecto a la edad, al igual que sucede en el ganado bovino, de manera que *C. ubiquitum* solo se observa en animales adultos, la prevalencia de *C. xiaoi* disminuye con la edad y la de *C. parvum* se mantiene. De todos modos, serían necesarios más estudios con objeto de incrementar el número de aislados identificados.

Nuestros resultados también indican que los corderos destetados y los ovinos de más de 12 meses actuarían como portadores asintomáticos de la especie zoonótica *C. parvum*, lo que coincide con otros estudios realizados en Europa (Majewska *et al.*, 2000; Mueller-Doblies *et al.*, 2008; Castro-Hermida *et al.*, 2011). Además, debido a que estos animales eliminan ooquistes de forma intermitente (Santín *et al.*, 2007) contribuirán a contaminar el ambiente, favoreciendo la infección de los animales lactantes que son los más sensibles a *C. parvum* (Pritchard *et al.*, 2007; Paoletti *et al.*, 2009). Este hecho también podría conllevar un mayor riesgo de aparición de brotes de diarrea neonatal en las explotaciones, especialmente en aquellas con condiciones higiénicas deficientes o donde los animales se manejan en

un sistema tradicional, como sucede en los rebaños ovinos en Galicia (Díaz *et al.*, 2015); lo que, podría explicar la elevada prevalencia de *C. parvum* en los corderos lactantes con diarrea en el área de estudio (Díaz *et al.*, 2010a, 2015).

En otras investigaciones llevadas a cabo en otros continentes, se observó que *C. ubiquitum* era la especie predominante en todos los grupos de edad (Ryan *et al.*, 2005; Santin *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010); además, Wang *et al.* (2010) señalaron que las hembras en el parto excretaban principalmente ooquistes de esta especie, por lo que constituían una importante fuente de infección para los corderos, detectándose esta especie tanto en corderos asintomáticos (Geurden *et al.*, 2008) como en los que presentaban diarrea (Díaz *et al.*, 2010a).

De todos modos, el patrón de eliminación de especies de *Cryptosporidium* observado en las ovejas gallegas contrasta con el señalado en otros estudios epidemiológicos, realizados en China y Australia, donde se analizaron animales de diversa edad. Así, Wang *et al.* (2010) observaron que, en China, *C. ubiquitum* era la especie más frecuente en todos los grupos de edad, mientras que *C. xiaoi* y *C. andersoni* sólo se identificaron en corderos y en hembras adultas, respectivamente, pero en mucha menor proporción. También en China, Ye *et al.* (2013) comprobaron que *C. xiaoi* era la especie predominante en adultos y en corderos, especialmente en aquellos de 3-4 semanas de edad, sugiriendo que las madres podrían transmitir *C. xiaoi* a los neonatos en el parto. Así mismo, *C. ubiquitum* también se encontró, aunque en menor proporción, en ambos grupos de edad, pero fue la especie más frecuente en corderos de 15-16 semanas, mientras que *C. parvum* únicamente se identificó en un cordero menor de un mes. En Australia, Sweeny *et al.* (2011b) también observaron que *C. xiaoi* era la especie más prevalente en los corderos desde las 2 semanas de vida hasta los 9 meses de edad, así como la única identificada en los animales adultos, mientras que, *C. ubiquitum* y *C. parvum* sólo se detectaron en corderos.

Los datos obtenidos sobre la asociación entre la edad y las especies de *Cryptosporidium* en nuestro estudio son los primeros realizados en Europa y muestran diferencias significativas con las

halladas en otros continentes. No obstante, y como se señaló anteriormente, en los diferentes estudios efectuados en pequeños ruminantes, los resultados varían de unos a otros y no siguen un patrón general definido, como el observado en el ganado vacuno, pudiéndose ser estas diferencias un reflejo de la variación de las especies de *Cryptosporidium* según el área geográfica.

Además, en este estudio y, desde un punto de vista de Salud Pública, hemos comprobado que los animales de más edad representan un mayor riesgo zoonótico, ya que el 5,5% de estas ovejas son portadoras de *C. parvum* y de *C. ubiquitum*, que podrían ser la causa de la aparición de brotes de criptosporidiosis en humanos.

En el **ganado caprino** se apreció que en ambos grupos de edad se identificaron las tres especies de *Cryptosporidium* (Figura 4.15.). El porcentaje de identificación de *C. xiaoi* fue similar en los 2 grupos, mientras que *C. parvum* y *C. ubiquitum* fueron más frecuentes en los animales destetados que en los adultos. Además, se observó que los porcentajes de infección por *C. parvum* y *C. ubiquitum* disminuyeron levemente, desde el 1,6% en los animales de 2 a 12 meses hasta el 1,2% en los de mayor edad; por el contrario, la prevalencia de *C. xiaoi* se incrementó desde el 1,6% al 2,3%.

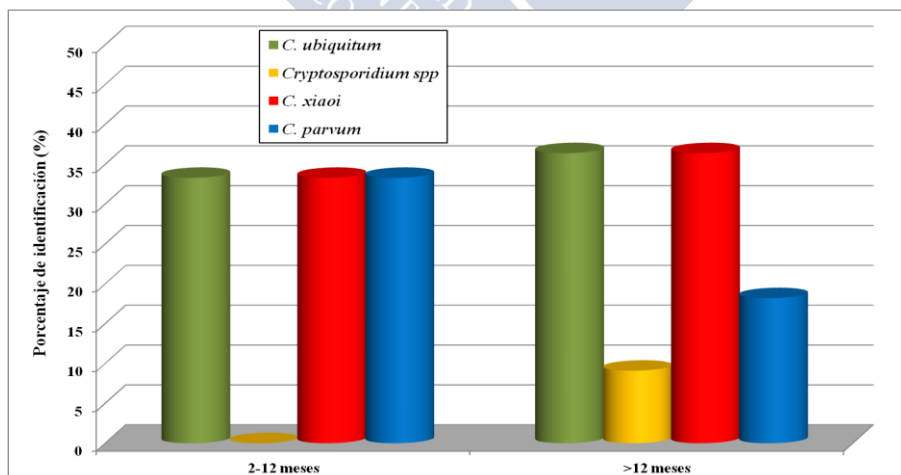


Figura 4.15. Porcentaje de identificación de cada una de las especies de *Cryptosporidium* detectadas en cabras al considerar la edad de éstas

El presente estudio es el primero en Europa en estudiar la posible relación entre la edad de las cabras y la presencia de determinadas especies de *Cryptosporidium*; de hecho, a nivel mundial, solo se han publicado 3 estudios completos en ganado caprino, por lo que la información disponible es muy escasa e incompleta. Aunque nuestros resultados reflejan un ligero incremento de *C. xiaoi* con la edad, al contrario de lo que sucede con *C. parvum* y con *C. ubiquitum*, estas diferencias son muy escasas. Otro aspecto destacable con respecto a otros estudios, es que, en todos los grupos de edad, se detectaron las tres especies. En este sentido, en ganado caprino de China, Mi *et al.* (2014) observaron que *C. xiaoi* era la especie predominante en todos los grupos de edad, mientras que *C. parvum* se observaba en todos los grupos de animales menores de dos años, especialmente en los cabritos destetados y que *C. ubiquitum* se detectaba a partir del destete. En la misma zona de estudio, Peng *et al.* (2016) obtuvieron unos resultados similares a los de Mi *et al.* (2014), ya que *C. xiaoi* fue también la especie más frecuentemente identificada en todos los grupos de edad y también lo fue *C. parvum*, aunque en menor proporción. Por el contrario, *C. ubiquitum* solo se identificó de forma esporádica en una muestra procedente de un cordero lactante y en otra de un animal adulto. En el mismo sentido, Rieux *et al.* (2013) apreciaron que la mayoría de los cabritos sin destetar eliminaban ooquistes de *C. xiaoi*. Estos resultados sugieren una posible transmisión de *C. xiaoi* en el periparto, similar a lo observado en ganado ovino (Ye *et al.*, 2013). Por el contrario, Wang *et al.* (2014), también en cabras de diferentes rebaños de China, identificó a *C. ubiquitum* en todos los grupos de edad, mientras que *C. xiaoi* solo se halló en cabritos y madres gestantes.

Al igual que sucedía en el ganado ovino, estas diferencias pueden reflejar importantes diferencias geográficas, incluso dentro de un mismo país, aunque también podrían obedecer a variaciones en el manejo. De todos modos, los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que *C. xiaoi* posee una gran importancia en todos los grupos de edad en el ganado caprino, aunque se necesitan más estudios para poder establecer conclusiones definitivas.

Los resultados obtenidos en este estudio, revelan que *C. parvum* no es muy prevalente en los cabritos destetados y en los adultos (porcentajes menores al 2% en ambos grupos); teniendo en cuenta que la gran mayoría de los cabritos neonatos con diarrea en Galicia eliminan ooquistes de *C. parvum* (Díaz *et al.*, 2015), estos datos sugieren que las cabras de más de 2 meses no suponen un importante riesgo de aparición de brotes de diarrea neonatal en los rebaños. Además, estos animales tienen poca importancia desde el punto de vista de la Salud Pública, ya que el porcentaje de animales que eliminan ooquistes con potencial zoonótico es muy reducido, aunque ligeramente superior en el grupo de 2-12 meses.

#### 4.2.4. Análisis subtípico

La información relativa a la variabilidad intraespecífica de *C. parvum* en pequeños rumiantes, principalmente mediante el análisis de la secuencia de ADN del gen GP60, ha aumentado notablemente en los últimos cinco años, aunque los estudios en este campo son todavía escasos, y en general, se han realizado utilizando un reducido número de muestras. Se han subtipado, para el gen GP60, 258 aislados de *C. parvum* procedentes de ganado ovino, principalmente de Europa, pues allí es la especie predominante, y de otros países como Australia, Brasil, China, Jordania y Papúa Nueva Guinea. Además, se han subtipado 113 aislados de caprino de Australia, Bélgica, China, España, Papúa Nueva Guinea, Polonia y Turquía (Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Díaz *et al.*, 2010a, 2015; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Connelly *et al.*, 2013; Imre *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2014; Paz e Silva, 2014; Yang *et al.*, 2014, 2015; Wells *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2016; Taylan-Ozkan *et al.*, 2016; Utsi *et al.*, 2016; Al-Habsi *et al.*, 2017; Kaupke *et al.*, 2017).

Todos los aislados procedentes de pequeños rumiantes identificados como *C. parvum* (16) con la PCR del gen SSU ARNr se analizaron también para el locus que codifica para la glicoproteína de 60 kDa (GP60). Sin embargo, sólo se obtuvieron bandas del tamaño esperado ( $\approx 850$  pb) en el 68,8% (11/16) de las muestras; la PCR fue positiva en 8 de las 13 muestras de ovejas (61,5%) y en todas (3/3;

100%) las procedentes de cabras. El análisis de las secuencias obtenidas reveló la presencia de 4 subtipos de *C. parvum* pertenecientes a las familias alélicas IIa y IIc (Tabla 4.4.).

**Tabla 4.4. Subtipos GP60 de *C. parvum* identificados en ganado ovino y caprino mayores de 2 meses procedentes de rebaños gallegos**

	Edad	Individual
OVEJAS	2-12 meses	IIaA15G2R1 (1)
	> 12 meses	IIaA14G2R1 (2)
		IIaA15G2R1 (5)
CABRAS	2-12 meses	IIcA17G1 (1)
	> 12 meses	IIaA13G1R1 (1)
		IIcA17G1 (1)

Esta baja diversidad genética es, posiblemente, un reflejo del reducido número de aislados caracterizados en los pequeños rumiantes; no obstante, en un estudio previo en el que se subtiparon 109 *C. parvum* procedentes de 171 corderos y 118 cabritos con diarrea, el número de subtipos fue también bajo, pues sólo se identificaron 5 diferentes, 4 en ovino y 5 en caprino (Díaz *et al.*, 2015).

En diversos estudios se ha observado que la familia IIa es la que tiene una distribución geográfica más amplia (Plutzer y Karanis, 2009; Xiao, 2010); por el contrario, la difusión de la familia IIc es más reducida, aunque se ha detectado en aislados de *Cryptosporidium* procedentes de humanos, ganado vacuno, ovino, caprino y en muestras de agua (Alves *et al.*, 2003, 2006; Peng *et al.*, 2003; Stantic-Pavlinic *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2006; Trotz-Williams *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007), siendo especialmente frecuente en pequeños rumiantes (Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Xiao, 2010; Yang *et al.*, 2014).

La mayoría de los subtipos identificados en pequeños rumiantes mostraron una homología del 100% con los aislados de referencia procedentes de animales o de humanos depositados en el GenBank; así las secuencias del subtipo IIaA13G2R1 fueron idénticas a la del aislado GU111578, la del IIaA15G2R1 a la del KT764964 y la del IIcA17G1 a la del DQ280495. Únicamente 4 aislados pertenecientes a los subtipos IIaA14G2R1 (10/16 y 10/28) y IIaA15G2R1 (4/1 y 12/8),



```

                160           170           180           190           200
4/6_IIaA15G2R1  CTGGTAGCCA GGGTTCTGAA GAGGAAGGTA GTGAAGACGA TGGCCAAACT
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1  .....
10/16_IIaA14G2R1  .....
10/28_IIaA14G2R1  .....
5/4_IIaA13G1R1  .....G...
2/6_IIdA17G1    -C...AAGG A.ACA...AAC...A...CAGACCGAG

                210           220           230           240           250
4/6_IIaA15G2R1  AGTGCTGCTT CCCAACCCAC TACTCCAGCT CAAAGTGAAG GCGCAACTAC
4/1_IIaA15G2R1  .....G...
12/8_IIaA15G2R1  .....
10/16_IIaA14G2R1  .....
10/28_IIaA14G2R1  .....
5/4_IIaA13G1R1  .....
2/6_IIdA17G1    ..A..T..T...A...C...A...

                260           270           280           290           300
4/6_IIaA15G2R1  CGAAACCATA GAAGCTACTC CAAAAGAAGA ATGCGGCACT TCATTGTGTA
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1  .....
10/16_IIaA14G2R1  .....
10/28_IIaA14G2R1  .....
5/4_IIaA13G1R1  .....
2/6_IIdA17G1    .....C..G...GA...G...T...T...

                310           320           330           340           350
4/6_IIaA15G2R1  TGTGTTTCGG AGAAGGTACC CCAGCTGCCA CATTGAAGTG TGGTGCCCTAC
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1  .....
10/16_IIaA14G2R1  .....
10/28_IIaA14G2R1  .....
5/4_IIaA13G1R1  .....G..GTT...T...AT...T...C.A...T
2/6_IIdA17G1    .....

                360           370           380           390           400
4/6_IIaA15G2R1  ACTATCGTCT ATGCACCTAT AAAAGACCAA ACAGATCCCG CACCAAGATA
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1  .....
10/16_IIaA14G2R1  .....C...
10/28_IIaA14G2R1  .....C...
5/4_IIaA13G1R1  .....
2/6_IIdA17G1    .....G...AGA...G...A...

                410           420           430           440           450
4/6_IIaA15G2R1  TATCTCTGGT GAAGTTACAT CTGTAACCTT TGAAAAGAGT GATAATACAG
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1  .....C...
10/16_IIaA14G2R1  .....C...
10/28_IIaA14G2R1  .....
5/4_IIaA13G1R1  .....
2/6_IIdA17G1    .....ACAA...G.GC...

```

Figura 4.16. (continuación)



```

                                460      470      480      490      500
4/6_IIaA15G2R1  TTAAAATCAA GGTTAACGGT CAGGATTCA GCACCTCTC TGCTAATCA
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1 .....
10/16_IIaA14G2R1 ..... T .....
10/28_IIaA14G2R1 .....
5/4_IIaA13G1R1 .....
2/6_IIaA17G1   ...C..... .TAA. GTA. .G.... .T. .A...GC...

                                510      520      530      540      550
4/6_IIaA15G2R1  AGTAGTCCAA CTGAAAATGG CCGATCTGCG GGTGAGCCTT CATCAAGATC
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1 .....
10/16_IIaA14G2R1 .....
10/28_IIaA14G2R1 .....
5/4_IIaA13G1R1 .....
2/6_IIaA17G1   .....A. ....A. ....T.C .....

                                560      570      580      590      600
4/6_IIaA15G2R1  AAGAAGATCA CTCCTCAGAG AAACCAGTGA AGCTGCTGCA ACCGTCGATT
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1 .....
10/16_IIaA14G2R1 .....
10/28_IIaA14G2R1 .....
5/4_IIaA13G1R1 .....
2/6_IIaA17G1   .....GG.T. ....A. ....

                                610      620      630      640      650
4/6_IIaA15G2R1  TGTTTGCCCT TACCCTTGAT GGTGGTAAAA GAATTGAAGT GGCTGTACCA
4/1_IIaA15G2R1  ..... G...
12/8_IIaA15G2R1 .....
10/16_IIaA14G2R1 .....
10/28_IIaA14G2R1 .....
5/4_IIaA13G1R1 .....
2/6_IIaA17G1   .....C..... .T.....

                                660      670      680      690      700
4/6_IIaA15G2R1  AACGTCGAAG ATGCATCTAA AAGAGACAAG TACAGTTTGG TTGCAGACGA
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1 .....
10/16_IIaA14G2R1 .....
10/28_IIaA14G2R1 .....
5/4_IIaA13G1R1 .....
2/6_IIaA17G1   .G..A..... .A.C.....

                                710      720      730      740      750
4/6_IIaA15G2R1  TAAACCTTTC TATACCGGCG CAAACAGCGG CACTACCAAT GGTGTCTACA
4/1_IIaA15G2R1  .....
12/8_IIaA15G2R1 .....
10/16_IIaA14G2R1 .....
10/28_IIaA14G2R1 .....
5/4_IIaA13G1R1 .....
2/6_IIaA17G1   .....T. .T. .G.C. TG. .A...T.G

```

Figura 4.16. (continuación)

Al considerar en conjunto ambas especies de pequeños rumiantes, se observó que el número de aislados pertenecientes a los subtipos de la familia IIa (9) fue muy superior a los de la familia IId (2), lo que coincide con los datos obtenidos en ganado vacuno, así como con un estudio previo realizado en pequeños rumiantes neonatos con diarrea de Galicia (Díaz *et al.*, 2015). Nuestros resultados confirman los obtenidos hasta la fecha en *C. parvum* procedentes de ganado ovino y caprino, y demuestran que los pequeños rumiantes se infectan únicamente con subtipos pertenecientes a las familias alélicas IIa y IId. Un análisis global de los aislados de *C. parvum* subtipados en estos animales muestra que en los ovinos son más frecuentes los subtipos de la familia IId, mientras que en los caprinos son los de la IIa; no obstante, se observan importantes diferencias entre estudios. Así, la familia IId predomina en corderos de Grecia, Rumanía o Australia (Imre *et al.*, 2013; Tzanidakis *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014, 2015) y en cabritos de Bélgica, China, Grecia, Italia y Polonia (Geurden *et al.*, 2008; Drumo *et al.*, 2012; Mi *et al.*, 2014; Tzanidakis *et al.*, 2014; Kaupke *et al.*, 2017); por el contrario, otros estudios, principalmente realizados en Europa, únicamente han identificado subtipos IIa en ambos animales (Smith *et al.*, 2010; Connelly *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Lange *et al.*, 2014; Paz e Silva *et al.*, 2014; Wells *et al.*, 2015; Hijjawi *et al.*, 2016; Utsi *et al.*, 2016; Al-Habsi *et al.*, 2017).

Un análisis detallado de los datos obtenidos en España revela importantes diferencias geográficas en la distribución de los subtipos de *C. parvum* que infectan a los rumiantes domésticos. Así, en el noreste de España, las poblaciones de *C. parvum* muestran una fuerte asociación de hospedador, de modo que los subtipos de la familia IIa predominan en los terneros, mientras que los corderos y cabritos están afectados fundamentalmente por subtipos IId (Quílez *et al.*, 2008a, b). Teniendo en cuenta estos resultados, algunos autores sugirieron que cuando en una zona en particular coexisten poblaciones de *C. parvum* pertenecientes a las familias IIa y IId, los subtipos IIa son más frecuentes en ganado vacuno y los IId en pequeños rumiantes (Quílez *et al.*, 2008 a, b; Xiao, 2010). Por el contrario, en el noroeste de España, los resultados obtenidos tanto en el presente trabajo como en

otros estudios previos (Díaz *et al.*, 2010a, 2015) demuestran el predominio de los subtipos IIa en ganado vacuno, ovino y caprino. Estas importantes variaciones geográficas pueden deberse a diferencias en el manejo de los animales. En Aragón, el ganado vacuno se maneja principalmente en intensivo, lo que evita el contacto de estos con los pequeños rumiantes; por el contrario, en Galicia, el manejo tradicional de las 3 especies de rumiantes domésticos, que fundamentalmente se explotan en régimen semiextensivo y donde los rebaños mixtos son bastante frecuentes, facilita que las tres especies de rumiantes compartan instalaciones y pastos, favoreciendo la transmisión de los subtipos de *C. parvum*. No obstante, es interesante destacar que no se identificaron subtipos comunes en las ovejas y las cabras, a pesar de que en esta región es frecuente la presencia de rebaños mixtos de estas especies, lo que favorecería la transmisión inter-especies. De todos modos, el estudio de un mayor número de aislados indudablemente daría lugar a la aparición de numerosas coincidencias, como se observó en corderos y cabritos neonatos con diarrea de Galicia, ya que estos compartieron el 80% del total de subtipos identificados (Díaz *et al.*, 2015).

En ganado ovino predominó claramente el subtipo IIaA15G2R1, con 6 aislados procedentes de 2 granjas de Lugo y A Coruña, mientras que el IIaA14G2R1 solo se identificó en dos animales de una granja de la provincia de Lugo (Tabla 4.4.). Estos resultados coinciden con los obtenidos tanto en vacuno como en corderos y cabritos con diarrea (Díaz *et al.*, 2010a, 2015) y revelan que el subtipo IIaA15G2R1 es el más frecuente y con mayor distribución en los rumiantes domésticos gallegos. Así mismo, estos resultados también permiten confirmar que, dentro de la familia IIa, el subtipo zoonótico IIaA15G2R1 es el más frecuente en ovinos, mostrando además una distribución mundial (Chalmers *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2008; Quílez *et al.*, 2008b; Smith *et al.*, 2010; Cacciò *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2013; Koinari *et al.*, 2014; Paz e Silva, 2014; Yang *et al.*, 2014). De hecho, Xiao (2010) y Yang *et al.* (2014) señalaron que en aquellas zonas donde *C. parvum* es muy frecuente en el ganado ovino, el subtipo IIaA15G2R1 suele ser el dominante. Por su parte, el

IaA14G2R1 es un subtipo minoritario y con escasa importancia epidemiológica en rumiantes domésticos, especialmente en ovejas y cabras, ya que hasta el momento únicamente se ha identificado en una muestra de ovino en España y en dos muestras de caprino en China y España (Mi *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2015).

En ganado caprino, se identificó el subtipo IaA13G1R1 en un animal adulto procedente de un rebaño de A Coruña, mientras que en dos animales de una granja localizada en la montaña de Lugo se detectó el subtipo IaA17G1 (Tabla 4.4.). La presencia del subtipo IaA13G1R1 demuestra su amplia distribución en el noroeste de la Península Ibérica, habiéndose identificado previamente en terneros, corderos, cabritos y jabalíes de nuestra Comunidad Autónoma (Díaz *et al.*, 2010a, 2015; García-Preedo *et al.*, 2013). Sin embargo, fuera de España únicamente se ha detectado en una muestra de un ternero en Francia (Follet *et al.*, 2011). Por otro lado, el subtipo IaA17G1 solo se halló en el ganado caprino, lo que coincide con los resultados previos obtenidos en pequeños rumiantes neonatos (Díaz *et al.*, 2015); asimismo, este fue también el subtipo IaA más frecuente en corderos y cabritos de Aragón (Quílez *et al.*, 2008b). Es interesante la ausencia del subtipo IaA16G3R1 en cabras, ya que fue el segundo subtipo más frecuente en el ganado vacuno, así como uno de los más frecuentes en corderos y cabritos con diarrea de Galicia (Díaz *et al.*, 2010a, 2015).

Al analizar la presencia de más de un subtipo GP60 en aquellas explotaciones donde se identificaron varios aislados de *C. parvum*, se observó un único alelo en todas las granjas. Estos resultados demuestran la utilidad de las técnicas de subtipado para rastrear e identificar la fuente de infección en casos de brotes de criptosporidiosis. Además, también reflejan que las infecciones por *C. parvum* son endémicas en los rebaños de ovino y caprino en Galicia, lo que está relacionado con instalaciones poco adecuadas y con el manejo tradicional de los animales que se realiza en un amplio porcentaje de las explotaciones gallegas. Durante la época de paridera nacen, en un corto periodo de tiempo, un elevado número de corderos y cabritos, muy sensibles a la infección por este parásito que, además,

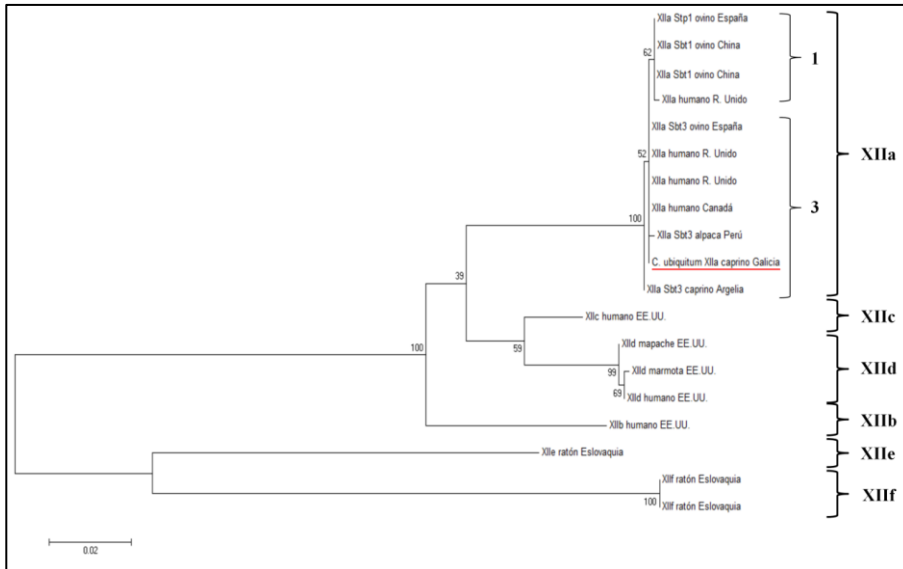
suelen estar en estrecho contacto, lo que favorece la rápida diseminación de un único subtipo de *C. parvum*, eliminado por los primeros animales infectados (Díaz *et al.*, 2015).

Los 4 subtipos hallados en este estudio ya habían sido identificados previamente en corderos y cabritos con diarrea de la misma región (Díaz *et al.*, 2015), y por lo tanto deben considerarse patógenos. En este sentido, las ovejas y cabras mayores de dos meses, especialmente los adultos, podrían actuar como portadores y reservorios de estos subtipos para los animales neonatos que son los más sensibles a la infección (Noordeen *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2016); sin embargo, la reducida prevalencia encontrada en este estudio sugiere que, desde el punto de vista epidemiológico, su importancia en la aparición de brotes de diarrea neonatal en las granjas es escasa, aunque tampoco debería subestimarse.

Todos los aislados de *C. parvum* obtenidos en pequeños ruminantes de más de dos meses pertenecían a subtipos previamente identificados en humanos y, por tanto, con potencial zoonótico (Alves *et al.*, 2006; Soba y Logar, 2008; Plutzer y Karanis, 2009; Chalmers *et al.*, 2011; Del Chierico *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2012). Por ello nuestros resultados indican que, en Galicia, las ovejas y las cabras de más de 2 meses, especialmente aquellas adultas, pueden considerarse un reservorio zoonótico, aunque debido a los escasos porcentajes de infección detectados su impacto en la Salud Pública sería muy reducido.

Todas las muestras positivas a *C. ubiquitum* mediante PCR del gen 18S, que incluyeron 1 de origen ovino y 5 de caprino, pertenecientes a 1 y 2 granjas de la provincia de Lugo, respectivamente, amplificaron para el gen GP60 y posteriormente se secuenciaron. Todas las secuencias fueron idénticas entre ellas, mostrando una homología del 100% con el aislado de referencia JX412916 perteneciente a la familia XIIa, previamente identificado en ovejas de España por Li *et al.* (2014). Además, estos autores, tras analizar filogenéticamente numerosos aislados XIIa procedentes de diversos animales domésticos y silvestres, también observaron que dentro de esta familia alélica se podían apreciar tres subtipos; así, todos los *C. ubiquitum* identificados en nuestro estudio pertenecen al

subtipo 3 (Figura 4.17.), donde, hasta el momento, se incluyen varios aislados procedentes de ovejas de España, Perú y Reino Unido, cabras de Argelia, équidos del Reino Unido y alpacas de Perú (Li *et al.*, 2014).



**Figura 4.17.** Estimación de las relaciones genéticas entre las 6 familias de subtipos GP60 de *C. ubiquitum*, mediante árbol filogenético neighbor-joining. Dentro de la familia XIIa, 1 y 3 señalan los subtipos XIIa1 y XIIa3. Los valores de bootstrap están indicados en cada una de los nodos del árbol. La barra de escala indica 0,02 sustituciones de nucleótidos inferidos por sitio

Al comparar la secuencia de los aislados obtenidos en este trabajo con la del aislado representativo del *C. ubiquitum* XIIa subtipo 3 (JX412917) se apreció una delección de tres nucleótidos (CCT) en la posición 201-203, lo que se tradujo en la ausencia de una prolina, así como una transición (GxA) en la posición 488 que no generó cambios en el aminoácido codificado (Figura 4.18.). Al comparar la secuencia con las de los subtipos 1 (JX412921) y 2 (JX412919), también se observó la misma delección de un trinucleótido en la misma posición, aunque en el subtipo 2 los nucleótidos ausentes fueron TCT, lo que supuso la ausencia de una serina; además, en ambos casos se apreció

una transversión (TxG) en la posición 207, lo que supuso un cambio de alanina a serina.

```

          10          20          30          40          50
PR Galicia  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
XIIa Sbt3   TGAGATTTT  ACTCGCTATC  GTATCACTCT  CCGTTTTCAT  CTCAGTTGTA
XIIa Sbt2   .....
XIIa Sbt1   .....

          60          70          80          90          100
PR Galicia  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
XIIa Sbt3   TTCTCAGTC  CAGGTGTTCC  ACTCAGAGT  ACATTGAAAG  AGGATGACAG
XIIa Sbt2   .....
XIIa Sbt1   .....

          110         120         130         140         150
PR Galicia  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
XIIa Sbt3   TACTAACGT  AGCACAACAA  CAGCTGCTCC  AAAGAAGATA  ATCGTCAGAT
XIIa Sbt2   .....
XIIa Sbt1   .....

          160         170         180         190         200
PR Galicia  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
XIIa Sbt3   CTACCAGGA  AGGCACAACA  CCTGCTCCTA  CTACTCCTAG  TACTACTGCT
XIIa Sbt2   .....
XIIa Sbt1   .....

          210         220         230         240         250
PR Galicia  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
XIIa Sbt3   --ACTTCTG  CTCCCACTAC  TGTTAGTACT  ACCGTCCTT  CTGGCGCGG
XIIa Sbt2   CCT...G...
XIIa Sbt1   CCT...G...

          260         270         280         290         300
PR Galicia  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
XIIa Sbt3   TGTTACTCT  ACTAGCACTG  ATGGAGATGA  GACTACTGAC  ACTGGTAGTG
XIIa Sbt2   .....
XIIa Sbt1   .....

          310         320         330         340         350
PR Galicia  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
XIIa Sbt3   GTACTACCG  CGAAACAGTT  ACAACTACTC  CTGACCCAAT  GGAGAAATGC
XIIa Sbt2   .....
XIIa Sbt1   .....

```

Figura 4.18. Alineamiento de secuencias de ADN de los productos de PCR del gen gp60 de *C. ubiquitum* obtenido en pequeños rumiantes de Galicia (PR Galicia), así como de diversos aislados representativos de los diferentes subtipos de la familia alélica XIIa (subtipo 1: JX412921; subtipo 2: JX412919; subtipo 3: JX412917). Los puntos indican nucleótidos idénticos a los del aislado PR Galicia y los guiones señalan deleciones. Las mutaciones de nucleótidos con respecto a dicho aislado se indican en rojo

	360	370	380	390	400
PR Galicia	GGTCTTTCAT	TCGTTCATGTG	GTTTGTTAGT	GGTACTCCAG	TTACAACCTCT
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	410	420	430	440	450
PR Galicia	CGAATGTGGA	CCTTACACCA	TGGTATATGG	ACCAGTTGAA	GGGGAGACTA
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	460	470	480	490	500
PR Galicia	ACCCTGCAGC	AAGGTATGTC	TCTGGGCCCG	TTACTACGGT	TACTTATGAA
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	A	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	510	520	530	540	550
PR Galicia	GAAAGCAGCA	AGAAACTCAT	GATCAATGGC	CAGGAATTGC	CCACTCTTTC
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	560	570	580	590	600
PR Galicia	CATGGATTCA	TCAAAACCAA	CCACAGCTAC	AACAACACCA	GCAGCTAGGT
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	610	620	630	640	650
PR Galicia	TACTTGCAGA	AGGTGGCACT	GCTACAGAAG	CCGTGCAAT	GACTGATCTA
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	660	670	680	690	700
PR Galicia	TACACCTTCA	CCTTAAAGGG	TGGTAAAGCC	ATTAGTGTAG	GTGTGCCCTGC
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	710	720	730	740	750
PR Galicia	TGTGGACGAT	TCAACTAAAA	GAGACAAATA	CAGTTTATCC	GCTGATAGCC
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....
	760	770	780	790	800
PR Galicia	AAACATTCTA	CACCGGTACT	GCTACCAATA	GTGGTACTAC	TAATGGAATC
XIIa Sbt3	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....	.....	.....

Figura 4.18. (continuación)



	810	820	
	..... ..... ..... ..... ..... .....		
PR Galicia	TTCAAATTGA	ACAATGATGG	TGATTTAGT
XIIa Sbt3	.....	.....	.....
XIIa Sbt2	.....	.....	.....
XIIa Sbt1	.....	.....	.....

Figura 4.18. (continuación)

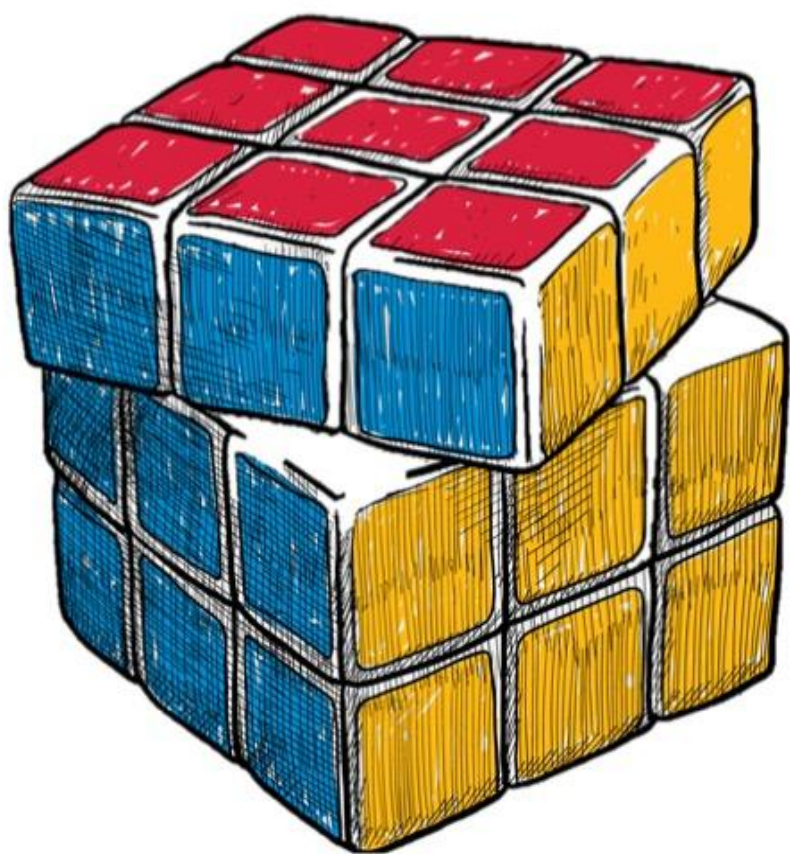
La secuencia de los subtipos GP60 de *C. ubiquitum* identificados en ovejas y cabras de más de 2 meses de Galicia fueron también idénticos a los hallados en corderos lactantes con diarrea neonatal de la misma zona de estudio (datos no publicados). Debido a que la mayoría (5/6) de los aislados de *C. ubiquitum* identificados en pequeños rumiantes gallegos se hallaron en animales de más de 12 meses (a excepción de una muestra procedente de un cabrito), nuestros resultados sugieren que los animales adultos podrían actuar como portadores de esta especie y favorecer la contaminación del ambiente y posterior infección de los más jóvenes. En este sentido, Paraud *et al.* (2014) observaron un incremento de la eliminación de ooquistes de *C. ubiquitum* en las cabras en el momento del parto, llegando a eliminar decenas de miles de ooquistes por gramo de heces una semana antes del parto, sin mostrar signos clínicos de enfermedad, señalando que estos animales podrían constituir una fuente de infección para los neonatos.

Aunque los resultados obtenidos en diferentes investigaciones han permitido identificar 6 familias alélicas (XIIa-XII f) dentro del gen que codifica para la GP60 de *C. ubiquitum*, el análisis de todos los aislados hallados hasta el momento sugiere una asociación de cada uno de los subtipos con determinadas especies animales, lo que podría reflejar una fuerte adaptación de esta especie del protozoo a sus hospedadores (Li *et al.*, 2014). Así, el subtipo XIIa se ha identificado en animales domésticos, sobre todo rumiantes como cabras, ovejas, caballos, búfalos, yaks y alpacas, aunque también se ha detectado en rumiantes silvestres como el ciervo; por el contrario, los subtipos XIIb-XII f se han hallado especialmente en roedores, como ratones, castores, ardillas, marmotas o puercoespines (Li *et al.*, 2014). Aunque el número de aislados de *C. ubiquitum* procedentes de ganado ovino y caprino caracterizados para el gen GP60 es todavía muy escaso y no

supera la centena, nuestros resultados coinciden con los señalados previamente en ovejas y cabras en Argelia, Australia, Brasil, China, EE.UU., España, Perú, Reino Unido y Turquía (Li *et al.*, 2014; Mi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Zahedi *et al.*, 2016; Al-Habsi *et al.*, 2017) y parecen confirmar que los pequeños rumiantes domésticos están infectados casi exclusivamente por subtipos de *C. ubiquitum* pertenecientes a la familia XIIa; de hecho, hasta el momento solo se han identificado un pequeño número de aislados pertenecientes a otras familias alélicas en ovejas de Australia, donde Yang *et al.* (2015) detectaron 9 subtipos XIIId.

Respecto al impacto negativo que estos animales puedan tener sobre la Salud Pública, cabe destacar que la familia XIIa de *C. ubiquitum* no sólo se ha identificado en muestras de animales domésticos y silvestres, sino también en humanos; de hecho, en personas se han detectado *C. ubiquitum* pertenecientes a los subtipos XIIa-XIIId, predominando el subtipo XIIa en Canadá, Perú, Reino Unido y Turquía y los XIIb-XIIId en EE.UU. (Li *et al.*, 2014). Por todo ello, los subtipos pertenecientes a la familia XIIa de *C. ubiquitum* poseen potencial zoonótico, de modo que las ovejas y cabras podrían constituir una fuente de infección de *C. ubiquitum* para el ser humano en Galicia. En este sentido, Li *et al.* (2014) consideran que el contacto directo con el ganado ovino es una forma común de transmisión zoonótica de esta especie del protozoo, especialmente en casos de criptosporidiosis humana en el Reino Unido; así como el consumo de agua no tratada y contaminada con ooquistes eliminados por animales domésticos y silvestres, aunque se necesitan más estudios para poder conocer mejor la dinámica de transmisión de esta especie.

# CONCLUSIONES





## 5. Conclusions

The following conclusions were drawn on the basis of the results of this study:

1<sup>a</sup>.- *Cryptosporidium* spp. is widely distributed in Galician ruminant farms without a history of neonatal diarrhoea since a high percentage of positive cattle (41.6%), sheep (47.4%) and goat (50.0%) farms was found.

2<sup>a</sup>.- In cattle, a negative relation between age and prevalence by *Cryptosporidium* spp. was observed, so that the percentage of infection decreased with increasing age. In contrast, no significant differences were observed in small ruminants.

3<sup>a</sup>.- Four *Cryptosporidium* species and a genotype were identified in cattle, being *C. parvum* and *C. bovis* the most frequent; *C. ryanae*, *C. andersoni* and the *C. suis-like* genotype were detected to a lesser extent.

4<sup>a</sup>.- A single *Cryptosporidium* species was identified in most cattle herds with more than one positive animal; *C. parvum* was the predominant species in those herds. There also were farms where two species were detected, being *C. parvum* + *C. bovis* the most common combination. Three species were only identified in two herds (*C. bovis* + *C. ryanae* + *C. parvum* and *C. bovis* + *C. ryanae* + *C. andersoni*).

5<sup>a</sup>.- An age-related variation of *Cryptosporidium* species was demonstrated in cattle; the number of species and genotypes increased with age. *C. bovis*, *C. ryanae* and the *C. suis-like* genotype were detected in post-weaned calves, the aforementioned species together with *C. parvum* were found in heifers and, finally, all species and genotypes were identified in adult animals.

6<sup>a</sup>.- Cattle from all age groups shed *C. parvum* oocysts; those results have a great epidemiological interest since healthy animals may act as reservoirs of that zoonotic *Cryptosporidium* species. Thus, asymptomatic cattle are a source of *C. parvum* oocyst environmental contamination, increasing the risk of infection for neonate calves which are more susceptible to clinical cryptosporidiosis.

7<sup>a</sup>.- The intra-specific variability of *C. parvum* found in healthy cattle was very low since only two subtypes belonging to the allelic family IIa (IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1) were identified, especially in suckling calves. Both subtypes have zoonotic potential and therefore asymptomatic cattle represent a threat for Public Health.

8<sup>a</sup>.- Three *Cryptosporidium* species were identified in sheep and goats, being *C. parvum* the most prevalent; *C. xiaoi* and *C. ubiquitum* were less common.

9<sup>a</sup>.- A single *Cryptosporidium* species was identified in most small ruminant farms with more than one positive animal; *C. parvum* was the predominant species in those farms. Mixed infections were also found in a sheep flock (*C. parvum* + *C. xiaoi*) and in a goat farm (*C. parvum* + *C. ubiquitum*).

10<sup>a</sup>.- This study represents the first investigation on age-related variation of *Cryptosporidium* species in sheep from Europe. *C. parvum* and *C. xiaoi* were detected in all age groups, whereas *C. ubiquitum* was only identified in a limited number of adult sheep. The number of *C. parvum* infections suggests that healthy sheep may represent a risk for the occurrence of neonatal diarrhoea outbreaks, especially in farms with poor hygiene such as traditional Galician sheep flocks.

11<sup>a</sup>.- The prevalence of *C. xiaoi* increased with the age of the goats, in contrast to *C. parvum* and *C. ubiquitum*. The low prevalence of *C. parvum* found in Galician goats suggests that those animals represent a lesser risk for the occurrence of neonatal diarrhoea outbreaks.

12<sup>a</sup>.- *C. parvum* intra-specific variability was low in small ruminants, although it was higher than that found in cattle. Four subtypes belonging to the allelic families IIa and IId were identified. Animals aged 2-12 months showed a lesser genetic variability: IIaA15G2R1 in post-weaned lambs and IIdA17G1 in post-weaned kids. IIaA14G2R1 and IIaA15G2R1 were identified in adult sheep, and both IIaA13G1R1 and IIdA17G1 in adult goats. Although further studies are needed, it is noticeable the absence of shared subtypes between sheep and goats despite the common presence of mixed farms in the study area which would favour the intra-species transmission.

13<sup>a</sup>.- The presence of the zoonotic *C. parvum* IIaA15G2R1 and *C. ubiquitum* XIIa subtypes in sheep and goats, respectively, provide evidence that domestic small ruminants in Galicia represent a source for human cryptosporidiosis.

## 5. Conclusiones

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

1ª.- *Cryptosporidium* spp. está ampliamente difundido en granjas de rumiantes de Galicia donde no había antecedentes de diarrea neonatal, y así lo confirman los elevados porcentajes de animales positivos en explotaciones de vacuno (41,6%), ovino (47,4%) y caprino (50%).

2ª.- En los bovinos se comprobó una relación negativa entre la edad y la prevalencia por *Cryptosporidium* spp., de modo que el porcentaje de infección disminuyó al aumentar la edad. Por el contrario, los pequeños rumiantes no mostraron diferencias significativas respecto a la edad.

3ª.- En el ganado vacuno se identificaron 4 especies y un genotipo, siendo *C. parvum* y *C. bovis* las más frecuentes; en menor proporción se detectaron *C. ryanae* y *C. andersoni* y el genotipo *C. suis-like*.

4ª.- En la mayoría de las granjas con más de un animal positivo sólo se identificó una especie de *Cryptosporidium*, siendo *C. parvum* la predominante. También se encontraron rebaños con 2 especies presentes, siendo la combinación *C. parvum* + *C. bovis* la más frecuente; únicamente 2 granjas fueron positivas a 3 especies (*C. bovis* + *C. ryanae* + *C. parvum* y *C. bovis* + *C. ryanae* + *C. andersoni*).



5ª.- Se evidenció una asociación entre la edad del ganado vacuno y ciertas especies de *Cryptosporidium*, de modo que la diversidad de especies y genotipos se incrementó con la edad; así, en los terneros de 2-12 meses se identificaron *C. bovis* y *C. ryanae* y el genotipo *C. suis-like*, en las novillas se hallaron las anteriores y *C. parvum*, y en los adultos se encontraron todas las especies y genotipos identificados en este estudio.

6ª.- Los bovinos de todos los grupos de edad eliminaron ooquistes de *C. parvum*, lo que tiene un considerable interés epidemiológico, ya que los animales sin diarrea actuarían como reservorios, contribuyendo a contaminar el medio e incrementando el riesgo de infección de los terneros neonatos, mucho más propensos a episodios de diarreas neonatales.

7ª.- La variabilidad intraespecífica de *C. parvum* hallada en el ganado vacuno sin diarrea fue muy reducida, identificándose solo 2 subtipos pertenecientes a la familia alélica IIa (IIaA15G2R1 y IIaA16G3R1), que fueron más frecuentes en los terneros lactantes. Debido a que ambos subtipos poseen potencial zoonótico, es evidente que suponen un riesgo para la salud humana.

8ª.- En las ovejas y en las cabras se identificaron 3 especies de *Cryptosporidium*, siendo *C. parvum* la más prevalente, en tanto que *C. xiaoi* y *C. ubiquitum* eran menos frecuentes.

9ª.- En la mayoría de las granjas de ovino y caprino con al menos dos animales positivos, se identificó una sola especie de *Cryptosporidium*. En las explotaciones de ovino también se hallaron infecciones mixtas por *C. parvum* y *C. xiaoi* y en las de cabras *C. parvum* y *C. ubiquitum*.

10<sup>a</sup>.- Es la primera vez que se estudia en Europa la posible relación entre la edad de los pequeños rumiantes y sus especies de *Cryptosporidium*. *C. ubiquitum* solo se identificó en unos pocos ovinos adultos, mientras que *C. parvum* y *C. xiaoi* se detectaron en todos los grupos de edad. El porcentaje de infección del ganado ovino por *C. parvum* supone riesgo de aparición de brotes de diarrea neonatal especialmente en explotaciones con condiciones higiénicas deficientes como sucede con frecuencia en los rebaños ovinos en Galicia con manejo tradicional.

11<sup>a</sup>.- En las cabras, la prevalencia de *C. xiaoi* aumentó con la edad y disminuyó la de *C. parvum* y *C. ubiquitum*. La escasa prevalencia de *C. parvum*, indicaría que, en Galicia, las cabras representan menor riesgo de brotes de diarreas neonatales.

12<sup>a</sup>.- La variabilidad intraespecífica de *C. parvum* en los pequeños rumiantes fue baja, aunque resultó superior a la del ganado vacuno; se identificaron 4 subtipos pertenecientes a las familias alélicas IIa y IIc. Los animales menores de 12 meses tuvieron menor variabilidad genética, concretamente el subtipo IIaA15G2R1 en corderos y el IIcA17G1 en cabritos. En las ovejas adultas se detectaron los IIaA14G2R1 y IIaA15G2R1 y en las cabras los IIaA13G1R1 y IIcA17G1. Aunque se necesitan más estudios, llama la atención la ausencia de subtipos comunes en ovejas y cabras, a pesar de que en Galicia son frecuentes rebaños mixtos, lo que podría favorecer la transmisión inter-especies.

13<sup>a</sup>.- La detección del subtipo IIaA15G2R1 de *C. parvum* en ovinos y de la familia XIIa de *C. ubiquitum*, potencialmente zoonótica, en ovejas y cabras, confirma que en Galicia estos dos rumiantes pueden constituir una fuente de infección para las personas.

# RESUMEN





## 6. Summary

A total of 1,113 faecal samples from healthy domestic ruminants were collected between 2013 and 2016. All animals belonged to 180 farms located in different Galician municipalities. No neonatal diarrhoea outbreaks were detected the year before the sampling.

Overall, 555 cattle faecal samples from 149 herds were taken, as well as 324 sheep faecal samples from 19 flocks and 234 goat samples from 16 farms. In order to study the possible influence of the age of the animals on both the prevalence and the *Cryptosporidium* species, a total of 4 age groups were considered in cattle: (G1) pre-weaned calves younger than 2 months; (G2) post-weaned calves aged 2-12 months; (G3) heifers between 12-24 months of age, and (G4) adult cattle older than 2 years. Two age groups were only considered in small ruminants due to the concentration of births at lambing: (G1) lambs and goat kids between 2-12 month-old and (G2) adults older than 12 months.

Faecal samples were directly taken from the rectum and kept refrigerated until analysed; samples were processed within 48 hours of collection. In order to reduce the number of false negatives, *Cryptosporidium* oocysts were firstly concentrated by a diphasic sedimentation method using distilled water and ethyl acetate. Later, *Cryptosporidium* spp. DNA was extracted directly from the sediment using a kit for DNA extraction from faecal samples. The *Cryptosporidium* spp. genotyping analysis was performed by a PCR-RFLP targeting the SSU rRNA gene, using the endonucleases SspI, VspI and MboII; restriction patterns were compared with those reported by Feng *et al.* (2007) and Xiao and Ryan (2008). A subset of representative isolates showing a restriction pattern different to *C. parvum* were selected and sequenced to confirm the RFLP results; sequences were scanned against the GenBank database. *C. parvum* and *C. ubiquitum* isolates were subtyped using a nested PCR to

amplify a fragment of the GP60 gene. Subtypes were named according to nomenclature described by Sulaiman *et al.* (2005).

In **cattle**, *Cryptosporidium* spp. DNA was detected in 91 out of 555 samples (16.4%). In addition, positive animals were detected in the 41.6% of herds. When the influence of age on the prevalence was studied, a negative relation was observed. Thus, the highest prevalence values were detected in pre-weaned calves (28.6%), and the lowest in adult cattle (9.7%). Four *Cryptosporidium* species (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* and *C. andersoni*) and a genotype (*Cryptosporidium suis-like* genotype) were identified. Considering the 91 *Cryptosporidium* spp. positive isolates, *C. parvum* (38.5%) and *C. bovis* (37.4%) were the most frequently identified species, whereas *C. ryanae* (8.8%), *C. suis-like* (7.7%) and *C. andersoni* (2.1%) were detected to a lesser extent. Finally, the 5.5% of the positive isolates showed underlying signals in the electropherogram that prevented the accurate readout of sequences. The high prevalence of *C. parvum* in Galician cattle involves a Public Health threat since healthy cattle should be considered a reservoir of this zoonotic species. A single positive animal was detected in most of positive farms (47/62). In the rest of herds (15/62), a single *Cryptosporidium* species (mainly *C. parvum*) was detected in 7 farms and two different species in 6 herds (mainly *C. parvum* and *C. bovis*). Finally, three different species (*C. parvum*+ *C. bovis*+ *C. ryanae* and *C. ryanae*+ *C. bovis*+ *C. andersoni*) were identified in two cattle farms.

When the age-related distribution of *Cryptosporidium* species was studied, *C. parvum*, *C. bovis* and *C. ryanae* were identified in pre-weaned calves, the former being predominant; *C. bovis* was the most common species in calves aged 2-12 months. The number of species/genotypes identified increased with the age of the animals; thus, *C. bovis*, *C. ryanae* and the *suis-like* genotype were detected in calves between 2-12 months, the aforementioned species together with *C. parvum* were found in heifers and, finally, all species and genotypes were detected in adult animals. The presence of *C. parvum* in all age groups has great epidemiological consequences, since healthy cattle shed *C. parvum* oocysts, increasing the infection

pressure and, consequently, the risk of infection in neonates; all this could favour the appearance of neonatal diarrhoea outbreaks in those herds.

Subtype analysis was performed in the 35 isolates identified as *C. parvum*; nevertheless, only 24 samples (68.6%) were successfully sequenced after GP60 PCR. The genetic variability within *C. parvum* was low since only two subtypes belonging to the allelic family IIa were identified. IIaA15G2R1 was the predominant subtype (20/24), whereas IIaA16G3R1 were only identified in 4 *C. parvum* isolates. The subtype IIaA15G2R1 was the most frequent (81.8%) in pre-weaned calves; although the subtype IIaA16G3R1 makes up only 18.2% of all positives from that age range, it is worth noting that all isolates belonging to this subtype were identified in pre-weaned calves. The subtype IIaA15G2R1 was the only one detected in heifers, whereas *C. parvum* isolates from adult animals could not be subtyped.

The prevalence of *Cryptosporidium* spp. was low and similar in both **small ruminant** species (5.9% in sheep and 6.0% in goats); in addition, the percentage of positive sheep flocks (47.4%) was almost identical to that of goat herds (50.0%). When considering the effect of age on the prevalence by *Cryptosporidium* spp., it was observed that post-weaned lambs showed similar percentage values to those of adult sheep (6.0% and 5.8%, respectively). In contrast, the percentage of positive adult goats (6.4%) was slightly higher than that observed in post-weaned kids (4.8%); nevertheless, all those differences were not significant.

Three *Cryptosporidium* species were identified in small ruminants; *C. parvum* was the most common species (48.5%), followed by *C. xiaoi* (24.2%) and *C. ubiquitum* (18.2%). Three samples (9.1%), two from sheep and one from a goat, were positive to PCR but the product was not sufficient to perform an RFLP analysis.

In **sheep**, *C. parvum* was the most prevalent species (4.0%), whereas *C. xiaoi* (0.9%) and *C. ubiquitum* (0.3%) were less common. In addition, *C. parvum*-positive animals were identified in the 26.3% of the flocks, and *C. xiaoi* and *C. ubiquitum* in the 15.8% and the

5.3% of the farms, respectively. A single *Cryptosporidium* species was identified in most of those farms with more than one positive animal. In addition, a single farm (5.3%) showed a mixed infection by *C. parvum* and *C. xiaoi*.

This study represents the first investigation on age-related variation of *Cryptosporidium* species in sheep from Europe. Both *C. parvum* and *C. xiaoi* were detected in all age groups, whereas *C. ubiquitum* was only identified in a limited number of adult sheep. The prevalence of *C. xiaoi* diminished with the age of the animals (2.4% in post-weaned and 0.4% in adults); in contrast, the percentage of infection by *C. parvum* increased from 3.6% in 2-12 month-old lambs to 4.2% in adult sheep. These results suggest that adult sheep represent a higher risk of appearance of human cryptosporidiosis.

In **goats**, the prevalence of each *Cryptosporidium* species was similar to those observed in sheep, although the percentage of infection by *C. xiaoi* and *C. ubiquitum* was slightly higher to that by *C. parvum*. When considering the herd-level prevalence, *C. xiaoi* (25.0%) was the predominant species, whereas *C. parvum* and *C. ubiquitum* were identified in the 12.5% of the farms. A single *Cryptosporidium* spp. was identified in those farms with more than a positive animal, with the exception of a single herd where both *C. parvum* and *C. ubiquitum* were detected. Considering the age of goats, a slightly lower prevalence of *C. parvum* and *C. ubiquitum* was detected in the youngest animals; in contrast, the prevalence of *C. xiaoi* increased with the age of goats.

In small ruminants, the subtype analysis allowed the identification of four different *C. parvum* subtypes belonging to the allelic families IIa and IIc. Only IIa subtypes were detected in sheep; subtype IIaA15G2R1 was identified in post-weaned lambs, whereas subtypes IIaA14G2R1 and IIaA15G2R1 were detected in adults. Due to the zoonotic potential of both subtypes, especially IIaA15G2R1, our results confirm that healthy sheep should be considered a source of infection by *C. parvum* to people.



In kids younger than 12 months, a single subtype of the family II<sub>d</sub> was identified (II<sub>d</sub>A17G1); in contrast, older goats showed subtypes belonging to allelic families II<sub>a</sub> (II<sub>a</sub>A13G1R1) and II<sub>d</sub> (II<sub>d</sub>A17G1). Although further studies are needed, it is worth mentioning the absence of shared subtypes between sheep and goats despite the common presence of mixed farms in the study area which favour the intra-species transmission.

All isolates positive to *C. ubiquitum* (1 from sheep and 5 from goats) belonged to the zoonotic family XII<sub>a</sub>. Consequently, domestic small ruminants may represent a source of infection by this species to man in Galicia.



## 6. Resumen

Entre 2013 y 2016 se tomaron un total de 1.113 muestras fecales de rumiantes domésticos, que en el momento de la recogida no presentaban diarrea, pertenecientes a 180 explotaciones situadas en diferentes municipios gallegos. Además, ninguno de los rebaños incluidos en el estudio no habían presentado brotes de diarreas neonatales en el año anterior al muestreo.

Se recogieron 555 muestras fecales de ganado vacuno procedentes de 149 explotaciones, 324 muestras de ovejas de 19 granjas y 234 de cabras de 16 explotaciones. Con objeto de estudiar la posible influencia de la edad sobre la prevalencia de infección y las especies de *Cryptosporidium* presentes. En el ganado vacuno se consideraron 4 grupos: G1: terneros menores de 2 meses; G2: terneros de entre 2-12 meses; G3: novillas entre 12-24 meses y G4: adultos mayores de 24 meses. En el ganado ovino y caprino, al concentrarse los partos en un período corto de tiempo, únicamente se consideraron 2 grupos: G1: corderos y cabritos de entre 2 y 12 meses y G2: adultos mayores de 12 meses.

Las heces se obtuvieron individualmente y directamente del recto, conservándose a 4°C hasta su procesado, que se realizó en las 48 horas posteriores a su obtención. Con objeto de reducir el número de falsos negativos, se procedió a la concentración de los ooquistes de *Cryptosporidium* mediante un método de sedimentación difásica con agua destilada y acetato de etilo. Posteriormente, el ADN parasitario se extrajo directamente del sedimento, utilizando un kit de extracción específico para muestras fecales. La presencia de *Cryptosporidium* se detectó mediante PCR del gen SSU rRNA, y la identificación de las especies/genotipos se llevó a cabo con el análisis de los fragmentos de restricción obtenidos tras la digestión de los productos de PCR con las enzimas SspI, VspI y MboII; los patrones de restricción obtenidos se compararon con los de Feng *et al.* (2007) y Xiao y Ryan (2008). Los aislados cuyo patrón de restricción no coincidió con el de *C. parvum*

se seleccionaron y un porcentaje significativo se secuenció para confirmar los resultados de la RFLP; las secuencias de ADN obtenidas se compararon con las depositadas en el GenBank. Además, los aislados identificados como *C. parvum* o *C. ubiquitum* se subtiparon mediante el análisis de la secuencia obtenida tras realizar una PCR del gen que codifica para la GP60. Los subtipos se nombraron siguiendo la nomenclatura propuesta por Sulaiman *et al.* (2005).

En el **ganado vacuno** se detectó la presencia de ADN de *Cryptosporidium* spp. en 91 muestras de las 555 analizadas (16,4%). Además, en el 41,6% de las granjas (62/149) había al menos un animal que eliminaba oocistos de este parásito. Al considerar la edad de los animales, se observó que la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. era superior en los terneros menores de 2 meses (28,6%) y que ésta disminuía con la edad (9,7% en los adultos).

Se identificaron 4 especies de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* y *C. andersoni*) y un genotipo (*Cryptosporidium* genotipo *suis-like*). Tras el análisis PCR-RFLP de los 91 aislados positivos, las especies más frecuentes fueron *C. parvum* (38,5%) y *C. bovis* (37,4%), hallándose en menor proporción *C. ryanae* (8,8%), *C. suis-like* (7,7%) y *C. andersoni* (2,1%); además, en el 5,5% de los aislados las bandas obtenidas fueron muy débiles, por lo que no se pudo realizar su secuenciación. La elevada detección de *C. parvum* conlleva un importante problema de salud pública, puesto que el ganado vacuno, incluso en ausencia de diarrea, puede considerarse como portador y diseminador de esta especie que tiene un importante potencial zoonótico. En la mayoría de las granjas positivas (47/62) solo se identificó un animal positivo. Al estudiar aquellos los rebaños con más de un animal positivo (15/62), en la mayoría (7/15) sólo se identificó una única especie del protozoo, predominando *C. parvum*. En el 40% (6/15) se detectaron 2 especies, siendo las más frecuentes *C. parvum* y *C. bovis* y únicamente en 2 granjas se hallaron animales positivos a 3 especies diferentes; en una se halló la combinación *C. parvum*+ *C. bovis*+ *C. ryanae* y en la otra *C. ryanae*+ *C. bovis*+ *C. andersoni*.

Al relacionar la edad de los animales con las especies de *Cryptosporidium* presentes, se observó que los más jóvenes tenían *C. parvum*, *C. bovis* y *C. ryanae*, con predominio de la primera la especie. En los animales de más de 2 meses *C. bovis* fue la especie más frecuente y, a medida que aumentó la edad de los animales, también lo hizo la variedad de especies y genotipos; así, en los terneros de 2-12 meses se identificaron *C. bovis* y *C. ryanae* y *C. genotipo suis-like*; en las novillas se hallaron *C. bovis* y *C. ryanae* y también *C. parvum* y, finalmente, en los adultos estaban presentes todas las especies y genotipos identificados en este estudio. La presencia de *C. parvum* en todos los grupos de edad, tiene importantes repercusiones desde el punto de vista epidemiológico, ya que esos animales sin diarrea eliminan ooquistes de *C. parvum*, incrementando el riesgo de infección para los terneros neonatos y por tanto propiciando las diarreas neonatales.

Al realizar el análisis subtípico de los 35 aislados identificados como *C. parvum*, sólo amplificaron 24 (68,6%) para la PCR de la GP60. La variabilidad genética fue reducida, pues únicamente se identificaron dos subtipos pertenecientes a la familia alélica IIa; el IIaA15G2R1 fue el predominante (20/24), mientras que el IIaA16G3R1 sólo se detectó en 4 aislados. En los terneros menores de 2 meses predominó el subtipo IIaA15G2R1 (81,8%), frente al IIaA16G3R1 que solo representó el 18,2% de los positivos, aunque cabe destacar que todos los aislados de este subtipo se detectaron en este grupo de edad. En la novillas (12-24 meses) sólo se halló el subtipo IIaA15G2R1, mientras que, en los animales de mayor edad, no se pudo subtipar *C. parvum*.

En el **ganado ovino y caprino**, tanto la prevalencia de *Cryptosporidium* (5,9% en ovejas y 6,0% en cabras) como el porcentaje de explotaciones positivas fueron muy similares, 47,4% y 50,0%, respectivamente. Al considerar la edad de los animales se observó que la prevalencia individual por *Cryptosporidium* spp. no mostró apenas diferencias entre los corderos destetados (6,0%) y las ovejas adultas (5,8%); por el contrario, en el ganado caprino, el porcentaje de adultos (6,4%) que eliminaron ooquistes del parásito fue

superior al de los cabritos destetados (4,8%), si bien las diferencias no fueron significativas en ninguna de las dos especies. En ovinos y caprinos se identificaron 3 especies de *Cryptosporidium*, siendo su prevalencia del 48,5% para *C. parvum*, del 24,2% para *C. xiaoi* y del 18,2% para *C. ubiquitum*. Tres muestras (9,1%), dos procedentes de ovejas y una de cabra, fueron positivas a PCR, pero el producto obtenido no fue suficiente para realizar un análisis RFLP.

En el **ganado ovino**, la prevalencia individual fue del 4,0% para *C. parvum*, del 0,9% para *C. xiaoi* y del 0,3% para *C. ubiquitum*. Además, *C. parvum* se identificó en el 26,3% de las granjas de ovejas y en menor proporción se hallaron *C. xiaoi* (15,8%) y *C. ubiquitum* (5,3%). En la mayoría de las explotaciones con más de un animal positivo sólo se identificó una especie de *Cryptosporidium* (94,7%); solamente se detectó una infección mixta por *C. parvum* y *C. xiaoi* en una granja (5,3%).

Es la primera vez que se estudia en Europa la posible relación entre la edad de las ovejas y las especies de *Cryptosporidium*, comprobándose que *C. parvum* y *C. xiaoi* se detectaban en los dos grupos de edad, mientras que *C. ubiquitum* únicamente se identificó en un escaso número de ovejas adultas. La prevalencia de *C. xiaoi* disminuyó con la edad (2,4% en los destetados y 0,4% en los adultos), mientras que se incrementaba la de *C. parvum* (3,6% en los de 2 a 12 meses y 4,2% en los de más edad); esto sugiere que los ovinos de más edad podrían ser importantes en transmisión de la criptosporidiosis humana.

En el **ganado caprino**, la prevalencia de cada una de las especies fue similar a la hallada en las ovejas, aunque el porcentaje de infección por *C. xiaoi* y *C. ubiquitum* (2,1%, respectivamente) fue ligeramente superior al de *C. parvum* (1,3%). Así mismo, al considerar la prevalencia por explotación, *C. xiaoi* (25,0%) fue la especie predominante, mientras que *C. parvum* y *C. ubiquitum* se identificaron, cada una, en el 12,5% de los rebaños. Sólo se identificó una única especie de *Cryptosporidium* en las granjas con más de un animal positivo, a excepción de un rebaño donde se detectaron

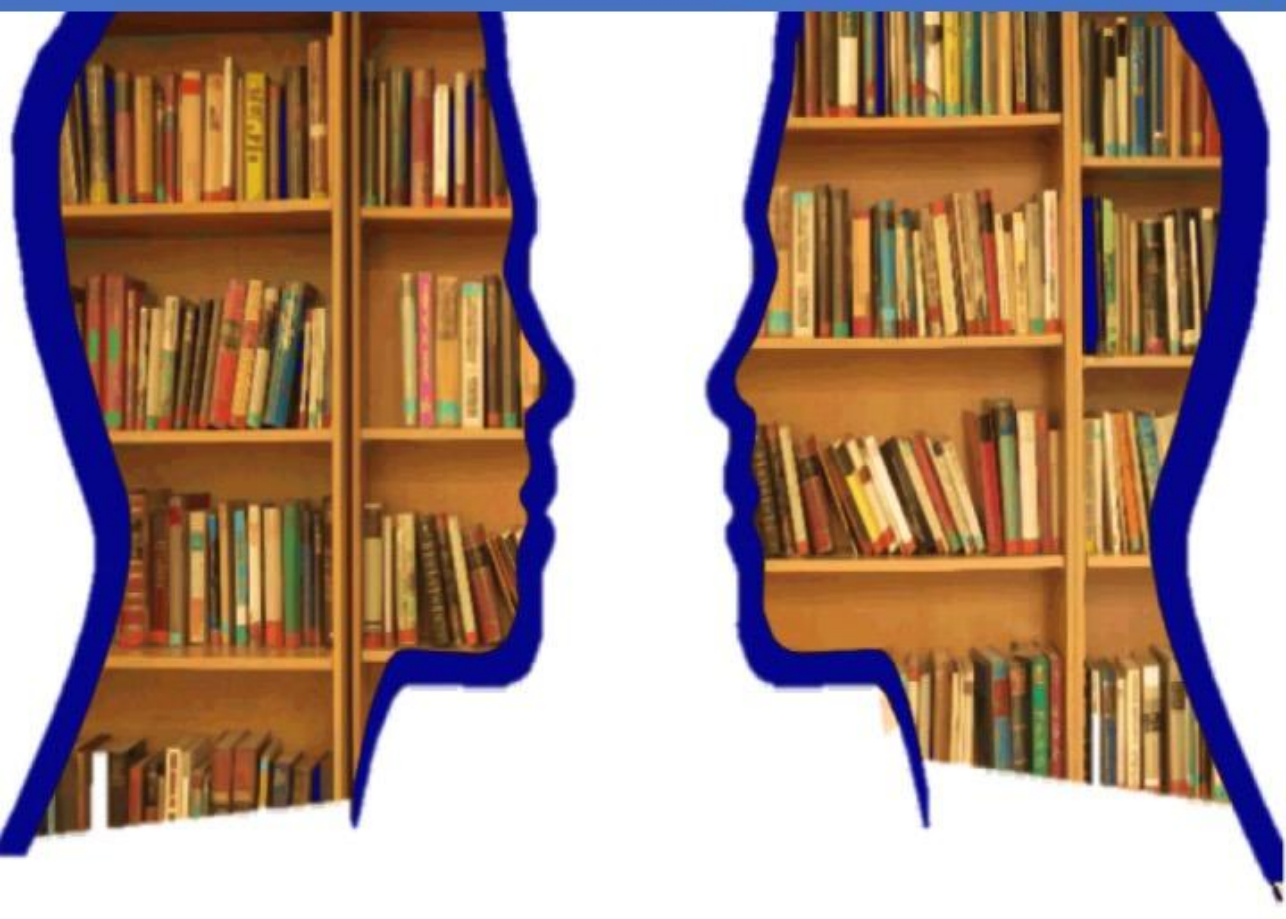
animales que eliminaban ooquistes de *C. parvum* y *C. ubiquitum*. En relación con la edad, se constató que la prevalencia de *C. parvum* y *C. ubiquitum* era ligeramente inferior en los animales más jóvenes, mientras que la de *C. xiaoi* se incrementaban con la edad de las cabras.

Respecto al análisis subtípico, se identificaron 4 subtipos de *C. parvum* pertenecientes a las familias alélicas IIa y IId en los pequeños rumiantes. En los ovinos sólo se hallaron subtipos pertenecientes a la familia alélica IIa; en los corderos de 2-12 meses se identificó el subtipo IIaA15G2R1, mientras que en los mayores de esta edad se detectaron los subtipos IIaA14G2R1 y IIaA15G2R1. Estos resultados confirman que el ganado ovino, aunque no presente diarrea, puede ser una fuente de infección de *C. parvum* para las personas, debido al potencial zoonótico de ambos subtipos, especialmente del IIaA15G2R1.

En los cabritos menores de 12 meses solo se halló un subtipo de la familia IId (IIdA17G1), mientras que en las cabras de mayor edad se detectaron subtipos pertenecientes a las familias alélicas IIa (IIaA13G1R1) y IId (IIdA17G1). Aunque es necesario realizar un estudio más amplio, llama la atención el no haber identificado subtipos comunes en las ovejas y las cabras, a pesar de que en esta región es frecuente la presencia de rebaños mixtos de estas especies, lo que favorecería la transmisión inter-especies.

Mediante PCR del gen gp60 se comprobó que todas las muestras positivas a *C. ubiquitum* (1 de ovino y 5 de caprino) pertenecían a la familia XIIa, que es potencialmente zoonótica, de modo que las ovejas y cabras podrían constituir una fuente de infección de *C. ubiquitum* para las personas en Galicia.

# BIBLIOGRAFÍA







## 7. Bibliografía

- Abal-Fabeiro, J.L.; Maside, X.; Llovo, J., Bartolomé, C., 2015. Aetiology and epidemiology of human cryptosporidiosis cases in Galicia (NW Spain), 2000-2008. *Epidemiology and Infection*, **143** (14): 3022-3035.
- Abd-El-Wahed, M. M., 1999. *Cryptosporidium* infection among sheep in Qalubia Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **29** (1): 113-118.
- Abeywardena, H.; Jex, A. R.; Nolan, M. J.; Haydon, S. R.; Stevens, M. A.; McAnulty, R. W.; Gasser, R. B., 2012. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infection, Genetics and Evolution*, **12** (8): 1984-1993.
- Abeywardena, H.; Jex, A. R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Haydon, S. R.; Stevens, M. A.; Gasser, R. B., 2013a. First molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from *Bubalus bubalis* (water buffalo) in Victoria, Australia. *Infection, Genetics and Evolution*, **20**: 96-102.
- Abeywardena, H.; Jex, A.R.; Firestone, S.M.; McPhee, S.; Driessen, N.; Koehler, A.V.; Haydon, S.R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Stevens, M.A.; Gasser, R.B., 2013b. Assessing calves as carriers of *Cryptosporidium* and *Giardia* with zoonotic potential on dairy and beef farms within a water catchment area by mutation scanning. *Electrophoresis*, **34**: 2259-2267.
- Abeywardena, H.; Jex, A.R.; Koehler, A.V.; Rajapakse, R.P.; Udayawarna, K.; Haydon, S.R.; Stevens, M.A.; Gasser, R.B., 2014. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and

- Giardia* from bovines (*Bos taurus* and *Bubalus bubalis*) in Sri Lanka: unexpected absence of *C. parvum* from pre-weaned calves. *Parasites and Vectors*, **7**: 75.
- Abeywardena, H.; Jex, A.R.; Gasser, R.B., 2015. Chapter Six-A Perspective on *Cryptosporidium* and *Giardia*, with an Emphasis on Bovines and Recent Epidemiological Findings. *Advances in Parasitology*, **88**: 243-301.
- Abreu-Acosta, N.; Quispe, M.A.; Foronda-Rodríguez, P.; Alcoba-Florez, J.; Lorenzo-Morales, J.; Ortega-Rivas, A.; Valladares, B., 2007. *Cryptosporidium* in patients with diarrhoea, on Tenerife. Canary Islands, Spain. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **101**: 539-45.
- Abreu-Acosta, N.; Foronda-Rodríguez, P.; López, M.; Valladares, B., 2009. Occurrence of *Cryptosporidium hominis* in pigeons (*Columba livia*). *Acta Parasitologica*, **54**:1-5.
- Acres, S.D.; Isaacson, R.E.; Babuik, L.A.; Kapitany, R.A., 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infection and Immunity*, **25**: 121-126.
- Adamu, H.; Petros, B.; Zhang, G.; Kassa, H.; Amer, S.; Ye, J.; Feng, Y., Xiao, L., 2014. Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Disease*, **8**: e2831.
- Agholi, M.; Hatam, G.R.; Motazedian, M.H., 2013a. HIV/AIDS-associated opportunistic protozoal diarrhea. *AIDS research and human retroviruses*, **29** (1): 35-41.
- Aiello, A.E.; Xiao, L.; Limor, J.R.; Liu, C.; Abrahamsen, M.S.; Lal, A.A., 1999. Microsatellite analysis of the human and bovine genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46** (5): 46S-47S.
- Aita, J.; Ichikawa-Seki, M.; Kinami, A.; Yaita, S.; Kumagai, Y.; Nishikawa, Y.; Itagaki, T., 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* detected in Japanese black and

- holstein calves in Iwate prefecture and Tanegashima island, Kagoshima prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, **77 (8)**: 997-999.
- Ajjampur, S.S.R.; Liakath, F.B.; Kannan, A.; Rajendran, P.; Sarkar, R.; Moses, P.D.; Simon, A.; Agarwall, I.; Mathew, A.; O'Connor, R.; Ward, H.; Kang, G., 2010. Multisite study of cryptosporidiosis in children with diarrhea in India. *Journal of Clinical Microbiology*, **48 (6)**: 2075-2081.
- Aldeyarbi, H.M.; Karanis, P., 2016a. The ultra-structural similarities between *Cryptosporidium parvum* and the gregarines. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **63 (1)**: 79-85.
- Aldeyarbi, H.M.; Karanis, P., 2016b. Electron microscopic observation of the early stages of asexual multiplication and development of *Cryptosporidium parvum* in in vitro axenic culture. *European Journal of Protistology*, **52**: 36-44.
- Aldeyarbi, H.M.; Karanis, P., 2016c. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*, **143 (6)**: 749-761.
- Al-Habsi, K.; Yang, R.; Williams, A.; Miller, D.; Ryan, U.; Jacobson, C., 2017. Zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* shedding by captured rangeland goats. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, **7**: 32-35.
- Al Mawly, J.; Grinberg, A.; Prattley, D.; Moffat, J.; French, N., 2015. Prevalence of endemic enteropathogens of calves in New Zealand dairy farms. *New Zealand Veterinary Journal*, **63 (3)**: 147-152.
- Alonso-Sanz, M.; Chaves, F.; Dronda, F.; Catalan, S.; González-López, A., 1995. Intestinal parasitoses in the prison population in the Madrid area (1991-1993). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **13**: 90-5.
- Álvarez-Pellitero, P.; Sitja-Bobadilla, A., 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus*

- labrax* L. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1007-1021.
- Álvarez-Pellitero, P.; Quiroga, M.I.; Sitja-Bobadilla, A.; Redondo, M.J.; Palenzuela, O.; Padros, F.; Vazquez, F.; Nieto, J.M., 2004. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa, *Cryptosporidiidae*) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**: 133.
- Alves, M.; Matos, O.; Antunes, F., 2003a. Microsatellite analysis of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in Portugal: A preliminary study. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 Suppl., 529 and 530.
- Alves, M.; Xiao, L.; Sulaiman, I.; Lal, A.A.; Matos, O.; Antunes, F., 2003b. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, **41(6)**: 2744-2747.
- Alves, M.; Xiao, L.; Antunes, F.; Matos, O., 2006a. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, **99 (3)**: 287-292.
- Alves, M.; Ribeiro, A.M.; Neto, C.; Ferreira, E.; Benoliel, M.J.; Antunes, F.; Matos, O., 2006b. Distribution of *Cryptosporidium* species and subtypes in water samples in Portugal: a preliminary study. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** Suppl 1: S24-25.
- Amadi, B.; Kelly, P.; Mwiya, M.; Mulwazi, E.; Sianongo, S.; Changwe, F.; Thomson, M.; Hachungula, J.; Watuka, A.; Walker-Smith, J.; Chintu, C. 2001. Intestinal and systemic infection, HIV, and mortality in Zambian children with persistent diarrhea and malnutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **32**: 550-554.
- Amer, S.; Honma, H.; Ikarashi, M.; Tada, C.; Fukuda, Y.; Suyama, Y.; Nakai, Y., 2010. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes

- in dairy calves in Egypt. *Veterinary Parasitology*, **169**: 382-386.
- Amer, S.; Zidan, S.; Adamu, H.; Ye, J.; Roellig, D.; Xiao, L.; Feng, Y., 2013a. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces; Egypt. *Experimental Parasitology*, **135**: 518-523.
- Amer, S.; Zidan, S.; Adamu, H.; Ye, J.; Roellig, D.; Xiao, L.; Feng, Y., 2013b. Prevalence and characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Nile River delta provinces, Egypt. *Experimental Parasitology*, **135 (3)**: 518-523.
- Anderson, B.C., 1985. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. *American Journal of Public Health*, **75 (12)**: 1433-1434.
- Angus, K.W., 1990. Cryptosporidiosis in ruminants. In: Dubey J.P, Speer C.A, Fayer R. (Eds.). *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton, CRC Press: 83-103.
- Angus, K.W.; Appleyard, W.T.; Menzies, J.D.; Campbell, I.; Sherwood, D., 1982a. An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. *Veterinary Record*, **110**: 129-130.
- Angus, K.W.; Tzipori, S.; Gray, E.W., 1982b. Intestinal lesions in SPF lambs associated with *Cryptosporidium* from calves with diarrhoea. *Veterinary Pathology*, **19**: 67-68.
- ANOFEL *Cryptosporidium* National Network, 2010. Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. *Euro Surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*, **15 (33)**: 19642.
- Anusz, K.Z.; Mason, P.H.; Riggs, M.W.; Perryman, L.E., 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 2770-2774.

- Aquino, M.C.; Widmer, G.; Zucatto, A.S.; Viol, M.A.; Inácio, S.V.; Nakamura, A.A.; Coelho, W.M.; Perri, S.M.; Meireless, M.V.; Bresciani, K.D., 2015. First molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. infecting buffalo calves in Brazil. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **62** (5): 657-661.
- Ares-Mazás, M.E.; Fernández-da Ponte, B.; Vergara-Castiblanco, C.A.; Freire-Santos, F.; Quilez-Cinca, J.; Causape-Valenzuela, A.C.; Sánchez-Acedo, C., 1999. Oocysts, IgG levels and immunoblot patterns determined for *Cryptosporidium parvum* in bovine examined during a visit to a farm (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **81**: 185–193.
- Arsenopoulos, K.; Theodoridis, A.; Papadopoulos, E., 2017. Effect of colostrum quantity and quality on neonatal calf diarrhoea due to *Cryptosporidium* spp. infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **53**: 50-55.
- Arslan, M.Ö.; Ekinci, A.İ., 2012. Determination of *Cryptosporidium parvum* subtypes in cattle in Kars province of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **18** (Suppl A): A221-A226.
- Atwill, E.R.; Johnson, E.; Klingborg, D.J.; Vesperat, G.M.; Markegard, G.; Jensen, W. A.; Prat, D.W.; Delmas, R.E.; George, H.A.; Forero, L.C.; Philips, R.L.; Barry, S.J.; McDougald, N.K.; Gildersleeve, R.R.; Frost, W.E., 1999. Age, geographic, and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow-calf herds. *American Journal of Veterinary Research*, **60** (4): 420-425.
- Augustin-Bichl, Boch, Henkel, 1984. Kryptosporidien-infektionen bei hund und katze. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift Journal*, **97**: 179-181.
- Ayinmode, A.B.; Olakunle, F.B.; Xiao, L., 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native calves in Nigeria. *Parasitology Research*, **107** (4): 1019-1021.

- Ayinmode, A.B.; Zhang, H.; Dada-Adegbola, H.O.; Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium hominis* subtypes and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in HIV-infected persons in Ibadan, Nigeria. *Zoonoses Public Health*, **61** (4): 297–303.
- Azami, M.; Moghaddam, D.D.; Salehi, R.; Salehi, M., 2007. The identification of *Cryptosporidium* species (protozoa) in Iсфаhan, Iran by PCR-RFLP analysis of the 18S rRNA gene. *Molekuliarnaia Biologiya* (Mosk), **41**: 934-939.
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research*, **45**: 6603-6614.
- Banda, Z.; Nichols, R.A.; Grimason, A.M.; Smith, H.V., 2009. *Cryptosporidium* infection in non-human hosts in Malawi. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **76** (4): 363-375.
- Barker, I.K.; Carbonell, P.L., 1974. *Cryptosporidium agni* sp. n. from lambs and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf with observations on the oocyst. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research*, **44**: 289-98.
- Barta, J.R.; Thompson, R.C., 2006. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends in Parasitology*, **22**: 463-468.
- Beck, M.P.; Blake, D.; Darde, M.L.; Felger, I.; Pedraza- Díaz, S.; Regidor- Cerillo, J., 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology*, **175**: 40-46.
- Beck, R.; Sprong, H.; Lucinger, S.; Pozio, E.; Cacciò, S.M., 2011a. A large survey of Croatian wild mammals for *Giardia duodenalis* reveals a low prevalence and limited zoonotic potential. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **11** (8): 1049-1055.
- Beck, R.; Sprong, H.; Bata, I.; Lucinger, S.; Pozio, E.; Cacciò, S.M., 2011b. Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in

- captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. *Veterinary parasitology*, **175** (1): 40-46.
- Benhouda, D.; Hakem, A.; Sannella, A.R.; Benhouda, A.; Cacciò, S.M., 2017. First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria. *Parasite*, **24**: 15.
- Beser, J.; Toresson, L.; Eitrem, R.; Troell, K.; Winiecka-Krusnell, J.; Lebbad, M., 2015. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. *Infection Ecology and Epidemiology*, **5**: 28463.
- Beyer, T.V.; Svezhova, N.V.; Sidorenko, N.V.; Khokhlov, S.E., 2000. *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Apicomplexa): some new ultrastructural observations on its endogenous development. *European Journal of Protistology*, **36**: 151-159.
- Bhat, S.A.; Juyal, P.D.; Singla, L.D., 2013. Bovine cryptosporidiosis: brief review of its distribution in India. *Trends in Parasitology Research*, **2** (2): 5-13.
- Björkman, C.; Lindström, L.; Oweson, C.; Ahola, H.; Troell, K.; Axen, C., 2015. *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology*, **142** (8): 1108-1114.
- Blackburn, B.G.; Mazurek, J.M.; Hlavsa, M.; Park, J.; Tillapaw, M.; Parrish, M., 2006. Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerging Infectious Diseases*, **12**: 684-686.
- Blagburn, B.L.; Current, W.L., 1983. Accidental infection of a researcher with human *Cryptosporidium*. *Journal of Infectious Diseases*, **148** (4): 772-773.
- Bodager, J.R.; Parsons, M.B.; Wright, P.C.; Rasambainarivo, F.; Roellig, D.; Xiao, L.; Gillespie, T.R., 2015. Complex epidemiology and zoonotic potential for *Cryptosporidium suis* in rural Madagascar. *Veterinary Parasitology*, **207** (1): 140-143.
- Bomfim, T.C.; Huber, F.; Gomes, R.S.; Alves, L.L., 2005. Natural infection by *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in dairy



- goats, associated with possible risk factors of the studied properties. *Veterinary Parasitology*, **134**: 9-13.
- Bornay-Llinares, F.J.; da Silva, A.J.; Moura, I.N.S.; Myjak, P.; Pietkiewicz, H.; Kruminis-Lozowska, W.; Graczyk, T.K.; Pieniazek, N.J., 1999. Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1455-1458.
- Bornay-Llinares, F.J.; Navarro-i-Martinez, L.; García-Orenes, F.; Araez, H.; Pérez-Murcia, M.D.; Moral, R., 2006. Detection of intestinal parasites in pig slurry: A preliminary study from five farms in Spain. *Livestock Science*, **102**: 237-242.
- Borowski, H.; Clode, P.L.; Thompson, R.C., 2008. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, **24**: 509-516.
- Borowski, H.; Thompson, R.C.; Armstrong, T.; Clode, P.L., 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology*, **137**: 13-26.
- Bouزيد, M.; Hunter, P.R.; Chalmers, R.M.; Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, **26** (1): 115-134.
- Boxell, A., 2012. *Characterisation of Cryptosporidium Growth and Propagation in Cell Free Environments*. Murdoch University. PhD Thesis.
- Boxell, A.; Hijjawi, N.; Monis, P.; Ryan, U., 2008. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. *Experimental Parasitology*, **120**: 67-72.
- Brogli, A.; Reckinger, S.; Cacciò, S.M.; Nöckler, K., 2008. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Veterinary Parasitology*, **154**: 8-13.
- Brook, E.J.; Christley, R.M.; French, N.P.; Hart, C.A., 2008. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fresh and frozen

- cattle faeces: comparison of three methods. *Letters in Applied Microbiology*, **46**: 26-31.
- Brook, E.J.; Hart, C.A.; French, N.P.; Christley, R.M., 2009. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England. *Veterinary Journal*, **179**: 378-382.
- Brownstein, D.G.; Strandberg, J.D.; Montali, R.J.; Bush, M.; Fortner, J., 1977. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Veterinary Pathology*, **14 (6)**: 606-617.
- Budu-Amoako, E.; Greenwood, S.J.; Dixon, B.R.; Sweet, L.; Ang, L.; Barkema, H.W.; McClure, J.T., 2012a. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* in humans on Prince Edward Island, Canada: evidence of zoonotic transmission from cattle. *Zoonoses and Public Health*, **59 (6)**: 424-433.
- Budu-Amoako, E.; Greenwood, S.J.; Dixon, B.R.; Barkema, H.W.; Hurnik, D.; Estey, C.; McClure, J.T., 2012b. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in pigs on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*, **184 (1)**: 18-24.
- Bull, S.; Chalmers, R.; Sturdee, A.P.; Curry, A.; Kennaugh, J., 1998. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology*, **77**: 195-197.
- Burenbaatar, B.; Bakheit, M.A.; Plutzer, J.; Suzuki, N.; Igarashi, I.; Ongerth, J.; Karanis, P., 2008. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* species from farm animals in Mongolia. *Parasitology Research*, **102 (5)**: 901-905.
- Butaeva, F.; Paskerova, G.; Entzeroth, R., 2006. *Ditrypanocystis* sp. (Apicomplexa, Gregarina, Selenidiidae): the mode of survival in the gut of *Enchytraeus albidus* (Annelida, Oligochaeta, Enchytraeidae) is close to that of the coccidian genus *Cryptosporidium*. *Tsitologiya*, **48**: 695-704.
- Cacciò, S.; Homan, W.; Camilli, R.; Traldi, G.; Kortbeek, T.; Pozio, E., 2000. A microsatellite marker reveals population

- heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, **120** (Pt 3): 237-244.
- Cacciò, S.; Spano, F.; Pozio, E., 2001. Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*, **31** (10): 1082–1086.
- Cacciò, S.M., 2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parasitologia*, **47** (2): 185-192.
- Cacciò, S. M.; Sannella, A. R.; Mariano, V.; Valentini, S.; Berti, F.; Tosini, F.; Pozio, E., 2013. A rare *Cryptosporidium parvum* genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. *Veterinary Parasitology*, **191**: 128-131.
- Cañavate, C.; Cuadros, J.; Martínez Ruiz, R.; Martín-Rabadán, P., 2009. El laboratorio de Microbiología ante las enfermedades parasitarias importadas. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Madrid*, 1-35.
- Cardona, G.A.; de Lucio, A.; Bailo, B.; Cano, L.; de Fuentes, I., Carmena, D., 2015. Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. *Veterinary Parasitology*, **209** (3): 258-263.
- Carmena, D.; Cardona, G.A.; Sánchez-Serrano, L.P., 2012. Current situation of *Giardia* infection in Spain: Implications for public health. *World J Clin Infect Dis*, **2**: 1-12.
- Carreno, R.A.; Martins, D.S.; Barta, J.R., 1999. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, **85** (11): 899-904.
- Casemore, D. P.; Wright, S. E.; Coop, R. L., 1997. Cryptosporidiosis-human and animal epidemiology. In: *Cryptosporidium and*

- cryptosporidiosis*. Fayer (Ed.). Boca Ratón, Florida: CRC Press, pp: 65-92.
- Castro-Hermida, J.A.; González-Losada, Y.A.; Ares-Mazas, E., 2002a. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **106 (1)**: 1–10.
- Castro-Hermida, J.A.; González-Losada, Y. A.; Mezo-Menéndez, M.; Ares-Mazas, E., 2002b. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, **106 (1)**: 11-17.
- Castro-Hermida, J.A.; Carro-Corral, C.; González-Warleta, M.; Mezo, M., 2006a. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Journal of Veterinary Medicine. Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, **53**: 244–246.
- Castro-Hermida, J.A.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2006b. Prevalence and Preliminary Genetic Characterization of *Cryptosporidium* spp. Isolated from Asymptomatic Heifers in Galicia (NW, Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53 (Suppl 1)**: S22–23.
- Castro-Hermida, J.A.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Rumbo-Lorenzo, C.; Mezo, M., 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitology Research*, **101**: 1443-1448.
- Castro-Hermida, J.A.; Garcia-Presedo, I.; Almeida, A.; Gonzalez-Warleta, M.; da Costa, J.M.; Mezo, M., 2009. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Water Research*, **43**: 4133–4142.
- Castro-Hermida, J.A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia Da Costa, J.M.; Mezo, M., 2011.

- Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *The Science of the Total Environment*, **409**: 2451-2459.
- Causapé, A.C.; Quilez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E., 1996. Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. *Veterinary Parasitology*, **67**: 161–167.
- Causapé, A.C.; Quilez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; López-Bernad, F., 2002. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **104**: 287–98.
- Cavalier-Smith, T., 2014. Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, **55**: 472-495.
- Swimming-associated cryptosporidiosis—Los Angeles, C.D.C., 1990. County. *MMWR*, **39**: 343-345.
- Certad, G.; Ngouanesavanh, T.; Guyot, K.; Gantois, N.; Chassat, T.; Mouray, A.; Fleurisse, L.; Pinon, A.; Cailliez, J.C.; Dei-Cas, E.; Creusy, C., 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infectious Agents and Cancer*, **2** (1): 22.
- Chalmers, R.M.; Davies, A.P., 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, **124** (1): 138-146.
- Chalmers, R.M.; Katzer, F., 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends of Parasitology*, **29**: 237–251.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Reilly, W.J.; Irvine, H.; Thomas, A.L.; Hunter, P.R., 2002. *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. *International Journal for Parasitology*, **32** (1): 21-26.

- Chalmers, R.M.; Hadfield, S.J.; Jackson, C.J.; Elwin, K.; Xiao, L.; Hunter, P., 2008. Geographic linkage and variation in *Cryptosporidium hominis*. *Emerging Infectious Diseases*, **14** (3): 496-498.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Thomas, A.L.; Guy, E.C.; Mason, B., 2009a. Long-term *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveillance*, **14**: 19086.
- Chalmers, R.M.; Robinson, G.; Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Xiao, L.; Ryan, U. Modha, D.; Mallaghan, C., 2009b. *Cryptosporidium* sp. *rabbit* genotype, a newly identified human pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, **15**: 829-830.
- Chalmers, R.M.; Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Robinson, G., 2011. Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases*, **17**: 536-538.
- Chan, R.; Chen, J.; York, M.K.; Setijono, N.; Kaplan, R.L.; Graham, F.; Tanowitz, H.B., 2000. Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 393-394.
- Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C., 2002. *Cryptosporidiosis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **15**: 523-527.
- Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C.; Langer-Curry, R.; Widmer, G.; Akiyoshi, D.E.; Tanriverdi, S.; Tzipori, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**: 851-857.
- Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C.; Langer-Curry, R.C.; Akiyoshi, D.E.; Widmer, G.; Tzipori, S., 2011. *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 238-242.

- Checkley, W.; White, A.C.Jr.; Jaganath, D., Arrowood, M.J.; Chalmers, R.M.; Chen, X.M.; Fayer, R.; Griffiths, J.K.; Guerrant, R.L.; Hedstrom, L.; Huston, C.D.; Kotloff, K. L.; Kang, G.; Mead, J.R.; Miller, M.; Petri, W.A.Jr.; Priest, J.W.; Roos, D.S.; Striepen, B.; Thompson, R.C.A.; Ward, H.D.; Van Voorhis, W.A.; Xiao, L.; Zhu, G.; Houpt, E.R., 2015. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infectious Diseases*, **15**: 85-94.
- Chen, F.; Huang, K., 2012. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle from farms in China. *Journal of Veterinary Science*, **13** (1): 15-22.
- Chrisp, C.E.; Suckow, M.A.; Fayer, R.; Arrowood, M.J.; Healey, M.C.; Sterling, C.R., 1992. Comparison of the host ranges and antigenicity of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium wrairi* from guinea pigs. *The Journal of Protozoology*, **39**: 406-409.
- Cieloszyk, J.; Goni, P.; Garcia, A.; Remacha, M.A.; Sanchez, E.; Clavel, A., 2012. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **30**: 549–551.
- Clavel, A.; Fleta, J.; Castillo, J.; Sánchez-Acedo, C., 1989. Incidencia de *Cryptosporidium* en heces de ovino. Comparación de métodos de identificación. *VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología*. Cáceres, 25-29 Septiembre.
- Clode, P.L.; Koh, W.H.; Thompson, R.C.A., 2015. Life without a host cell: what is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*, **31** (12): 614-624.
- Coklin, T.; Farber, J.; Parrington, L.; Dixon, B., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, **150** (4): 297-305.

- Connelly, L.; Craig, B.H.; Jones, B.; Alexander, C.L., 2013. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of Soay sheep on St. Kilda Islands. *Scotland Applied Environmental Microbiology*, **79**: 2240–2246.
- Consellería do Medio Rural (2011). Anuarios de estadística agraria, 2011.  
[http://mediorural.xunta.es/institucional/estadisticas/gando\\_ovino\\_e\\_cabrun](http://mediorural.xunta.es/institucional/estadisticas/gando_ovino_e_cabrun).
- Costa, J.F.D.R.; Novo, S.M.F.; Baccili, C.C.; Sobreira, N.M.; Hurley, D.J.; Gomes, V., 2017. Innate immune response in neonate Holstein heifer calves fed fresh or frozen colostrum. *Research in Veterinary Science*, **115**: 54-60.
- Cox, M.J.; Elwin, K.; Massad, E.; Azevedo, R.S., 2005. Age-specific seroprevalence to an immunodominant *Cryptosporidium* sporozoite antigen in a Brazilian population. *Epidemiology and Infection*, **133**: 951-956.
- Cui, Z.; Wang, R.; Huang, J.; Wang, H.; Zhao, J.; Luo, N.; Li, J.; Zhang, Z.; Zhang, L., 2014. Cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium parvum* subtype IIdA15G1 at a dairy farm in Northwestern China. *Parasites and Vectors*, **7** (1): 529.
- Current, W.L., 1985. Cryptosporidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **187**(12): 1334-8.
- Current, W.L.; Leech, J.H.; Sande, M.A.; Root, R.K., 1988. The biology of *Cryptosporidium*. *Parasitic infections*, 109-132.
- Current, W.L.; Reese, N.C., 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, **33**: 98-108.
- Current, W.L.; Upton, S.J.; Haynes, T.B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*, **33**: 289-296.
- Da Silva, A.J.; Cacciò, S.; Williams, C.; Won, K.Y.; Nace, E.K.; Whittier, C., 2003. Molecular and morphologic



- characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Veterinary Parasitology*, **111**: 297–307.
- Danisova, O.G.; Valencakova, A.; Petrincová, A., 2016. Detection and identification of six *Cryptosporidium* species in livestock in Slovakia by amplification of SSU and GP60 genes with the use of PCR analysis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **23** (2): 254-258.
- Davidson, R.K.; Kutz, S.J.; Madslie, K.; Hoberg, E.; Handeland, K., 2014. Gastrointestinal parasites in an isolated Norwegian population of wild red deer (*Cervus elaphus*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, **56** (1): 59.
- Davies, A.P.; Campbell, B.; Evans, M.R.; Bone, A.; Roche, A.; Chalmers, R.M., 2009. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **28**: 838-40.
- Del Águila, C.; Navajas, R.; Gurbindo, D.; Ramos, J.T.; Mellado, M.J.; Fenoy, S., Muñoz-Fernández, M.A.; Subirats, M.; Pleniasek, N.J., 1997. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **44**: 84S–85S.
- Del Coco, V.F.; Córdoba, M.A.; Basualdo, J., 2008. Comparación de tres técnicas de concentración de heces para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **42** (3): 333-337.
- Del Coco, V.F.; Córdoba, M.A.; Bilbao, G.; de Almeida Castro, A.P.; Basualdo, J.A.; Fayer, R.; Santín, M., 2014. *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Research in Veterinary Science*, **96** (2): 311-314.
- Del Coco, V.F.; Córdoba, M.A.; Sidoti, A.; Santín, M.; Drut, R.; Basualdo, J.A., 2012. Experimental infection with *Cryptosporidium parvum* IIaA21G1R1 subtype in immunosuppressed mice. *Veterinary Parasitology*, **190** (3): 411-417.

- Delafosse, A.; Castro-Hermida, J.A.; Baudry, C.; Ares-Mazás, E.; Chartier, C., 2006. Herd-level risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy-goat kids in western France. *Preventive Veterinary Medicine*, **77** (1): 109-121.
- De la Fuente, R.; García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Luzon, M.; Cid, D.; Garcia, S.; Orden, J.A.; Gómez-Bautista, M., 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, **36**: 145-152.
- De la Fuente, R.; Luzón, M.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; García, A.; Cid, D.; Orden, J.A.; García, S.; Sana, R.; Gómez-Bautista, M., 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, **80**: 179-185.
- Di Piazza, F.; Di Benedetto, M.A.; Maida, C.M.; Glorioso, S.; Adamo, G.; Mazzola, T.; Firenze, A., 2013. A study on occupational exposure of Sicilian farmers to *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, **54**: 212-217.
- Díaz, J.; García-Martos, P.; Chozas, N., 1990. Etiological research on acute gastroenteritis in the city of Cadiz. *Atención Primaria*, **7**: 498-501.
- Díaz, P., 2006. *Estudio epidemiológico de las principales endoparasitosis del ganado vacuno de raza Rubia Gallega de la provincia de Lugo*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Díaz, P.; Quílez, J.; Chalmers, R.M.; Panadero, R.; López, C.; Sánchez-Acedo, C.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P., 2010a. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology*, **137**(8): 1187-1193.
- Díaz, P.; Quílez, J.; Robinson, G.; Chalmers, R.M.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P., 2010b. Identification of *Cryptosporidium xiaoi*

- in diarrhoeic goat kids (*Capra hircus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, **172** (1): 132–134.
- Díaz, P.; Pipia, A.P.; Varcasia, A.; Sanna, G.; Ruiu, A.; Spissu, P.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Scala, A., 2010c. Prevalence and risk factors of *Cryptosporidium* spp infection in cattle farms in Sardinia (Italy). *XXVI Congreso Nazionale Società Italiana di Parassitologia*. Perugia (Italia), 22-25 Junio 2010.
- Díaz, P.; Hadfield, S.J.; Quílez, J.; Soilán, M.; López, C.; Panadero, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Chalmers, R.M., 2012. Assessment of three methods for multilocus fragment typing of *Cryptosporidium parvum* from domestic ruminants in north west Spain. *Veterinary Parasitology*, **186** (3): 188-195.
- Díaz, P.; Soilán, M.; Navarro, E.; Pérez, A.; Cabanelas, E.; Prieto, A.; Díaz, J.; López, C.M; Panadero, R.; Fernández, G.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P., 2014. Criptosporidiosis en rumiantes. *Ganadería*, **94**: 44-48.
- Díaz, P.; Quílez, J.; Prieto, A.; Navarro, E.; Pérez-Creo, A.; Fernández, G.; Panadero, R., López, C.M; Díez- Baños, P.; Morrondo, P., 2015. *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitology Research*, **114** (11): 4099-4105.
- Dillingham, R.A.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L., 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*, **4** (10): 1059-1066.
- Dixon, B.; Parrington, L.; Cook, A.; Pintar, K.; Pollari, F.; Kelton, D.; Farber, J., 2011. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Veterinary Parasitology*, **175** (1): 20-26.
- Do Couto, M.C.M.; de Freitas Lima, M.; do Bomfim, T.C.B., 2014. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. *Acta Tropica*, **130**: 117-122.

- Domingo, C.Y.J.; Dionision, R.D.A.; Lanzanida, G.C.; Corales, R.M.I., 2012. Human and caprine cryptosporidiosis among smallhold farms in aurora province, philippines. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **38(1)**: 53-62.
- Dos Santos Toledo, R.; Martins, F. D. C.; Freire, R. L., 2017. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in feces and water and the associated exposure factors on dairy farms. *Semina: Ciências Agrárias*, **38 (5)**: 3395-3416.
- Drumo, R.; Widmer, G.; Morrison, L.J.; Tait, A.; Grelloni, V.; D'Avino, N.; Pozio, E.; Cacciò, S.M., 2012. Evidence of host-associated populations of *Cryptosporidium parvum* in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 3523–3529.
- Dubey, J.P., Speer, C.A.; Fayer, R., 1990. *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B.; Jakubowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine*, **332 (13)**: 855-859.
- Duranti, A.; Cacciò, S.M.; Pozio, E.; Di Egidio, A.; De Curtis, M.; Battisti, A.; Scaramozzino, P., 2009. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in cattle. *Zoonoses and Public Health*, **56 (4)**: 176-182.
- Edwinson, A.; Widmer, G.; McEvoy, J., 2016. Glycoproteins and free Gal/GalNAc cause *Cryptosporidium* to switch from an invasive sporozoite to a replicative trophozoite. *International Journal for Parasitology*, **46 (1)**: 67-74.
- Egger, M.; Nguyen, X.M.; Schaad, U.B.; Krech, T., 1990. Intestinal cryptosporidiosis acquired from a cat. *Infection*, **18**: 177-178.
- Egyed, Z.; Sreter, T.; Széll, Z.; Varga, I., 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp.—recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, **111 (2)**: 103-114.
- Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2008. Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals

- Cryptosporidium bovis* and the *cervine* genotype in sheep (*Ovis aries*). *Parasitology Research*, **102**: 1103-1105.
- Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Robinson, G.; Chalmers, R.M., 2012a. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiology and Infection*, **140**: 673–683.
- Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Robinson, G.; Crouch, N.D.; Chalmers, R.M., 2012b. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *International Journal for Parasitology*, **42**: 675-682.
- Enemark, H.L.; Ahrens, P.; Lowery, C.J.; Thamsborg, S.M.; Enemark, J.M.D.; Bille-Hansen, V.; Lind, P., 2002. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. *Veterinary Parasitology*, **107 (1)**: 37-49.
- Enemark, H.L.; Ahrens, P.; Bille-Hansen, V.; Heegaard, P.M.; Vigre, H.; Thamsborg, S.M.; Lind, P., 2003. *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the “porcine” genotype. *Parasitology*, **126**: 407-416.
- Essid, R.; Mousli, M.; Aoun, K.; Abdelmalek, R.; Mellouli, F.; Kanoun, F.; Derouin, F.; Bouratbine, A., 2008. Identification of *Cryptosporidium* species infecting humans in Tunisia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79 (5)**: 702-705.
- Fall, A.; Thompson, R.C.; Hobbs, R.P.; Morgan- Ryan U., 2003. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *Journal of Parasitology*, **89**: 399-402.
- Fayer R., 1997. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, **124 (1)**: 90-97.

- Fayer, R., Xiao, L. (Eds.). (2007). *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC press.
- Fayer, R.; Santín, M., 2009. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, **164**: 192-200.
- Fayer, R.; Speer, C.A.; Dubey, J.P., 1990. *General biology of Cryptosporidium. Cryptosporidiosis of man animals*, 1-29. Boca Raton: CRC Press Inc.
- Fayer, R.; Trout, J.M.; Jenkins, M.C., 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, **84** (6):1165-1169.
- Fayer, R.; Morgan, U.; Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1305-1322.
- Fayer, R.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Morgan, U.M.; Lai, A.A.; Dubey, J.P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, **87** (6): 1415-1422.
- Fayer, R.; Santín, M.; Xiao, L., 2005. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, **91**(3): 624-629.
- Fayer, R.; Santin, M.; Trout, J.M.; Greiner, E., 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, **135**: 105-112.
- Fayer, R.; Santin, M.; Trout, J.M., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology*, **145**: 260-266.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J.M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, **156**: 191-198.

- Fayer, R.; Santín, M.; Macarisin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, **172**: 23-32.
- Feltus, D.C.; Giddings, C.W.; Schneck, B.L.; Monson, T.; Warshauer, D.; McEvoy, J.M., 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 4303–4308.
- Feltus, D.C.; Giddings, C.W.; Khaita, M.L.; McEvoy, J.M., 2008. High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Veterinary Parasitology*, **151** (2): 191-195.
- Feng, Y.; Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **24** (1): 110–140.
- Feng, X.; Rich, S.M.; Akiyoshi, D.; Tumwine, J.K.; Kekitiinwa, A.; Nabukeera, N.; Tzipori, S.; Widmer, G., 2000. Extensive polymorphism in *Cryptosporidium parvum* identified by multilocus microsatellite analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 3344–3349.
- Feng, Y.; Ortega, Y.; He, G.; Das, P.; Xu, M.; Zhang, X.; Fayer, R.; Gatei, W.; Cama, V.; Xiao, L., 2007a. Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology*, **144**: 1-9.
- Feng, Y.; Alderisio, K.A.; Yang, W.; Blancero, L.A.; Kuhne, W.G.; Ndareski, C.A., 2007b. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 6475–83.
- Feng, Y.; Karna, S.R.; Dearen, T.K.; Singh, D.K.; Adhikari, L.N.; Shrestha, A.; Xiao, L., 2012. Common occurrence of a unique *Cryptosporidium ryanae* variant in zebu cattle and water buffaloes in the buffer zone of the Chitwan National Park, Nepal. *Veterinary Parasitology*, **185** (2): 309-314.

- Feng, Y.; Li, N.; Roellig, D.M.; Kelley, A.; Liu, G.; Amer, S.; Tang, K.; Zhang, L.; Xiao, L., 2017. Comparative genomic analysis of the IId subtype family of *Cryptosporidium parvum*. *International Journal for Parasitology*, **47** (5): 281-290.
- Fernández, A.; Quezada, M.; Gómez, M.A.; Navarro, J.A.; Rodríguez, J.; Sierra, M.A., 1990. Cryptosporidiosis in chickens from southern Spain. *Avian Diseases*, **34**: 224-227.
- Fiuza, V.R.; Cosendey, R.I.; Frazão-Teixeira, E.; Santín, M.; Fayer, R.; de Oliveira, F.C., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. *Veterinary Parasitology*, **175**: 360-362.
- Fleta, J.; Sánchez-Acedo, C.; Clavel, A.; Quílez, J., 1995. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology*, **59** (3-4): 201-205.
- Follet, J.; Guyot, K.; Leruste, H.; Follet-Dumoulin, A.; Hammouma-Ghelboun, O.; Certad, G.; Dei-Cas, E.; Halama, P., 2011. *Cryptosporidium* infection in a veal calf cohort in France: molecular characterization of species in a longitudinal study. *Veterinary Research*, **42** (1): 116.
- Fontán- Sainz, M., 2011. *Cryptosporidium en la desinfección solar del agua de bebida*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
- Frost, F.; Muller, T., 1999. Two city *Cryptosporidium* study. *American Water Works Association*.
- Fujino, T.; Matsui, T.; Kobayashi, F.; Haruki, K.; Yoshino, Y.; Kajima, J.; Tsuji, M., 2002. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of Veterinary Medical Science/ the Japanese Society of Veterinary Science*, **64** (3): 199-200.
- Garber, L.P.; Salman, M.D.; Hurd, H.S.; Keefe, T.; Schlater, J.L., 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **205**: 86-91.



- García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J.A.; Orden, J.A.; Cid, D.; Sanz, R.; Gómez-Bautista, M.; de la Fuente, R., 2000. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **23 (3)**: 175–183.
- García Martos, P.; Moreno, B.; Romero, P.; Pimentel, R.; Muñoz, C.; Fernandez, M.T.; de Lomas, M., 1989. Intestinal protozoan parasitism in children from the bay of Cadiz. *Revista de Sanidad e Higiene Pública (Madrid)*, **63**: 79–84.
- García Meniño, I. 2013. *Implicación de Escherichia coli y otros enteropatógenos en la diarrea neonatal del ternero*. Trabajo de Master Universitario en Investigación en Medicina y Sanidad Veterinaria. *Universidad de Santiago de Compostela*.
- García-Meniño, I.; Díaz, P.; Gómez, V.; Navarro, E.; Pérez, A.; Cabanelas, E.; Prieto, A.; Díaz, J.; Soilán, M.; López, C.M.; Panadero, R.; Fernández, G.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P.; Mora, A. 2014. Diarreas neonatais en xatos: situación en Galicia. *AFRIGA*. **113**: 3-7.
- García-Meniño, I.; Díaz, P.; Gómez, V.; Prieto, A.; Fernández, G.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P.; Mora, A., 2015. Estudio de prevalencia de enteropatógenos implicados en la diarrea del ternero en Galicia. *El Boletín de ANEMBE*. **108**: 33-37.
- García-Preledo, I.; Pedraza-Díaz, S.; González-Warleta, M.; Mezo, M.; Gómez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L.M.; Castro-Hermida, J.A., 2013. The first report of *Cryptosporidium bovis*, *C. ryanae* and *Giardia duodenalis* sub-assembly A-II in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain. *Veterinary Parasitology*, **197 (3)**: 658-664.
- García-Rodríguez, J.A.; Martín-Sánchez, A.M.; Canut, B.A.; García Luis, E.J., 1990. The prevalence of *Cryptosporidium* species in children in day care centres and primary schools in Salamanca (Spain): an epidemiological study. *European Journal of Epidemiology*, **6**: 432–435.

- García-Sánchez, E.; Valladares-Carranza, B.; Talavera-Rojas, M.; Velázquez-Ordóñez, V., 2014. Cryptosporidiosis. Importancia en salud pública. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* [en línea], 15 (5). Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63633881003>> [consulta: 18 abril 2017].
- Gasser, R.B.; El-Osta, Y.A.; Chalmers, R.M., 2003. Electrophoretic analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (5): 2719-2730.
- Gatei, W.; Das, P.; Dutta, P.; Sen, A.; Cama, V.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2007. Multilocus sequence typing and genetic structure of *Cryptosporidium hominis* from children in Kolkata, India. *Infection, Genetics and Evolution*, **7**: 197-205.
- Gatei, W.; Hart, C.A.; Gilman, R.H.; Das, P.; Cama, V.; Xiao, L., 2006. Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**: S43-S48.
- Gelsinger, S.L.; Heinrichs, A.J., 2017. Comparison of immune responses in calves fed heat-treated or unheated colostrum. *Journal of Dairy Science*, **100** (5): 4090-4101.
- Geurden, T.; Goma, F. Y.; Siwila, J.; Phiri, I. G.; Mwanza, A. M.; Gabriël, S.; Claerebout, E.; Vercruyse, J., 2006. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Veterinary Parasitology*, **138** (3): 217-222.
- Geurden, T.; Berkvens, D.; Martens, C.; Casaert, S.; Vercruyse, J.; Claerebout, E., 2007. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*, **134** (14): 1981-1987.
- Geurden, T.; Thomas, P.; Casaert, S.; Vercruyse, J.; Claerebout, E., 2008. Prevalence and molecular characterisation of

- Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. *Veterinary Parasitology*, **155**: 142-145.
- Giles, M.; Chalmers, R.; Pritchard, G.; Elwin, K.; Mueller-Doblies, D.; Clifton-Hadley, F., 2009. *Cryptosporidium hominis* in a goat and a sheep in the UK. *Veterinary Record*, **164**: 24–25.
- Glaberman, S.; Sulaiman, I.M.; Bern, C.; Limor, J.; Peng, M.M.; Morgan, U.; Gilman, R.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2001. A multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48 (Suppl 1)**: 19S–22S.
- Göhring, F.; Möller-Holtkamp, P.; Dauschies, A.; Lendner, M., 2014. Untersuchungen zur Häufigkeit von *Cryptosporidium parvum* bei Durchfallkälbern und der Einfluss von Koinfektionen auf das Krankheitsgeschehen. *Tierärztliche Umschau*, **69 (4)**: 112-120.
- Goma, F.Y.; Geurden, T.; Siwila, J.; Phiri, I.G.K.; Gabriel, S.; Claerebout, E.; Vercruyse, J., 2007. The prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in small ruminants in Zambia. *Small Ruminant Research*, **72**: 77–80.
- Gómez, M.S.; Vila, T.; Feliu, C.; Montoliu, I.; Gracenea, M.; Fernández, J., 1996. A survey for *Cryptosporidium* spp. in mammals at the Barcelona Zoo. *International Journal of Parasitology*, **26 (11)**: 1331–1333.
- Gómez, M.S.; Torres, J.; Gracenea, M.; Fernández-Moran, J.; González-Moreno, O., 2000. Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona zoo mammals. *Parasitology Research*, **86**: 318–323.
- Gómez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L.M.; Gass, A.; Troncoso, J.M.; Rojo-Vázquez, F.A., 1989. Epizootology of the cryptosporidiosis in ruminants (calves, lambs and kids). Cáceres: *VI Congreso Nacional y I Iberico de Parasitología*. Cáceres, 25-29 de Septiembre.
- Gómez-Couso, H.; Amar, C.F.; McLauchlin, J.; Ares-Mazas, E., 2005. Characterisation of a *Cryptosporidium* isolate from water

- buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). *Veterinary Parasitology*, **131**: 139–144.
- Gómez-Couso, H.; Mendez-Hermida, F.; Ares-Mazas, E., 2006. First report of *Cryptosporidium parvum* 'ferret' genotype in American mink (*Mustela vison Shreber 1777*). *Parasitology Research*, **100** (4): 877–879.
- Gómez-Couso, H.; Fontán-Sainz, M.; Navntoft, C.; Fernández-Ibáñez, P.; Ares-Mazas, E., 2012. Comparison of different solar reactors for household disinfection of drinking water in developing countries: Evaluation of their efficacy in relation to the waterborne enteropathogen *Cryptosporidium parvum*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **106** (11): 645-652.
- Gong, C.; Cao, X.F.; Deng, L.; Li, W.; Huang, X.M.; Lan, J.C.; Xiao, Q.C.; Zhong, Z.J.; Feng, F.; Zhang, Y.; Wang, W.B.; Guo, P.; Wu, K.J.; Peng, G.N., 2017. Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China: A review. *Parasite*, **24** (5): 1.
- Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R.; Fayer, R., 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **54**: 274-279.
- Grinberg, A.; Biggs, P.J.; Dukkupati, V.S.R.; George, T.T., 2013. Extensive intra-host genetic diversity uncovered in *Cryptosporidium parvum* using Next Generation Sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, **15**: 18-24.
- Guyot, K.; Follet-Dumoulin, A.; Lelievre, E.; Sarfati, C.; Rabodonirina, M.; Nevez, G., Cailliez, D.; Camus, D.; Dei-Cas, E., 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (10): 3472-3480.

- Hajdušek, O.; Ditrich, O.; Šlapeta, J., 2004. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, **122**: 183–192.
- Halim, N.A.; Plutzer, J.; Bakheit, M.A.; Karanis, P., 2008. First report of *Cryptosporidium* deer-like genotype in Malaysian cattle. *Veterinary Parasitology*, **152** (3): 325-329.
- Hannes, I.S.; Gjerde, B.K.; Forberg, T.; Robertson, L.J., 2007. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, **143** (3-4): 347-353.
- Heckler, R.P.; Borges, D.G.L.; Bacha, F.B.; Onizuka, M.K.V.; Neves, J.P.L.; Leal, C.R.B.; de Lemos, R.A.A.; Meireles, M.; de Almeida Borges, F., 2015. First genetic identification of *Cryptosporidium parvum* subtype IIaA14G2R1 in beef cattle in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, **121** (3): 391-394.
- Heine, J.; Pohlenz, J.F.L.; Moon, H.W.; Woode, G.N., 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *Journal of Infectious Diseases*, **150** (5): 768-775.
- Heitman, T.L.; Frederick, L.M.; Viste, J.R.; Guselle, N.J.; Morgan, U.M.; Thompson, R.C.; Olson, M.E., 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, **48** (6): 530-541.
- Helmy, Y.A.; Krücken, J.; Nöckler, K.; Von Samson-Himmelstjerna, G.; Zessin, K.H., 2013. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Veterinary Parasitology*, **193** (1): 15-24.
- Hijjawi, N., 2010. *Cryptosporidium*: new developments in cell culture. *Experimental Parasitology*, **124**: 54-60.

- Hijjawi, N.S.; Meloni, B.P.; Ryan, U.M.; Olson, M.E.; Thompson, R.C.A., 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, **32 (14)**: 1719-1726.
- Hijjawi, N.S.; Meloni, B.P.; Ng'anzo, M.; Ryan, U.; Olson, M.E.; Cox, P.T.; Monis, P.T.; Thompson, R.C.A., 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, **34 (7)**: 769-777.
- Hijjawi, N.; Estcourt, A.; Yang, R.; Monis, P.; Ryan, U., 2010. Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell-free culture. *Veterinary Parasitology*, **169**: 29-36.
- Hijjawi, N.; Mukbel, R.; Yang, R.; Ryan, U., 2016. Genetic characterization of *Cryptosporidium* in animal and human isolates from Jordan. *Veterinary Parasitology*, **228**: 116-120.
- Hingole, A.C.; Gudewar, J.G.; Pednekar, R.P.; Gatne, M.L., 2017. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* species in cattle and buffalo calves in Mumbai region of India. *Journal of Parasitic Diseases*, **41 (1)**: 131-136.
- Holubová, N., Sak, B., Horčíčková, M., Hlásková, L., Květoňová, D., Menchaca, S., McEvoy, J., Kváč, M., 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*, **115**: 2243-2251.
- Homem, C.G; Nakamura, A.A.; Silva, D.C.; Texeira, W.F.; Coelho, W.M.; Meireles, M.V., 2012. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. *Parasitology Research*, **110 (5)**: 1741-1745.
- Huang, L.; Zhu, H.; Zhang, S.; Wang, R.; Liu, L.; Jian, F.; Ning, C.; Zhang, N., 2014. An in vitro model of infection of chicken

- embryos by *Cryptosporidium baileyi*. *Experimental Parasitology*, **147**: 41-47.
- Huber, F.; Da Silva, S.; Bomfim, T.C.B.; Teixeira, K.R.S.; Bello, A.R., 2007. Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, **150** (1): 65-74.
- Huetink, R.E.; Van der Giessen, J.W.; Noordhuizen, J.P.; Ploeger, H.W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, **102**: 53-67.
- Hussain, G.; Roychoudhury, S.; Singha, B.; Paul, J., 2017. Incidence of *Cryptosporidium andersoni* in diarrheal patients from southern Assam, India: a molecular approach. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **36** (6): 1023-1032.
- Ibrahim, M.A.; Abdel-Ghany, A.E.; Abdel-Latef, G.K.; Abdel-Aziz, S.A.; Aboelhadid, S.M., 2016. Epidemiology and public health significance of *Cryptosporidium* isolated from cattle, buffaloes, and humans in Egypt. *Parasitology Research*, **115** (6): 2439-2448.
- Ichikawa-Seki, M.; Aita, J.; Masatani, T.; Suzuki, M.; Nitta, Y.; Tamayose, G.; Iso, T.; Sukanuma, K.; Fujiwara, T.; Matsuyama, K.; Niikura, T.; Yokoyama, N.; Suzuki, H.; Yamakawa, K.; Inokuma, H.; Itagaki, T.; Zakimi, S.; Nishikawa, Y., 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* from two different Japanese prefectures, Okinawa and Hokkaido. *Parasitology International*, **64** (2): 161-166.
- Imre, K.; Dărăbuș, G., 2011. Distribution of *Cryptosporidium* species, genotypes and *C. parvum* subtypes in cattle in European countries. *Revista Scientifica Parasitologica*, **12** (1): 1-9.
- Imre, K.; Luca, C.; Costache, M.; Sala, C.; Morar, A.; Morariu, S.; Ilie, M.S.; Imre, M.; Dărăbuș, G., 2013. Zoonotic *Cryptosporidium*

- parvum* in Romanian newborn lambs (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, **191**: 119-122.
- Inman, L.R.; Takeuchi, A., 1979. Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Veterinary Pathology*, **16**: 89–95.
- Inpankaew, T.; Jiyipong, T.; Wongpanit, K.; Pinyopanuwat, N.; Chimnoi, W.; Kengradomkij, C.; Xuan, X.; Igarashi, I.; Xiao, L.; Jittapalapong, S., 2014. Molecular detection of *Cryptosporidium* spp. infections in water buffaloes from northeast Thailand. *Tropical Animal Health and Production*, **46** (2): 487-490.
- Instituto Galego de Estadística, 2017. Efectivos e explotacións de gando bovino Segundo tipoloxía da explotación e estrato. Galicia e provincias. Datos desde 2008.
- Insulander, M.; Silverlas, C.; Lebbad, M.; Karlsson, L.; Mattsson, J.G.; Svenungsson, B., 2013. Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiology and Infection*, **141**: 1009–1020.
- Iqbal, A.; Lim, Y.A.; Surin, J.; Sim, B.L., 2012. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PloS One*, **7** (2): e31139.
- Iseki, M., 1979. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology*, **28**: 285-307.
- Jacobson, C.; Williams, A.; Yang, R.; Ryan, U.; Carmichael, I.; Campbell, A.J.; Gardner, G.E., 2016. Greater intensity and frequency of *Cryptosporidium* and *Giardia* oocyst shedding beyond the neonatal period is associated with reductions in growth, carcass weight and dressing efficiency in sheep. *Veterinary Parasitology*, **228**: 42-51.
- Jakubowski, W., 1995. *Giardia* and *Cryptosporidium*: the details. 1995 Safe Drinking Water Act Seminar. U.S. Environmental Protection Agency.



- Jellison, K.L.; Distel, D.L.; Hemond, H.F.; Schauer, D.B., 2004. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (1): 452-458.
- Jellison, K.L.; Lynch, A.E.; Ziemann, J.M., 2009. Source tracking identifies deer and geese as vectors of human-infectious *Cryptosporidium* genotypes in an urban/suburban watershed. *Environmental Science and Technology*, **43**: 4267–4272.
- Jex, A.R.; Gasser, R.B., 2010. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies—research review. *Biotechnology Advances*, **28** (1): 17-26.
- Jex, A.R.; Smith, H.V.; Monis, P.T.; Campbell, B.E.; Gasser, R.B., 2008b. *Cryptosporidium*- biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variations. *Biotechnology Advances*, **26** (4): 304-317.
- Jiang, J.; Alderisio, K.A.; Xiao, L., 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied Environmental Microbiology*, **71**: 4446–4454.
- Jiang, Y.; Ren, J.; Yuan, Z.; Liu, A.; Zhao, H.; Liu, H.; Chu, L.; Pan, W.; Cao, Y.; Lin, Y.; Shen, Y., 2014. *Cryptosporidium andersoni* as a novel predominant *Cryptosporidium* species in outpatients with diarrhea in Jiangsu Province, China. *BioMed Central Infectious Diseases*, **14** (1): 555.
- Jirků, M.; Valigurová, A.; Koudela, B.; Krízek, J.; Modrý, D.; Slapeta, J., 2008. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica (Praha)*, **55**: 81-94.

- Joachim, A.; Krull, T.; Schwarzkopf, J.; Dauschies, A., 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Veterinary Parasitology*, **112**: 277-288.
- Johnson, E.H.; Muirhead, D.E.; Windsor, J.J.; King, G.J.; Al-Busaidy, R.; Cornelius, R., 1999. Atypical outbreak of caprine cryptosporidiosis in Sultanate of Oman. *Veterinary Record*, **145**: 521-524.
- Johnston, S.P.; Ballard, M.M.; Beach, M.J.; Causer, L.; Wilkins, P.P., 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 623-626.
- Juste, R.A.; García, A.L.; Gelabert, J.L.; González, L.; Marco, J., 1987. Presencia de *Cryptosporidium* spp. en casos de diarreas neonatales de rumiantes. *II Jornadas sobre Producción Animal ITEA*, Volumen extra No 7, Zaragoza, pp. 256-258.
- Kang'ethe, E.K.; Mulinge, E.K.; Skilton, R.A.; Njahira, M.; Monda, J.G.; Nyongesa, C.; Mbae, C.K.; Kamwati, S.K., 2012. *Cryptosporidium* species detected in calves and cattle in Dagoretti, Nairobi, Kenya. *Tropical Animal Health and Production*, **44** Suppl 1: S25-31.
- Karanis, P.; Aldeyarbi, H.M., 2011. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *International Journal for Parasitology*, **41**: 1231-1242.
- Karanis, P.; Plutzer, J.; Halim, N. A.; Igori, K.; Nagasawa, H.; Ongerth, J.; Liqing, M., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. *Parasitology Research*, **101** (6): 1575-1580.
- Karanis, P.; Kimura, A.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Suzuki, N., 2008. Observations on *Cryptosporidium* life cycle stages during excystation. *The Journal of Parasitology*, **94** (1): 298-300.
- Katsumata, T.; Hosea, D.; Ranuh, I.G.; Uga, S.; Yanagi, T.; Kohno, S., [SEP]2000. Short report: [SEP]possible *Cryptosporidium muris*

- infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**: 70–2.
- Kaupke, A.; Rzeżutka, A., 2015. Emergence of novel subtypes of *Cryptosporidium parvum* in calves in Poland. *Parasitology Research*, **114** (12): 4709-4716.
- Kaupke, A.; Michalski, M.M.; Rzeżutka, A., 2017. Diversity of *Cryptosporidium* species occurring in sheep and goat breeds reared in Poland. *Parasitology Research*, **116** (3): 871-879.
- Kehl, K.S.; Cicirello, H.; Havens, P. L., 1995. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**: 416-418.
- Kelly, D.; Coutts, A.G.P., 2000. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proceedings of the Nutrition Society*, **59**: 177-185.
- Keshavarz, A.; Haghighi, A.; Athari, A.; Kazemi, B.; Abadi, A.; Mojarad, E.N., 2009. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. *Veterinary Parasitology*, **160** (3): 316-318.
- Khan, S.M.; Debnath, C.; Pramanik, A.K.; Xiao, L.; Nozaki, T.; Ganguly, S., 2010. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology*, **171**: 41-47.
- Kinross, P.; Beser, J.; Troell, K.; Silverlås, C.; Björkman, C.; Lebbad, M.; Winiecka-Krusnell, J.; Lindh, J.; Löfdahl, M., 2015. *Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden. *Epidemiology and Infection*, **143** (13): 2748-2756.
- Koch, K.L.; Shankey, T.V.; Weinstein, G.S.; Dye, R.E.; Abt, A.B.; Current W.L.; Eyster, M.E., 1983. Cryptosporidiosis in a patient with hemophilia, common variable hypogammaglobulinemia, and the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of International Medicine*, **99**: 337- 40.
- Koh, W.; Clode, P.L.; Monis, P.; Thompson, R.C., 2013.

- Multiplication of the water- borne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasites and Vectors*, **6**: 270.
- Koh, W.; Thompson, R.C.; Edwards, H.; Monis, P.; Clode, P.L., 2014. Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BioMed Central Microbiology*, **14**: 281.
- Koinari, M.; Lymbery, A.J.; Ryan, U.M., 2014. *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. *Experimental Parasitology*, **141**: 134–137.
- Kosek, M.; Alcantara, C.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L., 2001. Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Infectious Diseases*, **1**: 262–269.
- Koudela, B.; Modry, D., 1998. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitologica*, **45**: 93-100.
- Koyama, Y.; Satoh, M.; Maekawa, K.; Hikosaka, K.; Nakai, Y., 2005. Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. *Veterinary Parasitology*, **130** (3): 323-326.
- Kváč, M.; Vítovec, J., 2003. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Zoonoses and Public Health*, **50** (9): 451-457.
- Kváč, M.; Havrdová, N.; Hlásková, L.; Daňková, T.; Kanděra, J.; Ježková, J.; Vítovec, J.; Sak, B.; Ortega, Y.; Xiao, L.; Modrý, D.; Chelladurai, J. R. J. J.; Prantlová, V.; McEvoy, J., 2016. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS ONE*, **11** (1): e0147090.
- Kváč, M.; Kouba, M.; Vítovec, J., 2006. Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy

- and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, **137**(3): 202-209.
- Kváč, M.; Hromadová, N.; Květoňová, D.; Rost, M.; Sak, B., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Veterinary Parasitology*, **177** (3): 378-382.
- Kváč, M.; Kestřánová, M.; Pinková, M.; Květoňová, D.; Kalinová, J.; Wagnerová, P.; Kotková, M.; Vítovec, J.; Ditrich, O.; McEvoy, J.; Stenger, B.; Sak, B., 2013. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, **191** (3): 218-227.
- Kváč, M.; Hofmannová, L.; Hlásková, L.; Květoňová, D.; Vítovec, J.; McEvoy, J.; Sak, B., 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology*, **201** (1): 9-17.
- Laberge, I.; Griffiths, M.W.; Griffiths, M.W., 1996. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *International Journal of Food Microbiology*, **32** (1): 1-26.
- Lange, H.; Johansen, Ø.H.; Vold, L.; Robertson, L.J.; Anthonisen, I.L., Nygard, K., 2014. Second outbreak of infection with a rare *Cryptosporidium parvum* genotype in schoolchildren associated with contact with lambs/goat kids at a holiday farm in Norway. *Epidemiology and Infection*, **142** (10): 2105-2113.
- Langkjaer, R.B.; Vigre, H.; Enemark, H.L.; Maddox-Hyttel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*, **134**: 339-350.
- Lassen, B.; Ståhl, M.; Enemark, H.L., 2014. Cryptosporidiosis—an occupational risk and a disregarded disease in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **56** (1): 36.

- Leander, B.S.; Clopton, R.E.; Keeling, P.J., 2003. Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53** (1): 345-354.
- Learmonth, J. J.; Ionas, G.; Pita, A.B.; Cowie, R.S., 2003. Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Science and Technology*, **47** (3): 21-26.
- Lebbad, M.; Beser, J.; Insulander, M.; Karlsson, L.; Mattsson, J.G.; Svenungsson, B.; Axén, C., 2013. Unusual cryptosporidiosis cases in Swedish patients: extended molecular characterization of *Cryptosporidium viatorum* and *Cryptosporidium chipmunk* genotype I. *Parasitology*, **140**: 1735–1740.
- Lee, S.H.; VanBik, D.; Kim, H.Y.; Lee, Y.R.; Kim, J.W.; Chae, M.; Oh, S.I.; Goo, Y.K.; Kwon, O.D.; Kwak, D., 2016. Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. in young calves with diarrhea in Korea. *Veterinary Parasitology*, **229**: 81-89.
- Leoni, F.; Amar, C.; Nichols, G.; Pedraza-Diaz, S.; McLauchlin, J., 2006. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology*, **55** (6): 703–707.
- Leoni, F.; Mallon, M.E.; Smith, H.V.; Tait, A.; McLauchlin, J., 2007. Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* isolates from sporadic livestock cases in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, **45** (10): 3286-3294.
- Levine, N.D., 1980. Some corrections of coccidian (*Apicomplexa*, *Protozoa*) nomenclature. *Journal of Parasitology*, **66**: 830-834.
- Li, N.; Xiao, L.; Wang, L.; Zhao, S.; Zhao, X.; Duan, L.; Guo, M.; Liu, L.; Feng, Y., 2012. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by

- genotyping and subtyping parasites in wastewater. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6** (9): e1809.
- Li, N.; Xiao, L.; Alderisio, K.; Elwin, K.; Cebelinski, E.; Chalmers, R.; Santin, M.; Fayer, R.; Kvac, M.; Ryan, U.; Sak, B.; Stanko, M.; Guo, Y.; Wang, L.; Zhang, L.; Cai, J.; Roellig, D.; Feng, Y., 2014. Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerging Infectious Diseases*, **20** (2): 217–224.
- Li, X.; Pereira, M.D.G.C.; Larsen, R.; Xiao, C.; Phillips, R.; Striby, K.; McCowan, B.; Atwill, E.R., 2015. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **4** (3): 343-350.
- Li, F.; Wang, H.; Zhang, Z.; Li, J.; Wang, C.; Zhao, J.; Hu, S.; Wang, R.; Zhang, L.; Wang, M., 2016. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Beijing, China. *Veterinary Parasitology*, **219**: 61-65.
- Lima, R.C.A.; Aquino, M.C.C.; Inácio, S.V.; Viol, M.A.; Zucatto, A.S.; da Silveira Neto, L.; Oliveira, B.C.; Vasconcelos, E.N.; Bresciani, K.D; Oliveira, G.; Costa, A.J., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in calves (*Bos taurus* and *Bos indicus*) in the Formiga city, Minas Gerais-Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, **34** (6): 3747-3754.
- Lindsay, D.S.; Upton, S.J.; Owens, D.S.; Morgan, U.M.; Mead, J.R.; Blagburn, B.L., 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47** (1): 91-95.
- Liu, A.; Wang, R.; Li, Y.; Zhang, L.; Shu, J.; Zhang, W.Z.; Feng, Y.Y.; Xiao, L.H.; Ling, H., 2009. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Heilongjiang Province, China. *Parasitology Research*, **105** (3): 797-802.

- Liu, H.; Shen, Y.; Yin, J.; Yuan, Z.; Jiang, Y.; Xu, Y.; Pan, W.; Hu, Y.; Cao, J., 2014. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, *Giardia* and *Cyclospora* in diarrheal outpatients in China. *BioMed Central Infectious Diseases*, **14** (1): 25.
- Llorente, M.T.; Clavel, A.; Goni, M.P.; Varea, M.; Seral, C.; Becerril, R.; Suarez, L.; Gómez-Lus, R., 2007. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International*, **56**: 201–205.
- Lorenzo Lorenzo, M.J.; Ares-Mazas, E.; Villacorta Martínez, D.M.I., 1993. Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*, **47**: 9–15.
- Lu, Q.B.; Qiu, S.X.; Ru, B.R.; Liu, W.; Wang, S.M.; Miao, T.; Wang, Y.; Duan, Z.X.; Ning, C.S.; Zhang, L.X., 2008. Epidemiological investigation of cryptosporidiosis in dairy calves in some prefectures of Henan Province. *Veterinary Science China*, **3**: 261–267.
- Lucio-Forster, A.; Griffiths, J.K.; Cama, V.A.; Xiao, L.; Bowman, D.D., 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*, **26**: 174-179.
- Lundborg, G.K.; Svensson, E.C.; Oltenacu, P.A., 2005. Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. *Preventive Veterinary Medicine*, **68** (2): 123-143.
- Lv, C.; Zhang, L.; Wang, R.; Jian, F.; Zhang, S.; Ning, C.; Wang, H.; Feng, C.; Wang, X.; Ren, X.; Qi, M.; Xiao, L., 2009. *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, **75** (24): 7692-7699.
- Ma, J.; Cai, J.; Ma, J.; Feng, Y.; Xiao, L., 2014. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in yaks



- (*Bos grunniens*) in China. *Veterinary Parasitology*, **202 (3)**: 113-118.
- Ma, J.; Li, P.; Zhao, X.; Xu, H.; Wu, W.; Wang, Y.; Guo, Y.; Wang, L.; Feng, Y.; Xiao, L., 2015. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle, beef cattle and water buffaloes in China. *Veterinary Parasitology*, **207 (3)**: 220-227.
- Maddox-Hyttel, C.; Langkjaer, R.B.; Enemark, H. L.; Vigre, H., 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs--occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology*, **141**: 48-59.
- MAGRAMA, 2015. *Anuario de Estadística 2014*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en España, Madrid.
- Mahfouz, M.E.; Mira, N.; Amer, S., 2014. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in farm animals in Egypt. *Journal of Veterinary Medical Science*, **76 (12)**: 1569-1575.
- Maikai, B.V.; Umoh, J.U.; Kwaga, J.K.; Lawal, I.A.; Maikai, V.A.; Cama, V.; Xiao, L., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Veterinary Parasitology*, **178 (3)**: 241-245.
- Majewska, A.C.; Werner, A.; Sulima, P.; Luty, T., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west- central region of Poland. *Veterinary Parasitology*, **89**: 269-275.
- Mallon, M.; MacLeod, A.; Wastling, J.; Smith, H.; Reilly, B.; Tait, A., 2003a. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Molecular Evolution*, **56 (4)**: 407-417.
- Mallon, M.E.; Macleod, A.; Wastling, J.M.; Smith, H.; Tait, A., 2003b. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium parvum* Type 2: population genetics and sub-structuring. *Infection, Genetics and Evolution*, **3**: 207-218.

- Martín-Gómez, S.; Ortega-Mora, L.M.; Pilar-Izquierdo, M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Pereira-Bueno, J., 1995a. Prevalencia de la infección por *Cryptosporidium parvum* en terneros en la provincia de León. *IV Congreso Ibérico de Parasitología*. Santiago de Compostela, 24-28 de Julio.
- Martín-Gómez, S.; Ortega-Mora, L.M.; Pilar-Izquierdo, M.; Rojo-Vázquez, F.A.; Pereira-Bueno, J., 1995b. Factores epidemiológicos asociados a la infección por *Cryptosporidium parvum* en corderos. *IV Congreso Ibérico de Parasitología*. Santiago de Compostela, 24-28 de Julio.
- Martins-Vieira, M.B.C.; Brito, L.A.L.; Heller, L., 2009. *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of experimentally infected calf. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **61 (6)**: 1454-1458.
- Mascaró, C.; Arnedo, T.; Rosales, M.J., 1994. Respiratory cryptosporidiosis in a bovine. *Journal of Parasitology*, **80**: 334-336.
- Mason, R.W.; Martley, W.J.; Tilt, L., 1981. Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. *Australian Veterinary Journal*, **57**: 386-388.
- Mat Yusof, A.; Hashim, N.; Md Isa, M.L., 2017. First molecular identification of *Cryptosporidium* by 18S rRNA in goats and association with farm management in Terengganu. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **7 (5)**: 385-388.
- Matos-Fernández, M.J.; Pereira-Bueno, J.; Ortega-Mora, L.M.; Pilar-Izquierdo, M.; Ferre, I.; Rojo-Vázquez, F.A., 1993. Prevalence of the infection by *Cryptosporidium parvum* in lambs, kids and calves in the province of León. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **1**: 211.
- Matos-Fernández, M. J.; Ortega-Mora, L. M.; Pereira-Bueno, J.; González-Paniello, R. M.; Reguera de Castro, E. N.; Reyero-Fernández, F.; Alvarez-Pacios, C., Rojo-Vázquez, F. A., 1994. Epidemiología de la criptosporidiosis en el ganado ovino y

- caprino de la montaña de León. *Medicina Veterinaria*, **11**: 147–154.
- Matsubayashi, M.; Kimata, I.; Iseki, M.; Hajiri, T.; Tani, H.; Sasai, K.; Baba, E., 2005. Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. *Veterinary Parasitology*, **129** (1): 165-168.
- Matsura, Y.; Matsubayashi, M.; Nukata, S.; Shibahara, T.; Ayukawa, O.; Kondo, Y.; Matsuo, T.; Uni, S.; Furuya, M.; Tani, H.; Tsuji, N.; Sasai, K., 2017. Report of fatal mixed infection with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal calves. *Acta Parasitologica*, **62** (1): 214-220.
- Maurya, P.S.; Rakesh, R.L.; Pradeep, B.; Kumar, S.; Kundu, K.; Garg, R.; Ram, H.; Kumar, A.; Banerjee, P.S., 2013. Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* spp. infection in young domestic livestock in India. *Tropical Animal Health and Production*, **45**: 941–946.
- McLauchlin, J.; Pedraza-Díaz, S.; Amar-Hoetzeneder, C.; Nichols, G. L., 1999. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (10): 3153–3158.
- McLauchlin, J.; Amar, C.; Pedraza-Díaz, S.; Nichols, G.L., 2000. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1; 705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **38** (11): 3984-3990.
- Medema, G.; Teunis, P.; Blokker, M; Deere, D.; Davison, A.; Charles, P.; Loret, J. F., 2006. WHO Guidelines for Drinking Water Quality: *Cryptosporidium*. WHO, New York, **138**.
- Meireles, M.V.; Soares, R.M.; dos Santos, M.M.; Gennari, S.M., 2006. Biological studies and molecular characterization of a

- Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *Journal of Parasitology*, **92** (3): 623-626.
- Meireles, M.V.; de Oliveira, F.P.; Teixeira, W.F.P.; Coelho, W.M.; Mendes, L.C.N., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. *Parasitology Research*, **109** (3): 949-951.
- Mendez-Hermida, F.; Gomez-Couso, H.; Romero-Suances, R.; Ares-Mazas, E., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild otters (*Lutra lutra*). *Veterinary Parasitology*, **144**: 153–156.
- Mendonça, C.; Almeida, A.; Castro, A.; de Lurdes Delgado, M.; Soares, S.; da Costa, J. M.C.; Canada, N., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology*, **147** (1): 47-50.
- Mercado, R.; Peña, S.; Ozaki, L.S.; Fredes, F.; Godoy, J., 2015. Multiple *Cryptosporidium parvum* subtypes detected in a unique isolate of a Chilean neonatal calf with diarrhea. *Parasitology Research*, **114** (5): 1985-1988.
- Mi, R.; Wang, X.; Li, C.; Huang, Y.; Zhou, P.; Li, Z.; Lei, M.; Cai, J.; Chen, Z., 2013. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* in yaks in Qinghai Province of China. *PLoS One*, **8** (9): e74985.
- Mi, R.; Wang, X.; Huang, Y.; Zhou, P.; Liu, Y.; Chen, Y.; Chen, J.; Zhu, W.; Chen, Z., 2014. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in goats across four provincial level areas in China. *PLoS One*, **9** (10): e111164.
- Millar, B.C.; Finn, M.; Xiao, L.; Lowery, C.J.; Dooley, J.S.G.; Moore, J.E., 2002. *Cryptosporidium* in foodstuffs—an emerging aetiological route of human foodborne illness. *Trends in Food Science and Technology*, **13**: 168–187.
- Mirhashemi, M.E.; Zintl, A.; Grant, T.; Lucy, F.; Mulcahy, G.; De Waal, T., 2016. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species in livestock in Ireland. *Veterinary Parasitology*, **216**: 18-22.

- Misic, Z.; Abe, N., 2007. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology*, **134** (3): 351-358.
- Mohammed, H.O.; Wade, S.E.; Schaaf, S., 1999. Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, **83**: 1-13.
- Molbak, K.; Hojlyng, N.; Gottschau, A.; Sá, J.C.; Ingholt, L.; da Silva, A.P.; Aaby, P., 1993. Cryptosporidiosis in infancy and childhood mortality in Guinea Bissau, west Africa. *British Medical Journal*, **307**: 417-420.
- Moles, B.; Torres, L.; Milagro, A.; Gorricho, J.; Seoane, A.; Navascues, J., 1998. Incidence of *Cryptosporidium* in Zaragoza: an 8-year study (1989-1996). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **16**: 356-358.
- Molina-López, R.A.; Ramis, A.; Martín-Vazquez, S.; Gómez-Couso, H.; Ares-Mazas, E.; Cacciò, S.M.; Leiva, M.; Darwich, L., 2010. *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus scops*) in a rehabilitation centre. *Avian Pathology*, **39**: 171-176.
- Molloy, S.F.; Smith, H.V.; Kirwan, P.; Nichols, R.A.; Asaolu, S.O.; Connelly, L., 2010. Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**: 608-613.
- Moon, H.W.; McClurkin, A.W.; Isaacson, R.E.; Pohlenz, J.; Skartvedt, S.M.; Gillette, K. G.; Baetz, A.L., 1978. Pathogenic relationships of rotavirus, *Escherichia coli*, and other agents in mixed infections in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **173** (5 Pt 2): 577-583.

- Mor, S.M.; Tzipori, S., 2008. Cryptosporidiosis in children in Sub-Saharan Africa: a lingering challenge. *Clinical Infectious Diseases*, **47**: 915-921.
- Morgan, U.M.; Thompson, R.C.A., 1998a. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? *Parasitology Today*, **14**: 241-244.
- Morgan, U.M.; Thompson, R.C.A., 1998b. PCR detection of *Cryptosporidium*: addendum. *Parasitology Today*, **14**: 469.
- Morgan, U.M.; Xiao, L.; Fayer, R.; Lal, A.A.; Thompson, R.C., 1999. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1733–1751.
- Morgan, U.; Weber, R.; Xiao, L.; Sulaiman, I.; Thompson, R.C.; Ndiritu, W.; Lal, A.; Moore, A.; Deplazes, P., 2000. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland Kenya, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 1180–1183.
- Morgan-Ryan, U.M.; Fall, A.; Ward, L.A.; Hijjawi, N.; Sulaiman, I.; Fayer, R.; Thompson, R.C.; Olson, M.; Lal, A.; Xiao, L., 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49** (6): 433-440.
- Morse, T.D.; Nichols, R.A.B.; Grimason, A.M.; Campbell, B.M.; Tembo, K.C.; Smith, H.V., 2007. Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiology and Infection*, **135** (8): 1307-1315.
- Mueller-Doblies, D.; Giles, M.; Elwin, K.; Smith, R.P.; Clifton-Hadley, F.A.; Chalmers, R.M., 2008. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. *Veterinary Parasitology*, **154** (3): 214-219.
- Muhid, A.; Robertson, I.; Ng, J.; Ryan, U., 2011. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp.

- infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor; Malaysia. *Experimental Parasitology*, **127**: 534-538.
- Muñoz, M.; Álvarez, M.; Lanza, I.; Carmenes, P., 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiology and Infection*, **117**: 203-211.
- Muñoz-Fernández, M.; Álvarez, M.; Lanza, I.; Carmenes, P., 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiology and Infection*, **117**: 203-211.
- Murakoshi, F.; Xiao, L.; Matsubara, R.; Sato, R.; Kato, Y.; Sasaki, T.; Fukuda, Y.; Tada, C.; Nakai, Y., 2012. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in grazing beef cattle in Japan. *Veterinary Parasitology*, **187** (1): 123-128.
- Murakoshi, F.; Ichikawa-Seki, M.; Aita, J.; Yaita, S.; Kinami, A.; Fujimoto, K.; Nishikawa, Y.; Murakami, S.; Horimoto, T.; Kato, K., 2016. Molecular epidemiological analyses of *Cryptosporidium parvum* virus 1 (CSpV1), a symbiotic virus of *Cryptosporidium parvum*, in Japan. *Virus Research*, **211**: 69-72.
- Nagano, Y.; Finn, M.B.; Lowery, C.J.; Murphy, T.; Moriarty, J.; Power, E.; Toolan, D.; O'Loughlin, A.; Watabe, M.; McCorry, K.A.; Crothers, E.; Dooley, J.S.G.; Rao, J.R.; Rooney, P.J.; Millar, B.C.; Matsuda, M.; Elborn, J.S.; Moore, J. E., 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and bacterial pathogens in faecal material in the red fox (*Vulpes vulpes*) population. *Veterinary Research Communications*, **31** (5): 559-564.
- Nagy, B.; Bozso, M.; Palfi, V.; Nagy, G.; Sahibi, M.A., 1984. Studies on cryptosporidial infection of goat kids. In: Yvoré P., Perrini G. (Ed.). *Les maladies de la chèvre*. INRA Publ, 443-451.
- Navarro-i-Martinez, L., 2010. *Detección y Caracterización Molecular de Cryptosporidium spp. Aislados de Humanos y Animales*.

- Tesis Doctoral. Sant Joan D'Alacant: Universidad Miguel Hernández.
- Navarro-i-Martinez, L.; Bornay-Llinares, F.J.; Rueda, C.; Del Aguila, C.; Da Silva, A.J.; Oleaga, A.; Ramajo, V.; Fenoy, S.; Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. from animals in Spain. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50** Suppl: 553–554.
- Navarro-i-Martinez, L.; da Silva, A.J.; Bornay-Llinares, F.J.; Moura, I.N.S.; Del Aguila, C.; Oleaga, A.; Pieniazek, N.J., 2007. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium bovis-like* isolate from a newborn lamb in Spain. *Journal of Parasitology*, **93**: 1536–1538.
- Navarro-i-Martinez, L.; del Águila, C.; Bornay-Llinares, F.J., 2011. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **29** (2): 135-143.
- Navarro-i-Martinez, L.; da Silva, A.J.; Llovo Taboada, J.; Del Águila, C.; Pieniazek, N. J.; Bornay-Llinares, F.J., 2012. Caracterización molecular de aislados humanos de *Cryptosporidium* spp. procedentes de 2 diferentes localizaciones de España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **31**: 506–510.
- Nazemalhosseini-Mojarad, E.; Haghghi, A.; Taghipour, N.; Keshavarz, A.; Mohebi, S. R.; Zali, M.R.; Xiao, L., 2011. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* isolates from humans and cattle in Iran. *Veterinary Parasitology*, **179** (1): 250-252.
- Ng, J.; Pavlasek, I.; Ryan, U., 2006. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (12): 7548-7553.
- Ng, J.; Eastwood, K.; Durrheim, D.; Massey, P.; Walker, B.; Armson, A.; Ryan, U., 2008. Evidence supporting zoonotic transmission



- of *Cryptosporidium* in rural New South Wales. *Experimental Parasitology*, **119** (1): 192-195.
- Ng, J.; Yang, R.; McCarthy, S.; Gordon, C.; Hijjawi, N.; Ryan, U., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Veterinary Parasitology*, **176** (2): 145-150.
- Ng, J.S.Y; Eastwood, K.; Walker, B.; Durrheim, D.N.; Massey, P.D.; Porigneaux, P.; Kemp, R.; McKinnon, B.; Laurie, K.; Miller, D.; Bramley, E.; Ryan, U., 2012. Evidence of *Cryptosporidium* transmission between cattle and humans in northern New South Wales. *Experimental Parasitology*, **130** (4): 437-441.
- Ngouanesavanh, T.; Guyot, K.; Certad, G.; Le Fichoux, Y.; Chartier, C.; Verdier, R.I.; Cailliez, J.C.; Camus, D.; Dei-Cas, E.; Bañuls, A.L., 2006. *Cryptosporidium* population genetics: evidence of clonality in isolates from France and Haiti. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53** (Suppl 1): S33-S36.
- Nguyen, S.T.; Fukuda, Y.; Tada, C.; Sato, R.; Duong, B.; Nguyen, D.T.; Nakai, Y., 2012. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in native beef calves in central Vietnam. *Parasitology Research*, **111** (4): 1817-1820.
- Nichols, G., 2007. Epidemiology. En: *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 79-118.
- Nichols, G.L.; Chalmers, R.M.; Sopwith, W.; Regan, M.; Hunter, C.A.; Grenfell, P.; Harrison, F.; Lane, C., 2006. Cryptosporidiosis: a report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. *Drinking Water Directorate Contract Number DWI, 70/2/ 201*. Drinking Water Inspectorate, U.K., 142.
- Nichols, R.A.; Connelly, L.; Sullivan, C.B.; Smith, H.V., 2010. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. *Applied Environmental Microbiology*, **76**: 5977-5986.

- Nime, F.A.; Burek, J.D.; Page, D.L.; Holscher, M.A.; Yardley, J.H., 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, **70**: 592-598.
- Nolan, M.J.; Jex, A.R.; Mansell, P.D.; Browning, G.F.; Gasser, R.B., 2009. Genetic characterization of *Cryptosporidium parvum* from calves by mutation scanning and targeted sequencing—zoonotic implications. *Electrophoresis*, **30 (15)**: 2640-2647.
- Noordeen, F.; Faizal, A.C.; Rajapakse, R.P.; Horadagoda, N.U.; Arulkanthan, A., 2001. Excretion of *Cryptosporidium* oocysts by goats in relation to age and season in the dry zone of Sri Lanka. *Veterinary Parasitology*, **99**: 79–85.
- Noordeen, F.; Horadagoda, N.U.; Faizal, A.C.; Rajapakse, R.P.; Razak, M.A., Arulkanthan, A., 2002. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* isolated from asymptomatic adult goats to mice and goat kids. *Veterinary Parasitology*, **103**: 217–225.
- Novo, S.M.F.; dos Reis Costa, J.F.; Baccili, C.C.; Sobreira, N.M.; Silva, B.T.; de Oliveira, P.L.; Hurley, D.J.; Gomes, V., 2017. Effect of maternal cells transferred with colostrum on the health of neonate calves. *Research in Veterinary Science*, **112**: 97-104.
- Núñez, A.; McNeilly, F.; Perea, A.; Sanchez-Cordon, P.J.; Huerta, B.; Allan, G., Carrasco, L., 2003. Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, **50**: 255–258.
- O'Brien, E.; McInnes, L.; Ryan, U., 2008. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. *Experimental Parasitology*, **118 (1)**: 118-121.
- O'Donoghue P.J., 1995. *Cryptosporidium* and Criptosporidiosis in Man and Animals. *International Journal for Parasitology*, **25 (2)**: 139-195.

- O'Handley, R.M.; Olson, M.E., 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, **22** (3): 623-643.
- O'Handley, R.M.; Cockwill, C.; McAllister, T.A.; Jelinski, M.; Morck, D.W.; Olson, M. E., 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **214** (3): 391-396.
- O'Handley, R.M.; Olson, M.E.; Fraser, D.; Adams, P.; Thompson, R.C., 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Veterinary Parasitology*, **90** (3): 193-200.
- Okhuysen, P.C.; Chappell, C.L.; Sterling, C.R.; Jakubowski, W.; DuPont, H.L., 1998. Susceptibility and serologic response of healthy adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity*, **66**: 441-443.
- Olson, M.E.; O'Handley, R.M.; Ralston, B.J.; McAllister, T.A.; Thompson, R.A., 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, **20** (4): 185-191.
- Ondráčková, Z.; Kvác, M.; Sak, B.; Kvetonová, D.; Rost, M., 2009. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia; the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, **165**: 141-144.
- Ong, C.S.; Eisler, D.L.; Alikhani, A.; Fung, V.W.; Tomblin, J.; Bowie, W.R.; Isaac-Renton, J.L., 2002. Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a *cervine* genotype. *Emerging Infectious Diseases*, **8**: 263-268.
- Ortega-Mora, L.M.; Wright, S.E., 1994. Age-related resistance in ovine cryptosporidiosis: patterns of infection and humoral immune response. *Infection and Immunity*, **62**: 5003- 5009.

- Ortega-Mora, L.M.; Requejo-Fernandez, J.A.; Pilar-Izquierdo, M.; Pereira-Bueno, J., 1999. Role of adult sheep in transmission of infection by *Cryptosporidium parvum* to lambs: confirmation of periparturient rise. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1261–1268.
- Ortega-Pierres, G.; Smith, H.V.; Cacciò, S.M.; Thompson, R.C., 2009. New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends in Parasitology*, **25**: 410–416.
- Pages-Mante, A.; Pages-Bosch, M.; Majo-Masferrer, N.; Gómez-Couso, H.; Ares- Mazas, E., 2007. An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red- legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. *Avian Pathology*, **36**: 275–278.
- Pancieria, R.J.; Thomas, R.W.; Garner, F., 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, **8**: 479-484.
- Paoletti, B.; Giangaspero, A.; Gatti, A.; Iorio, R.; Cembalo, D.; Milillo, P.; Traversa, D., 2009. Immunoenzymatic analysis and genetic detection of *Cryptosporidium parvum* in lambs from Italy. *Experimental Parasitology*, **122**: 349-352.
- Paraud, C.; Pors, I.A.; Brunet, S., 2014. High excretion of *Cryptosporidium ubiquitum* by periparturient goats in one flock in western France. *Veterinary Parasitology*, **202**: 301–304.
- Park, J.H.; Guk, S.M.; Han, E.T.; Shin, E.H.; Kim, J.L.; Chai, J.Y., 2006. Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, **44**: 27–33.
- Parsons, M.B.; Travis, D.; Lonsdorf, E.V.; Lipende, I.; Roellig, D.M.A.; Kamenya, S.; Zhang, H.; Xiao, L.; Gillespie, T.R., 2015. Epidemiology and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in humans, wild primates, and domesticated animals in the Greater Gombe Ecosystem, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **9** (2): e0003529.

- Paul, S.; Chandra, D.; Tewari, A.K.; Banerjee, P.S.; Ray, D.D.; Raina, O.K.; Rao, J.R., 2009. Prevalence of *Cryptosporidium andersoni*: a molecular epidemiological survey among cattle in India. *Veterinary Parasitology*, **161** (1): 31-35.
- Pavlašek, I.; Lavicková, M.; Horák, P.; Kral, J.; Kral, B., 1995. *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity at Prague zoo. *Gazella*, **22**: 99–108.
- Paz e Silva, F.M.; Lopes, R.S.; Bresciani, K.D.; Amarante, A.F.; Araujo, J.P.Jr., 2014. High occurrence of *Cryptosporidium ubiquitum* and *Giardia duodenalis* genotype E in sheep from Brazil. *Acta Parasitologica*, **59** (1): 193-196.
- Paziewska-Harris, A.; Singer, M.; Schoone, G.; Schallig, H., 2016. Quantitative analysis of *Cryptosporidium* growth in vitro culture- the impact of parasite density on the success of infection. *Parasitology Research*, **115** (1): 329-337.
- Pedraza-Díaz, S.; Amar, C.F.; McLauchlin, J.; Nichols, G.L.; Cotton, K.M.; Godwin, P.; Iversen, A.M.; Milne, L.; Mulla, J.R.; Nye, K.; Panigrahl, H.; Venn, S.R.; Wiggins, R.; Williams, M.; Youngs, E.R., 2001. *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. *Journal of Infection*, **42**: 243–250.
- Pedraza-Díaz, S.; Ortega-Mora, L.M.; Carrion, B.A.; Navarro, V.; Gómez-Bautista, M., 2009. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Veterinary Parasitology*, **160**: 204–210.
- Peng, M.M.; Meshnick, S.R.; Cunliffe, N.A.; Thindwa, B.D.; Hart, C.A.; Broadhead, R. L.; Xiao, L., 2003. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children in Malawi. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**, Suppl: 557–559.
- Peng, X.Q.; Tian, G.R.; Ren, G.J.; Yu, Z.Q.; Lok, J.B.; Zhang, L.X.; Wang, X.T.; Song, J.K.; Zhao, G.H., 2016. Infection rate of

- Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi* in cashmere, dairy and meat goats in China. *Infection, Genetics and Evolution*, **41**: 26-31.
- Pérez-Creo, A., 2015. *Seroprevalencia de Fasciola hepatica en ganado ovino y caprino en Galicia y análisis de los principales factores de riesgo*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Pieniazek, N.J.; Bornay-Llinares, F.J.; Slemenda, S.B.; Da Silva, A.J.; Moura, I.N.; Arrowood, M.J; Ditrich, O.; Addiss, D.G., 1999. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 444–449.
- Pilar-Izquierdo, M.; Ortega-Mora, L.M.; Pereira-Bueno, J., Rojo-Vázquez, F.A., 1993. Participación de *Cryptosporidium parvum* en brotes de diarrea en corderos en el N.O. de Castilla y León. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **1**: 223.
- Plutzer, J.; Karanis, P., 2007. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Veterinary Parasitology*, **146**: 57-62.
- Plutzer, J.; Karanis, P., 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, **165**: 187–199.
- Pohlenz, J.; Bemrick, W.J.; Moon, H.W.; Cheville, N.F., 1978. Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Veterinary Pathology*, **15**: 417-427.
- Polack, B.; Chermette, R.; Savey, M.; Bussieras, J., 1983. Les cryptosporidies en France. Techniques usuelles d'identification et résultats préliminaires d'enquêtes épidémiologiques. *Point Veterinary*, **15**: 41.
- Ponce, G.F.; Herrera, S.; Castro, A.T.; García, D.B.; Martínez Díaz, R.A., 2002. Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Veterinary Parasitology*, **107**: 137–160.

- Power, M.L.; Ryan, U.M., 2008. A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *Journal of Parasitology*, **94**: 1114-1117.
- Pritchard, G.C.; Marshall, J.A.; Giles, M.; Chalmers, R.M.; Marshall, R.N., 2007. *Cryptosporidium parvum* infection in orphan lambs on a farm open to the public. *The Veterinary Record*, **161**: 11-14.
- Pritchard, G.C.; Marshall, J.A.; Giles, M.; Mueller-Doblies, D.; Sayers, A.R.; Marshall, R.N.; Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2008. *Cryptosporidium* species in lambs submitted for diagnostic postmortem examination in England and Wales. *The Veterinary Record*, **163**: 688-689.
- Qi, M.; Cai, J.; Wang, R.; Li, J.; Jian, F.; Huang, J.; Zhou, H.; Zhang, L., 2015a. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from yaks in the central western region of China. *BioMed Central Microbiology*, **15** (1): 108.
- Qi, M.; Wang, H.; Jing, B.; Wang, D.; Wang, R.; Zhang, L., 2015b. Occurrence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Xinjiang, northwestern China. *Veterinary Parasitology*, **212** (3): 404-407.
- Qi, M.; Wang, R.; Jing, B.; Jian, F.; Ning, C.; Zhang, L., 2016. Prevalence and multilocus genotyping of *Cryptosporidium andersoni* in dairy cattle and He cattle in Xinjiang, China. *Infection, Genetics and Evolution*, **44**: 313-317.
- Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; Clavel, A.; Causape, A.C., 1996a. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **66** (3-4): 139-146.
- Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; Clavel, A.; del Cacho, E.; López-Bernad, F., 1996b. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **67** (1-2): 83-88.

- Quílez, J.; Ares-Mazas, E.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; Clavel, A.; Causape, A. C., 1996c. Comparison of oocyst shedding and the serum immune response to *Cryptosporidium parvum* in cattle and pigs. *Parasitology Research*, **82** (6): 529–534.
- Quílez, J.; Vergara-Castiblanco, C.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; Lopez-Bernad, F., 2001. Prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en ganado caprino en la provincia de Zaragoza. Estudio preliminar. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **8**: 167.
- Quílez, J.; Sanchez-Acedo, C.; Avendaño, C.; del Cacho, E.; Lopez-Bernad, F., 2005. Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 2479–2483.
- Quílez, J.; Torres, E.; Chalmers, R.M.; Robinson, G.; del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C., 2008a. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology*, **135** (14): 1613–1620.
- Quílez, J.; Torres, E.; Chalmers, R.M.; Hadfield, S.J.; Del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C., 2008b. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (19): 6026–6031.
- Quiñones-Mateu, M.E.; Avila, S.; Reyes-Teran, G.; Martínez, M.A., 2014. Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. *Journal of Clinical Virology*, **61** (1): 9–19.
- Raccurt, C.P., 2007. Worldwide human zoonotic cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium felis*. *Parasite*, **14**: 15–20.
- Radostits, O.M.; Acres, S.D., 1983. The control of acute undifferentiated diarrhea of newborn beef calves. *The Veterinary clinics of North America. Large Animal Practice*, **5** (1): 143–155.
- Rahmouni, I.; Essid, R.; Aoun, K.; Bouratbine, A., 2014. Glycoprotein 60 diversity in *Cryptosporidium parvum* causing human and cattle cryptosporidiosis in the rural region of Northern Tunisia.



- The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **90** (2): 346-350.
- Ralston, B.; Thompson, R.C.A.; Pethick, D.; McAllister, T.A.; Olson, M.E., 2010. *Cryptosporidium andersoni* in Western Australian feedlot cattle. *Australian Veterinary Journal*, **88** (11): 458-460.
- Ramo, A.; Quílez, J.; Vergara-Castiblanco, C.; Monteagudo, L.; Del Cacho, E.; Clavel, A., 2015. Multilocus typing and population structure of *Cryptosporidium* from children in Zaragoza, Spain. *Infection, Genetics and Evolution*, **31**: 190-197.
- Ramo, A.; Quílez, J.; Monteagudo, L.; Del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C., 2016a. Intra-Species diversity and panmictic structure of *Cryptosporidium parvum* populations in cattle farms in Northern Spain. *PloS One*, **11** (2): e0148811.
- Ramo, A.; Monteagudo, L.V.; Del Cacho, E.; Sánchez-Acedo, C.; Quílez, J., 2016b. Intra-species genetic diversity and clonal structure of *Cryptosporidium parvum* in sheep farms in a confined geographical area in northeastern Spain. *PloS one*, **11** (5): e0155336.
- Ravaszová, P.; Halanova, M.; Goldova, M.; Valencakova, A.; Malcekova, B.; Hurníková, Z.; Halan, M., 2012. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitology Research*, **110** (1): 469-471.
- Rehg, J.E.; Lawton, G.W.; Pakes, S.P., 1979. *Cryptosporidium cuniculus* in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **29**: 656-660.
- Reid, A.; Lymbery, A.; Ng, J.; Tweedle, S.; Ryan, U., 2010. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Veterinary Parasitology*, **168** (3): 190-195.
- Ren, X.; Zhao, J.; Zhang, L.; Ning, C.; Jian, F.; Wang, R.; Lv, C.; Wang, Q.; Arrowood, M. J.; Xiao, L., 2012. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic

- mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, **130**: 274-281.
- Rieux, A.; Chartier, C.; Pors, I.; Delafosse, A.; Paraud, C., 2013a. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from high-excreting young dairy calves in dairy cattle herds in Western France. *Parasitology Research*, **112 (10)**: 3423-3431.
- Rieux, A.; Paraud, C.; Pors, I.; Chartier, C., 2013b. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned kids in a dairy goat farm in western France. *Veterinary Parasitology*, **192**: 268-272.
- Rieux, A.; Paraud, C.; Pors, I.; Chartier, C., 2014. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. *Veterinary Parasitology*, **202 (3)**: 171-179.
- Robertson, L.J., 2009. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. *Epidemiology and Infection*, **137 (7)**: 913-921.
- Robertson, L.J.; Gjerde, B.K.; Furuseth Hansen, E.F, 2010. The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Veterinary Parasitology*, **171 (1)**: 140-145.
- Robertson, L.J.; Björkman, C.; Axén, C.; Fayer, R.; Cacciò, S.M.; Widmer, G. (Eds.), 2014. *Cryptosporidium: parasite and disease*. Springer Science and Business Media.
- Robinson, G., Chalmers, R.M., 2012. Assessment of polymorphic genetic markers for multilocus typing of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Experimental Parasitology*, **132**: 200-215.
- Robinson, G.; Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2008. Unusual *Cryptosporidium* genotypes in human cases of diarrhea. *Emerging Infectious Diseases*, **14 (11)**: 1800-1802.

- Robinson, G.; Thomas, A.L.; Daniel, R.G.; Hadfield, S.J.; Elwin, K.; Chalmers, R.M., 2006. Sample prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, **142** (1): 163-167.
- Robinson, G.; Wright, S.; Elwin, K.; Hadfield, S.J.; Katzer, F.; Bartley, P.M.; Hunter, P. R.; Nath, M.; Innes, E.A.; Chalmers, R.M., 2010. Redescription of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, **40** (13): 1539-1548.
- Robinson, G.; Chalmers, R.M.; Stapleton, C.; Palmer, S.R.; Watkins, J.; Francis, C.; Kay, D., 2011. A whole water catchment approach to investigating the origin and distribution of *Cryptosporidium* species. *Journal of Applied Microbiology*, **111** (3): 717-730.
- Rodríguez-Hernández, J.; Canut-Blasco, A.; Ledesma-García, M.; Martín-Sánchez, A.M., 1994. *Cryptosporidium* oocysts in water for human consumption. Comparison of staining methods. *European Journal of Epidemiology*, **10**: 215–218.
- Rodríguez-Hernández, J.; Canut-Blasco, A.; Martín-Sánchez, A.M., 1996. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centres in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *European Journal of Epidemiology*, **12**: 291–295.
- Rojo, F.J.; Gass, A.; Alunda, J.M., 1985. Denuncia en España de la criptosporidiosis ovina. *IV Congreso Nacional de Parasitología*. Tenerife, 9-13 de Julio.
- Romero-Salas, D.; Alvarado-Esquivel, C.; Cruz-Romero, A.; Aguilar-Domínguez, M.; Ibarra-Priego, N.; Merino-Charrez, J.O.; Pérez de León, A.A.; Hernández-Tinoco, J., 2016. Prevalence of *Cryptosporidium* in small ruminants from Veracruz, Mexico. *BioMed Central Veterinary Research*, **12** (1): 14.

- Rosales, M.J.; Córdón, G.P.; Moreno, M.S.; Sánchez, C.M.; Mascaró, C., 2005. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica*, **95**: 74-78.
- Roy, S.S.; Sarkar, S.; Batabyal, S.; Pramanik, A.K.; Das, P., 2006. Observations on the epidemiology of bovine cryptosporidiosis in India. *Veterinary Parasitology*, **141** (3): 330-333.
- Roy, S.S., Pramanik, A.K., Sarkar, S., Misra, S.S., 2010. Comparative molecular epidemiological studies on bovine and human cryptosporidiosis. *Indian Journal of Animal Sciences*, **80** (10): 945-955.
- Ryan, U.M.; Xiao, L.; Read, C.; Sulaiman, I.M.; Monis, P.; Lal, A.A.; Fayer, R.; Pavlasek, I., 2003. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, **89** (4): 809-813.
- Ryan, U.M.; Monis, P.; Enemark, H.L.; Sulaiman, I.; Samarasinghe, B.; Read, C.; Buddle, R.; Robertson, I.; Zhou, L.; Thompson, R.C.A.; Xiao, L., 2004. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, **90** (4): 769-773.
- Ryan, U.M.; Bath, C.; Robertson, I.; Read, C.; Elliot, A.; McInnes, L.; Traub, R.; Besier, B., 2005. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (9): 4992-4997.
- Ryan, U.M.; Power, M.; Xiao, L., 2008. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55** (1): 22-26.
- Ryan, U.; Fayer, R.; Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, **141** (13): 1667-1685.
- Ryan, U.; Papparini, A.; Tong, K.; Yang, R.; Gibson-Kueh, S.; O'Hara, A.; Lymbery, A.; Xiao, L., 2015. *Cryptosporidium huwi* n. sp.

- (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology*, **150**: 31-35.
- Ryan, U.; Zahedi, A.; Paparini, A., 2016a. *Cryptosporidium* in human and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology*, **38 (9)**: 535-547.
- Ryan, U.; Paparini, A.; Monis, P.; Hijjawi, N., 2016b. It's official -. *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?. *Water Research*, **105**: 305-313.
- Santín, M., 2013. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, **61**: 1–10.
- Santín, M.; Trout, J.M., 2008. *Companion animals*. In: Fayer, R. and Xiao, L. (Eds.). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 437-449.
- Santín, M.; Fayer, R., 2015. *Enterocytozoon bienersi*, *Giardia*, and *Cryptosporidium* Infecting White-tailed Deer. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **62 (1)**: 34-43.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Zhou, L.; Greiner, E.; Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, **122 (2)**: 103-117.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Fayer, R., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Veterinary Parasitology*, **146 (1-2)**: 17-24.
- Santín, M.; Trout, J.M.; Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, **155 (1-2)**: 15-23.
- Santos, M.M.A.B.; Peiro, J.R.; Meireles, M.V., 2005. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. *Brazilian Journal of Poultry Science*, **7 (2)**: 113-117.

- Sanz-Ceballos, L.; Illescas Gómez, P.; Sanz Sampelayo, M.R.; Gil Extremera, F.; Rodríguez Osorio, M., 2009. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats maintained under semi-extensive feeding conditions in the southeast of Spain. *Parasite*, **16**: 315-318.
- Sari, B.; Arslan, M.O.; Gicik, Y.; Kara, M.; Taşçi, G.T., 2009. The prevalence of *Cryptosporidium* species in diarrhoeic lambs in Kars province and potential risk factors. *Tropical Animal Health and Production*, **41**: 819–826.
- Savioli, L.; Smith, H.; Thompson, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, **22**: 203-208.
- Segura, R.; Prim, N.; Montemayor, M.; Valls, M.E.; Muñoz, C., 2015. Predominant virulent IbA10G2 subtype of *Cryptosporidium hominis* in human isolates in Barcelona: a five-year study. *PLoS One*, **10** (3): e0121753.
- Sevá, A.D.P.; Funada, M.R.; Souza, S.D.O.; Nava, A.; Richtzenhain, L.J.; Soares, R.M., 2010. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **19** (4): 249-253.
- Shen, Y.; Yin, J.; Yuan, Z.; Lu, W.; Xu, Y.; Xiao, L., Cao, J., 2011. The identification of the *Cryptosporidium ubiquitum* in pre-weaned Ovines from Aba Tibetan and Qiang autonomous prefecture in China. *Biomedical Environmental Sciences*, **24**: 315–320.
- Shoukry, N.M.; Dawoud, H.A.; Haridy, F.M., 2009. Studies on zoonotic cryptosporidiosis parvum in Ismailia Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **39**: 479–488.

- Shrestha, R.D.; Grinberg, A.; Dukkipati, V.S.; Pleydell, E.J.; Prattley, D.J.; French, N. P., 2014. Infections with multiple *Cryptosporidium* species and new genetic variants in young dairy calves on a farm located within a drinking water catchment area in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, **202**: 287-291.
- Siddiki, A.Z.; Mina, S.A.; Farzana, Z.; Ayesa, B.; Das, R.; Hossain, A.H., 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium xiaoi* in goat kids in Bangladesh by nested PCR amplification of 18S rRNA gene. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **5 (3)**: 202-207.
- Silva, S.O.; Richtzenhain, L.J.; Barros, I.N.; Gomes, A.M.; Silva, A.V.; Kozerski, N.D.; de Araujo Ceranto, J.B; Keid, L.B; Soares, R.M., 2013. A new set of primers directed to 18S rRNA gene for molecular identification of *Cryptosporidium* spp. and their performance in the detection and differentiation of oocysts shed by synanthropic rodents. *Experimental Parasitology*, **135 (3)**: 551-557.
- Silverlås, C.; Björkman, C.; Egenvall, A., 2009a. Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Preventive Veterinary Medicine*, **91 (2-4)**: 73-84.
- Silverlås, C.; Emanuelson, U.; de Verdier, K.; Björkman, C., 2009b. Prevalence and associated management factors of *Cryptosporidium* shedding in 50 Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, **90 (3-4)**: 242-253.
- Silverlås, C.; de Verdier, K.; Emanuelson, U.; Mattsson, J.G.; Björkman, C., 2010a. *Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems. *Parasitology Research*, **107 (6)**: 1435-1444.
- Silverlås, C.; Näslund, K.; Björkman, C.; Mattsson, J.G., 2010b. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Veterinary Parasitology*, **169 (3)**: 289-295.

- Silverlås, C.; Mattsson, J.G.; Insulander, M.; Lebbad, M., 2012. Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *International Journal for Parasitology*, **42** (11): 963–967.
- Silverlås, C.; Bosaeus-Reineck, H.; Näslund, K.; Björkman, C., 2013. Is there a need for improved *Cryptosporidium* diagnostics in Swedish calves?. *International Journal for Parasitology*, **43** (2): 155-161.
- Sischo, W.M.; Atwill, E.R.; Lanyon, L.E.; George, J., 2000. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, **43** (4): 253-267.
- Sitja-Bobadilla, A.; Padros, F.; Aguilera, C.; Álvarez-Pellitero, P., 2005. Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cultures: from hatchery to market size. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:131–139.
- Siwila, J.; Phiri, I.G.; Vercruyse, J.; Goma, F.; Gabriel, S.; Claerebout, E.; Geurden, T., 2007. Asymptomatic cryptosporidiosis in Zambian dairy farm workers and their household members. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **101** (7): 733-734.
- Šlapeta, J., 2009. Centenary of the genus *Cryptosporidium*: from morphological to molecular species identification. In: Ortega-Pierres, M.G., Cacciò, S., Fayer, R., Mank, T., Smith, H., Thompson, R.C.A. (Eds.), *Giardia and Cryptosporidium: From Molecules to Disease*. CAB International, pp. 31–50.
- Šlapeta, J., 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow?. *International Journal for Parasitology*, **43** (12): 957-970.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, **65**: 262-270.



- Smith, H., 2008. Diagnostics. In: Fayer, R.; Xiao, L. (Eds.). *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Ratón, Florida (EE.UU.).
- Smith, H.V.; Nichols, R.A.; Mallon, M.; Macleod, A.; Tait, A.; Reilly, W.J.; Browning, L.M.; Gray, D.; Reid, S.W.; Wastling, J.M., 2005. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *The Veterinary Record*, **156** (22): 710-711.
- Smith, H.V.; Cacciò, S.M.; Cook, N.; Nichols, R.A.B; Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology*, **149** (1-2): 29-40.
- Smith, R.P.; Chalmers, R.M.; Mueller-Doblies, D.; Clifton-Hadley, F.A.; Elwin, K.; Watkins, J.; Paiba, G.A.; Hadfield, S.J.; Giles, M., 2010. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Preventive Veterinary Medicine*, **94** (1-2): 9-17.
- Smith, R.P.; Clifton-Hadley, F.A.; Cheney, T.; Giles, M., 2014. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. *Veterinary Parasitology*, **204** (3-4): 111-119.
- Snak, A.; Smiderle, F.R.; Mello Fernandes, N.L.; Lara, A.A.; Garcia, F.G.; Ogawa, L.; Osaki, S.C., 2017. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. in sheep. *Semina: Ciências Agrárias*, **38** (4): 1917-1924.
- Snodgrass, D.R.; Angus, K.W.; Gray, E.W., 1984. Experimental cryptosporidiosis in germ-free lambs. *Journal of Comparative Pathology*, **94** (1): 141-152.
- Soba, B.; Logar, J., 2008. Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*, **135** (11): 1263-1270.
- Soilán López, M., 2014. *Criptosporidiosis en rumiantes domésticos de Galicia: análisis genotípico y subgenotípico*. Tesis Doctoral.

Facultad de Veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela.

- Soltane, R.; Guyot, K.; Dei-Cas, E.; Ayadi, A., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. *Parasite*, **14 (4)**: 335-338.
- Sréter, T.; Varga, I., 2000. Cryptosporidiosis in birds--a review. *Veterinary Parasitology*, **87**: 261-279.
- Starkey, S.R.; Zeigler, P.E.; Wade, S.E.; Schaaf, S.L.; Mohammed, H.O., 2006. Factors associated with shedding of *Cryptosporidium parvum* versus *Cryptosporidium bovis* among dairy cattle in New York State. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **229**: 1623-1626.
- Stensvold C.R.; Elwin, K.; Winiecka-Krusnell, J.; Chalmers, R.M.; Xiao, L.; Lebbad, M., 2015. Development and Application of a gp60-Based Typing Assay for *Cryptosporidium viatorum*. *Journal of Clinical Microbiology*, **53 (6)**:1891-1897.
- Striepen, B., Kissinger, J. C., 2004. Genomics meets transgenics in search of the elusive *Cryptosporidium* drug target. *Trends Parasitology*, **20 (8)**: 355-358.
- Strong, W.B.; Gut, J.; Nelson, R.G., 2000. Cloning and Sequence Analysis of a Highly Polymorphic *Cryptosporidium parvum* Gene Encoding a 60-kilodalton Glycoprotein and Characterization of its 15- and 45-Kilodalton Zoite Surface Antigen Products. *Infection and Immunity*, **68 (7)**: 4117-4134.
- Sturdee, A.P.; Chalmers, R.M.; Bull, S.A., 1999. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*, **80 (4)**: 273-280.
- Sturdee, A.P.; Bodley-Tickell, A.T.; Archer, A.; Chalmers, R.M., 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, **116 (2)**: 97-113.

- Suárez-Luengas, L.; Clavel, A.; Quílez, J.; Goñi-Cepero, M.P.; Torres, E.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*, **148**: 231–235.
- Sulaiman, I.M.; Morgan, U.M.; Thompson, R.C.A.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology*, **66 (6)**: 2385–2391.
- Sulaiman, I.M.; Lal, A.A.; Xiao, L., 2001. A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48 (Suppl 1)**: 24S–27S.
- Sulaiman, I.M.; Hira, P.R.; Zhou, L.; Al-Ali, F.M.; Al-Shelahi, F.A.; Shweiki, H.M.; Iqbal, J.; Khalid, N.; Xiao, L., 2005. Unique Endemicity of Cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, **43 (6)**: 2805-2809.
- Swain, K., 2016. *Molecular Characterization of Cryptosporidium species in buffaloes in haryana*. Doctoral Dissertation, LUVAS.
- Sweeny, J.P., 2012. *Determining the impact of protozoan and strongylid parasites on meat lamb productivity*. Ph.D. Thesis. Murdoch University, Perth, WA.
- Sweeny, J.P.A.; Ryan, U.M.; Robertson, I.D.; Yang, R.; Bell, K.; Jacobson, C., 2011. Longitudinal investigation of protozoan parasites in meat lamb farms in southern Western Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, **101 (3-4)**: 192-203.
- Sweeny, J.P.A.; Robertson, I.D.; Ryan, U.M.; Jacobson, C.; Woodgate, R.G., 2012. Impacts of naturally acquired protozoa and strongylid nematode infections on growth and faecal attributes in lambs. *Veterinary Parasitology*, **184 (2-4)**: 298-308.
- Taha, S.; Elmalik, K.; Bangoura, B.; Lendner, M.; Mossaad, E.; Dauschies, A., 2017. Molecular characterization of bovine

- Cryptosporidium* isolated from diarrheic calves in the Sudan. *Parasitology Research*, **116 (11)**: 2971–2979.
- Tanriverdi, S.; Widmer, G., 2006. Differential evolution of repetitive sequences in *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Infection, Genetics and Evolution*, **6 (2)**: 113–122.
- Tanriverdi, S.; Markovics, A.; Arslan, M.Ö.; Itik, A.; Shkap, V.; Widmer, G., 2006. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **72 (4)**: 2507–2513.
- Taylan-Ozkan, A.; Yasa-Duru, S.; Usluca, S.; Lysen, C.; Ye, J.; Roellig, D.M.; Feng, Y.; Xiao, L., 2016. *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in dairy calves and goat kids reared under traditional farming systems in Turkey. *Experimental Parasitology*, **170**: 16-20.
- Teixeira, M.C.; Barreto, M.L.; Melo, C.; Silva, L.R.; Moraes, L.R.; Alcântara-Neves, N.M., 2007. A serological study of *Cryptosporidium* transmission in a periurban area of a Brazilian Northeastern city. *Tropical Medicine and International Health*, **12**: 1096-1104.
- Templeton, T.J.; Enomoto, S.; Chen, W.J.; Huang, C.G.; Lancto, C.A.; Abrahamsen, M. S.; Zhu, G., 2010. A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a *Gregarine* and *Cryptosporidium*. *Molecular Biology and Evolution*, **27**: 235-248.
- Thomaz, A.; Meireles, M.V.; Soares, R.M.; Pena, H.F.; Gennari, S.M., 2007. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **150 (4)**: 291-296.
- Thompson, H.P.; Dooley, J.S.; Kenny, J.; McCoy, M.; Lowery, C.J.; Moore, J.E.; Xiao, L., 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. *Parasitology Research*, **100 (3)**: 619-624.

- Thompson, R.A.; Palmer, C.S.; O'Handley, R., 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *The Veterinary Journal*, **177** (1): 18-25.
- Thompson, R.C.A.; Ash, A., 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, **40**: 315-323.
- Tibayrenc, M.; Ayala, F.J., 2014. *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Pneumocystis* genetic variability: cryptic biological species or clonal near-clades?. *PLoS Pathogens*, **10** (4): e1003908.
- Tomazic, M.L.; Maidana, J.; Dominguez, M.; Uriarte, E.L.; Galarza, R.; Garro, C.; Florin-Christensen, M.; Schnittger, L., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Veterinary Parasitology*, **198** (3): 382-386.
- Torres, J.; Gracenea, M.; Gómez, M.S.; Arrizabalaga, A.; González-Moreno, O., 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology*, **92**: 253-260.
- Trotz-Williams, L.A.; Martin, D.S.; Gatei, W.; Cama, V.; Peregrine, A.S.; Martin, S.W., 2006. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research*, **99**: 346-352.
- Trotz-Williams, L.A.; Martin, S.W.; Leslie, K.E.; Duffield, T.; Nydam, D.V.; Peregrine, A.S., 2007. Calf-level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, **82** (1): 12-28.
- Trout, J.M.; Santín, M.; Fayer, R., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **37**: 141-144.
- Tumwine, J.K.; Kekitiinwa, A.; Nabukeera, N.; Akiyoshi, D.E.; Rich, S.M.; Widmer, G.; Feng, X.; Tzipori, S., 2003. *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mulago

- Hospital, Kampala, Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**: 710-715.
- Tyzzer, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **5** (1): 12-13.
- Tyzzer, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*, **26**: 394-412.
- Tzanidakis, N.; Sotiraki, S.; Claerebout, E.; Ehsan, A.; Voutzourakis, N.; Kostopoulou, D.; Stijn, C.; Vercruyssen, J.; Geurden, T., 2014. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheep and goats reared under dairy husbandry systems in Greece. *Parasite*, **21**: 45.
- Tzipori, S.A.U.L., 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews*, **47** (1): 84.
- Tzipori, S.; Angus, K.W.; Gray, E.W.; Campbell, I.; Allan, F., 1981. Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *American Journal of Veterinary Research*, **42** (8): 1400-1404.
- Tzipori, S., Smith, M., Halpin, C., Angus, K.W., Sherwood, D.; Campbell, I., 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *The Veterinary record*, **112** (6): 116-120.
- Ungar, B.L.; Gilman, R.H.; Lanata, C.F.; Pérez-Schael, I., 1988. Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. *Journal of Infectious Diseases*, **157**: 551-556.
- Ungar, B.L.; Mulligan, M.; Nutman, T.B., 1989. Serologic evidence of *Cryptosporidium* infection in US volunteers before and during Peace Corps service in Africa. *Archives of Internal Medicine*, **149**: 894-897.

- Utsi, L.; Smith, S.J.; Chalmers, R.M.; Padfield, S., 2016. Cryptosporidiosis outbreak in visitors of a UK industry-compliant petting farm caused by a rare *Cryptosporidium parvum* subtype: a case-control study. *Epidemiology and Infection*, **144** (5): 1000-1009.
- Valentiner-Branth, P.; Steinsland, H.; Fischer, T.K.; Perch, M.; Scheutz, F.; Dias, F.; Aaby, P.; Molbak, K.; Sommerfelt, H., 2003. Cohort study of Guinean children: incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk for enteropathogens during the first 2 years of life. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 4238-4245.
- Valigurová, A.; Hofmannová, L.; Koudela, B.; Vávra, J., 2007. An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54**: 495-510.
- Valigurová, A.; Paskerova, G.G.; Diakin, A.; Kováčiková, M.; Simdyanov, T.G., 2015. Protococcidian *Eleutheroschizon duboscqi*, an unusual apicomplexan inter-connecting gregarines and Cryptosporidia. *PLoS One*, **10** (4): e0125063.
- Van Dyke, M.I.; Ong, C.S.; Prystajecky, N.A.; Isaac-Renton, J.L.; Huck, P.M., 2012. Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. *Journal of Water and Health*, **10**: 311-323.
- 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.
- Vergara Castiblanco, C.A., 1999. *Estudio inmunológico de la cryptosporidiosis humana en Colombia*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
- Vergara, C.; Quílez, J., 2004. Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. *Revista MVZ Córdoba*, **9** (1): 363-372.

- Vetterling, J.M.; Jervis, H.R.; Merrill, T.G.; Sprinz, H., 1971. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus* with an emendation of the genus. *Journal of Protozoology*, **18**: 243-247.
- Vieira, P.M.; Mederle, N.; Lobo, M.L.; Imre, K.; Mederle, O.; Xiao, L.; Darabaus, G.; Matos, O., 2015. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* (Apicomplexa) in children and cattle in Romania. *Folia Parasitologica*, **62**: 002.
- Villacorta Martínez de Maturana, M.I., 1989. *Diagnóstico; incidencia y profilaxis de la cryptosporidiosis. Infecciones experimentales*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
- Villacorta, I.; Ares-Mazas, E.; Lorenzo, M.J., 1991. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Veterinary Parasitology*, **38**: 249-252.
- Waldron, L.S.; Dimeski, B.; Beggs, P.J.; Ferrari, B.C.; Power, M.L., 2011. Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, **77 (21)**: 7757-7765.
- Waltner-Toews, D.; Martin, S.W.; Meek, A.H.; McMillan, I., 1986a. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. I. The data. *Preventive Veterinary Medicine*, **4 (2)**: 103-124.
- Waltner-Toews, D.; Martin, S.W.; Meek, A.H., 1986b. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. II. Age and seasonal patterns. *Preventive Veterinary Medicine*, **4 (2)**: 125-135.
- Waltner-Toews, D.; Martin, S.W.; Meek, A.H., 1986c. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. III. Association of management with morbidity. *Preventive Veterinary Medicine*, **4 (2)**: 137-158.
- Waltner-Toews, D.; Martin, S.W.; Meek, A.H., 1986d. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein



- herds. IV. Association of management with mortality. *Preventive Veterinary Medicine*, **4 (2)**: 159-171.
- Wang, L.; Xiao, L.; Duan, L.; Ye, J.; Guo, Y.; Guo, M.; Liu, L.; Feng, Y., 2013a. Concurrent infections of *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, and *Clostridium difficile* in children during a cryptosporidiosis outbreak in a pediatric hospital in China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7 (9)**: e2437.
- Wang, L.; Zhang, H.; Zhao, X.; Zhang, L.; Zhang, G.; Guo, M.; Liu, L.; Feng, Y.; Xiao, L., 2013b. Zoonotic *Cryptosporidium* species and *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in HIV-positive patients on antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 557-563.
- Wang, R.; Qi, M.; Jingjing, Z.; Sun, D.; Ning, C.; Zhao, J.; Zhang, L.; Xiao, L., 2011a. Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. *Veterinary Parasitology*, **175 (1-2)**: 151-154.
- Wang, R.; Ma, G.; Zhao, J.; Lu, Q.; Wang, H.; Zhang, L.; Jian, F.; Ning, C.; Xiao, L., 2011b. *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult dairy cattle in China. *Parasitology International*, **60 (1)**: 1-4.
- Wang, R.; Li, G.; Cui, B.; Huang, J.; Cui, Z.; Zhang, S.; Dong, H.; Yue, D.; Zhang, L.; Ning, C.; Wang, M., 2014a. Prevalence, molecular characterization and zoonotic potential of *Cryptosporidium spp.* in goats in Henan and Chongqing, China. *Experimental Parasitology*, **142**: 11-16.
- Wang, R.; Zhang, L.; Axén, C.; Bjorkman, C.; Jian, F.; Amer, S.; Liu, A.; Feng, Y.; Li, G.; Lv, C.; Zhao, Z.; Qi, M.; Dong, H.; Wang, H.; Sun, Y.; Ning, C.; Xiao, L., 2014b. *Cryptosporidium parvum* IId family: clonal population and dispersal from Western Asia to other geographical regions. *Scientific Reports*, **4**: 4208.
- Wang, Y.; Feng, Y.; Cui, B.; Jian, F.; Ning, C.; Wang, R.; Zhang, L.; Xiao, L., 2010. Cervine genotype is the major

- Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitology Research*, **106** (2): 341-347.
- Ward, L.A.; Wang Y., 2001. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **41**: 37-42.
- Watanabe, Y.; Yang, C.H.; Ooi, H.K., 2005. *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan. *Parasitology Research*, **97** (3): 238-241.
- Wegayehu, T.; Karim, M.R.; Li, J.; Adamu, H.; Erko, B.; Zhang, L.; Tilahun, G., 2017. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* species and *Giardia duodenalis* in lambs in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. *BioMed Central Veterinary Research*, **13** (1): 22.
- Weitzel, T.; Dittrich, S.; Möhl, I.; Adusu, E.; Jelinek, T., 2006. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clinical Microbiology and Infection*, **12**: 656-659.
- Wells, B.; Shaw, H.; Hotchkiss, E.; Gilray, J.; Ayton, R.; Green, J.; Katzer, F.; Wells, A.; Innes, E., 2015. Prevalence, species identification and genotyping *Cryptosporidium* from livestock and deer in a catchment in the Cairngorms with a history of a contaminated public water supply. *Parasites and Vectors*, **8** (1): 66.
- Widmer, G.; Feng, X.; Tanriverdi, S., 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with microsatellite markers. *Methods in Molecular Biology*, **268**: 177-188.
- Wielinga, P.R.; de Vries, A.; Van der Goot, T.H.; Mank, T.; Mars, M.H.; Kortbeek, L. M.; van der Giessen, J.W., 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *International Journal for Parasitology*, **38** (7): 809-817.

- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of Cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, **124**: 80-89.
- Xiao, L.; Herd, R.P., 1994. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology*, **55 (3)**: 257-262.
- Xiao, L.; Cama, V., 2006. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In: Ortega, Y. R. (Ed.). *Foodborne Parasites*. New York: Springer Verlag.
- Xiao, L.; Fayer, R., 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, **38 (11)**: 1239-1255.
- Xiao, L., Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. Immunology and Medical Microbiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **52 (3)**: 309-323.
- Xiao, L.; Ryan, U.M., 2008. Molecular epidemiology. En: Fayer R., Xiao, L. (Eds). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press; Taylor and Francis Group; Boca Raton. pp 119-172.
- Xiao, L.; Herd, R.P.; Rings, D.M., 1993. Diagnosis of *Cryptosporidium* on a sheep farm with neonatal diarrhea by immunofluorescence assays. *Veterinary Parasitology*, **47 (1-2)**: 17-23.
- Xiao, L.; Bern, C.; Limor, J.; Sulaiman, I.; Roberts, J.; Checkley, W.; Cabrera, L.; Gilman, R.H.; Lal, A.A., 2001a. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, **183 (3)**: 492-497.
- Xiao, L.; Limor, J.; Bern, C.; Lal, A.A., 2001b. Epidemic Working Group. Tracking *Cryptosporidium parvum* by sequence analysis of small double-stranded RNA. *Emerging Infectious Diseases*, **7(1)**: 141-145.
- Xiao, L.; Sulaiman, I.M.; Ryan, U.M.; Zhou, L.; Atwill, E.R.; Tischler, M.L.; Zhang, X.; Fayer, R.; Lal, A.A., 2002a. Host adaptation and host-parasite coevolution in *Cryptosporidium*: implications

- for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, **32** (14): 1773-1785.
- Xiao, L.; Bern, C.; Arrowood, M.; Sulaiman, I.; Zhou, L.; Kawai, V.; Vivar, A.; Lal, A.A.; Gilman, R. H., 2002b. Identification of the *Cryptosporidium pig* genotype in a human patient. *The Journal of Infectious Diseases*, **185** (12): 1846-1847.
- Xiao, L.; Fayer, R.; Ryan, U.; Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**(1): 72-97.
- Xiao, L.; Zhou, L.; Santín, M.; Yang, W.; Fayer, R., 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. *Parasitology Research*, **100** (4): 701-706.
- Yang, R.; Jacobson, C.; Gordon, C.; Ryan, U., 2009. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in preweaned sheep in Australia. *Veterinary Parasitology*, **161** (1-2): 19-24.
- Yang, R.; Jacobson, C.; Gardner, G.; Carmichael, I.; Angus, J.D.; Campbell, A.J.; Ng-Hublin, J.; Ryan, U., 2014. Longitudinal prevalence; oocyst shedding and molecular characterisation of *Cryptosporidium* species in sheep across four states in Australia. *Veterinary Parasitology*, **200** (1-2): 50-58.
- Yang, R., Gardner, G.E., Ryan, U., Jacobson, C., 2015. Prevalence and pathogen load of *Cryptosporidium* and *Giardia* in sheep faeces collected from saleyards and in abattoir effluent in Western Australia. *Small Ruminant Research*, **130**: 216-220.
- Yang, X.Y.; Liu, Z.L.; Yang, L.R.; Ma, Z.Q.; Yan, Z.D., 2004. Primary investigation of bovine *Cryptosporidium* infestation in Huhhot region of Inner Mongolia. *China Journal Inner Mongolia Agricultural University*, **25**: 40-42.
- Ye, J.; Xiao, L.; Wang, Y.; Wang, L.; Amer, S.; Roellig, D.M.; Guo, Y.; Feng, Y., 2013. Periparturient transmission of *Cryptosporidium xiaoi* from ewes to lambs. *Veterinary Parasitology*, **197**: 627-633.

- You, X.; Arrowood, M.J.; Lejkowski, M.; Xie, L.; Schinazi, R.F.; Mead, J.R., 1996. A chemiluminescence immunoassay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* growth in vitro. *FEMS Microbiology. Letters*, **136**: 251-256.
- Zahedi, A.; Paparini, A.; Jian, F.; Robertson, I.; Ryan, U., 2016a. Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **5 (1)**: 88-109.
- Zahedi, A.; Monis, P.; Aucote, S.; King, B.; Paparini, A.; Jian, F.; Yang, R.; Oskam, C.; Ball, A.; Robertson, I.; Ryan, U., 2016b. Zoonotic *Cryptosporidium* species in animals inhabiting Sydney water catchments. *PloS one*, **11 (12)**: e0168169.
- Zhang, J., 2007. Investigation of *Cryptosporidium* infection in cattle in Qinghai Province. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, **43**: 36.
- Zhang, L.; Sheoran, A.S.; Widmer, G., 2009. *Cryptosporidium parvum* DNA replication in cell-free culture. *Journal of Parasitology*, **95**: 1239-1242.
- Zhang, W.; Shen, Y.; Wang, R.; Liu, A.; Ling, H.; Li, Y.; Cao, J.; Zhang, X.; Shu, J.; Zhang, L., 2012. *Cryptosporidium cuniculus* and *Giardia duodenalis* in rabbits: genetic diversity and possible zoonotic transmission. *PloS One*, **7**: e31262.
- Zhang, W.; Wang, R.; Yang, F.; Zhang, L.; Cao, J.; Zhang, X.; Ling, H.; Liu, A.; Shen, Y., 2013. Distribution and genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in Northeastern China's Heilongjiang Province. *PLoS One*, **8**: e54857.
- Zhang, X.X.; Tan, Q.D.; Zhou, D.H.; Ni, X.T.; Liu, G.X.; Yang, Y.C.; Zhu, X.Q., 2015. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle, northwest China. *Parasitology Research*, **114 (7)**: 2781-2787.

- Zhao, G.H.; Ren, W.X.; Gao, M.; Bian, Q.Q.; Hu, B.; Cong, M.M.; Lin, Q.; Wang, R.J.; Qi, M.; Qi, M.Z.; Zhu, X.Q.; Zhang, L.X., 2013. Genotyping *Cryptosporidium andersoni* in cattle in Shaanxi province, Northwestern China. *PLoS One*, **8** (4): e60112.
- Zhao, W.; Wang, R.; Zhang, W.; Liu, A.; Cao, J.; Shen, Y.; Yang, F.; Zhang, L., 2014. MLST subtypes and population genetic structure of *Cryptosporidium andersoni* from dairy cattle and beef cattle in northeastern China's Heilongjiang Province. *PLoS one*, **9** (7): e102006.
- Zhou, L.; Singh, A.; Jiang, J.; Xiao, L., 2003. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (11): 5254–5257.
- Zhou, L.; Fayer, R.; Trout, J.M.; Ryan, U.M.; Schaefer III, F.W.; Xiao, L., 2004. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (12): 7574-7577.
- Zhou, R.; Li, G.; Xiao, S.; Xia, Y.; Guo, Y., 2007. PCR amplification and sequence analyses of ITS-1 rDNA from *Cryptosporidium andersoni* in dairy cattle. *Parasitology Research*, **100** (5): 1135-1138.
- Ziegler, P.E.; Wade, S.E.; Schaaf, S.L.; Chang, Y.F.; Mohammed, H.O., 2007. *Cryptosporidium* spp. from small mammals in the New York City watershed. *Journal of Wildlife Diseases*, **43**: 586–96.
- Zintl, A.; Proctor, A.F.; Read, C.; Dewaal, T.; Shanaghy, N.; Fanning, S.; Mulcahy, G., 2009. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. *Epidemiology and Infection*, **137**: 270–277.

Zucatto, A.S.; Aquino, M.C.C.; Inácio, S.V.; Figueiredo, R.N.; Pierucci, J.C.; Perri, S.H.V.; Meireles, M.V.; Bresciani, K.D.S., 2015. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* spp. in lambs in the South Central region of the State of São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **67** (2): 441-446.

