



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA

***CRYPTOSPORIDIUM EN MOLUSCOS BIVALVOS***

**MEMORIA** que para optar al Grado de  
Doctor en Farmacia presenta

**Hipólito Gómez Couso**

**Santiago de Compostela, 2005**



M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás, Profesora Titular de Parasitología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**INFORMA:**

Que el trabajo de investigación titulado "***Cryptosporidium* en moluscos bivalvos**", que presenta el Licenciado en Farmacia D. Hipólito Gómez Couso para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Parasitología de este Departamento y, hallándose concluido, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 12 de diciembre de 2005

Fdo. M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás



Ana María Otero Casal, Profesora Titular de Microbiología y Secretaria del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado "***Cryptosporidium* en moluscos bivalvos**", que presenta el Licenciado en Farmacia D. Hipólito Gómez Couso para optar al Grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado bajo la dirección de la Prof. Dra. Dña M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás en el Laboratorio de Parasitología de este Departamento.

Y para que así conste y a los efectos oportunos expido el presente certificado en Santiago de Compostela, a 12 de diciembre de 2005.

Fdo. Ana María Otero Casal



*A mis padres, hermanos y a Vânia*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera hacer constar mi más sincero agradecimiento a la Prof. Dra. Dña. M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás por la dirección, apoyo permanente y horas de trabajo dedicadas a la elaboración de esta Tesis Doctoral, así como por su gran paciencia, entusiasmo y valiosos consejos.

Deseo expresar, también, mi afecto a la Dra. Dña. Rosario García Ramos por sus enseñanzas y orientación en un momento confuso de mi carrera profesional, brindándome la oportunidad de conocer a la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Elvira Ares Mazás.

Asimismo, deseo manifestar mi gratitud a todas aquellas personas e instituciones que de forma directa o indirecta hicieron posible la realización de este Trabajo, en especial:

A los Drs. D. Francisco Freire Santos, Dña. María Ortega Iñarrea, D. Fernando Méndez Hermida y D. José Antonio Castro Hermida, por su valiosa orientación y colaboración en los distintos estudios realizados.

A los Drs. D. Oscar García Martín y D. Jaime Martínez Urtaza, Director e Investigador, respectivamente, del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela, por facilitarnos las muestras de moluscos bivalvos y los datos correspondientes, haciendo extensivo mi agradecimiento a los demás miembros de la Unidad de Control de Moluscos del citado Instituto por la buena disposición mostrada en todo momento. Al Dr. D. Gustavo Hernández Córdova, también del mencionado Instituto, por su inestimable ayuda en el estudio histológico y por compartir sus conocimientos sobre la anatomía de los moluscos bivalvos.

A la Dra. Dña. Dorotea Martínez Patiño y a Dña. Justa Ojea Martínez del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (Lugo) y a Dña. M<sup>a</sup> Isabel Seoane Ramallo y D. Valentín Rodríguez Castro del Centro de Experimentación en Acuicultura de Couso (A Coruña), por suministrarnos las semillas de ostra y almeja con las que se llevaron a cabo los estudios de contaminación experimental. Al Dr. D. Arturo Silva Abuín por sus recomendaciones para el mantenimiento de los cultivos de microalgas.

También deseo agradecer a las distintas personas que amablemente me acogieron en sus laboratorios en los que tuve la oportunidad de realizar varias estancias muy

enriquecedoras, tanto profesional como personalmente: a las Profs. Dras. Dña. Isabel Fazendeiro y Dña. Isabel Fonseca del "Departamento de Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa"; a los Profs. Drs. D. Francisco Antunes y Dña. Olga Matos de la "Unidade de Protozoários Oportunistas, VIH e outras Protozooses, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa" y a los Drs. D. Jim McLauchlin, Dña. Corinne Amar y Dña. Kathie Grant del "Food Safety Microbiology Laboratory, Centre for Infections, Health Protection Agency" (Londres). De igual forma, quiero dar las gracias a los restantes miembros de los equipos de investigación de las personas anteriormente nombradas y a todas aquéllas que, gracias a estas estancias, tuve la ocasión de conocer y compartir muy buenos momentos, especialmente a los residentes en el Hospital de Colindale (Londres).

A la Prof. Dra. Dña. Esperanza Paniagua Crespo, por su constante disposición en la resolución de las dudas que nos fueron surgiendo a medida que redactábamos esta Memoria y al Dr. D. Román Vilas Peteiro, por su inestimable asesoramiento en cuestiones genéticas.

A los Señores propietarios de las granjas por su desinteresada colaboración en los muestreos realizados para la obtención de los aislados ooquisticos. Al personal responsable de las estaciones de tratamiento de agua potable, de depuración de aguas residuales y de las redes de alcantarillado de los distintos municipios de las Rías Baixas, por permitir y colaborar en la recogida de muestras durante la realización de los estudios de contaminación natural por *Cryptosporidium* y *Giardia* en zonas de cultivo de moluscos bivalvos.

A las empresas Aureon BioSystems GmbH (Viena) y Hortas Suministros S.L. (Santiago de Compostela) por suministrarnos, de forma desinteresada, el instrumental y los reactivos utilizados en la técnica de inmunoseparación magnética empleada en los análisis de las muestras ambientales.

A D. Ángel Oteiza López, Dña. Yolanda González Losada y Dña. María Rodríguez Velasco; a los profesores del Departamento de Microbiología y Parasitología; a los técnicos y demás compañeros, por la ayuda prestada y buenos momentos compartidos.

Por último, y no por ello menos importante, quisiera agradecer a mi familia su enorme paciencia y por animarme siempre a seguir adelante y, también, a Vânia, por su ayuda, apoyo y motivación en la última fase de este Trabajo, que han sido esenciales para mí.

Esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiada por el Proyecto de Investigación titulado "Control sanitario de *Cryptosporidium* en moluscos bivalvos de consumo" subvencionado por la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica del Ministerio de Educación y Cultura, Plan Nacional de I+D (1FD97-1718).

Durante su realización, D. Hipólito Gómez Couso disfrutó de una beca de postgrado del Programa Nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y de los beneficios complementarios del citado Programa (2001-2005).



---

LOS RESULTADOS DE ESTA MEMORIA SE HAN PUBLICADO O SE ENCUENTRAN EN PROCESO DE PUBLICACIÓN, CONSTITUYENDO LOS SIGUIENTES ARTÍCULOS:

**Freire-Santos, F.; Gómez-Couso, H.; Ortega-Iñarrea, M.R.; Castro-Hermida, J.A.; Oteiza-López, A.M.; García-Martín, O. y Ares-Mazás, M.E. 2002.** Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). *Parasitology Research*, **88**: 130-133.

**Gómez-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Ortega-Iñarrea, M.R.; Castro-Hermida, J.A. y Ares-Mazás, M.E. 2003.** Environmental dispersal of *Cryptosporidium parvum* oocysts and cross transmission in cultured bivalve molluscs. *Parasitology Research*, **90**: 140-142.

**Gómez-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Martínez-Urtaza, J.; García-Martín, O. y Ares-Mazás, M.E. 2003.** Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *International Journal of Food Microbiology*, **87**: 97-105.

**Gómez-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Amar, C.F.L.; Grant, K.A.; Williamson, K.; Ares-Mazás, M.E. y McLauchlin, J. 2004.** Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, **91**: 279-288.

**Gómez-Couso, H.; Freire-Santos, F.; Hernández-Córdova, G.A. y Ares-Mazás, M.E. 2005.** A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *International Journal of Food Microbiology*, **102**: 57-62.

**Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A. y Ares-Mazás, E. 2005.** Occurrence of *Giardia* cysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) destined for human consumption. *Journal of Food Protection*, **68**: 1702-1705.

**Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A. y Ares-Mazás, E. 2005.** *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Veterinary Parasitology*, **133**: 13-18.

**Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A. y Ares-Mazás, E. 2005.** *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *Journal of Food Protection* (en prensa).

**Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A. y Ares-Mazás, E. 2005.** Cooking mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by steam does not destroy the infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Food Protection* (en prensa).

**Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F. y Ares-Mazás, E. 2005.** Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods (sometido).

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO .....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	5
1. LAS RÍAS GALLEGAS .....	7
2. LOS MOLUSCOS BIVALVOS: ALGUNOS ASPECTOS DE SU BIOLOGÍA .....	10
<b>2.1. Generalidades anatómicas y fisiológicas</b> .....	11
<b>2.2. Alimentación y digestión</b> .....	16
3. PRODUCCIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS.....	18
<b>3.1. Importancia socio-económica</b> .....	18
<b>3.2. Cultivo de mejillón</b> .....	20
<b>3.3. Cultivo de ostra</b> .....	22
<b>3.4. Producción de almeja y berberecho</b> .....	24
4. INFECCIONES ASOCIADAS CON EL CONSUMO DE MOLUSCOS BIVALVOS. ....	25
<b>4.1. Infecciones de etiología vírica</b> .....	27
<b>4.2. Infecciones de etiología bacteriana</b> .....	29
<b>4.3. Potenciales infecciones de etiología parasitaria</b> .....	30
5. CONTROLES SANITARIOS DURANTE LA PRODUCCIÓN Y PROCESADO DE MOLUSCOS BIVALVOS VIVOS.....	33
<b>5.1. Clasificación de las zonas de producción</b> .....	34
<b>5.2. Depuración de moluscos bivalvos</b> .....	36
6. CRYPTOSPORIDIOSIS Y SALUD PÚBLICA .....	38
<b>6.1. Agente etiológico</b> .....	38
<b>6.2. Consideraciones epidemiológicas</b> .....	43
6.2.1. Distribución y prevalencia .....	43
6.2.2. Dosis infectante .....	44
6.2.3. Resistencia de los ooquistes a las condiciones ambientales.....	45
6.2.4. Rutas de transmisión.....	48
<b>6.3. La parasitosis en el hombre</b> .....	53

6.3.1. Fundamentos patogénicos y manifestaciones clínicas .....	53
6.3.2. Situación actual del tratamiento y control .....	57
MATERIAL Y MÉTODOS .....	61
1. <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. ....	63
<b>1.1. Obtención de aislados ooquisticos</b> .....	63
<b>1.2. Determinación de la viabilidad ooquistica</b> .....	64
1.2.1. Técnica de inclusión/exclusión de colorantes vitales fluorogénicos .....	64
1.2.2. Bioensayos en ratón .....	65
<b>1.3. Detección en muestras de moluscos bivalvos</b> .....	65
1.3.1. Técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) .....	66
1.3.2. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	66
<b>1.4. Caracterización molecular</b> .....	68
1.4.1. Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (técnica de RFLP) .....	68
1.4.2. Secuenciación del ADN .....	68
<b>1.5. Análisis estadístico</b> .....	69
2. ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN NATURAL .....	70
<b>2.1. Detección y determinación de la viabilidad ooquistica de <i>Cryptosporidium</i> spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano</b> .....	70
2.1.1. Muestras .....	70
2.1.2. Detección y determinación de la viabilidad ooquistica .....	70
<b>2.2. Determinación de los niveles de detección de ooquistes de <i>C. parvum</i> en moluscos bivalvos mediante las técnicas de IFD y PCR</b> .....	71
2.2.1. Evaluación de la técnica de IFD .....	71
2.2.2. Evaluación de la técnica de PCR .....	72
<b>2.3. Caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano</b> .....	73
2.3.1. Muestras .....	73
2.3.2. Técnicas moleculares .....	74
<b>2.4. <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en zonas de cultivo de moluscos bivalvos</b> .....	74
2.4.1. Muestras ambientales .....	75

2.4.2. Muestras biológicas .....	78
2.4.3. Detección de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. y de quistes de <i>Giardia</i> spp.....	78
2.4.4. Identificación de especies/genotipos de <i>Cryptosporidium</i> .....	78
3. ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL .....	78
<b>3.1. Supervivencia de <i>C. parvum</i> en dos especies de moluscos bivalvos: <i>O. edulis</i> y <i>T. decussatus</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>3.2. <i>C. parvum</i> en <i>T. decussatus</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>3.3. Transmisión de <i>C. parvum</i> entre especies de moluscos bivalvos .....</b>	<b>81</b>
<b>3.4. ¿Es <i>Cryptosporidium</i> infectante después de cocinar los mejillones al vapor? .....</b>	<b>82</b>
RESULTADOS .....	87
1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN NATURAL .....	89
<b>1.1. Detección y determinación de la viabilidad ooquistica de <i>Cryptosporidium</i> spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano.....</b>	<b>89</b>
<b>1.2. Determinación de los niveles de detección de ooquistes de <i>C. parvum</i> en moluscos bivalvos mediante las técnicas de IFD y PCR.....</b>	<b>93</b>
1.2.1. Evaluación de la técnica de IFD.....	93
1.2.2. Evaluación de la técnica de PCR.....	94
<b>1.3. Caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano .....</b>	<b>96</b>
<b>1.4. <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en zonas de cultivo de moluscos bivalvos.....</b>	<b>102</b>
1.4.1. Detección de <i>Cryptosporidium</i> spp. y <i>Giardia</i> spp. en muestras ambientales y biológicas procedentes de las Rías Baixas .....	102
1.4.2. Identificación de especies/genotipos de <i>Cryptosporidium</i> .....	105
2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL.....	106
<b>2.1. Supervivencia de <i>C. parvum</i> en dos especies de moluscos bivalvos: <i>O. edulis</i> y <i>T. decussatus</i> .....</b>	<b>106</b>
<b>2.2. <i>C. parvum</i> en <i>T. decussatus</i> .....</b>	<b>107</b>
<b>2.3. Transmisión de <i>C. parvum</i> entre especies de moluscos bivalvos .....</b>	<b>112</b>
<b>2.4. ¿Es <i>Cryptosporidium</i> infectante después de cocinar los mejillones al vapor? .....</b>	<b>113</b>
DISCUSIÓN .....	115

---

CONCLUSIONES.....	133
BIBLIOGRAFÍA .....	137
RESUMEN.....	177
APÉNDICE .....	183

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BOE</b>	Boletín Oficial del Estado
<b>CF</b>	Coliformes fecales
<b>COWP</b>	Proteína de la pared del ooquiste de <i>Cryptosporidium</i>
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>Di</b>	Dosis infectante
<b>DIC</b>	Contraste diferencial de interferencia
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>DOCE</b>	Diario Oficial de la Comunidad Europa
<b>DWI</b>	Drinking Water Inspectorate
<b>EDAR</b>	Estación depuradora de aguas residuales
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ETAP</b>	Estación de tratamiento de aguas potables
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<b>FISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
<b>FOM</b>	Orgánulo alimentador de membrana
<b>HAART</b>	Terapia antirretroviral altamente activa
<b>HBSS</b>	Solución balanceada de Hanks
<b>IFD</b>	Inmunofluorescencia directa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IMS</b>	Inmunoseparación magnética
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>JACUMAR</b>	Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>NMP</b>	Número más probable
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pi</b>	Post-inoculación
<b>RAE</b>	Real Academia Española
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

<b>TAE</b>	Tampón tris-acetato-EDTA
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil)-aminoetano
<b>UCM</b>	Unidad de Control de Moluscos
<b>UNF</b>	Unidades nefelométricas
<b>USEPA</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>vs</b>	Versus
<b><math>\chi^2</math></b>	Test de chi-cuadrado

## ÍNDICE DE FIGURAS

**FIGURA 1.** Localización geográfica de las rías gallegas (clasificación de Torre Enciso, 1954, 1958). (pág. 9)

**FIGURA 2.** Anatomía interna de la almeja *T. decussatus* (cortesía del Dr. Hernández Córdova). (pág. 13)

**FIGURA 3.** Cultivo de mejillón *M. galloprovincialis*. (pág. 21)

**FIGURA 4.** Cultivo de ostras. (pág. 23)

**FIGURA 5.** Producción en parques de cultivo de almejas y berberechos (obtenidas de Pérez Camacho, 1992b). (pág. 25)

**FIGURA 6.** Representación esquemática del ciclo biológico de *C. parvum* (adaptado de Smith y Rose, 1998). (pág. 41)

**FIGURA 7.** Representación gráfica de las potenciales rutas de transmisión de la cryptosporidiosis. (pág. 49)

**FIGURA 8.** Diseño experimental aplicado para establecer el nivel de detección de ooquistes de *C. parvum* en moluscos bivalvos mediante la técnica de IFD. (pág. 71)

**FIGURA 9.** Diseño experimental aplicado para establecer el nivel de detección de ooquistes de *C. parvum* en moluscos bivalvos mediante la técnica de PCR. (pág. 73)

**FIGURA 10.** Rías Baixas: localización geográfica de los puntos de muestreo. (pág. 77)

**FIGURA 11.** Diseño experimental aplicado en el estudio de transmisión de ooquistes de *C. parvum* entre especies de moluscos bivalvos. (pág. 83)

**FIGURA 12.** Contaminación experimental de semillas de moluscos bivalvos con ooquistes de *C. parvum*. (pp. 84-85)

**FIGURA 13.** Evolución anual de la contaminación por *Cryptosporidium* spp. en muestras de moluscos bivalvos destinados al consumo humano. (pág. 92)

**FIGURA 14.** Geles de agarosa mostrando la ausencia de inhibición de la técnica de PCR en el ADN extraído de mejillones (*M. galloprovincialis*). (pág. 94)

**FIGURA 15.** Resultados obtenidos mediante la técnica de PCR aplicada a sedimentos de mejillones (*M. galloprovincialis*) experimentalmente contaminados con ooquistes purificados de *C. parvum*. (pág. 95)

**FIGURA 16.** Resultados de la técnica de RFLP aplicada a fragmentos del gen COWP amplificados a partir de moluscos bivalvos naturalmente contaminados. (pág. 97)

**FIGURA 17.** Resultados de la técnica de RFLP aplicada a fragmentos del gen COWP resultantes de la clonación de las muestras M23 y M25. (pág. 98)

**FIGURA 18.** Comparación entre las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de aislados de *Cryptosporidium* procedentes de moluscos bivalvos naturalmente contaminados y las secuencias AF266273 (*C. parvum*) y AF481960 (*C. hominis*) depositadas en el GenBank. (pág. 100)

**FIGURA 19.** Árbol filogenético, obtenido mediante el método de Neighbour-Joining a partir de la secuencia nucleotídica diana del gen COWP, en el que se muestran las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* detectados en moluscos bivalvos y otras especies y genotipos pertenecientes al género. (pág. 101)

**FIGURA 20.** Evolución comparativa entre la contaminación por *Cryptosporidium* y *Giardia* en muestras biológicas y las precipitaciones registradas durante el período de estudio. (pág. 104)

**FIGURA 21.** Resultados de la técnica de RFLP aplicada a fragmentos del gen COWP amplificados a partir de muestras ambientales y biológicas. (pág. 105)

**FIGURA 22.** Evolución de la viabilidad ooquistica de *C. parvum* en semillas de ostra (*O. edulis*) y almeja (*T. decussatus*). (pág. 107)

**FIGURA 23.** Branquias de semillas de almeja *T. decussatus* experimentalmente contaminadas con ooquistes de *C. parvum*. (pág. 109)

**FIGURA 24.** Estómago y hepatopáncreas de semillas de almeja *T. decussatus* experimentalmente contaminadas con ooquistes de *C. parvum*. (pág. 110)

**FIGURA 25.** Intestino de semillas de almeja *T. decussatus* experimentalmente contaminadas con ooquistes de *C. parvum*. (pág. 111)

**FIGURA 26.** Evolución de la temperatura interna de los mejillones durante el proceso de cocinado al vapor. (pág. 114)

## ÍNDICE DE TABLAS

**TABLA 1.** Especies de moluscos bivalvos de interés comercial que se producen en Galicia. (pág. 19)

**TABLA 2.** Especies de moluscos bivalvos naturalmente contaminadas por *Cryptosporidium* spp. (pág. 32)

**TABLA 3.** Condiciones que deben reunir los moluscos bivalvos destinados al consumo humano inmediato [BOE (núm. 86) de 10 de abril de 1999]. (pág. 34)

**TABLA 4.** Clasificación de las zonas de producción de moluscos bivalvos de acuerdo con su calidad microbiológica. (pág. 35)

**TABLA 5.** Especies del género *Cryptosporidium* actualmente reconocidas. (pág. 39)

**TABLA 6.** Efecto de diversos factores ambientales sobre la viabilidad/infectividad de ooquistes de *C. parvum*. (pág. 46)

**TABLA 7.** Moléculas implicadas en las interacciones iniciales parásito-célula hospedadora en la infección por *C. parvum*. (pág. 55)

**TABLA 8.** Algunos datos sobre la geografía física de las Rías Baixas. (pág. 75)

**TABLA 9.** Contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos destinados al consumo humano. (pág. 90)

**TABLA 10.** Contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos procedentes de Galicia (España) y de otros países pertenecientes a la Unión Europea. (pág. 90)

**TABLA 11.** Tiempos de depuración y contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos destinados al consumo humano. (pág. 91)

**TABLA 12.** Contaminación por *Cryptosporidium* spp. en muestras de moluscos bivalvos clasificadas de acuerdo con los estándares de la Unión Europea. (pág. 92)

**TABLA 13.** Resultados de la técnica de IFD aplicada sobre sedimentos de mejillones (*M. galloprovincialis*) experimentalmente contaminados con ooquistes purificados de *C. parvum*. (pág. 93)

**TABLA 14.** Investigación de la existencia de inhibidores de la técnica de PCR en la detección de *C. parvum* en mejillones (*M. galloprovincialis*). (pág. 94)

**TABLA 15.** Detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras de moluscos bivalvos mediante las técnicas de IFD y PCR. (pág. 96)

**TABLA 16.** Relación entre los resultados obtenidos mediante las técnicas de IFD y PCR en la detección de *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos. (pág. 97)

**TABLA 17.** Caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* spp. obtenidos en muestras de moluscos bivalvos. (pág. 99)

**TABLA 18.** Detección mediante la técnica de IFD de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en muestras ambientales y biológicas procedentes de las Rías Baixas. (pág. 102)

**TABLA 19.** Contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de muestras ambientales y biológicas recogidas en zonas de cultivo de moluscos bivalvos (Rías Baixas). (pág. 103)

**TABLA 20.** Contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de muestras biológicas clasificadas de acuerdo con la calidad microbiológica de la zona de cultivo. (pág. 103)

**TABLA 21.** Contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de muestras biológicas clasificadas de acuerdo con su calidad microbiológica. (pág. 104)

**TABLA 22.** Localización de ooquistes de *C. parvum* en distintos tejidos de almejas (*T. decussatus*) experimentalmente contaminadas. (pág. 108)

**TABLA 23.** Transmisión experimental de ooquistes de *C. parvum* entre dos especies de moluscos bivalvos (*O. edulis* y *T. decussatus*). (pág. 113)

**TABLA 24.** Efecto del vapor sobre la infectividad de ooquistes de *C. parvum* recuperados de mejillones (*M. galloprovincialis*) experimentalmente contaminados. (pág. 114)

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO



La producción mundial de moluscos bivalvos ha experimentado un notable incremento en los últimos años debido a la creciente demanda de estos productos alimenticios. Las peculiaridades oceanográficas de la costa gallega y su elevada riqueza en nutrientes convierten a las rías gallegas en un modelo de ecosistema marino altamente productivo cuyas aguas ofrecen unas excelentes condiciones para el desarrollo de organismos de interés comercial, entre los que se incluyen diversas especies de moluscos bivalvos. En Galicia se concentra más del 95% de la producción española, correspondiendo aproximadamente el 98% al cultivo de mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Evidentemente, la producción y comercialización de moluscos bivalvos constituye un sector estratégico para la economía de la Comunidad Autónoma de Galicia.

El consumo de moluscos bivalvos, tradicionalmente crudos o poco cocinados, está frecuentemente relacionado con el desencadenamiento de cuadros de gastroenteritis, ya que estos organismos, al alimentarse mediante procesos de filtración, concentran contaminantes tanto bióticos como abióticos. Las áreas de cultivo de estos moluscos suelen localizarse en zonas intermareales o próximas a la costa, que en el caso de Galicia están densamente pobladas. La contaminación microbiológica de las aguas litorales se debe principalmente a la emisión directa de residuos urbanos, ganaderos e industriales. Como consecuencia, existe una estricta legislación que establece las normas técnico-sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los moluscos bivalvos vivos destinados al consumo humano directo o a la transformación previa a su consumo.

Las infecciones relacionadas generalmente con la ingestión de moluscos bivalvos son de origen bacteriano y/o vírico. Sin embargo, ciertos protozoos parásitos entéricos, como *Cryptosporidium* y *Giardia*, responsables de importantes brotes de transmisión hídrica, son actualmente considerados como potenciales agentes patógenos transmisibles a través de estos alimentos. La cryptosporidiosis es una infección cosmopolita producida por especies del género *Cryptosporidium* que afectan al hombre y a un gran número de animales vertebrados. Las formas infectantes, los ooquistes, se eliminan en grandes cantidades en las heces de los individuos parasitados durante la fase aguda de la infección, presentan un pequeño tamaño (4-8  $\mu\text{m}$ ), son resistentes a las condiciones ambientales y a

los desinfectantes habitualmente empleados, la dosis mínima infectante es muy baja y en la actualidad no existe un tratamiento específico para la infección.

Las enfermedades transmitidas por alimentos no sólo tienen importancia desde el punto de vista de la salud pública, ya que suelen manifestarse como brotes, sino que también pueden provocar una desmedida alarma social y el consiguiente impacto económico, siendo responsabilidad de las autoridades competentes promover las medidas necesarias que garanticen a la población el consumo de alimentos salubres.

El objetivo del presente trabajo de investigación es contribuir al establecimiento de las bases científico-técnicas que permitan garantizar la calidad y la seguridad de los moluscos bivalvos destinados al consumo humano, determinando para ello el papel que desempeñan estos organismos en la transmisión de la cryptosporidiosis.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## 1. LAS RÍAS GALLEGAS

Galicia, región geográfica situada en el extremo noroccidental de la Península Ibérica, presenta hacia el océano Atlántico 1692 km de costa que se extienden a lo largo de dos grados de latitud (225 km), desde la desembocadura del río Eo (43° 35' N, 7° 01' O) hasta la del río Miño (41° 52' N, 8° 52' O), siendo el cabo de Estaca de Bares (43° 47' N, 7° 41' O) el punto más septentrional. De este a oeste abarca, aproximadamente, dos grados de longitud (185 km) hasta el cabo Touriñán (43° 3' N, 9° 18' O). La plataforma continental gallega, entendiendo como tal la zona costera hasta los 200 m de profundidad, es relativamente estrecha, con una anchura que oscila entre 25-35 km y una superficie total estimada de 10000 km<sup>2</sup> (Penas, 1986). Una particularidad de la costa gallega es la existencia de numerosas rías, fenómenos geológicos existentes en escasos lugares del planeta (Irlanda, China, Francia) (Instituto Gallach, 1994, 1994a).

El término ría tiene un origen relativamente lejano en el tiempo, figurando ya en la edición de 1495 del vocabulario español-latino de Elio Antonio de Nebrija en el que equivale a "puerto de río o fluvial", del latín *ostium fluminis* (Nebrija, 1951). Sin embargo, la adopción de este vocablo en el lenguaje científico data de finales del siglo XIX, siendo propuesto en 1886 por el alemán Von Richthofen para describir un tipo de costa caracterizada por la existencia de un valle ocupado por el mar (Von Richthofen, 1886). Desde entonces, el empleo de esta palabra se ha extendido hasta su inclusión en 1970 en el Diccionario de la Lengua Española de la Real Academia Española (RAE), cuyo significado es "penetración que forma el mar en la costa, debida a la sumersión de la parte litoral de una cuenca fluvial de laderas más o menos abruptas". Tiene una segunda acepción: "ensenada amplia en la que vierten al mar aguas profundas" (RAE, 1970).

Las rías gallegas son, por lo tanto, antiguos valles por los que discurría un cauce fluvial y que, como consecuencia de una serie de procesos tectónicos, fueron invadidos por aguas marinas. Ante el origen fluvial del valle, actualmente ocupado por el mar, el antiguo cauce del río, relleno de sedimentos, se localiza longitudinalmente en el centro de las rías, en donde se detecta la mayor profundidad. Aunque se dispone de importantes estudios en

los campos de oceanografía geológica y geología marina, todavía existe una problemática con respecto al origen y evolución de las rías gallegas (Méndez y Rey, 2000).

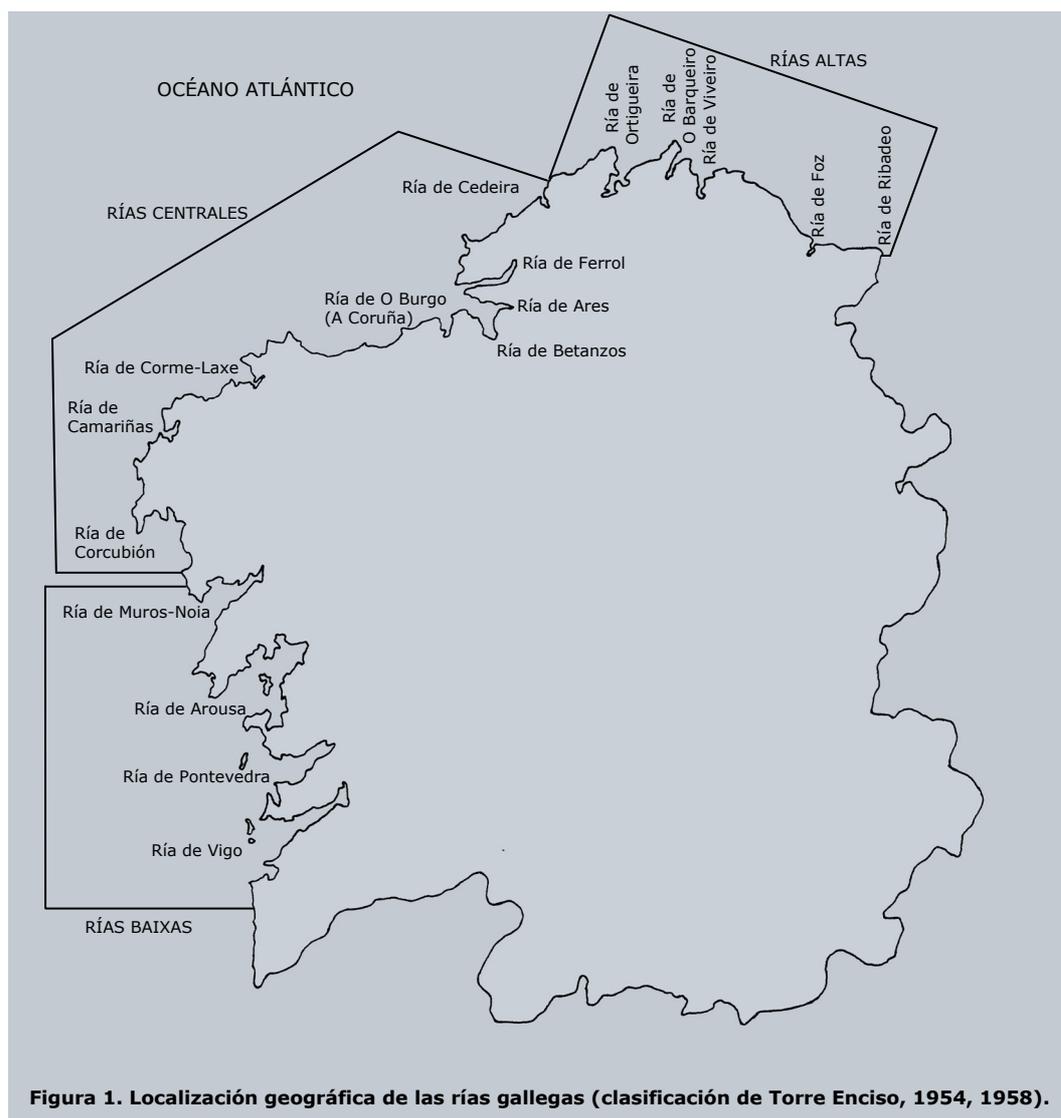
Diversos criterios (origen, desarrollo, orientación...) se utilizaron para la clasificación de las rías gallegas, siendo la propuesta por Torre Enciso (1954, 1958) (Figura 1) una de las consideradas válidas por expertos en el tema (Méndez y Rey, 2000):

- i) Rías del bloque septentrional o Rías Altas en sentido estricto: rías de Ribadeo, Foz, Viveiro, O Barqueiro y Ortigueira.
- ii) Rías enclavadas en los bordes de la penillanura que se extiende por el noroeste gallego y denominadas Rías Centrales: rías de Cedeira, el conjunto lobulado del seno coruñés (Ferrol, Ares, Betanzos y O Burgo), Corme-Laxe, Camariñas y Corcubión.
- iii) Rías del bloque suroccidental o Rías Baixas: rías de Muros-Noia, Arousa, Pontevedra y Vigo.

Las variaciones hidrográficas que se producen en las rías están influenciadas por diversos factores como son: el vertido de los ríos; la amplitud de las mareas; la profundidad; la forma de la costa; la topografía del fondo; las condiciones climáticas; y el régimen de vientos. Además, es necesario considerar que la capa de agua oceánica no permanece invariable sino que a lo largo del año presenta oscilaciones influenciadas por el giro anticiclónico del Atlántico Norte, consecuencia del movimiento rotacional de la Tierra (Corral, 1992).

En todas las rías existe un fenómeno de circulación estuárica que básicamente consiste en una entrada por la parte interior de agua dulce procedente del aporte fluvial y una penetración de agua oceánica desde la boca de la ría. El agua dulce del río, por su menor densidad, fluye superficialmente y se mezcla con el agua salada a medida que avanza hacia la boca de la ría, saliendo principalmente por la orilla norte. Esta circulación hacia el océano se compensa por la entrada de agua marina desde el fondo de la ría que se va mezclando verticalmente con el agua superficial que sale. Este modelo de circulación de agua se conoce con el nombre de circulación estuárica positiva (Corral, 1992).

Por otra parte, este tipo de circulación del agua provoca oscilaciones opuestas entre los niveles de salinidad existentes en la superficie y en el fondo de las rías. La capa de agua superficial, de un espesor de 3-4 m, puede registrar valores muy bajos de salinidad dependiendo del caudal de los ríos, del viento existente y de la pluviosidad [la mayor parte de la costa gallega registra anualmente precipitaciones abundantes y superiores a 1300 mm



(Carballeira y col., 1983)]. Por debajo de esta capa superficial, se encuentran aguas con valores de salinidad similares a los oceánicos (35-35,5‰) (Corral, 1992).

La concentración de oxígeno disuelto en el agua de las rías disminuye con la profundidad. Los niveles de este gas pueden incrementarse por la acción de los vientos; las corrientes; las disminuciones de la temperatura y la salinidad; la actividad fotosintética del fitoplancton; y la proliferación de algas. Sin embargo, en ciertos fondos con exceso de materia orgánica puede existir un déficit de oxígeno, limitando el tipo de organismo que

habita en estas zonas. Con respecto a la temperatura, el agua de las rías gallegas no experimenta grandes variaciones a lo largo del año. Las temperaturas mínimas invernales suelen oscilar entre los 10-12°C y las máximas, alcanzadas a finales del verano, varían entre los 18-20°C (Corral, 1992).

Como consecuencia de las características oceanográficas de la costa gallega se produce un fenómeno conocido con el nombre de afloramiento marino, asociado con importantes áreas de pesca y consistente en el ascenso de capas de agua profundas a la superficie. En el afloramiento que se origina frente al litoral gallego, las aguas que ascienden proceden de al menos 200 m de profundidad y, cuando se aproximan a la costa, invaden las rías entrando por el fondo. Se trata de aguas frías y ricas en nutrientes, necesarios para el desarrollo del fitoplancton, primer eslabón de la cadena trófica en el mar. El afloramiento se produce por una serie de factores que actúan de forma conjunta, siendo el más importante el giro anticiclónico del Atlántico Norte centrado en las islas Azores (anticiclón de las Azores) que afecta a Galicia con vientos de componente norte que empujan las aguas cercanas a la costa hacia el océano y favorecen el ascenso de aguas profundas. En el litoral gallego, el afloramiento comienza a manifestarse en el mes de mayo para alcanzar en agosto su punto culminante y desaparecer prácticamente a finales de octubre. De esta forma y coincidiendo con los ciclos estacionales de luz, de abundancia de nutrientes disueltos y de una temperatura adecuada, se favorece la existencia de una elevada producción primaria con ciclos que se repiten anualmente. Además, los aportes procedentes de las aguas fluviales y de escorrentía junto con el reciclado natural de nutrientes, son factores importantes en el mantenimiento de esta extraordinaria producción primaria. Por tanto, las rías gallegas constituyen un modelo de ecosistema marino altamente productivo, cuyas aguas ofrecen unas excelentes condiciones para el desarrollo de organismos de interés comercial entre los que se incluyen diversas especies de moluscos bivalvos (Figueiras y col., 2002).

## 2. LOS MOLUSCOS BIVALVOS: ALGUNOS ASPECTOS DE SU BIOLOGÍA

El phylum Mollusca consta de aproximadamente 50000 especies descritas, de las cuales alrededor de 30000 habitan en ambientes marinos. La clase Bivalvia, una de las seis que componen el phylum, incluye unas 7500 especies caracterizadas porque su cuerpo está en el interior de una concha formada por dos valvas unidas mediante un ligamento elástico. Aparte del propio interés zoológico, esta clase es importante porque algunos de sus representantes forman parte de la cadena alimentaria humana (Gosling, 2003). De esta

forma, la producción mundial de moluscos bivalvos derivada de la pesca y de la acuicultura fue superior a los 15 millones de toneladas en el año 2003 (FAO, 2005).

### 2.1. Generalidades anatómicas y fisiológicas

Los moluscos bivalvos son organismos comprimidos lateralmente, con simetría bilateral y carentes de esqueleto interno. Su cuerpo se encuentra protegido por una concha constituida por dos valvas, generalmente simétricas y unidas mediante un ligamento y una charnela (articulación en la que los dientes de una valva penetran en la cavidad de la otra). El carbonato cálcico es el principal componente de la concha, que se forma a partir del depósito de cristales de esta sal sobre una matriz orgánica constituida por la proteína conquiolina. En realidad, cada una de las valvas consta de tres capas: la más externa, compuesta por conquiolina, presenta frecuentemente un espesor reducido como consecuencia de abrasiones mecánicas, presencia de parásitos...; una capa intermedia prismática constituida por aragonita o calcita, formas cristalinas de carbonato cálcico, y una capa interna calcárea, de aspecto nacarado, opaco o iridiscente. En la Figura 2 se muestran las principales estructuras internas de un molusco bivalvo representado por la especie de almeja *Tapes decussatus*.

La **concha** de estos moluscos actúa como esqueleto para la unión de los músculos, protege al organismo frente a predadores y, en especies bentónicas, contribuye a evitar la penetración de arena o fango en la cavidad paleal. El color, la forma y las características superficiales y ornamentales de las valvas varían notablemente entre los diferentes grupos de bivalvos, por lo que estos caracteres se utilizan para la identificación de las especies (Montero, 1971).

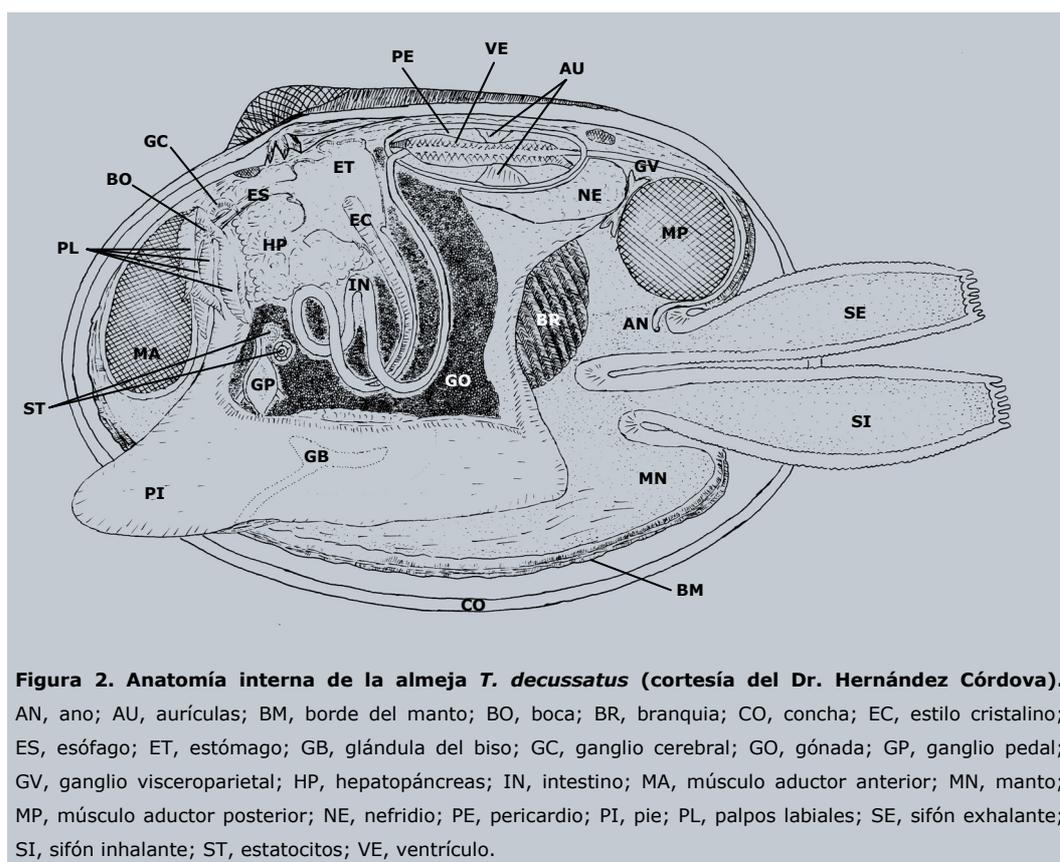
El **manto**, constituido por tejido conjuntivo, forma dos lóbulos que envuelven los órganos internos, dejando un espacio o cavidad denominada cavidad del manto o cámara paleal. Los márgenes del manto se extienden formando tres pliegues: uno externo, próximo a la concha y relacionado con la secreción de la valva, uno intermedio, con función sensorial, y el interno, de naturaleza muscular, que controla el flujo de agua en la cámara paleal. Además, los bordes del manto presentan unas prolongaciones que se entrelazan al abrir las valvas, constituyendo una especie de filtro que impide la entrada de partículas de gran tamaño. El manto posee en la región ventral una abertura inhalante por donde entra el agua y un orificio exhalante por donde la expulsa, previa captación del oxígeno disuelto y de las partículas que servirán de alimento. En algunas especies bentónicas, el manto presenta modificaciones formando habitualmente dos prolongaciones tubulares retráctiles

denominadas sifones. Éstos pueden estar separados o parcialmente soldados, presentando en su extremo numerosos tentáculos.

Sobre la línea medio ventral y situado por debajo de la masa visceral, se observa un órgano de naturaleza muscular, el **pie**, cuya forma típica es de lengua o de hacha. El pie alcanza su máximo desarrollo en los moluscos excavadores, a los que sirve tanto para desplazarse sobre el fondo como para enterrarse en él. Numerosas especies presentan en el extremo posterior del pie la glándula bisógena encargada de segregar el biso, término que hace referencia a un conjunto de filamentos de naturaleza proteica terminados en un pequeño disco adhesivo mediante los cuales se fijan a una base o soporte. En la mayoría de los bivalvos, esta glándula sólo es funcional en las formas juveniles. Sin embargo, en ciertas especies, como las pertenecientes al género *Mytilus*, la capacidad de segregar biso se conserva durante toda la vida del individuo, lo que indica una preferencia por hábitats con fuertes corrientes (Puerta Henche, 1995).

El **sistema muscular** de los moluscos bivalvos consta de dos músculos aductores que unen las valvas entre sí y son los encargados de cerrar la concha en oposición al ligamento. El músculo aductor anterior es de tamaño reducido y está situado en la porción anterior del borde ventral. El aductor posterior, mucho más grande, se localiza en la parte posterior de la región dorsal. Además, existen en el pie, músculos encargados de estirar y encoger este órgano dentro de la concha. También presentan los denominados músculos paleales, especialmente desarrollados en la parte ventral, que son los responsables de unir la concha con el borde del manto.

Los moluscos bivalvos realizan la función respiratoria a través de las **branquias**, dos estructuras de aspecto laminar situadas en la cámara paleal. Las branquias están formadas por un conjunto de filamentos en forma de W suspendidos de un eje que a su vez se fusiona con el margen dorsal del manto. Cada filamento branquial presenta un epitelio ciliado por su cara externa, pudiendo unirse entre sí mediante haces de cilios (filibranquias) o puentes tisulares (eulamelibranquias) y dejando entre ellos numerosas aberturas o poros. Las branquias dividen la cavidad paleal en dos partes, una más externa situada entre las branquias y el manto (cámara inhalante) y otra delimitada por la cara interna de las branquias (cámara exhalante). Además del oxígeno disuelto en el agua, los moluscos bivalvos pueden captar a través de las branquias sustancias disueltas y partículas en suspensión que quedan retenidas en la superficie externa cuando el agua se filtra a través de las mismas.



**Figura 2. Anatomía interna de la almeja *T. decussatus* (cortesía del Dr. Hernández Córdoba).**

AN, ano; AU, aurículas; BM, borde del manto; BO, boca; BR, branquia; CO, concha; EC, estilo cristalino; ES, esófago; ET, estómago; GB, glándula del biso; GC, ganglio cerebral; GO, gónada; GP, ganglio pedal; GV, ganglio visceroparietal; HP, hepatopáncreas; IN, intestino; MA, músculo aductor anterior; MN, manto; MP, músculo aductor posterior; NE, nefridio; PE, pericardio; PI, pie; PL, palpos labiales; SE, sifón exhalante; SI, sifón inhalante; ST, estatocitos; VE, ventrículo.

El **aparato digestivo** de estos moluscos se inicia en una boca, ciliada y rodeada por dos pares de palpos labiales, que conduce a un esófago estrecho y también ciliado. A continuación, se localiza el estómago que presenta dos regiones claramente diferenciadas: la región dorsal en la que desembocan el esófago y los conductos del hepatopáncreas y la región ventral, en forma de saco y de naturaleza glandular, en la que se encuentra un bastoncillo transparente o amarillento denominado estilo cristalino. Esta estructura, de tamaño considerable con respecto al del molusco, es secretada por las paredes glandulares del fondo del saco gástrico y se compone de capas concéntricas de mucoproteínas y enzimas digestivos. Las paredes del tramo superior del saco gástrico están recubiertas de numerosos cilios que, al vibrar, provocan un movimiento de rotación al estilo. De esta forma, su extremo anterior gira sobre el escudo gástrico o capa cuticular de la pared, triturando los alimentos y liberando los enzimas digestivos. El estómago presenta numerosos orificios que se prolongan hacia el exterior, ramificándose notablemente y ofreciendo un aspecto de racimos glandulares cuyos extremos distales son ciegos. Este

conjunto, que envuelve completamente al estómago, constituye la llamada glándula digestiva o hepatopáncreas. El intestino, ciliado y relativamente largo, forma varias asas en su región inicial, atraviesa el pericardio y el ventrículo cardíaco, se prolonga hasta el recto y desemboca en el ano, próximo al orificio exhalante.

El **corazón**, situado en la región dorsal media del cuerpo y formado por un único ventrículo y dos aurículas, está rodeado por un tejido pericárdico que también recubre una parte del intestino. Del ventrículo parten, anterior y posteriormente, dos arterias que se ramifican para conducir la sangre o hemolinfa por todo el cuerpo. Las principales arterias irrigan el manto, las vísceras, los músculos de la concha y el pie, desembocando en una red de senos lagunares en los cuales la hemolinfa baña directamente los tejidos, constituyendo por lo tanto un sistema circulatorio abierto. A continuación, la hemolinfa es recogida mediante un sistema venoso que la transporta a los riñones y retorna al corazón. En especies del género *Mytilus*, parte de la hemolinfa que se dirige al riñón entra previamente en las branquias donde se oxigena. En otros bivalvos, la hemolinfa fluye directamente de las branquias al corazón. En general, a nivel del manto existe un sistema circulatorio bien desarrollado que representa un lugar adicional de oxigenación (Gosling, 2003).

La **hemolinfa** puede contener pigmentos respiratorios, como la hemocianina en la que el cobre desempeña el papel del hierro en la hemoglobina, o bien carecer de ellos por lo que el oxígeno se disuelve directamente en el plasma. Además, la hemolinfa contiene células denominadas hemocitos que se clasifican en dos grupos, granulocitos (10-20  $\mu\text{m}$ ) y agranulocitos (4-6  $\mu\text{m}$ ). Los primeros fagocitan bacterias, algas, restos celulares y protozoos parásitos, mientras que los segundos presentan una menor actividad fagocítica. La presencia de hemocitos no se restringe a la hemolinfa sino que éstos también pueden localizarse en la luz intestinal y en la cavidad paleal, lugares en los que intervienen en el transporte, digestión y excreción de nutrientes, contribuyendo igualmente a la reparación tisular y defensa del organismo. La hemolinfa desempeña importantes papeles en la fisiología de los bivalvos como son el intercambio gaseoso, la osmorregulación, la distribución de nutrientes, la eliminación de residuos y la inmunidad. También proporciona una rigidez temporal a los palpos labiales, al pie y a los bordes del manto.

En los bivalvos existen dos tipos de **órganos excretores**, las glándulas pericárdicas y los riñones, aunque los productos de la excreción también pueden ser eliminados a través de las branquias y de la superficie corporal (Bayne y col., 1976). Los riñones o nefridios, con aspecto de U, están situados por debajo de la cavidad pericárdica. Uno de los brazos es glandular y se abre en el pericardio; el otro consiste en una vesícula

de pared fina que mediante el nefridioporo desemboca en la cavidad del manto. Las glándulas pericárdicas presentan unas células que acumulan los productos de desecho, que se descargan periódicamente en la cavidad pericárdica para, a continuación, ser eliminados a través del riñón. Además, tienen otras células que se encargan de filtrar la hemolinfa como paso previo a la formación de orina. Ésta presenta una elevada concentración de amonio y pequeñas cantidades de aminoácidos y creatinina.

El **sistema nervioso** de los moluscos bivalvos presenta simetría bilateral y es notablemente sencillo. Está compuesto por tres pares de ganglios: cerebrales, situados debajo del esófago y a ambos lados de la boca; viscerales, localizados por debajo del músculo aductor posterior y los ganglios pediales emplazados en la base del pie. Los ganglios están interconectados por cordones nerviosos de los que parte una amplia red de terminaciones nerviosas. Este sistema es descentralizado ya que la respuesta a los distintos estímulos tiene lugar a nivel local o ganglionar.

Dependiendo de la especie de que se trate, los bivalvos pueden presentar diferentes **órganos sensoriales**. Los tentáculos paliales o del manto contienen células táctiles y quimiorreceptoras que permiten detectar variaciones en la composición del agua; los estatocitos, generalmente situados en el pie en número par, son los responsables del equilibrio; los osfradios, órganos sensoriales químicos, están situados en la cámara exhalante; y finalmente, los ocelos, existentes en el borde del manto o de los sifones, pueden detectar cambios bruscos en la intensidad de la luz.

El **sistema reproductor** de estos moluscos consta de dos gónadas formadas por túbulos ramificados que se unen entre sí para originar conductos de mayor calibre que se abren en un corto gonoducto. Los gametos se forman a partir del epitelio de los túbulos y a través del gonoducto llegan a la cámara paleal, siendo expulsados al exterior a través de la abertura exhalante. Por tanto, la fertilización es externa excepto en el caso de algunas especies de ostra que mantienen sus gametos femeninos en la cavidad del manto. La mayoría de las especies de bivalvos son dioicas y no presentan dimorfismo sexual. También se ha comprobado la existencia del fenómeno de hermafroditismo que puede manifestarse de forma simultánea o asincrónicamente (Gosling, 2003).

El **desarrollo** de los moluscos bivalvos implica la existencia de varias fases larvarias pelágicas. Aproximadamente a las 24 horas de la fecundación, surge la larva trocófora, ciliada y con aspecto de peonza; al cabo de 24-48 horas, se convierte en larva veliger que recibe sucesivas denominaciones a medida que se originan nuevas estructuras

(veliger en forma de D, umbonada y pediveliger). La larva pediveliger presenta un geotropismo positivo, fijándose a un sustrato de forma temporal o permanente donde evoluciona hasta alcanzar el estado juvenil, morfológicamente similar al adulto. Este desarrollo puede oscilar entre 20 y 80 días según la especie de molusco bivalvo, estando además influenciado por la disponibilidad de alimento, la temperatura y la salinidad del agua.

## 2.2. Alimentación y digestión

Los moluscos bivalvos se alimentan por microfagia, consumiendo materia orgánica en forma de partículas inertes, detritos, fitoplancton y microzooplancton que se encuentran en suspensión en el agua que filtran. En menor medida, consumen bacterias y pueden absorber directamente sustancias disueltas en el agua como aminoácidos y azúcares (Bayne y Hawkins, 1992).

El proceso de filtración tiene lugar mediante el movimiento de los cilios laterales de las branquias, el cual origina una corriente de agua que entra en la cámara inhalante, atraviesa las branquias hacia la cámara exhalante y finalmente, es expulsada a través del orificio exhalante. La velocidad de este proceso depende de varios factores: i) el tamaño del molusco (los de mayor tamaño filtran, en términos absolutos, volúmenes superiores de agua pero menor cantidad si la filtración se valora en proporción al peso del animal); ii) la temperatura del agua (su incremento favorece la velocidad de filtración); y iii) la concentración de alimento (la velocidad aumenta cuando hay poco alimento disponible y disminuye si éste es muy abundante). El volumen de agua que los moluscos bivalvos pueden filtrar es elevado. Así, la ostra americana, *Crassostrea virginica*, puede procesar unos 37 litros de agua por hora (Brusca y Brusca, 2002).

Las partículas transportadas por el agua son retenidas por los cilios laterofrontales que las envían a los cilios frontales del filamento branquial, encargados de mezclarlas con el mucus secretado por las células glandulares y de transportarlas hacia unos canales situados en los pliegues ventrales y en los márgenes dorsales de las branquias, alcanzando finalmente los palpos labiales. El tamaño de las partículas retenidas depende de la especie de molusco y oscila entre un mínimo de 1-5  $\mu\text{m}$  y un máximo de 400-500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por encima de este valor, la penetración de las partículas en la cavidad paleal es impedida por los bordes del manto, siendo expulsadas de nuevo al exterior. Por debajo del tamaño mínimo, sólo son retenidas aquellas partículas adsorbidas sobre otras de mayor tamaño. Se demostró que tanto el mejillón como la ostra son capaces de retener partículas con

diámetros de 2-5  $\mu\text{m}$ , entre cuyos márgenes se encuentran un gran número de bacterias, componentes del plancton y restos de organismos vegetales y animales (Puerta Henche, 1995).

Los palpos labiales se encargan de seleccionar, en función del tamaño, textura y composición química, las partículas que penetran en la boca y también de regular la cantidad de alimento ingerido, rechazando parte de él hacia el manto cuando la cantidad es excesiva. Las partículas aceptadas son transportadas en dirección a la boca, mientras que las rechazadas llegan al manto para su posterior expulsión mediante el pie o bien a través del orificio exhalante como pseudoheces.

El alimento pasa desde la boca al esófago y penetra en el estómago, en donde se dirige hacia el estilo cristalino que, al rotar y rozar contra el escudo gástrico, facilita la trituración del alimento y su mezcla con los enzimas digestivos liberados del extremo del mismo. El alimento así digerido es absorbido a través de ciertas áreas del estómago que presentan abundantes rugosidades. Este proceso se conoce como digestión extracelular.

Paralelamente y como consecuencia del movimiento de los cilios existentes sobre las crestas gástricas, las partículas de menor tamaño y el material digerido son dirigidos hacia los conductos del hepatopáncreas, mientras que las de mayor tamaño, así como otras más pequeñas pero muy densas, son transportadas hacia el intestino. En el hepatopáncreas existen células digestivas que mediante fenómenos de pinocitosis incorporan partículas de pequeño tamaño que son digeridas intracelularmente. Los nutrientes son vertidos al sistema hemolinfático para su posterior distribución por todo el cuerpo mientras que el material de desecho se almacena en el interior de vesículas. La destrucción de las células digestivas provoca la liberación de estos productos al estómago para que, tras su paso por el intestino, se eliminen a través del ano. La existencia de hemocitos libres, tanto en el estómago como en el intestino, también posibilita la digestión intracelular de eventuales partículas alimenticias.

La permanencia del alimento en el tracto digestivo de los moluscos bivalvos está condicionada por factores metabólicos inherentes al propio molusco y por las características fisicoquímicas del agua. En general, se considera que el tránsito tiene lugar entre 0,5-2 días, pudiendo realizarse en tan solo 75 minutos (Puerta Henche, 1995). Del alimento ingerido, los moluscos bivalvos solamente asimilan una pequeña parte, siendo el material restante eliminado al medio acuático a través de las heces. Una parte de éstas se descompondrá por acción de las bacterias, liberando compuestos minerales que harán

posible el desarrollo del fitoplancton; otra parte permanecerá en suspensión en el agua, pudiendo ser de nuevo ingerida por el organismo y la mayor proporción se depositará sobre el fondo. Un ejemplo ilustrativo de este proceso es el cultivo en batea del mejillón *Mytilus galloprovincialis* en las rías gallegas. Los moluscos aprovechan aproximadamente el 50% del alimento ingerido. El restante, unos 200 kg de materia seca por batea y día, es eliminado a las rías, acumulándose en el fondo y formando grandes depósitos de fango (Pérez Camacho, 1992).

### 3. PRODUCCIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS

#### 3.1. Importancia socio-económica

El informe realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el que se recogen datos de producción de acuicultura marina durante el último tercio del siglo XX, pone de manifiesto que el número de especies de moluscos bivalvos que se cultivan se incrementó anualmente durante el período considerado. Además, se constató la implicación en este campo de un mayor número de países, sobre todo aquellos en vías de desarrollo. En este estudio también se evaluaron los factores que contribuyeron a este progresivo aumento de la producción, siendo los más importantes: i) la necesidad de alcanzar una mayor independencia en la producción de alimentos (caso de países en vías de desarrollo); ii) el hecho de que los moluscos bivalvos constituyen una fuente de proteína animal de fácil obtención que mejora el estado nutricional de poblaciones rurales; y iii) los avances relacionados con el cultivo, el transporte y la distribución (cit. Gosling, 2003).

De esta forma, la producción mundial de moluscos bivalvos cultivados fue en 1999 de aproximadamente 8,8 millones de toneladas, representando más del 80% de las capturas combinadas de bivalvos a partir del cultivo y de poblaciones naturales, y suponiendo un valor estimado de 7500 millones de dólares estadounidenses. China es con diferencia el principal país productor, al aportar aproximadamente el 77% de la producción mundial. Otros países productores importantes son España, Italia y Grecia en mejillón *M. galloprovincialis*; Japón, Corea y Francia en la producción de ostra *Crassostrea gigas*; e Italia, Corea, Estados Unidos y España en almeja *Ruditapes philippinarum* (Gosling, 2003).

A lo largo del litoral español, con excepción del archipiélago canario, existen diversas áreas de producción de moluscos bivalvos cuya ubicación y límites están recogidos

**Tabla 1. Especies de moluscos bivalvos de interés comercial que se producen en Galicia.**

Nombre científico	Denominación en castellano
<i>Aequipecten opercularis</i> Linneo, 1758	Volandeira/Golondrina
<i>Callista chione</i> Linneo, 1758	Almejón
<i>Cerastoderma edule</i> Linneo, 1758	Berberecho
<i>Crassostrea gigas</i> Thunberg, 1793	Ostra japonesa
<i>Chamelea gallina</i> Linneo, 1758	Chirla
<i>Chlamys varia</i> Linneo, 1758	Zamburiña
<i>Donax trunculus</i> Linneo, 1758	Coquina
<i>Dosinia exoleta</i> Linneo, 1758	Reloj
<i>Ensis ensis</i> Linneo, 1758	Navaja
<i>Ensis siliqua</i> Linneo, 1758	Muerto
<i>Glycimeris glycimeris</i> Linneo, 1758	Almendra de mar
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	Mejillón
<i>Ostrea edulis</i> Linneo, 1758	Ostra
<i>Pecten maximus</i> Linneo, 1758	Vieira
<i>Tapes decussatus</i> Linneo, 1758	Almeja fina
<i>Ruditapes philippinarum</i> Adams y Reeve, 1850	Almeja japonesa
<i>Solen marginatus</i> Pennant, 1777	Longueirón
<i>Spisula solida</i> Linneo, 1758	Almeja blanca
<i>Venerupis aureus</i> Lamarck, 1818	Almeja dorada
<i>Venerupis pullastra</i> Lamarck, 1818	Almeja babosa
<i>Venerupis rhomboideus</i> Pennant, 1777	Almeja rubia
<i>Venus verrucosa</i> Linneo, 1758	Almeja vieja

en el Anexo de la Orden APA/3228/2005 (BOE, núm. 249, de 18 de octubre de 2005). Sin embargo, las peculiaridades oceanográficas de la costa gallega y su elevada riqueza en nutrientes hacen que las rías sean uno de los ecosistemas marinos más productivos del mundo. Así, se concentra en Galicia más del 95% de la producción española, correspondiendo aproximadamente el 98% al cultivo de mejillón *M. galloprovincialis* (JACUMAR, 2005).

Evidentemente, la producción y comercialización de moluscos bivalvos constituye un sector estratégico para la economía de la Comunidad Autónoma de Galicia (Tabla 1). Datos estimativos establecen que la producción anual de moluscos bivalvos se sitúa entorno a las 265000 toneladas y representa un valor en primera venta superior a los 250 millones de euros, proporcionando empleo directo a más de 15000 personas. En las rías gallegas están fondeadas 3537 bateas, de las que prácticamente la totalidad se dedican al cultivo de mejillón, mientras que un escaso número se destinan al cultivo mixto y/o de otras especies como ostras (*Ostrea edulis*, *C. gigas*) y vieira (*Pecten maximus*). Existen, además, 1200

parques de cultivo, principalmente de almejas japonesa (*R. philippinarum*), fina (*Tapes decussatus*) y babosa (*Venerupis pullastra*). Además, este sector dispone de una flota auxiliar de más de 1000 unidades y de tres criaderos de moluscos (Suárez Piñeiro y Soto López, 2004).

### 3.2. Cultivo de mejillón

En la naturaleza existen centenares de especies de mejillones pero son escasas las que tienen interés comercial. La producción mundial de mejillones fue superior a 1,7 millones de toneladas en el año 2003, procediendo más del 89% de cultivos. De esta forma, la miticultura es una actividad realizada por más de 40 países en todo el planeta. El principal país productor es China, con una producción que ese año superó las 680000 toneladas; el segundo lugar está ocupado por España con una producción próxima a las 250000 toneladas; Italia, Nueva Zelanda, Francia y Holanda superaron ese mismo año las 60000 toneladas (FAO, 2005, 2005a). El mejillón *M. galloprovincialis* es la especie más importante de las que se cultivan en España y su cultivo se realiza en su práctica totalidad en Galicia, por lo que esta región es la segunda potencia mundial en la producción de esta especie (JACUMAR, 2005).

El mejillón ha estado ligado desde épocas remotas a las diferentes poblaciones que habitaban las zonas costeras de Galicia. Las primeras evidencias de su aprovechamiento por el hombre se remontan a los asentamientos celtas. A partir de este primer testimonio, el consumo de mejillón es un hecho continuo en las poblaciones de la costa gallega. En aquella época sólo se recolectaba y por tanto no existía ninguna fórmula de cultivo, al ser innecesaria ante la escasa población existente y la abundancia del recurso. El mejillón fue considerado durante siglos "alimento de pobres" ante la mayor estima de la carne, sus derivados, el trigo, etc. Con el paso de los años, los avances en la preparación y condimentación de los alimentos permitieron la expansión de este producto hacia el interior de la península, existiendo testimonios de su consumo en Castilla, limitado a las clases altas y en determinadas épocas del año. Aunque no había cultivo propiamente dicho, existían parques o zonas determinadas sujetas a un régimen de concesión ostentado por ciertas familias. El consumo de mejillón fue extendiéndose paralelamente a la importancia del recurso, por lo que hacia finales de siglo XIX comenzaron los primeros intentos de cultivo, si bien se trató de iniciativas aisladas, sin continuidad y de forma esporádica (MAPA, 1999).

Durante los primeros años del siglo XX se intensificaron los experimentos utilizando el modelo francés de estacas colocadas en empalizada (método internacionalmente

conocido con el término francés de "bouchots"), sin embargo, no llegó a consolidarse. Fue en la primera mitad de la década de los años 40 cuando se intentó adaptar a las especiales características de las rías gallegas el tradicional sistema de cultivo oriental mediante estructuras flotantes. Así en 1945, se ensayó el cultivo en suspensión, instalando la primera batea en la Ría de Arousa. Ante el éxito y los beneficios del sistema, el fondeo de bateas se extendió con rapidez por toda la ría. En la actualidad, se contabilizan más de 3300 bateas dedicadas al cultivo de mejillón situadas en los 63 polígonos de cultivo establecidos en las rías de Ares-Betanzos, Muros-Noia, Arousa, Pontevedra y Vigo, siendo la ría de Arousa la que concentra un mayor número de bateas (aproximadamente, el 70%) (Labarta, 2004).



**Figura 3. Cultivo de mejillón *M. galloprovincialis*.**

A, vista superficial de una batea. B, vista submarina (obtenidas de Durán Neira y col., 1990).

El cultivo de mejillón es un proceso natural que está condicionado por la variabilidad de las condiciones ambientales en el ecosistema de las rías y particularmente por las variaciones interanuales y espaciales que tienen lugar en ellas. El cultivo en batea comienza con la recogida de la semilla (tamaño comprendido entre 0,5-1 cm), procedente de las rocas del litoral o de cuerdas colectoras suspendidas de las bateas. A continuación y mediante una operación denominada "encordado", la semilla se envuelve en las cuerdas de cultivo con una fina red biodegradable. Después de varios meses en el mar, los moluscos crecen considerablemente (4-5 cm) por lo que el peso de las cuerdas se incrementa, provocando un crecimiento más lento y heterogéneo, siendo por tanto necesario reducir la

concentración de ejemplares en las cuerdas. Este proceso, que en Galicia se conoce como "desdoble", consiste en izar las cuerdas de semilla, separar los juveniles de las mismas y confeccionar unas nuevas cuerdas de menor densidad con ejemplares más homogéneos en cuanto a la talla. La última fase del proceso de cultivo, la "cosecha", se realiza en el momento en que el molusco alcanza la talla comercial de 7-10 cm de longitud. Se calcula que el ciclo de producción oscila entre 16-18 meses (Pérez Camacho, 1992a)

La explotación de las bateas está condicionada por las características del proceso de cultivo y por el ciclo de ventas anual. Aunque la cosecha se realiza durante todo el año, el período de mayor intensidad tiene lugar entre los meses de octubre y marzo, en el que se comercializa el 70% de la producción anual de mejillón en Galicia. Un factor determinante en la época de venta es el tipo de comercialización. Así, el mejillón destinado a la industria conservera, aproximadamente el 40% del total, se cosecha generalmente durante el verano, y el destinado al consumo fresco, un 60% de la producción anual, preferentemente durante el otoño y el invierno (Pérez Camacho, 1992a). La producción media por batea en la etapa 1997-2001 se estimó en 75 toneladas con un rango comprendido entre 60-84 toneladas dependiendo de la zona de cultivo (Labarta, 2004).

### 3.3. Cultivo de ostra

Los grandes bancos ostrícolas naturales desaparecieron o se encuentran muy reducidos debido a la sobreexplotación a la que se sometieron, a la aparición de enfermedades, al deterioramiento de los fondos y a la contaminación de amplias zonas costeras. En el año 2003, la producción mundial de ostra superó los 4,7 millones de toneladas, procediendo alrededor del 95% de la acuicultura. Los principales países productores de ostra cultivada fueron China (43%); Japón (20%); Corea (17%); y Francia (13%). Durante ese mismo año, la producción total de ostra en España rebasó ligeramente las 3000 toneladas (3127 toneladas), de las que prácticamente la totalidad (99,6%) procedían de cultivos. Las regiones productoras fueron Galicia (70,6%); Cataluña (13,7%); Asturias (12,0%); Cantabria (2,6%); y Andalucía (1,1%) (FAO, 2005, 2005a; JACUMAR, 2005).

Los bancos naturales de ostra plana europea (*O. edulis*) se extendían, desde tiempos muy remotos, por toda la costa cantábrica y Galicia. En el litoral gallego fueron siempre muy abundantes siendo habitual su consumo, como se pone de manifiesto por los cuantiosos restos de valvas que aparecen en los "concheiros" de los antiguos castros celtas y otras referencias históricas (construcción de la muralla de Lugo, cartas marinas...).

A partir del siglo XVIII, estos bancos naturales sufren un progresivo agotamiento hasta su práctica desaparición a mediados del siglo XX. Entre los factores de diferente índole que diezmaron los importantes y numerosos bancos ostrícolas, tanto del litoral español como particularmente del gallego, destacan: la recolección masiva de ejemplares adultos; la desaparición paulatina de los sustratos adecuados para la fijación de las larvas; la contaminación industrial y urbana en las zonas costeras; la competencia con el cultivo de mejillón y las enfermedades de diversa etiología importadas con la ostra foránea (principalmente las causadas por los parásitos *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae*) (Guerra, 2002).



**Figura 4. Cultivo de ostras.**

A, en cuerdas suspendidas de bateas (obtenida de Pérez Camacho y Cuña Casasbellas, 1992). B, en cajas (obtenida de Pérez Camacho, 1992c).

Desde entonces, el cultivo de la ostra experimentó en Galicia un importante desarrollo, el cual consta de las siguientes etapas: i) obtención de la semilla (0,5-1 cm) a partir de la captación natural en zonas en las que todavía existen restos de bancos naturales; obtenidas en criaderos (instalaciones donde por distintos medios se reproducen especies marinas y se favorece el desarrollo de las mismas en las fases iniciales de su ciclo biológico) o bien procedentes de la importación; ii) una fase de preengorde en el medio natural o en los mismos criaderos hasta alcanzar el estado juvenil (4-5 cm), transcurridos aproximadamente 12 meses; y iii) una última fase de engorde, cuya duración es de 10-14 meses, hasta que se obtienen ejemplares adultos de talla superior a los 6 cm. En Galicia, esta etapa se realiza habitualmente utilizando cestos ostrícolas apilables o bien mediante el sistema tradicional de fijación de las ostras con cemento a las cuerdas suspendidas de las bateas (Pérez Camacho y Cuña Casasbellas, 1992). En zonas intermareales o poco

profundas de las Rías Altas gallegas, se practican dos tipos de cultivo: directamente sobre el fondo (parque de fondo) o bien se introducen en sacos de malla colocados sobre caballetes elevados unos 30-50 cm.

En Galicia se cultivan dos especies de ostra, *O. edulis* (fundamentalmente en batea) y la ostra japonesa *C. gigas*, cultivada en parque de fondo y comercializada por los productores gallegos con el nombre de ostra rizada (Guerra, 2002). Con respecto al rendimiento del cultivo, se calcula que una batea con 1000 cuerdas de 20 cestos cada una, puede contener unas 800000 ostras y producir anualmente entre 480000-560000 ejemplares de un tamaño superior a los 7 cm de longitud y unos 60 g de peso. La comercialización de la ostra (5-10 cm) tiene lugar durante todo el año, aunque la demanda se incrementa notablemente durante el mes de diciembre (Pérez Camacho y Cuña Casasbellas, 1992).

### **3.4. Producción de almeja y berberecho**

En el año 2003, la producción de almeja y berberecho a nivel mundial rebasó los 4,7 millones de toneladas, de las que un 80% procedían de la acuicultura. El principal país productor es también China, que cultiva fundamentalmente la especie *R. philippinarum*. Durante ese mismo año, la producción española alcanzó casi las 8000 toneladas, siendo Galicia la región con mayor número de capturas. Éstas procedieron tanto del cultivo propiamente dicho, como del sistema de semicultivo a partir de bancos naturales sumergidos o situados en la zona intermareal (FAO 2005, 2005a; JACUMAR, 2005).

Estos bivalvos representan uno de los productos más importantes derivados de la milenaria actividad del marisqueo, sector precursor de la acuicultura y con una problemática social muy específica. La producción de almejas presenta unas grandes expectativas al tratarse de especies con una amplia demanda y un valor económico considerable. En Galicia, al igual que en el resto de España, se cultivan la almeja fina (*T. decussatus*); la almeja japonesa (*R. philippinarum*), y la almeja babosa (*Venerupis pullastra*). Para estas especies se ha desarrollado una tecnología específica de producción de semilla en criaderos (Pérez Camacho, 1992b).

El cultivo de almeja se inicia a partir de la cría, cuya longitud oscila entre los 3-5 mm, producida en los criaderos industriales. Ésta se somete a una fase de preengorde en un medio protegido, el semillero, hasta que alcanza un tamaño adecuado de siembra (12-15 mm). El tiempo necesario para que se alcance la talla de siembra depende de la especie

y de la época del año, variando para *R. philippinarum* entre 3-4 meses si se inicia en primavera y unos 6 meses si se comienza en otoño. Posteriormente, se procede a su engorde en los parques de cultivo (parcelas de la zona marítimo-terrestre en comunicación permanente o temporal con el mar y dedicadas al cultivo intensivo en fondo de organismos marinos) hasta que se alcanza una talla comercial entorno a los 40 mm. Para la especie citada anteriormente, este período de engorde varía entre 13-14 meses si tiene lugar en la Ría de Arousa o supera los 2 años cuando se realiza en las Rías Altas o en el litoral cantábrico (Pérez Camacho, 1992b).



**Figura 5. Producción en parques de cultivo de almejas y berberechos (obtenidas de Pérez Camacho, 1992b).**

La duración total del ciclo de producción oscila entre 2-4 años, dependiendo de la especie cultivada y de las condiciones ambientales de la zona de cultivo, especialmente de la temperatura y de la disponibilidad de alimento. Por otra parte, la supervivencia durante la fase de engorde está condicionada por la existencia de predadores (principalmente cangrejos). Si las labores de cultivo se desarrollan correctamente, la supervivencia es del orden del 70-80% (Pérez Camacho, 1992b).

#### 4. INFECCIONES ASOCIADAS CON EL CONSUMO DE MOLUSCOS BIVALVOS.

Los moluscos bivalvos presentan, como se ha comentado anteriormente, una particular característica anatómo-fisiológica relacionada con su alimentación y respiración: mediante sus laminillas branquiales filtran importantes cantidades de agua reteniendo la

materia orgánica y el plancton presentes en la misma. Las partículas retenidas son desplazadas hasta los palpos labiales que las introducen en la boca, siendo discriminadas las de mayor tamaño que son expulsadas al medio externo en forma de pseudoheces. Este eficaz mecanismo provoca que, asociados a la retención de nutrientes, sean acumulados diversos agentes contaminantes químicos y/o biológicos presentes en el medio en el que habitan.

Por otra parte, las poblaciones de moluscos bivalvos marinos crecen principalmente en zonas intermareales o próximas a la costa que, en ciertas ocasiones, están densamente pobladas. Las deficiencias en los tratamientos de las aguas residuales, la emisión de residuos ganaderos o industriales al mar y las aguas de escorrentía son, entre otros, factores que provocan una contaminación química y/o microbiológica, amplia y diversa, en toda la franja costera y consecuentemente, en los moluscos que en ella se desarrollan. Estos hechos junto con la tradicional costumbre del consumo crudo o poco cocinado de estos productos, determinan que los moluscos bivalvos sean considerados alimentos de alto riesgo sanitario al asociarse con casos de toxiinfecciones alimentarias relacionadas con metales pesados, biotoxinas y microorganismos patógenos (Harada, 1995; Potasman y col., 2002; Brett, 2003). Además, se han descrito, relacionadas con algunos moluscos bivalvos, reacciones de hipersensibilidad mediadas por inmunoglobulina E (Lehrer y col., 2003).

La asociación entre el consumo de moluscos bivalvos crudos o poco cocinados y la aparición de enfermedades infecciosas ha sido sospechada durante siglos. Uno de los primeros brotes de infección humana relacionado con la ingestión de moluscos bivalvos fue el descrito por el médico francés J.P.A. Pasquier en 1816 (cit. Rippey, 1994), quien diagnosticó fiebres tifoideas en un grupo de personas que habían consumido ostras procedentes de un área contaminada con aguas residuales. Desde entonces, más de 400 brotes y 300000 casos han sido descritos a nivel mundial (Potasman y col., 2002), siendo el más importante, por el número de personas afectadas, el ocurrido en Shangai (China) en 1988, en el que alrededor de 290000 personas padecieron hepatitis A tras el consumo de almejas procedentes de una zona de cultivo contaminada con aguas residuales (Halliday y col., 1991; Tang y col., 1991). En Estados Unidos, un 8% de los aproximadamente 33 millones de casos anuales relacionados con enfermedades de transmisión alimentaria, se asocian con el consumo de ostras crudas (Altekruse y col., 1999).

Sin embargo, estos datos sólo representan una pequeña proporción del número de casos a nivel mundial (Hauschild y Bryan, 1980), por lo que la incidencia de las enfermedades infecciosas transmitidas por moluscos bivalvos está infravalorada (Archer y

Kvender, 1985). Las razones que justifican esta subestimación pueden ser varias, considerándose como principales: la ausencia de obligación, por parte de los profesionales sanitarios, de informar a las autoridades pertinentes sobre los casos de gastroenteritis de etiología no identificada; el hecho de que muchos de los casos originados sean leves y autolimitados; y la dificultad para atribuir la infección a un alimento en particular cuando el número de personas afectadas es reducido.

Las infecciones alimentarias debidas al consumo de moluscos se clasifican en tres categorías de acuerdo con el origen del agente etiológico (Rippey, 1994): i) las asociadas con agentes patógenos procedentes de la contaminación fecal humana o animal; ii) las ocasionadas por organismos autóctonos de ambientes marinos y estuarios; y iii) las originadas por la contaminación del alimento durante su procesado o manipulación. Sin embargo, el riesgo que esta contaminación supone para la salud humana depende de la localización del agente patógeno (en la superficie o en el interior del molusco), de su capacidad de supervivencia a los procesos de conservación/culinarios y del estado inmunitario del consumidor (Lees, 2000).

#### **4.1. Infecciones de etiología vírica**

En el medio marino, diversos agentes virales se encuentran en gran abundancia, generalmente en número de  $10^{12}$  partículas virales por litro, aunque son fundamentalmente los de origen humano los que han sido asociados con casos de enfermedad tras el consumo de alimentos contaminados (Fuhrman, 1999; Lees, 2000).

Los virus que presentan una ruta fecal-oral son los mejor adaptados para transmitirse a través del consumo de moluscos bivalvos. Entre ellos se incluyen los responsables de enfermedades gastrointestinales y otros como el virus de la hepatitis A y el virus de la poliomielitis que, aunque se transmiten por ruta fecal-oral y tienen una fase de replicación en el tracto intestinal, originan síntomas clínicos a nivel extraintestinal (Lees, 2000). Muchos de los virus que se transmiten por esta ruta presentan una alta prevalencia en la comunidad, pudiendo los individuos infectados eliminar millones de partículas virales en sus heces. Además, los procedimientos habituales de depuración de las aguas residuales no son totalmente eficaces en su eliminación, por lo que existe una contaminación relativamente constante en el ambiente (Sorber, 1983).

En el mar, estos virus pueden sobrevivir durante semanas o meses, tanto libres en el agua como adheridos a partículas o acumulados en sedimentos (Nasser, 1994; Callahan y

col., 1995; Gantzer y col., 1998). Se ha demostrado la existencia de una amplia variedad de virus (Calicivirus, Astrovirus, Rotavirus, Adenovirus, Enterovirus y virus de la hepatitis A) tanto en moluscos bivalvos como en sus zonas de cultivo (Lees, 2000). Entre los moluscos bivalvos, las ostras, las almejas, los berberechos y los mejillones son las especies principalmente implicadas en este tipo de infecciones, quizá debido a su tradicional consumo crudo o ligeramente cocinados y a la ingestión del animal entero, incluyendo las vísceras (Jaykus y col., 1994). Además, los procedimientos comunes de conservación por refrigeración y congelación pueden facilitar la supervivencia de los agentes virales, al ser estas técnicas ampliamente utilizadas en el laboratorio para la preservación de muestras. Sin embargo y a pesar de la gran variedad de virus transmitidos por la ruta fecal-oral y de su presencia en moluscos bivalvos y en áreas de cultivo, sólo ciertas especies han sido relacionadas epidemiológicamente con enfermedad tras el consumo de estos alimentos (Lees, 2000).

La gastroenteritis de etiología vírica es reconocida como una consecuencia del consumo de moluscos bivalvos contaminados (Richards, 1985; Rippey, 1994). Después de un período de incubación de 18-48 horas, surgen las manifestaciones clínicas caracterizadas frecuentemente por diarrea y vómitos, síntomas que desaparecen a las 24-48 horas, por lo que raramente se requiere atención sanitaria. El primer brote de gastroenteritis vírica descrito y relacionado con el consumo de bivalvos tuvo lugar en el Reino Unido durante el invierno de 1976-1977. Epidemiológicamente se asoció la ingestión de berberechos cocinados con 33 brotes de infección que afectaron a una cifra próxima a 800 personas (Appleton y Pereira, 1977). De igual forma, durante el verano de 1978, se produjo en Australia un brote de gastroenteritis asociado con el consumo de ostras que afectó a unas 2000 personas, demostrándose por primera vez la asociación entre el virus Norwalk y cuadros de gastroenteritis tras la ingestión de moluscos bivalvos (Murphy y col., 1979). A partir de estas primeras referencias, se han documentado numerosos brotes de gastroenteritis causados por la ingestión de estos alimentos, identificándose en la mayor parte de los casos partículas virales pertenecientes al género *Norovirus* (Familia Caliciviridae) (Lees, 2000).

La hepatitis A (*Hepatovirus*, Picornaviridae) es la infección viral más grave asociada con el consumo de moluscos bivalvos, al desencadenar una enfermedad debilitante y ocasionalmente la muerte. El primer brote documentado de este proceso infeccioso se describió en Suecia en 1955 cuando 629 casos se asociaron con el consumo de ostras crudas (Roos, 1956). Desde entonces, numerosos brotes relacionados con el consumo de moluscos bivalvos se han descrito a nivel mundial (Richards, 1985; Jaykus y col., 1994;

Rippey, 1994), alcanzando algunos de ellos un nivel epidémico, como el ocurrido en Shangai (China) en 1988 (Halliday y col., 1991; Tang y col., 1991).

La verdadera relación entre la ingestión de moluscos bivalvos y los casos de hepatitis A diagnosticados en la población está subestimada debido al largo período de incubación (media de 4 semanas), que dificulta la asociación entre un determinado alimento y los casos esporádicos o individuales, y a los síntomas iniciales poco específicos de la enfermedad. Además, los resultados obtenidos en estudios seroepidemiológicos retrospectivos permiten establecer que el consumo de moluscos bivalvos es uno de los más importantes factores de riesgo para contraer la infección (Koff y col., 1967; Stille y col., 1972; O'Mahony y col., 1983; Kiyosawa y col., 1987; Mele y col., 1991). Incluso, estimaciones realizadas recientemente sugieren que estos moluscos pueden ser los responsables del 70% de los casos de hepatitis A diagnosticados en Italia (Salamina y D'Argenio, 1998).

También se han asociado casos de hepatitis no-A y no-B con el consumo de estos alimentos (Mele y col., 1986; Torne y col., 1988; Jaykus y col., 1994). Aunque no ha sido establecido formalmente, es probable que dichos casos sean consecuencia del virus de la hepatitis E, transmitido por la ruta fecal-oral. La hepatitis E no es endémica en países industrializados, sin embargo la reciente demostración de partículas virales en muestras de aguas residuales en una zona de Barcelona, sugiere que los moluscos bivalvos podrían actuar como vehículos de la infección incluso en áreas no endémicas (Pina y col., 1998).

#### **4.2. Infecciones de etiología bacteriana**

Las primeras descripciones de enfermedad bacteriana transmitida a través del consumo de moluscos bivalvos datan del siglo XIX y principios del XX. Con anterioridad a 1950, la infección más comúnmente asociada con la ingestión de estos moluscos crudos o insuficientemente cocinados era la fiebre tifoidea. Sin embargo, el establecimiento de medidas de control en la producción y comercialización de estos productos y las mejoras en el tratamiento de las aguas residuales tuvieron como consecuencia una notable disminución de las enfermedades bacterianas transmitidas por estos alimentos. Así, aunque especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* y *Escherichia* son encontradas frecuentemente en aguas residuales, el tratamiento con cloro consigue su eliminación (Rippey, 1994).

En la actualidad, los principales agentes bacterianos implicados en brotes de infecciones transmitidas por moluscos bivalvos son diversas especies pertenecientes al

género *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*; *V. cholerae*; *V. vulnificus*; *V. mimicus*; y *V. hollisae*), responsables del 20% de los casos descritos. Se trata de organismos halófilos ampliamente distribuidos en medios marinos y estuarios, preferentemente en aguas cálidas (10-30°C) y de salinidad comprendida entre un 5-30‰ (Potasman y col., 2002; Lozano-León y col., 2003; Morris, 2003, Martínez-Urtaza y col., 2004; McLauhlin y col., 2005). En estas condiciones se demostró que el 100% de las ostras pueden estar contaminadas, alcanzando concentraciones 100 veces superiores a las existentes en el agua circundante (Wright y col., 1996).

En un 80% de los casos de infección por *Vibrio* spp., la gastroenteritis es el cuadro clínico más frecuentemente observado. Generalmente, la aparición de los síntomas oscila entre tan solo unas horas hasta un máximo de 5 días, manteniéndose durante 2-3 días. Aunque en escasas ocasiones, se han descrito infecciones de heridas y, en pacientes inmunocomprometidos o con patología hepática, septicemia primaria (Butt y col., 2004).

Las infecciones causadas por especies del género *Salmonella* y asociadas con el consumo de moluscos bivalvos fueron muy frecuentes en el pasado, pero actualmente representan un pequeño porcentaje, a pesar de su presencia en medios marinos (Martínez-Urtaza y col., 2004a). *Shigella* puede ser un potencial agente infeccioso debido a su baja dosis infectante y a su prolongado tiempo de supervivencia en almejas y ostras. En particular *S. flexneri* y *S. sonnei* han sido implicadas en casos de disentería relacionados con la ingestión de bivalvos. Otras bacterias asociadas en menor medida con el consumo de estos alimentos son *Plesiomonas shigelloides* y *Listeria monocytogenes* (Brett y col., 1998; Potasman y col., 2002; Terajima y col., 2004).

#### **4.3. Potenciales infecciones de etiología parasitaria**

Los moluscos bivalvos, al concentrar partículas alimenticias, pueden también retener y acumular formas de resistencia de organismos parásitos, en particular protozoos, que se encuentran en el agua de mar circundante y cuya forma y tamaño son similares al de las partículas retenidas. Entre estos parásitos se encuentran *Cryptosporidium* spp.; *Giardia* spp.; *Cyclospora* spp.; *Toxoplasma gondii*; y algunas especies de Microsporidia, los cuales presentan una distribución cosmopolita y son frecuentemente diagnosticados en el hombre y animales. Los estados exógenos, ooquistes/quistes/esporas, son resistentes a la mayoría de los desinfectantes comúnmente utilizados y pueden sobrevivir en medios acuáticos durante semanas y/o meses, incluso cuando se exponen a un amplio rango de temperaturas y salinidades (Fayer y col., 2004). Algunas de estas especies fueron

responsables de importantes brotes de infección relacionados con la contaminación de aguas destinadas al consumo humano (Benenson y col., 1982; Bowie y col., 1997; Mac Kenzie y col., 1994; Bern y col., 1999; Cotte y col., 1999; Lee y col., 2002). Aunque también han sido detectadas en moluscos bivalvos, hasta la actualidad no se ha descrito ningún brote infeccioso asociado con su consumo (Graczyk, 2003; Fayer, 2004).

La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas costeras ha sido demostrada por diversos autores (Johnson y col., 1995; Fayer y col., 1998a) y su supervivencia confirmada mediante colorantes vitales y ensayos de infectividad en ratones (Robertson y col., 1992; Freire-Santos y col., 1999). Diversos estudios experimentales comprobaron la captación y retención de formas infectantes del parásito por moluscos bivalvos (Graczyk, 2003; Graczyk y col., 2003; Izumi y col., 2004; Miller y col., 2005). También, la contaminación natural fue observada en diferentes especies destinadas al consumo humano (Tabla 2).

Al igual que *Cryptosporidium*, quistes de *Giardia* spp. han sido detectados en aguas marinas (Johnson y col., 1995). Su supervivencia en agua de mar no ha sido evaluada, pero la existencia de infecciones en mamíferos marinos sugiere que, de alguna forma, ofrecen cierta resistencia al menos a salinidades bajas (Fayer y col., 2004). Experimentalmente se ha demostrado que la almeja *C. fluminea*, el mejillón *D. polymorpha* y la ostra *C. virginica* pueden acumular quistes de *G. duodenalis* (Graczyk y col., 1997, 1998b, 1999a, 2003). Estas observaciones fueron confirmadas posteriormente en moluscos bivalvos naturalmente contaminados (Graczyk y col., 1999c, 2004; Schets y col., 2003; Miller y col., 2005).

Brotes de ciclosporidiosis descritos en países industrializados se han relacionado con el consumo de alimentos, como frutas y verduras, importados de regiones tropicales y subtropicales donde la infección humana es más frecuente (Mansfield y Gajadhar, 2004). Se ha demostrado que la almeja de agua dulce *C. fluminea* puede captar y retener ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* presentes en agua contaminada experimentalmente (Graczyk y col., 1998). Recientemente, Negm (2003) detectó ooquistes de *Cyclospora* sp. en bivalvos naturalmente contaminados y adquiridos en un mercado local de Alejandría (Egipto). Sin embargo, los ooquistes recuperados de estos moluscos no fueron infectantes para ratones de 4-6 semanas de edad.

La elevada seroprevalencia de *T. gondii* detectada en varias especies de mamíferos marinos evidencia la presencia y supervivencia de este parásito en el medio marino (Fayer y col., 2004). Lindsay y col. (2003) demostraron la capacidad de los ooquistes para esporular en el agua de mar y mantener su viabilidad durante al menos 6 meses. En un

estudio realizado por Miller y col. (2002), se observó una elevada presencia de anticuerpos específicos frente a *T. gondii* en nutrias de zonas costeras que recibían abundantes aguas de escorrentía. Cole y col. (2000) sugirieron que los ooquistes de *T. gondii* podrían llegar al ecosistema marino a partir de heces de gatos domésticos y que ciertos invertebrados actuarían como hospedadores de transporte. Por lo que respecta a los moluscos bivalvos, se ha demostrado experimentalmente que tanto la ostra *C. virginica* como el mejillón *M. galloprovincialis* pueden retener ooquistes esporulados de *T. gondii* (Lindsay y col., 2001; Arkush y col., 2003), los cuales continúan siendo infectantes para ratones tras permanecer 85 días en su interior (Lindsay y col., 2004). Estos mismos autores concluyen que los moluscos bivalvos contaminados pueden ser una fuente de infección para los mamíferos marinos y posiblemente, también para el hombre.

**Tabla 2. Especies de moluscos bivalvos naturalmente contaminadas por *Cryptosporidium* spp.**

Especie	Procedencia	Referencia
<i>C. edule</i>	España, Portugal	Freire-Santos y col., 2000a; Gómez-Bautista y col., 2000; cit. Fayer y col., 2004
<i>C. gigas</i>	Holanda	Schets y col., 2003
<i>C. virginica</i>	Estados Unidos	Fayer y col., 1998a
<i>Caelaturia pruneri</i> *	Egipto	Negm, 2003
<i>Chamelea gallina</i>	Italia	Traversa y col., 2004; Giangaspero y col., 2005
<i>Corbicula fluminea</i> *	Estados Unidos	Miller y col., 2005
<i>Donax</i> sp.	Egipto, Portugal	Negm, 2003; cit. Fayer y col., 2004
<i>Dosinia exoleta</i>	España	Freire-Santos y col., 2000a
<i>Dreissena polymorpha</i> *	Canadá, Irlanda	Graczyk y col., 2001, 2004
<i>Ischadium recurvum</i> *	Estados Unidos	Graczyk y col., 1999b
<i>Macoma balthica</i> *	Estados Unidos	Graczyk y col., 2000b
<i>Mytilus californianus</i>	Estados Unidos	Miller y col., 2005b
<i>M. edulis</i>	Irlanda, Portugal	Chalmers y col., 1997; cit. Fayer y col., 2004
<i>M. galloprovincialis</i>	España	Freire-Santos y col., 2000a; Gómez-Bautista y col., 2000
<i>O. edulis</i>	España, Inglaterra	Freire-Santos y col., 2000a
<i>R. philipinarum</i>	Italia	Freire-Santos y col., 2000a
<i>T. decussatus</i>	Portugal	cit. Fayer y col., 2004
<i>V. pullastra</i>	España	Freire-Santos y col., 2000a
<i>Venus verrucosa</i>	España	Freire-Santos y col., 2000a
<i>Scrobicularia plana</i>	Portugal	cit. Fayer y col., 2004

\*Especie de agua dulce

Esporas de distintas especies de Microsporidia que infectan al hombre y animales han sido identificadas en diversos tipos de aguas (Didier y col., 2004). Estudios epidemiológicos demostraron que entre los factores de riesgo para la adquisición de la microsporidiosis humana se incluyen la exposición a aguas recreacionales y la ingestión de aguas contaminadas (Hutin y col., 1998; Cotte y col., 1999; Dascomb y col., 2000). Fayer (2004a) comprobó la diferente capacidad para sobrevivir, en aguas con distintas salinidades y temperaturas, de esporas de tres especies del género *Encephalitozoon*. Por otra parte, Negm (2003) detectó esporas de Microsporidia en dos especies de almeja destinadas al consumo humano. También, formas de resistencia de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi* se observaron en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Graczyk y col., 2004).

## 5. CONTROLES SANITARIOS DURANTE LA PRODUCCIÓN Y PROCESADO DE MOLUSCOS BIVALVOS VIVOS

El riesgo de adquirir una enfermedad infecciosa tras el consumo de moluscos bivalvos crudos o ligeramente cocinados ha sido reconocido durante muchos años. Consecuentemente, la mayoría de los países productores han establecido controles sanitarios en la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos. En la Unión Europea, estos controles se recogen en la Directiva 91/492/CEE [Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE) (núm. L 268) de 24 de septiembre de 1991], reflejada en la Legislación Española en el Real Decreto 571/1999 [BOE (núm. 86) de 10 de abril de 1999]. Esta reglamentación establece las normas técnico-sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los moluscos bivalvos vivos destinados al consumo humano directo o a la transformación previa a su consumo. Además, incluye las condiciones que deben cumplir las zonas de producción y los moluscos bivalvos vivos, las normas para la recolección, transporte, envasado, conservación y almacenamiento.

Estos controles se basan en la determinación de indicadores bacterianos tradicionales de contaminación fecal, como son los recuentos de coliformes fecales (CF) y/o *Escherichia coli*, para así evaluar la contaminación e implementar medidas de control adecuadas. Ante la ausencia de métodos habituales de detección de virus y de normas virológicas, el control sanitario se basa exclusivamente en el recuento de bacterias fecales. Cuando se demuestre científicamente la necesidad de introducir otros controles sanitarios o de modificar los parámetros indicados, con el fin de proteger la salud pública, dichas medidas serán adoptadas con arreglo al procedimiento previsto en la normativa

comunitaria. Los moluscos bivalvos que se importen desde terceros países a la Unión Europea deberán haber sido producidos atendiendo a los mismos estándares de calidad (Tabla 3).

**Tabla 3. Condiciones que deben reunir los moluscos bivalvos destinados al consumo humano inmediato [BOE (núm. 86) de 10 de abril de 1999].**

<p>Características propias de frescura y viabilidad, ausencia de suciedad en la concha, reacción adecuada a la percusión y cantidad normal de líquido intervalvar.</p> <p>Menos de 300 coliformes fecales ó menos de 230 <i>E. coli</i> en 100 g de carne de molusco y líquido intervalvar (NMP).</p> <p>Ausencia de <i>Salmonella</i> spp. en 25 g de carne de molusco.</p> <p>Compuestos tóxicos y nocivos.<sup>a</sup></p> <p>Radionucleidos.<sup>b</sup></p> <p>Concentración de toxina paralizante de los moluscos (PSP) inferior a 80 µg por 100 g de parte comestible.</p> <p>Ausencia de reacción positiva respecto a la presencia de toxina diarreica de los moluscos (DSP) en las partes comestibles.</p> <p>Contenido de toxina amnésica de los moluscos (ASP) inferior a 20 µg de ácido domoico por gramo de parte comestible.</p>
--

<sup>a</sup>Normas de calidad de las aguas y de la producción de moluscos y de otros invertebrados marinos.

<sup>b</sup>Legislación vigente para los productos alimenticios.

Generalmente, se acepta que el método más efectivo y fiable para controlar la contaminación de los moluscos es el cultivo en zonas de producción con una buena calidad de agua. El control de la contaminación durante el procesado de los moluscos suele ser menos efectivo aunque constituye una alternativa para aquellos países en los que exista un riesgo de contaminación fecal del agua. Básicamente, existen dos opciones para reducir la contaminación microbiológica durante el procesado comercial: i) mediante un tratamiento térmico apropiado, y ii) prolongando el proceso natural de filtración en agua de mar limpia con el fin de eliminar la contaminación microbiológica (depuración). Estas alternativas dependen del nivel de contaminación detectado en el molusco bivalvo vivo y establecido con respecto a los indicadores bacterianos de contaminación fecal (Lees, 2000).

### 5.1. Clasificación de las zonas de producción

En la Unión Europea [DOCE (núm. L 268) de 24 de septiembre de 1991] y en la Legislación Española [BOE (núm. 86) de 10 de abril de 1999], los indicadores de contaminación fecal se determinan utilizando la prueba del número más probable (NMP), en

la que se utilizan cinco tubos y tres diluciones, aplicada sobre la carne del molusco y líquido intervalvar. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las zonas de producción se clasifican en diferentes categorías (Tabla 4). El estándar de Categoría A describe la zona de producción más limpia. Los moluscos bivalvos recolectados en estas zonas presentarán menos de 230 *E. coli* o menos de 300 coliformes fecales por 100 g de carne y líquido intervalvar y pueden ser destinados para el consumo humano sin previo tratamiento, siempre y cuando cumplan las condiciones establecidas en la legislación vigente (Tabla 3). Los moluscos procedentes de zonas de producción con valores de contaminación superiores no pueden ser recolectados para el consumo humano directo, aunque pueden comercializarse después de ser sometidos a un proceso de depuración o a un tratamiento térmico adecuado [Diario Oficial de la Unión Europea (núm. L 283) de 31 de octubre de 2003]. Sin embargo, como estos procesos no son totalmente efectivos, se estableció un límite máximo en el grado de contaminación a partir del cual tales procedimientos no pueden ser utilizados.

**Tabla 4. Clasificación de las zonas de producción de moluscos bivalvos de acuerdo con su calidad microbiológica.**

Categoría	<i>E. coli</i> /100 g	Coliformes fecales/100 g	Destino
Zonas tipo A	<230 en todas las muestras	<300 en todas las muestras	Consumo humano directo si el producto final reúne las condiciones establecidas
Zonas tipo B	<4600 en el 90% de las muestras	<6000 en el 90% de las muestras	Depuración, reinstalación o tratamiento térmico hasta alcanzar las condiciones de la categoría A
Zonas tipo C	-	<60000 en todas las muestras	Reinstalación durante al menos 2 meses hasta alcanzar la categoría A o tratamiento térmico
-	-	>60000	Prohibida la recolección

El Real Decreto 571/1999 también establece que la autoridad competente informará de cualquier cambio de demarcación y/o cierre temporal o definitivo de las zonas de producción a las organizaciones o asociaciones de productores afectadas, a los responsables de los centros de depuración, de los centros de expedición y de los establecimientos de transformación, así como a las autoridades competentes en materia de salud pública [BOE (núm. 86) de 10 de abril de 1999].

## 5.2. Depuración de moluscos bivalvos

Los tratamientos térmicos, aunque garantizan la salubridad del producto, no son aplicables a los moluscos bivalvos que se comercializan vivos. En este caso, se opta, si la legislación así lo permite, por prolongar el proceso natural de filtración y de esta forma eliminar una parte considerable de los microorganismos contaminantes, proceso que recibe el nombre de depuración de moluscos bivalvos. Considerando que este proceso se realice en el mar o en centros especializados, se distinguen dos tipos de depuración: la depuración natural o reinstalación y la depuración controlada.

La reinstalación consiste en trasladar los moluscos bivalvos vivos a zonas marítimas, laguneras o de estuario autorizadas, claramente delimitadas y señalizadas por boyas, postes o cualquier otro tipo de material fijo, durante el tiempo necesario para la eliminación de contaminantes de origen microbiano. Al no variar el hábitat, evitando así el estrés que supone la depuración controlada, este método ofrece las ventajas de una mayor rapidez y eficacia, así como, la posibilidad de prolongar el tiempo de depuración. De esta forma, la reinstalación es apropiada para tratar moluscos bivalvos muy contaminados que necesiten un mayor tiempo de depuración (la legislación especifica un mínimo de dos meses para aquellos procedentes de zonas tipo C). Los principales inconvenientes de la depuración natural son la limitada disponibilidad de zonas costeras limpias, la dificultad de obtención de derechos de propiedad, la imposibilidad de controlar la calidad del agua (contaminaciones ocasionales) y otros parámetros del agua de mar, así como una mayor vulnerabilidad a la sustracción ilegal.

Por el contrario, la depuración controlada, utilizada por primera vez en el Reino Unido durante la década de los años 20 del siglo pasado, se realiza en instalaciones en tierra que proporcionan a los moluscos el hábitat idóneo para su descontaminación. Este proceso se lleva a cabo en unas industrias convenientemente dotadas denominadas Centros de Depuración de Moluscos Bivalvos. El Real Decreto 571/1999 define este tipo de instalación como "el establecimiento homologado que dispone de estanques alimentados con agua de mar limpia de manera natural o depurada mediante un tratamiento adecuado, en los que se mantienen los moluscos bivalvos vivos durante el tiempo necesario para que puedan eliminar la contaminación de origen microbiano, con el fin de convertirlos en aptos para el consumo humano". En el citado Real Decreto también se recogen las condiciones que deben cumplir (los locales, los estanques, los equipos e instrumentos, higiene...) y se establecen las diferentes etapas del proceso de depuración [BOE (núm. 86) de 10 de abril de 1999].

Los moluscos bivalvos recolectados, una vez que llegan al centro de depuración, se lavan con agua de mar limpia o tratada a presión, eliminando así gran parte de las impurezas (fangos, lodos y algas) y la materia orgánica que puedan llevar adherida externamente. A continuación, se introducen en bandejas que se colocan en los estanques, en donde se realiza un segundo lavado. Posteriormente, se procede al llenado de los estanques con agua de mar limpia o tratada y los moluscos permanecen depurándose de forma continua durante el tiempo suficiente hasta ajustarse a las normas microbiológicas establecidas en la legislación (habitualmente 48 horas). Una vez finalizado el proceso, los estanques se vacían rápidamente y los moluscos se lavan de nuevo con abundante agua limpia, potable o de mar y se envasan para su entrega al consumidor o detallista.

En España y concretamente en Galicia, casi todos los centros de depuración utilizan la cloración como sistema de tratamiento del agua de mar que se empleará a lo largo del proceso de depuración (en Cataluña se usa también la ozonización). En cualquier caso, los niveles residuales de cloro y ozono deben ser completamente eliminados, consiguiéndose generalmente mediante sistemas de caída en cascada, en los que además se favorece una oxigenación del agua.

La eficacia del proceso de depuración depende de factores relacionados con el estado fisiológico del molusco (fases de desove/postdesove); de las características de las instalaciones (longitud de los estanques, caudal y circulación del agua); y de los parámetros físico-químicos del agua utilizada (temperatura, salinidad, concentración de oxígeno disuelto, turbidez). En relación a estos últimos, las condiciones óptimas son: temperatura comprendida entre 14-18°C; salinidad superior al 30‰; concentración de oxígeno disuelto mayor de 5,5 g/l y agua ligeramente turbia (máximo 70 mg/l). Además, las condiciones de extracción, manipulación y transporte de los moluscos repercuten en su capacidad de filtración y por tanto, en el proceso de depuración. En condiciones adecuadas, la velocidad de eliminación de microorganismos contaminantes se ajusta a una curva exponencial, reduciéndose los niveles de bacterias patógenas en un 90-95% transcurridas 24 horas, incluso en el caso de moluscos con altos niveles de contaminación (Cuña Casasbellas, 1992).

## 6. CRYPTOSPORIDIOSIS Y SALUD PÚBLICA

### 6.1. Agente etiológico

Ernest Edward Tyzzer fue el primero en describir y denominar la especie tipo del género *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907, al observar estados de desarrollo de un nuevo organismo en el estómago del ratón común (*Mus musculus*) (Tyzzer, 1907, 1910). En 1912, describe una segunda especie encontrada en ratones de laboratorio, *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912, que difiere de la especie tipo tanto en el lugar de la infección como en la morfología de los ooquistes (Tyzzer, 1912). Otra significativa aportación de Tyzzer al género *Cryptosporidium* fue el descubrimiento de una especie en la bolsa de Fabricio de pollos, erróneamente denominada *C. parvum* (Tyzzer, 1929). Con posterioridad, esta especie se nombró *C. tyzzeri* por Levine en 1961 (Upton, 2003), pero permaneció como *nomen nudum* hasta que Current y col. (1986) realizaron una completa descripción, reemplazando el *nomen nudum* por el de *C. baileyi*. Desde entonces, hubo una continua evolución en la determinación de especies y rango de hospedadores. Diversas especies fueron denominadas simplemente al ser encontradas en un nuevo hospedador, en el cual *Cryptosporidium* no había sido descrito previamente. Desde el momento en que ciertas especies de *Cryptosporidium* se reconocieron como agentes patógenos para el ganado (Panciera y col., 1971) y el hombre (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976), adquirieron una mayor importancia y se incrementaron los estudios de transmisión utilizando aislados ooquisticos de procedencia humana a hospedadores animales. De esta forma, se comprobó que aislados morfológicamente indistinguibles pudieron ser transmitidos entre dos o más especies de hospedadores. Como consecuencia de estos hallazgos, algunos investigadores sugirieron que el género *Cryptosporidium* podría ser monoespecífico (Tzipori y col., 1980). Sin embargo, posteriores estudios de transmisión cruzada y recientes aportaciones moleculares invalidaron esta hipótesis.

En los últimos años, la caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* ha permitido clarificar la confusa taxonomía de las especies de este género y validar la existencia de diferentes especies en cada clase de hospedador vertebrado. Nuevas especies de *Cryptosporidium* han sido denominadas basándose en diferentes parámetros que incluyen no sólo los datos morfológicos sino también los aspectos biológicos, la especificidad por el hospedador, las consecuencias histopatológicas y las particularidades moleculares (Tabla 5).

Por otra parte, diversos estudios moleculares y filogenéticos sugieren que el género *Cryptosporidium* surgió en los Apicomplexa como un linaje independiente mucho antes en el

tiempo que los considerados coccidios típicos, con los que no formaría un grupo monofilético sino que más bien parece conformar un taxón hermano de los Coccidia y los Hematozoa (Escalante y Ayala, 1995; Morrison y Ellis, 1997; Zhu y col., 2000). Esta temprana emergencia del género *Cryptosporidium* podría explicar algunas observaciones biológicas y bioquímicas como son la localización epicelular de los estados de desarrollo, la ausencia de un genoma extracelular y de un plástido característico de muchos miembros de este phylum y el metabolismo de las poliaminas (Göebel y Brandler, 1982; Yarlett y col., 1996; Coombs, 1999; Zhu y col., 2000a).

**Tabla 5. Especies del género *Cryptosporidium* actualmente reconocidas.**

Especie	Ooquiste (µm)	Hospedador tipo	Localización primaria	Referencia
<i>C. muris</i>	5,6 × 7,4	<i>Mus musculus</i>	ES	Tyzzler, 1910
<i>C. parvum</i>	4,5 × 5,5	<i>M. musculus</i>	ID	Tyzzler, 1912
<i>C. meleagridis</i>	4,6 × 5,2	<i>Meleagris gallopavo</i>	ID	Slavin, 1955
<i>C. wrairi</i>	4,6 × 5,4	<i>Cavia porcellus</i>	ID	Vetterling y col., 1971
<i>C. felis</i>	4,5 × 5,0	<i>Felis catis</i>	ID	Iseki, 1979
<i>C. serpentis</i>	5,3 × 6,2	<i>Elaphe guttata</i> ; <i>E. subocularis</i> ; <i>Sanzinia madagascariensis</i>	ES	Levine, 1980
<i>C. baileyi</i>	4,6 × 6,2	<i>Gallus gallus</i>	BF; CL; TR	Current y col., 1986
<i>C. saurophilum</i>	4,7 × 5,0	<i>Eumeces schneideri</i>	CL, ID	Koudela y Modry, 1998
<i>C. andersoni</i>	5,5 × 7,4	<i>Bos taurus</i>	A	Lindsay y col., 2000
<i>C. canis</i>	4,9 × 4,7	<i>Canis familiares</i>	ID	Fayer y col., 2001
<i>C. hominis</i>	4,9 × 5,2	<i>Homo sapiens</i>	ID	Morgan-Ryan y col., 2002
<i>C. molnari</i>	4,7 × 4,4	<i>Sparus aurata</i> ; <i>Dicentrarchus labrax</i>	ES	Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla, 2002
<i>C. galli</i>	6,3 × 8,2	<i>G. gallus</i> ; <i>Pinicola enucleator</i> ; <i>Tetrao urogallus</i> ; especies de Spermestidae y Fringillidae	PR	Ryan y col., 2003
<i>C. suis</i>	5,0 × 4,4	<i>Sus scrofa</i>	ID	Ryan y col., 2004
<i>C. bovis</i>	4,6 × 4,9	<i>Bos taurus</i>	-	Fayer y col., 2005

A, abomaso; BF, bolsa de Fabricio; CL, cloaca; ES, estómago; ID, intestino delgado; PR, proventrículo; TR, tráquea.

A pesar de las similitudes biológicas con los Coccidia (Figura 6) y de la presencia de un orgánulo similar a una mitocondria (Riordan y col., 1999; Putignani y col., 2004), existen ciertas peculiaridades que los distinguen: i) la presencia de una particular estructura

conocida como orgánulo alimentador de membrana (FOM); ii) la ausencia de esporocistos, micropilo y gránulos polares; iii) la capacidad de autoinfección endógena; y iv) la resistencia observada frente a la mayoría de los fármacos anticoccidiales (Lumb y col., 1988 ; Fayer y col., 1997; Armson y col., 2003).

Recientemente, datos moleculares indican que *Cryptosporidium* está más relacionado filogenéticamente con los gregarínidos que con los coccidios (Carreno y col., 1999; Barta, 2001; Perkins y Keller, 2001). Además, la proximidad a este grupo está también apoyada por observaciones biológicas que demuestran la existencia de estados extracelulares en el ciclo biológico de *Cryptosporidium* (Hijawi y col., 2002, 2004; Rosales y col., 2005).

---

**Figura 6.** Tras el desenquistamiento de los ooquistes en la luz intestinal, los esporozoítos penetran en las células del hospedador y se transforman en trofozoítos en el interior de vacuolas parasitóforas formadas en el borde de las microvellosidades del epitelio de la mucosa intestinal. Los trofozoítos sufren una división asexual (esquizogonia=merogonia) dando lugar a merozoítos. Después de ser liberados de los esquizontes Tipo I, los merozoítos invasivos penetran en células adyacentes dando lugar a nuevos esquizontes Tipo I o bien a esquizontes Tipo II. Los esquizontes Tipo II originan merozoítos de segunda generación que penetran en las células para dar lugar a las etapas sexuales, microgamontes y macrogamontes. La mayoría de los cigotos formados tras la fertilización del macrogameto por el microgameto (liberado del microgamonte), se transforman en ooquistes de pared gruesa, que sufren una esporogonia dando lugar a ooquistes esporulados conteniendo cuatro esporozoítos. Los ooquistes esporulados eliminados en las heces son las formas de resistencia del ciclo biológico y transmiten la infección de un hospedador a otro. Un porcentaje menor de cigotos no forma una pared gruesa, sino que tienen una única membrana rodeando a los cuatro esporozoítos. Estos ooquistes de pared fina representan las formas autoinfectantes del ciclo endógeno que permiten el mantenimiento de la infección en el hospedador, sin que éste se exponga a nuevas infecciones externas.

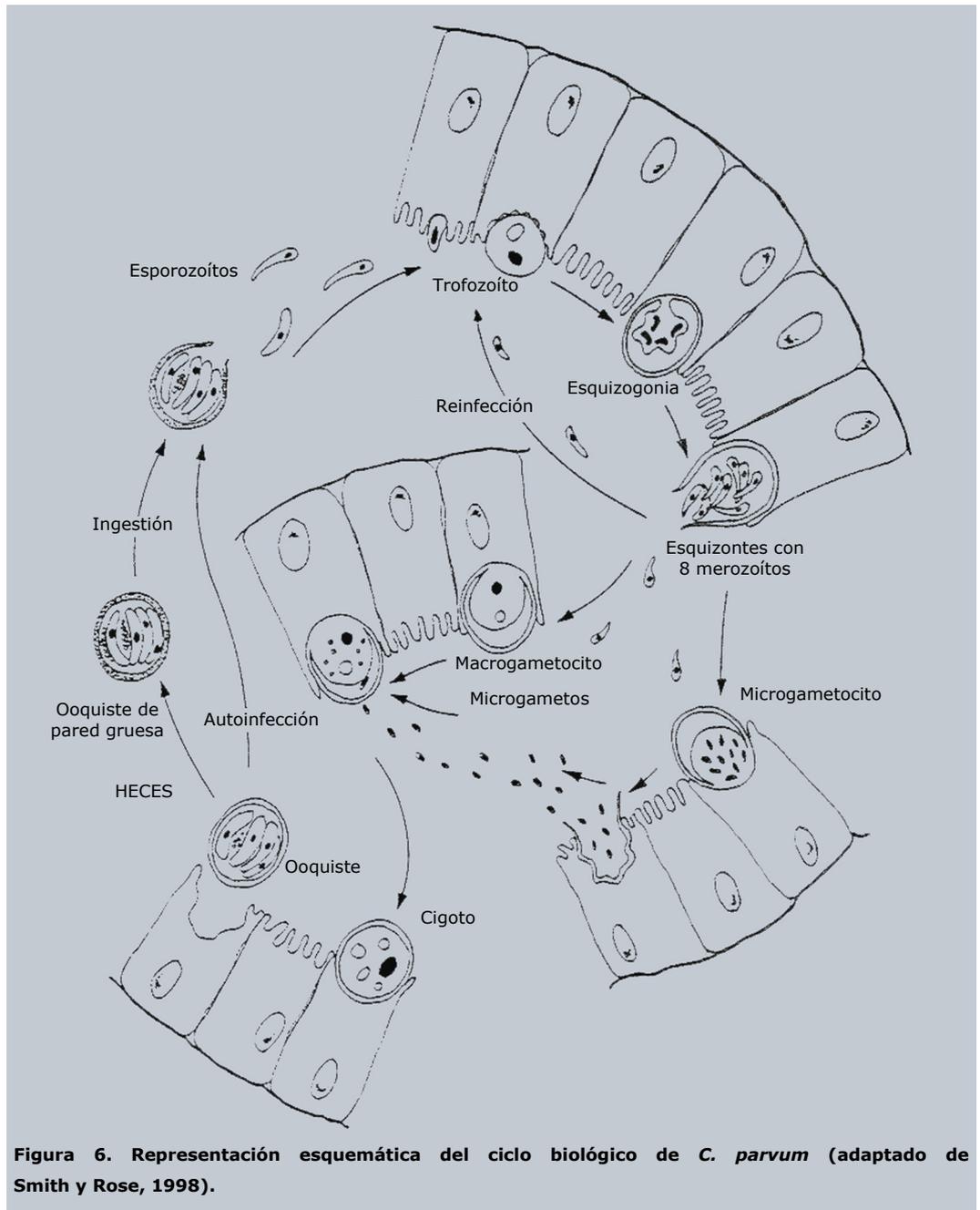


Figura 6. Representación esquemática del ciclo biológico de *C. parvum* (adaptado de Smith y Rose, 1998).

- Importancia de la caracterización molecular de *Cryptosporidium*

La cryptosporidiosis es un importante problema de salud pública a nivel mundial. En países en vías de desarrollo la enfermedad afecta fundamentalmente a la población infantil y a personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En países industrializados, el empleo de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) en personas afectadas por el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ha reducido la prevalencia de la infección, así como la gravedad y duración de las manifestaciones clínicas (Mele y col., 2003). Sin embargo, los brotes hídricos de cryptosporidiosis descritos en estos países no sólo han provocado una alarma social sino que han tenido un fuerte impacto económico (Pretty y col., 2000; Corso y col., 2003).

La capacidad de *Cryptosporidium* spp. para infectar al hombre y a una amplia variedad de animales y la generalizada presencia de las formas de resistencia del parásito en el ambiente, determinan que el hombre pueda adquirir la infección a través de varias rutas de transmisión. Por otra parte, el pequeño tamaño de las formas infectantes y la morfología similar que presentan los ooquistes de diferentes especies o genotipos dificultan el diagnóstico de la cryptosporidiosis y la detección de ooquistes en aguas y productos alimentarios. Por lo tanto, la identificación molecular de *Cryptosporidium* spp. puede ser importante con el fin de: i) identificar las especies de *Cryptosporidium* que infectan al hombre; ii) determinar las fuentes de infección o contaminación; iii) establecer la dinámica de transmisión en grupos de población; iv) caracterizar el espectro clínico y patológico de la cryptosporidiosis; y v) desarrollar medidas preventivas para minimizar el riesgo de infección (Xiao y col., 2004).

Tradicionalmente, *C. parvum* fue considerada como la única especie responsable de la cryptosporidiosis humana. Sin embargo, los resultados de recientes estudios biológicos y moleculares demostraron que *C. parvum* es un complejo de varias especies o genotipos que difieren en características genéticas, especificidad por el hospedador y otros aspectos biológicos (Morgan y col., 1999, 2000; Xiao y col., 2000). De esta forma, numerosos estudios han demostrado que dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *C. hominis*, son las responsables de la mayoría de las infecciones humanas. *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis*, *C. muris* y los genotipos procedentes de ciervos y monos, también infectan a personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas (Cacciò y col., 2005). En particular, *C. meleagridis*, un parásito inicialmente descrito en pavos por Slavin (1955), es actualmente reconocido como un patógeno humano, al ser responsable de un 1% de las infecciones descritas en el Reino Unido (McLauchlin y col., 2000) y de aproximadamente un

10% de las diagnosticadas en Perú, donde su prevalencia es similar a la establecida para *C. parvum* (Cama y col., 2003).

## 6.2. Consideraciones epidemiológicas

Ciertas características biológicas de las especies del género *Cryptosporidium* determinan los aspectos epidemiológicos generales de la infección. El pequeño tamaño de los ooquistes (4-8  $\mu\text{m}$ ); su gran resistencia a las condiciones ambientales y a los desinfectantes habituales; la baja dosis infectante; la capacidad para multiplicarse en un mismo hospedador; y la ausencia de un tratamiento totalmente eficaz son, entre otros, factores que facilitan su difusión (Casemore y col., 1997; Dillingham y col., 2002).

### 6.2.1. Distribución y prevalencia

Desde 1976, año en el que se describieron los primeros casos humanos de cryptosporidiosis (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976), las infecciones por *Cryptosporidium* spp. han sido diagnosticadas en más de 90 países y en todos los continentes (excepto en la Antártida), lo que confirma el carácter ubicuo de este parásito (Ungar, 1990). *Cryptosporidium* es responsable de aproximadamente 500 millones de los casos anuales de infecciones entéricas diagnosticadas en África, Asia y América Latina (Current y Garcia, 1991). La recopilación de numerosos trabajos coprológicos, excluyendo los realizados durante brotes epidémicos y en enfermos de SIDA, reflejan una mayor prevalencia de la infección en países en vías de desarrollo. En una amplia revisión de más de cien estudios realizados en 40 países, Ungar (1990) comprobó que la prevalencia de la infección humana osciló entre: 2,6-21,3% en países africanos; 3,2-31,5% en países centro y suramericanos; y 1,3-13,1% en países asiáticos. En áreas del Pacífico y del Caribe, aunque está descrita la infección, no se dispuso de datos globales. Estas prevalencias superan las establecidas en Europa (0,1-14,1%) y Norteamérica (0,3-4,3%), atribuyéndose a las diferencias existentes en las condiciones sanitarias, a la calidad del agua de bebida y al estado nutricional de la población. Por otra parte, los datos obtenidos en estudios de seroprevalencia indican niveles de exposición al parásito mucho más elevados (O'Donoghue, 1995; Vergara Castiblanco, 1999). En la actualidad, *Cryptosporidium* está considerado como uno de los tres agentes enteropatógenos más frecuentemente identificados en heces diarreicas, pudiendo ocasionar infecciones esporádicas, diarreas del viajero y, en ocasiones, brotes epidémicos importantes (O'Donoghue, 1995; Rose, 1997).

La infección afecta prácticamente a individuos de todas las edades. Entre las personas inmunocompetentes, los grupos con mayor susceptibilidad están constituidos por

niños de 1-5 años y adultos de 20-40 años, este último en menor proporción y relacionado con la exposición ocupacional a animales o como consecuencia de transmisiones secundarias originadas a partir de la población infantil. El riesgo de infección no parece incrementarse con la edad, probablemente debido a la larga exposición al parásito durante la vida, aunque se han diagnosticado casos en personas de edad avanzada (Current, 1983; Casemore, 1990).

Un grupo de alto riesgo para el padecimiento de la cryptosporidiosis es el constituido por personas inmunocomprometidas, en las que la infección adquiere un carácter oportunista. En este grupo se incluyen los enfermos de SIDA o con otras enfermedades del sistema inmunitario y los sometidos a terapia inmunosupresora (Hunter y Nichols, 2002). La prevalencia de la cryptosporidiosis en enfermos de SIDA es elevada, alcanzando valores que oscilan entre un 30-50% en países en vías de desarrollo (Petersen, 1992). En Europa se han descrito valores de prevalencia entorno al 6,6% en personas VIH positivas (Pedersen y col., 1996) y Sorvillo y col. (1994) sugirieron, en un estudio prospectivo, que alrededor de un 3-4% de los enfermos de SIDA padecerían la infección por *Cryptosporidium* durante el desarrollo de su enfermedad. Sin embargo y como consecuencia de un tratamiento más eficaz (HAART), desde hace algunos años se observa un descenso en estos valores (Manabe y col., 1998; Mele y col., 2003). Otros grupos de riesgo para el padecimiento de la infección son las personas residentes en colectividades, las que asisten a instituciones, aquéllas en contacto con enfermos y los viajeros a zonas endémicas (Casemore y col., 1997).

Algunos autores detectaron variaciones estacionales en la aparición e incidencia de la cryptosporidiosis humana. Duong y col. (1995) observaron una mayor incidencia de la infección en niños menores de dos años durante la época de lluvias en Gabón; Clavel y col. (1996) comprobaron en Aragón, una mayor incidencia durante los meses de otoño-invierno, situación que los autores asocian con el inicio del curso escolar; en el Reino Unido, se encontró una mayor incidencia en la primavera y a finales de otoño-principios de invierno, relacionándola con ciertas actividades ganaderas y épocas de lluvia (Casemore, 1990; Palmer y Biffin, 1990). Sin embargo, aunque la transmisión local puede estar afectada por la pluviosidad y por actividades agropecuarias, el comportamiento humano puede ser más importante que los factores climáticos y estacionales (Casemore, 1990).

#### 6.2.2. Dosis infectante

El hombre adquiere la cryptosporidiosis mediante la ingestión de ooquistes eliminados ya esporulados, y por lo tanto con capacidad infectante, en las heces de

hospedadores parasitados. Las rutas de transmisión más frecuentes son por contacto directo persona-persona, animal-hombre o indirectamente a través de aguas destinadas al consumo y/o superficiales, alimentos y posiblemente, por inhalación (Fayer y col., 2000).

La dosis infectante (Di) de *C. parvum* genotipo bovino inicialmente establecida en voluntarios humanos sanos fue de un valor medio de 132 ooquistes (Dupont y col., 1995). Sin embargo, en posteriores estudios se comprobó que, dependiendo de los diferentes aislados, el rango puede oscilar entre 9 y 1042 ooquistes (Okhuysen y col., 1999). En personas inmunocomprometidas esta dosis no está determinada, no obstante se sospecha que la enfermedad puede ser causada por un único ooquiste (Rose, 1997). Además, extrapolaciones realizadas a partir del brote hídrico de Milwaukee sugieren que la Di para ciertos individuos puede variar entre 1 y 10 ooquistes (Newman y col., 1994; Eisenberg y col., 1998).

Por otra parte, el período de prepatencia, es decir el tiempo que transcurre desde la ingestión de los ooquistes infectantes hasta que comienza la excreción de los mismos después de completarse el ciclo biológico, puede ser de tan solo 3-5 días o alcanzar dos semanas (Fayer, 2004). En voluntarios sanos infectados con tres aislados diferentes de *C. parvum*, este período varió entre 4 y 7,7 días. La duración de la excreción ooquistica o período de patencia osciló entre un mínimo de 3,3 días y un máximo de 8,4 días (Okhuysen y col., 1999).

### 6.2.3. Resistencia de los ooquistes a las condiciones ambientales

Estudios bioquímicos de las formas infectantes de *C. parvum* demostraron que la pared ooquistica presenta numerosos puentes bisulfito, confiriéndole una elevada resistencia a las condiciones ambientales y por tanto, constituyendo una barrera protectora para los esporozoítos (Mitschler y col., 1994). En la Tabla 6 se exponen los resultados de diversos estudios de supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* después de haber sido sometidos a diferentes condiciones ambientales.

La temperatura es un factor que influye en la supervivencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Debido a la composición proteica de la pared ooquistica, la temperatura elevada puede provocar la desnaturalización de las proteínas y consecuentemente alterar la integridad de dicha pared, exponiendo los esporozoítos a condiciones que comprometen su supervivencia (Harris y Petry, 1999). *Cryptosporidium* puede sobrevivir durante meses en agua a temperaturas que oscilan entre 4-25°C (Fayer, 1994; Pokorny y col., 2002). Sin embargo, valores de temperatura superiores afectan

negativamente a la viabilidad e infectividad ooquisticas. De igual forma, temperaturas de congelación también alteran la infectividad. Así, mientras que los ooquistes sometidos a temperaturas de -20°C; -10°C; y -5°C permanecen viables durante 8 horas, una semana y dos meses respectivamente, la congelación a -70°C inactiva inmediatamente los ooquistes de *C. parvum*, incluso con crioprotectores (Robertson y col., 1992; Fayer y col., 1998).

**Tabla 6. Efecto de diversos factores ambientales sobre la viabilidad/infectividad de ooquistes de *C. parvum*.**

Factor	Referencia	Método	Condiciones	Ooquistes
Temperatura	Fayer y col., 1996	IR	14 días; 30°C en agua	Infectantes
	Harp y col., 1996	IR	5 seg; 71,7°C en agua	No infectantes
	Fayer, 1994	IR	1min; >72,4°C en agua	No infectantes
			>2min; 64,2°C	No infectantes
			5min; 59,7°C	Infectantes
	Robertson y col., 1992	CV	152h; -22°C	<10% viables
			Congelación instantánea	No viables
	Fayer y Nerad, 1996	IR	1, 8 y 24h; -70°C	No infectantes
1, 3 y 5h; -20°C			Infectantes	
Desecación	Robertson y col., 1992	CV	4h; T ambiente	<1 viables
Agua				
Estéril	Olson y col., 1999	CV/IR	>12 semanas; -4°C	Viables e infectantes
	Jenkins y col., 2003	IR/CC	7 meses; 15°C	Infectantes
Desionizada	Fayer y col., 1998	IR	6 meses; 20°C	Infectantes
			7 días; 35°C	Infectantes
Del grifo	Robertson y col., 1992	CV	176 días; T ambiente	4% viables
De río	Robertson y col., 1992	CV	176 días; T ambiente	6% viables
	Pokorny y col., 2002	CC	1 semana; -20°C	No infectantes
			14 semanas; 4°C y 10°C	Infectantes
De mar	Robertson y col., 1992	CV	12 semanas; 21-23°C	<1% infectantes
			35 días; 4°C	62% viables
	Fayer y col., 1998	IR	4 semanas; 30‰; 20°C	Infectantes
	Freire-Santos y col., 1999	IR	40 días, 35‰; 18°C	Infectantes
Heces bovinas	Robertson y col., 1992	CV	176 días; T ambiente	34% viables
Heces humanas	Robertson y col., 1992	CV	178 días; 4°C	22% viables

CC, cultivo celular; CV, colorantes vitales; IR, infectividad en ratones; T, temperatura.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. también sobreviven en agua de mar durante largos períodos de tiempo, manteniéndose viables tras permanecer en oscuridad durante 35 días a 4°C (Robertson y col., 1992). Estudios de infectividad en ratones demostraron que las mayores intensidades de infección se producen cuando los ooquistes se mantienen a bajas salinidades durante cortos períodos de tiempo (Fayer y col., 1998). Freire-Santos y col. (1999, 2000) valoraron de forma conjunta los efectos de la salinidad, la temperatura y el tiempo sobre la supervivencia de los ooquistes de *C. parvum* en el medio acuático, comprobando que la temperatura no es un factor limitante. Sin embargo, la salinidad, el tiempo y su interacción afectan significativamente a la infectividad ooquistica. Los autores demostraron que ooquistes mantenidos durante 40 días en agua de mar con salinidad del 35‰ y a una temperatura de 18°C fueron infectantes para ratones recién nacidos.

Otro factor ambiental que puede afectar a la supervivencia de las formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. es el grado de humedad. Robertson y col. (1992) demostraron que los ooquistes de *C. parvum* son susceptibles a la desecación: sólo un 3% de ellos permanecieron viables tras secarse una suspensión acuosa depositada en un portaobjetos y mantenida a temperatura ambiente durante 2 horas. Mayores períodos de tiempo ocasionaron prácticamente una inactivación total (>99% al cabo de 4 horas).

El tipo de sustrato sobre el que se encuentran los ooquistes también influye en su viabilidad e infectividad. Robertson y col. (1992), mediante ensayos de permeabilidad a colorantes vitales, demostraron que entre un 0-59% de los ooquistes de *Cryptosporidium* sobrevivieron después de permanecer 178 días en heces humanas conservadas a 4°C. De igual forma, comprobaron que un 39% de los ooquistes de origen bovino se mantuvieron viables en heces de ternero a 4°C después de 176 días. Además, Jenkins y col. (1999) demostraron que la proporción de ooquistes de *C. parvum* potencialmente infectantes varía notablemente según el tipo de suelo y/o residuo animal en el que se mantienen. Por otra parte, Barwick y col. (2003) al analizar muestras de suelo recogidas en granjas de ganado bovino, comprobaron un menor número de ooquistes en los suelos de pH neutro o básico.

Las poblaciones bacterianas existentes en el medio en el que se encuentran los ooquistes también pueden repercutir en su supervivencia. De esta forma, su viabilidad está influenciada por los niveles de bacterias heterótrofas presentes en aguas naturales (Heisz y col., 1997), comprobándose que los ooquistes sobreviven con más facilidad en aguas de río previamente filtradas (Chauret y col., 1998). También se demostró el efecto adverso en la supervivencia ooquistica provocado por *Serratia marcescens*, una bacteria que posee gran actividad quitinolítica (Zuckerman y col., 1997). Deng y col. (2001) observaron que ciertas

especies bacterianas presentes en residuos animales causan la inactivación de *C. parvum* al inducir el desenquistamiento. Por otra parte, se comprobó que varios organismos eucariotas presentes en medios hídricos, entre los que se incluyen varias especies de rotíferos, amebas, copépodos, y el nematodo *Caenorhabditis elegans* son capaces de ingerir ooquistes de *C. parvum*, pudiendo así influir tanto en su supervivencia como en la diseminación del patógeno en el ambiente (Fayer y col., 2000a; Ares-Mazás y col., 2004; Huamanchay y col., 2004; Méndez-Hermida y col., 2005).

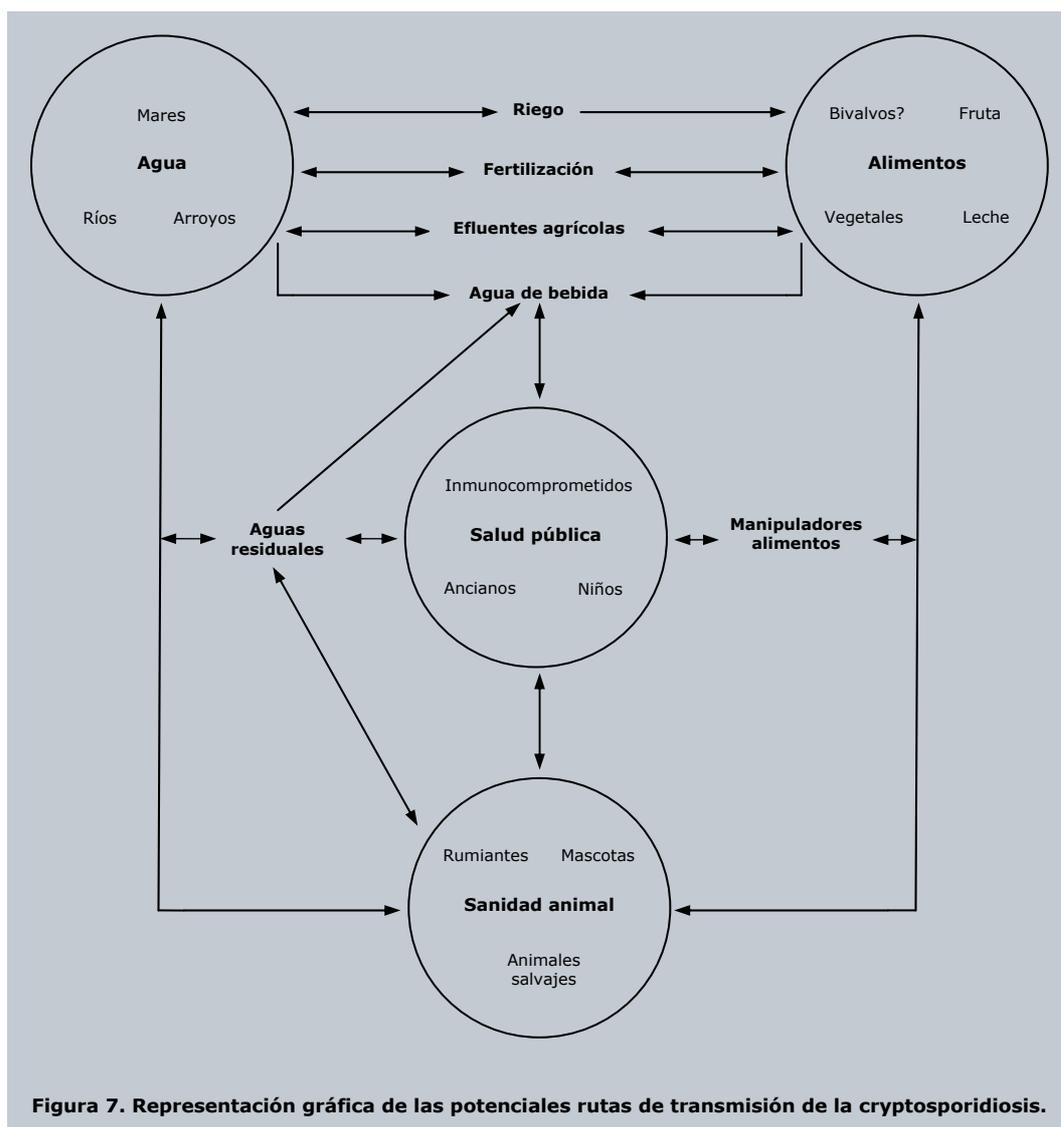
#### 6.2.4. Rutas de transmisión

La cryptosporidiosis es una infección que afecta a una gran diversidad de animales vertebrados. Como se ha comentado anteriormente, *C. parvum* y *C. hominis* son las dos especies que habitualmente se identifican en muestras humanas. *C. parvum* es también capaz de infectar a más de 155 especies de mamíferos, algunas de las cuales eliminan grandes cantidades de ooquistes en sus heces (Fayer, 2004). Así, un ternero infectado puede excretar aproximadamente  $10^{10}$  ooquistes/día durante el período de patencia (Blewett, 1989; Widmer y col., 1996) y un enfermo con SIDA y cryptosporidiosis puede llegar a eliminar  $1,2 \times 10^9$  ooquistes en 24 horas (cit. Donnelly y Stentiford, 1997). Estos datos ponen de manifiesto la existencia de potenciales fuentes de contaminación ambiental y en consecuencia el alto riesgo que supone para la salud pública.

Evidentemente, el mecanismo de transmisión es la ingestión de ooquistes bien a través del contacto con aguas, alimentos y/o superficies expuestas a heces humanas y/o de animales infectados o bien por contacto directo persona-persona (Rose, 1997) (Figura 7).

La transmisión de la infección persona-persona se evidenció por la contaminación accidental de un investigador con un concentrado de ooquistes de *C. parvum* de origen humano (Blagburn y Current, 1983). Desde entonces, este tipo de transmisión ha sido descrita frecuentemente como brotes en guarderías, instituciones y núcleos familiares, estimándose que esta ruta es la responsable de aproximadamente un 60% de los casos diagnosticados (Cordell y Addiss, 1994; Puech y col., 2001; Redlinger y col., 2002; Miller y col., 2003; Gómez-Couso y col., 2004).

Sorvillo y col. (1994) y Pedersen y col. (1996) sugirieron que la cryptosporidiosis puede ser sexualmente adquirida al comprobar una mayor prevalencia de la infección en enfermos de SIDA en los que se sospechó la vía sexual en la transmisión del VIH con respecto a otros grupos de riesgo. Recientemente, Hellard y col. (2003) concluyen que el comportamiento sexual es un factor de riesgo para el padecimiento de la cryptosporidiosis en hombres homosexuales.



**Figura 7. Representación gráfica de las potenciales rutas de transmisión de la cryptosporidiosis.**

Diversas publicaciones apoyan la transmisión nosocomial de la cryptosporidiosis. Baxby y col. (1983) relacionaron la presencia de la infección en una enfermera con el contacto con un niño hospitalizado con cryptosporidiosis aguda y posteriores estudios demostraron este tipo de transmisión en hospitales (Koch y col., 1985; Dryjanski y col., 1986; el-Sibaei y col., 2003; Aygun y col., 2005). La contaminación de salas y unidades de transplante, además de posibles negligencias higiénicas del personal hospitalario, pueden contribuir a la diseminación de la infección, afectando fundamentalmente a individuos inmunocomprometidos (Martino y col., 1988; Navarrete y col., 1991).

Considerando que ciertos síntomas respiratorios son relativamente frecuentes durante el curso de la cryptosporidiosis, tanto en pacientes inmunocomprometidos como en personas inmunocompetentes, y habiéndose aislado ooquistes en el esputo de individuos inmunocomprometidos, se planteó la posibilidad de que la transmisión también pueda producirse por vía aerógena (Hojlyng y col., 1987). Egger y col. (1990a) hallaron una correlación entre los síntomas respiratorios y los procesos diarreicos desencadenados por *Cryptosporidium* en población infantil y concluyen que la afección del tracto respiratorio puede ser común en niños sanos, contribuyendo a la transmisión persona-persona. Sin embargo, otros autores sugieren que la infección respiratoria en mamíferos puede ser debida a una aspiración accidental del vómito o a una diseminación por vía sanguínea (Mascaró y col., 1994).

La transmisión zoonótica de la cryptosporidiosis se consideró a partir de una serie de observaciones: i) la descripción de los dos primeros casos humanos en los que se demostró una exposición previa a animales de granja (Meisel y col., 1976; Nime y col., 1976); ii) el diagnóstico de infecciones en personas que mantenían contacto con animales parasitados como granjeros y veterinarios (Anderson y col., 1982; Reese y col., 1982; Current y col., 1983); y iii) ante el hecho de que algunos casos de cryptosporidiosis humana coincidieron con brotes de infección en corderos (Casemore, 1989). En la actualidad, el carácter zoonótico de la infección no se cuestiona ante el gran número de reservorios existentes y ante la demostrada presencia en el hombre de especies de *Cryptosporidium* originarias de animales (Fayer, 2004; Xiao y col., 2004).

La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en diversas especies de animales de compañía y mascotas está documentada (Robertson y col., 2000; Irwin, 2002). Fleta-Zaragozano y col. (1994) describieron la infección accidental de una niña de dos años a partir de un cordero-mascota con cryptosporidiosis. Además, se han publicado varios casos de infección humana relacionados con el contacto con gatos parasitados (Lewis y col., 1985; Egger y col., 1990). Recientemente, ha sido confirmada la presencia de *C. felis* y *C. canis* en personas con procesos diarreicos, demostrando la implicación de estos animales como fuente de infección para el hombre, particularmente, aunque no de forma exclusiva, para individuos inmunocomprometidos (cit. Cacciò y col., 2005).

En los últimos años del siglo XX, se reconoció la posibilidad de la transmisión de la cryptosporidiosis a través de la cadena alimentaria (Laberge y col., 1996; Rose y Slifko, 1999). Aunque escasos, algunos alimentos han sido asociados con brotes de infección: zumo de manzana (Millard y col., 1994); ensalada de pollo (Besser-Wiek y col., 1996); y

leche no pasteurizada (Gelletlie y col., 1997; Harper y col., 2002). La importancia de *Cryptosporidium* como agente causal de enfermedad transmitida a través de los alimentos está probablemente subestimada, al igual que en el caso de otros protozoos. Existen brotes de gastroenteritis en los que no se determina la etiología y la ausencia de métodos adecuados para la detección de ooquistes en matrices alimentarias puede contribuir a esta situación (Chalmers, 2003). Sin embargo, ooquistes de *Cryptosporidium* spp. fueron detectados en diferentes frutas y vegetales utilizados habitualmente crudos en la elaboración de ensaladas (Monge y Chinchilla, 1996; Ortega y col., 1997; Robertson y Gjerde, 2001; Robertson y col., 2002). Además, diversos estudios demostraron la contaminación por *Cryptosporidium* spp. de distintas especies de moluscos bivalvos destinados al consumo humano (Graczyk, 2003).

La contaminación fecal del agua representa numéricamente la principal fuente de infección de la cryptosporidiosis humana. Los cauces de agua transportan las formas infectantes a áreas recreacionales, tanto de agua dulce como salada, abastecimientos de agua de bebida y a sistemas de regadío que a su vez pueden contaminar alimentos de cultivo o industriales. Además, es cada vez más frecuente el empleo de aguas residuales depuradas para el riego de ciertas zonas recreacionales (parques públicos, zonas verdes urbanas, campos de golf...) utilizando generalmente el sistema de riego por aspersión, lo que representa un posible mecanismo de transmisión de enteropatógenos a través de los aerosoles formados (partículas de diámetro comprendido entre 0,01-50  $\mu\text{m}$ ). El hallazgo de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas residuales brutas o parcialmente tratadas, en aguas superficiales e incluso en aguas destinadas al consumo, indica una amplia contaminación fecal y el alto riesgo que representa para la salud pública (Rose, 1997).

Se han descrito diversos brotes de cryptosporidiosis, que afectaron a más de 10000 personas, relacionados con aguas recreacionales fundamentalmente piscinas (Fayer y col., 2000; Yoder y col., 2004). La contaminación accidental con materias fecales y la resistencia de las formas infectantes a la desinfección por cloro son factores que facilitan la transmisión (Carpenter y col., 1999). Así, en un estudio llevado a cabo en 54 piscinas en Alemania, se identificaron ooquistes de *Cryptosporidium* en el 17% de las muestras (cit. Chalmers, 2003). Sin embargo, no se relacionaron casos de cryptosporidiosis con el agua de mar, a pesar de que se detectaron ooquistes en estuarios y en mamíferos marinos (Fayer y col., 2004).

Desde hace más de dos décadas, *Cryptosporidium* se incluye entre los agentes etiológicos de la diarrea del viajero, al detectarse en individuos sanos de países

industrializados y procedentes de determinadas zonas geográficas (Jokipii y col., 1985; Ma y col., 1985; Sterling y col., 1986; Gatti y col., 1993). Por analogía de este parásito con otros enteropatógenos, se sospechó que la contaminación hídrica podría desempeñar un importante papel en la epidemiología de la enfermedad. Los iniciales hallazgos de ooquistes en aguas superficiales y residuales tratadas y no tratadas apoyó esta hipótesis (Rose y col., 1986, 1991; Madore y col., 1987; Ongert y Stibbs, 1987; LeChevallier y col., 1991, 1991a).

Desde que D'Antonio y col. (1985) documentaron el primer brote hídrico de cryptosporidiosis en Texas (Estados Unidos), se han descrito a nivel mundial más de 49 brotes de infección relacionados con el agua de bebida, la mayoría de ellos en Estados Unidos, Reino Unido y Japón (Fayer, 2004). Dichos brotes se atribuyeron fundamentalmente a deficiencias en los procesos de tratamiento de aguas y a filtraciones de aguas residuales en los sistemas de distribución (Rose, 1997; Smith y Rose, 1998). Al ser las formas infectantes de *Cryptosporidium* particularmente resistentes a los desinfectantes químicos utilizados en el tratamiento de aguas de bebida, la eliminación física del parásito por filtración constituye la etapa más importante de este proceso. De todos modos, puede no proporcionar una protección absoluta ya que en algunos brotes se había utilizado este sistema. Además, diversos estudios han demostrado la existencia de un pequeño número de ooquistes en aguas filtradas y desinfectadas (LeChevallier y col., 1991a; LeChevallier y Norton, 1995). Sin embargo, recientemente Goh y col. (2005) comprobaron que la instauración de un sistema de filtración del agua de bebida disminuyó en un 79% el riesgo de contraer la infección.

El mayor brote hídrico de cryptosporidiosis documentado ocurrió en Milwaukee en 1993 y afectó a aproximadamente 403000 personas (Mac Kenzie y col., 1994). La causa fue la contaminación del lago Michigan que abastecía a una de las plantas de potabilización de agua de dicha ciudad, además de un deficiente tratamiento de la alta turbidez que presentaba el agua. Las intensas precipitaciones que tuvieron lugar con anterioridad en la zona y el elevado censo de ganado bovino existente en las inmediaciones del lago se consideraron factores que contribuyeron al brote. Sin embargo, el análisis molecular de muestras fecales procedentes de pacientes afectados durante el brote, permitió identificar los ooquistes como pertenecientes a la especie *C. hominis*, sugiriendo que la contaminación tuvo un origen humano (Peng y col., 1997).

La presencia de formas infectantes del parásito en ciertas estructuras externas y en las heces de algunos animales con hábitos coprófagos, plantea la posibilidad de que éstos puedan actuar como vehículos diseminadores de la infección (cit. Slifko y col., 2000). Zerpa

y Huicho (1994) describieron un caso de cryptosporidiosis infantil asociado con la identificación de ooquistes de *C. parvum* en cucarachas. Varios autores observaron la presencia de ooquistes en la superficie externa, tracto gastrointestinal y heces de varias especies de moscas y escarabajos tras exponerlos experimentalmente a heces contaminadas de origen bovino (Graczyk y col., 1999, 2000a; Mathison y Ditrich, 1999; Follet-Dumoulin y col., 2001). Estudios posteriores, confirmaron la existencia de ooquistes de *C. parvum* en moscas naturalmente contaminadas, detectándose un alto porcentaje de ooquistes viables (Clavel y col., 2002; Graczyk y col., 2003a; Szostakowska y col., 2004).

### **6.3. La parasitosis en el hombre**

#### **6.3.1. Fundamentos patogénicos y manifestaciones clínicas**

Los mecanismos patogénicos por los que *Cryptosporidium* spp. origina diarrea y malabsorción son complejos e indudablemente, consecuencia de una combinación del daño que el parásito origina en la superficie intestinal y de la respuesta del hospedador a la infección. Las interacciones iniciales parásito-célula hospedadora son cruciales para el desarrollo de la infección y suponen un proceso que implica ligandos del parásito y receptores del enterocito hospedador. Los estados invasivos de los Apicomplexa, zoítos, presentan orgánulos secretores especializados (roptrías, micronemas y gránulos densos) que componen el denominado complejo apical y son los encargados de secretar diferentes moléculas que facilitan la unión, invasión y formación de la vacuola parasitófora (Tzipori y Ward, 2002).

Mediante estudios de microscopía óptica y electrónica se comprobó que los estados invasivos, esporozoítos y merozoítos, se unen al enterocito mediante su polo anterior, provocando una invaginación en su membrana (Lumb y col., 1988; Aji y col., 1991). La célula hospedadora engloba al parásito en una vacuola parasitófora intracelular, pero extracitoplasmática, en la cuál el trofozoíto se desarrolla (Tzipori y Griffiths, 1998; Flanigan y col., 1991). Utilizando técnicas inmunológicas y moleculares, se identificaron en los estados invasivos de *C. parvum* diferentes moléculas implicadas en la unión e invasión de las células epiteliales hospedadoras (Tabla 7).

Por otra parte, se comprobó que diversos componentes del citoesqueleto de la célula hospedadora se alteran durante los procesos de invasión y desarrollo de *C. parvum*, formándose una estructura particular en la interfaz hospedador-parásito denominada orgánulo alimentador de membrana (FOM) que separa directamente los

citoplasmas de las dos células (Marcial y Madara, 1986; Lumb y col., 1988; Elliot y Clark, 2000).

Mediante cultivos celulares se observó la existencia de un daño celular consistente en la alteración de uniones intercelulares, en una pérdida de la función de barrera y en la liberación intracelular de lactato deshidrogenasa (Adams y col., 1994). Aunque se desconocen los mecanismos implicados en esta alteración de membranas durante la invasión por *Cryptosporidium*, ciertas moléculas, como fosfolipasas, proteasas o hemolisinas, pueden ser responsables del daño tisular (Okhuysen y Chappell, 2002).

Actualmente existe una controversia sobre el fenómeno de apoptosis de la célula hospedadora durante la infección por *C. parvum*. Estudios preliminares *in vitro* con diferentes líneas celulares demostraron que *C. parvum* causaba apoptosis (Chen y col., 1998; Ojcius y col., 1999; Widmer y col., 2000). Sin embargo, diferentes autores comprobaron que a pesar de detectar un cierto nivel de apoptosis durante la infección, la mayoría de las células afectadas estaban claramente protegidas frente a la muerte celular, incluso en presencia de fuertes agentes inductores del fenómeno (McCole y col., 2000; Chen y col., 2001). Recientemente, Mele y col. (2004) observaron que dependiendo del estado del desarrollo, *C. parvum* puede inhibir o promover la apoptosis de la célula hospedadora, sugiriendo que el parásito es capaz de regular la expresión génica de dicha célula.

Como consecuencia de la invasión de los enterocitos se desencadena una respuesta inmunitaria innata caracterizada tanto por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias [interleuquina-8 (IL-8); factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); y la interleuquina regulada por activación, secretada y expresada por células T normales (RANTES)] que favorecen la aparición de neutrófilos y macrófagos, como por la producción de una citoquina anti-inflamatoria denominada factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que estimula la síntesis de proteínas extracelulares y regula la reparación de la mucosa intestinal (Laurent y col., 1997; Seydel y col., 1998; Maillot y col., 2000; Robinson y col., 2000; Roche y col., 2000; Deng y col., 2004; Ehigiator y col., 2005). Además, se demostró un aumento de las prostaglandinas PGE-2 y PGE-2 $\alpha$  que contribuyen a la secreción de fluidos por parte de la mucosa (Laurent y col., 1998, 1999; Deng y col., 2004). También se comprobó un aumento en la producción de óxido nítrico y del péptido antimicrobiano  $\beta$ -defensina-2, sugiriendo que estas moléculas pueden desempeñar un papel importante en la respuesta inmune innata del hospedador (Arrowood y col., 1991; Leitch y He, 1994; Tarver y col., 1998; Zaalouk y col., 2004; Gookin y col., 2005).

**Tabla 7. Moléculas implicadas en las interacciones iniciales parásito-célula hospedadora en la infección por *C. parvum*.**

Componente molecular	Localización	Referencia
GP15	Superficie del zoíto	Cevallos y col., 2000; Jenkins y col., 1993; Strong y col., 2000
GP40	Extremo apical del esporozoíto, probablemente en micronemas, superficie y región apical del merozoíto	Cevallos y col., 2000; Strong y col., 2000; Tosini y col., 1999
GP900	Micronemas del zoíto y superficie del esporozoíto	Barnes y col., 1998; Petersen y col., 1992; Bonnin y col., 2001
P23	Superficie del esporozoíto	Perryman y col., 1996
CPS-500	Membrana superficial del zoíto	Riggs y col., 1999
CSL	Complejo apical del zoíto	Langer y col., 2001; Riggs y col., 1997; Langer y Riggs, 1999
CP47	Complejo apical del esporozoíto	Nesterenko y col., 1999
Cpa135	Probablemente en micronemas	Tosini y col., 1999, 2004
TRAP-C1	Complejo apical del esporozoíto, probablemente en micronemas	Spano y col., 1998
Lectina Gal/GalNAc	Componente de la membrana de la vacuola parasitófora	Joe y col., 1998
CP2	En membranas de distintos estados de desarrollo	O'Hara y col., 2004
Fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> )	Desconocida	Pollok y col., 2003
Hemolisina H4	Desconocida	Steele y col., 1995
Proteasas	Superficie del esporozoíto o secretadas	Forney y col., 1996, a, b; Nesterenko y col., 1995; Okhuysen y col., 1994
HSP70, HSP90	Propuesto en el citoplasma	Khramtsov y col., 1995; Woods y col., 1999

A pesar de que *C. parvum* es un parásito mínimamente invasivo, provoca una respuesta inmunitaria humoral y celular en el hospedador (Riggs, 2002). Las personas infectadas desarrollan anticuerpos séricos y secretores, cuya presencia no evita que la infección pueda cronificarse en enfermos de SIDA (Ungar y col., 1986; Cozon y col., 1994; Benhamou y col., 1995). Estos hechos sugieren que la inmunidad humoral no es suficiente

para controlar el curso de la parasitosis, siendo los linfocitos T cruciales en el control de la infección crónica por *C. parvum* (Heine y col., 1984; Flanigan y col., 1992; Waters y Harp, 1996). Aunque la inmunidad celular mediada por linfocitos T- $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es el componente inmunitario más importante para la resolución de la infección, estudios recientes, utilizando modelos murino y bovino con cryptosporidiosis, han sugerido un papel protector de los linfocitos T- $\gamma\delta$  (Deng y col., 2004a).

Por otra parte, la citoquina pro-inflamatoria interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) puede ser un componente importante tanto de la respuesta inmune innata como de la mediada por células, al observarse un incremento de la misma en la mucosa intestinal humana y animal durante la infección por *C. parvum*. Sin embargo, los mecanismos y rutas por los cuales el IFN- $\gamma$  favorece la resolución de la parasitosis todavía no están demostrados (Deng y col., 2004a).

El mecanismo específico por el cual *Cryptosporidium* induce diarrea tampoco ha sido identificado. Ante la presencia de una diarrea secretora profusa en pacientes con cryptosporidiosis y considerando que la absorción de glucosa-ión sodio (Na<sup>+</sup>) y agua está disminuida y la secreción de ión cloruro (Cl<sup>-</sup>) está incrementada (Argenzio y col., 1990, 1993; Moore y col., 1995), se planteó la posibilidad de que el parásito produjese una enterotoxina. Sin embargo, es poco probable que la diarrea asociada a la infección sea debida únicamente a un efecto enterotoxigénico, ya que la atrofia de las vellosidades y otras alteraciones estructurales de la mucosa son también responsables de la malabsorción de fluidos y nutrientes que desencadenan procesos diarreicos (Goodgame y col., 1993, 1995).

Como en todas las infecciones entéricas, los portadores asintomáticos desempeñan un importante papel en el mantenimiento y transmisión de la cryptosporidiosis en la población. Aunque escasos, diversos estudios demostraron la existencia de infecciones asintomáticas en población infantil, principalmente de países en vías de desarrollo, y en personas afectadas por el VIH (Hadad-Meléndez y col., 1993; Kamel y col., 1994; Pettoello-Mantovani y col., 1995; Esteban y col., 1998; Solórzano-Santos y col., 2000; Hörman y col., 2004; Palit y col., 2005).

Las manifestaciones clínicas de la cryptosporidiosis humana dependen del estado inmunitario del hospedador, reconociéndose tres categorías clínicas: aguda autolimitada o enfermedad transitoria, crónica y fulminante.

La cryptosporidiosis aguda autolimitada o enfermedad transitoria es la forma clínica más frecuente en personas inmunocompetentes. El período de prepatencia suele ser de 4-7 días, transcurridos los cuales se manifiesta un proceso diarreico que durante un máximo de 7 días puede desencadenar entre 8-20 deposiciones diarias. Sin embargo, la excreción ooquistica puede alcanzar una duración superior a un mes después de la resolución de los síntomas. Además de la diarrea acuosa, también se han descrito malestar general, dolor abdominal difuso, anorexia y fiebre moderada en algunos casos (Chappell y col., 2003).

La cryptosporidiosis crónica se manifiesta habitualmente en enfermos afectados por el SIDA y en personas con un cierto grado de malnutrición (Blanshard y col., 1992; Cárcamo y col., 2005). El cuadro clínico se caracteriza también por diarrea acuosa, dolor abdominal difuso, náuseas, vómitos, cefaleas, anorexia, fiebre y pérdida de peso. La Organización Mundial de la Salud establece que la cryptosporidiosis con diarrea de más de un mes de duración y en enfermos con una infección por el VIH bien demostrada y no existiendo otras causas de inmunodeficiencia que puedan explicarla, es una de las situaciones clínicas diagnósticas de SIDA (Gatell y col., 1996).

La infección fulminante solamente se ha descrito en enfermos de SIDA o con inmunosupresión inducida por fármacos. En estos casos, la enfermedad se presenta como un cuadro similar al cólera, ocasionando la muerte por "shock" hipovolémico (Hunter y Nichols, 2002).

### 6.3.2. Situación actual del tratamiento y control

Los estudios de tratamiento de la cryptosporidiosis tienen una larga e infructuosa historia. Numerosos fármacos han sido evaluados, tanto *in vitro* como *in vivo*, sin que ninguno de ellos haya mostrado una eficacia totalmente satisfactoria. Los conocimientos actuales sobre la bioquímica de *Cryptosporidium* y sus interacciones con la célula hospedadora deben de establecer las bases para una investigación terapéutica más racional (Armson y col., 2003).

En sanidad humana, uno de los primeros fármacos empleados con relativo éxito fue el antibiótico macrólido espiramicina. Sin embargo, su eficacia en personas VIH positivas nunca ha sido demostrada en ensayos clínicos controlados (Blagburn y Soave, 1997). Otros antibióticos macrólidos evaluados también con resultados contradictorios fueron la azitromicina y la claritromicina (Smith y Corcoran, 2004). En un estudio de tratamiento con roxitromicina en 24 personas infectadas, Sprinz y col. (1998) comprobaron una remisión

completa de los síntomas en el 50% de los enfermos y una respuesta parcial en el 29% de los restantes, después de 4 semanas de tratamiento.

La paromomicina, un antibiótico aminoglucósido, se emplea en muchos países como fármaco de elección en el tratamiento de la cryptosporidiosis, aunque también con resultados diversos. Mientras que White y col. (1994) y Flanigan y col. (1996) observan una disminución significativa en la frecuencia de las deposiciones y un acortamiento en el período de excreción ooquistica, Hewitt y col. (2000) no observaron diferencias entre la administración de paromomicina y un placebo respecto a la duración de la diarrea, variaciones de peso corporal y período de patencia.

Recientemente, la nitazoxanida [2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida], un antiparasitario sintético de amplio espectro, se ha revelado como uno de los fármacos más prometedores en el tratamiento de la cryptosporidiosis. Administrada por vía oral y una vez en sangre, es rápidamente hidrolizada por esterasas, obteniéndose el derivado desacetilado tizoxanida (desacetil-nitazoxanida) que constituye el metabolito activo (Stockis y col., 1996). Estudios *in vitro* realizados con protozoos y bacterias anaerobias mostraron que la nitazoxanida inhibe el enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductasa, esencial para el metabolismo energético de organismos anaerobios (Sisson y col., 2002). Sin embargo, esta ruta probablemente no sea la única por la cual la nitazoxanida muestra su actividad antiprotozoaria, además de desconocerse el mecanismo de acción antihelmíntico (Fox y Saravolatz, 2005). En diciembre de 2002, el organismo encargado del control de alimentos y fármacos de Estados Unidos ("United States Food and Drug Administration") aprobó la administración oral de nitazoxanida para el tratamiento de procesos diarreicos causados por especies de *Cryptosporidium* en niños de 1-11 años de edad (Fox y Saravolatz, 2005).

En personas con SIDA, el tratamiento de elección es la restauración de la función inmune mediante HAART, que actúa no sólo profilácticamente sino también como tratamiento y profilaxis secundaria cuando la cryptosporidiosis está establecida en estos enfermos (cit. Smith y Corcorán, 2004). Varios estudios comprobaron que los fármacos inhibidores de la proteasa usados en la HAART (nelfinavir, indinavir, ritonavir) reducen el desarrollo *in vitro* de *C. parvum*, mostrando un efecto sinérgico cuando se combinan con la paromomicina (Hommer y col., 2003; Mele y col., 2003).

Considerando que la transmisión hídrica es el mecanismo numéricamente más importante en la epidemiología de la cryptosporidiosis, en la actualidad las medidas de control se dirigen a la puesta a punto y perfeccionamiento de técnicas que permitan

detectar e identificar las formas infectantes de este parásito en el agua (Fayer, 2004). Tan solo dos países, Estados Unidos y el Reino Unido, han adoptado medidas para optimizar el tratamiento del agua potable y minimizar el riesgo de contaminación por *Cryptosporidium* (USEPA, 2001; DWI, 2003) e incluso, en el Reino Unido y a través del organismo "Drinking Water Inspectorate" (DWI), las empresas de tratamiento de aguas destinadas al consumo humano están legalmente obligadas a monitorizar continuamente la efectividad del tratamiento aplicado. De acuerdo con el informe de la DWI, la presencia de tan solo un ooquiste de *Cryptosporidium* en un volumen de 10 litros de agua tratada e independientemente de su especie y/o viabilidad, supone un delito, a menos que la empresa implicada demuestre la aplicación de los protocolos recomendados.

La Legislación Española vigente recoge en el Real Decreto 140/2003 los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano y considera agua apta para tal fin, aquélla que no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia en una cantidad o concentración que pueda suponer un peligro para la salud humana. En el Anexo I, parte A, se cita que cuando exista una turbidez mayor de 5 unidades nefelométricas (UNF), se determinarán, en la salida de la estación de tratamiento de aguas potables (ETAP) o depósito y si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, *Cryptosporidium* u otros organismos o parásitos [BOE (núm. 45) de 21 de febrero de 2003].

Por otra parte y teniendo en cuenta que la cryptosporidiosis humana puede tener un origen zoonótico, es necesario el tratamiento y control de la infección en los rumiantes domésticos, una de las principales fuentes de contaminación ambiental. Hasta el momento, tan solo el lactato de halofuginona (comercializado para uso exclusivamente veterinario bajo el nombre de Halocurt®), la paromomicina y el decoquinato han demostrado ser parcialmente efectivos en la prevención y tratamiento de la cryptosporidiosis en estos animales (Naciri e Yvoré, 1989; Naciri y col., 1993; Mancassola y col., 1995, 1997; Viu y col., 2000). Actualmente, se intenta obtener una vacuna frente a *C. parvum* con el fin de generar un calostro hiperinmune que pueda ser efectivo en la inmunoterapia pasiva frente a la infección en animales jóvenes (Jenkins, 2004). El desarrollo de programas de tratamiento de residuos ganaderos, el control de la integridad de las fosas sépticas y las mejoras en el tratamiento de aguas residuales que vierten a aguas superficiales o son reutilizadas, se dirigirán a reducir la contaminación ambiental de todos los patógenos de transmisión hídrica, incluyendo a *Cryptosporidium* (Fayer, 2004).

Finalmente, las prácticas higiénicas en la elaboración y procesado de los alimentos, así como la educación sanitaria de la población, son medidas necesarias para controlar la

transmisión de esta parasitosis (Slifko y col., 2000). De hecho, en el Reino Unido, la cryptosporidiosis está incluida entre las infecciones gastrointestinales que incapacitan para su trabajo a los manipuladores de alimentos y, desde 1995, existen unas normas higiénico-sanitarias para estos profesionales incluyendo a los relacionados con la fabricación de hielo y embotellamiento de aguas (Donnelly y Stentiford, 1997).

## MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. *CRYPTOSPORIDIUM SPP.*

### 1.1. Obtención de aislados ooquisticos

Se utilizaron diversos aislados ooquisticos procedentes de muestras fecales recogidas durante diversos muestreos en explotaciones ganaderas de la provincia de A Coruña. Las muestras fueron obtenidas directamente del recto de terneros de raza Frisona menores de 15 días infectados naturalmente. Mediante la realización de una tinción negativa directa con fucsina fenicada (Heine, 1982), se seleccionaron aquellas muestras que presentaron un promedio superior a 10 ooquistes de *Cryptosporidium spp.* por campo microscópico 100×, valor obtenido tras la observación de 20 campos microscópicos seleccionados al azar (criterio establecido en anteriores estudios como indicativo de infección grave) (Castro Hermida, 2002). Las muestras se conservaron, en cámara fría a 4°C, en igual volumen de solución acuosa de dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) al 5%.

#### Tinción de Heine (1982)

Sobre portaobjetos desengrasados se colocan volúmenes similares de heces y fucsina fenicada, se homogeniza la mezcla y la extensión realizada se deja secar a temperatura ambiente. La observación microscópica (100×) se realiza en un tiempo inferior a 15 minutos.

#### Concentración

- Se homogenizan en un mortero alícuotas de heces conservadas en  $K_2Cr_2O_7$  al 5%. Se tamizan a través de mallas con tamaño de poro de 150 y 45  $\mu m$ . El  $K_2Cr_2O_7$  se elimina por sucesivos lavados en PBS 0,04M pH 7,2 (Apéndice) mediante centrifugación a 1250  $\times g$ , a 4°C, durante 5 minutos.
- Se realizan concentraciones difásicas en PBS 0,04M pH 7,2/éter etílico (2:1) hasta la total extracción de restos lipídicos por centrifugación a 1250  $\times g$ , a 4°C, durante 5 minutos.
- Los restos de éter etílico se eliminan mediante sucesivos lavados del sedimento obtenido con PBS 0,04M pH 7,2 por centrifugación a 1250  $\times g$ , a 4°C, durante 5 minutos.
- El sedimento obtenido se resuspende en PBS 0,04M pH 7,2 y se adiciona igual volumen de solución acuosa de  $K_2Cr_2O_7$  al 5%. Se conserva a 4°C hasta su purificación.

### Purificación

- Los ooquistes previamente concentrados y conservados a 4°C en  $K_2Cr_2O_7$  al 2,5% se lavan dos veces con PBS 0,04M pH 7,2 mediante centrifugación a  $1250 \times g$ , a 4°C, durante 5 minutos.
- El sedimento obtenido se purifica en gradiente discontinuo de Percoll® de densidades 1,13; 1,09; 1,05; y 1,01 g/ml (Stibbs y Ongerth, 1986) (Apéndice). En un tubo graduado de fondo cónico se colocan 2,5 ml de cada una de las soluciones de Percoll® (desde 1,13 hasta 1,01 g/ml) y se añade el sedimento resuspendido en 1 ml de PBS 0,04M pH 7,2.
- A continuación se centrifuga a  $650 \times g$ , a 4°C, durante 15 minutos.
- Se separa la banda rica en ooquistes, situada entre las soluciones de Percoll® de densidades 1,05 y 1,09 g/ml.
- Los restos de Percoll® se eliminan mediante varios lavados en PBS 0,04M pH 7,2 por centrifugación a  $1250 \times g$ , a 4°C, durante 5 minutos.

### Cuantificación

El recuento de ooquistes se realiza en un hemacitómetro (cámara de Neubauer, 40×) utilizando una solución acuosa de verde malaquita al 0,16% (Apéndice) como contracolorante.

## 1.2. Determinación de la viabilidad ooquistica

### 1.2.1. Técnica de inclusión/exclusión de colorantes vitales fluorogénicos

Se aplicó la técnica descrita por Campbell y col. (1992) que utiliza dos colorantes vitales fluorogénicos: 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e ioduro de propidio (IP).

- Se resuspenden  $2 \times 10^6$  ooquistes purificados en 100  $\mu$ l de solución balanceada de Hanks (HBSS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos).
- Se añaden 10  $\mu$ l de solución de trabajo DAPI (Apéndice) y 10  $\mu$ l de solución de trabajo IP (Apéndice), incubándose a 37°C durante 2 horas (tiempo óptimo establecido para producir la máxima adquisición de los colorantes).
- Se realizan dos lavados con HBSS a  $11300 \times g$ , a 4°C, durante 5 minutos.
- Se elimina el sobrenadante hasta un volumen final de 500  $\mu$ l.
- Alícuotas de 10  $\mu$ l de la suspensión ooquistica se observan bajo fluorescencia con un microscopio equipado con un filtro ultravioleta de banda ancha (excitación 330-385 nm;

barrera 420 nm) para el colorante DAPI y un filtro verde de banda ancha (excitación 510-550 nm; barrera 590 nm) para el colorante IP.

Los resultados se interpretaron de acuerdo con el siguiente criterio: ooquistes viables (inclusión de DAPI pero no inclusión de IP); ooquistes inviables (inclusión de IP); ooquistes vacíos (detectados por contraste de fases); y ooquistes viables tras estimulación (no inclusión de ambos colorantes).

### 1.2.2. Bioensayos en ratón

Se utilizaron camadas de ratones Swiss CD-1 suministradas por el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela. En todos los ensayos se emplearon animales con un peso corporal comprendido entre 2,5-3 g (3-4 días de edad). Las camadas con sus respectivas madres se mantuvieron separadas en jaulas de plástico a una temperatura aproximada de 20°C. Diariamente recibieron un pienso comercial (Panlab S.L., Barcelona, España) y agua, manteniéndose bajo unas condiciones higiénicas adecuadas de acuerdo con la legislación vigente sobre protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos [BOE (núm. 67) de 18 de marzo de 1988; BOE (núm. 256) de 25 de octubre de 1990].

Los ratones se separaron de sus madres al menos una hora antes de ser inoculados intragástricamente utilizando una micropipeta de volumen fijo de 100 µl y colocándose de nuevo con ellas en sus jaulas hasta el momento del sacrificio. A los 7 días post-inoculación (pi), día de máxima producción ooquistica establecido en estudios previos (Villacorta y col., 1988), se sacrificaron los animales y los intestinos se recogieron individualmente sobre 5 ml de PBS 0,04M pH 7,2. A continuación, se trituraron utilizando un homogenizador de barras (Ultra-Turrax® T8, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania). La producción ooquistica se cuantificó en cámara de Neubauer previa dilución del homogenizado intestinal (1:10) con solución de verde malaquita al 0,16%. La intensidad de infección se expresó como el número de ooquistes/totalidad del intestino homogenizado.

### 1.3. Detección en muestras de moluscos bivalvos

Previa aplicación de las técnicas de detección de *Cryptosporidium* spp., las muestras de moluscos bivalvos se sometieron a un proceso de concentración. Cada muestra estuvo constituida por 6-8 ejemplares, a los que se les extrajeron las branquias y el tejido gastrointestinal, siendo posteriormente homogenizados en PBS 0,04M pH 7,2 mediante un homogenizador de cuchillas Osterizer Pulse Matic 16 (Oster, Milwaukee, Wisconsin, Estados

Unidos). El homogenizado resultante fue tamizado (mallas con tamaño de poro de 150 y 45  $\mu\text{m}$ ) y concentrado en PBS 0,04M pH 7,2/éter etílico (2:1) mediante centrifugación a  $1250 \times g$ , a  $4^\circ\text{C}$ , durante 5 minutos.

#### 1.3.1. Técnica de inmunofluorescencia directa (IFD)

Sobre el sedimento obtenido como se describe en el apartado anterior, se aplicó una técnica de inmunofluorescencia directa utilizando dos pruebas comerciales: Monofluo<sup>®</sup> Kit *Cryptosporidium* (Sanofi Diagnostics Pasteur, Mannes-la-Coquette, Francia) y Merifluor<sup>®</sup> *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La identificación ooquistica se realizó con un microscopio de epifluorescencia equipado con filtro azul de banda ancha (excitación 450-480 nm; barrera 515 nm) de acuerdo con los criterios propuestos por Graczyk y col. (1998b): fluorescencia verde brillante, correcta forma y tamaño de los objetos teñidos con fluoresceína y pared ooquistica claramente visible.

#### 1.3.2. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

##### - Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

La extracción del ADN a partir del material biológico se realizó de acuerdo con el método descrito por Patel y col. (1998) y modificado por McLaughlin y col. (1999). El protocolo aplicado incluye la agitación con perlas de circonio para facilitar la destrucción de la pared ooquistica y diversas modificaciones del procedimiento original de extracción de ácidos nucleicos descrito por Boom y col. (1990).

- Aproximadamente 200  $\mu\text{l}$  del sedimento obtenido a partir de la muestra como se describe anteriormente, se añadieron sobre 900  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis L6 (Apéndice); 0,3 g de perlas de circonio de 0,5 mm de diámetro (Stratech Scientific, Luton, Reino Unido); y 60  $\mu\text{l}$  de alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich Co.).

- La mezcla se agitó en un Mini-Beadbeater-8 (Stratech Scientific) durante 2 minutos a la velocidad máxima.

- Se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 15 segundos.

- El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf y, sobre el mismo, se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de suspensión de sílice (Severn Biotech Ltd., Kidderminster, Reino Unido), incubándose a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos con agitación suave.

- A continuación, se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 15 segundos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado L2 (Apéndice).
- Posteriormente, se lavó dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 80% y una sola vez con 200  $\mu\text{l}$  de acetona (reactivos conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- El sedimento resultante se secó a  $55^{\circ}\text{C}$ , se resuspendió en 150  $\mu\text{l}$  de agua para biología molecular (Sigma-Aldrich Co.) y de nuevo se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.
- Finalmente, se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 2 minutos y el sobrenadante conteniendo el ADN se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.
- Descripción de la técnica

Un ensayo de PCR desarrollado por Amar (2003) para la detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras fecales en el Food Safety Microbiology Laboratory (Centre for Infections, Health Protection Agency, Londres, Reino Unido), se utilizó para amplificar un fragmento de 341 pares de bases (pb) del gen que codifica una proteína de la membrana externa de la pared ooquistica de *Cryptosporidium* (COWP). La técnica de PCR se llevó a cabo en dos etapas (PCR anidada), constituida cada una de ellas por una reacción independiente. En todos los ensayos se incluyeron controles positivos y negativos.

En la primera etapa se amplificó un fragmento de 430 pb del gen COWP presente en un amplio rango de especies de *Cryptosporidium* usando los cebadores PCOWPF y PCOWPR (Apéndice). La reacción de amplificación se realizó con 5  $\mu\text{l}$  del ADN extraído; 1  $\mu\text{l}$  de tampón de PCR 10 $\times$ ; 2,5 nmol de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP); 3 pmol de cada oligonucleótido; 20 nmol de  $\text{MgCl}_2$ ; y 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline Ltd., Londres, Reino Unido) en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ . Los tubos con las mezclas correspondientes se sometieron a una fase de desnaturalización inicial del ADN a  $94^{\circ}\text{C}$  durante un minuto seguida de 25 ciclos de amplificación ( $94^{\circ}\text{C}$  durante 20 segundos;  $50^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos;  $72^{\circ}\text{C}$  durante un minuto) y de una extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

En la segunda etapa se amplificó un segmento interno de 341 pb del fragmento del gen COWP anteriormente amplificado, empleando los cebadores PCOWPIF y PCOWPIR (Apéndice). La reacción de amplificación se realizó utilizando 10  $\mu\text{l}$  del producto amplificado en la primera etapa (diluido 1:10 en agua para biología molecular); 2  $\mu\text{l}$  de tampón de PCR 10 $\times$ ; 5 nmol de cada dNTP; 20 pmol de cada oligonucleótido; 30 nmol de  $\text{MgCl}_2$ ; y una unidad de *Taq* ADN polimerasa en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Las condiciones de la reacción consistieron en una desnaturalización inicial del ADN a  $94^{\circ}\text{C}$  durante un minuto, 33 ciclos

de amplificación (94°C durante 20 segundos; 56°C durante 30 segundos; 72°C durante un minuto) y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

- Visualización del resultado

Los productos obtenidos mediante la técnica de PCR se analizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (p/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co.) y aplicando un voltaje de 4 V/cm durante una hora en tampón de electroforesis TAE 1× (Apéndice). Los ácidos nucleicos se visualizaron empleando un transiluminador ultravioleta.

#### **1.4. Caracterización molecular**

1.4.1. Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (técnica de RFLP)

Se utilizó un ensayo de RFLP optimizado por Amar (2003) en el Food Safety Microbiology Laboratory. Los productos obtenidos de la amplificación mediante la técnica de PCR descrita en el apartado anterior se sometieron a un proceso de digestión con las enzimas *RsaI* y *AluI* (Stratagene, La Jolla, California, Estados Unidos) que reconocen puntos de restricción AG↓CT y GT↓AC (5'→3'), respectivamente, originando fragmentos de diferente tamaño en función del número y localización de los puntos de corte en la secuencia amplificada.

La técnica de RFLP se llevó a cabo mediante la incubación, a 37°C durante 4 horas, de 5-10 µl del producto obtenido por la técnica de PCR con 5 unidades de cada uno de las enzimas de restricción en tampón universal 1× (Stratagene) y en un volumen final de 30 µl. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3,2% (p/v) en tampón TAE 1× teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) aplicando un voltaje de 3,5 V/cm durante 3 horas. Los fragmentos se visualizaron utilizando un transiluminador ultravioleta.

1.4.2. Secuenciación del ADN

Para determinar las diferencias existentes entre las secuencias nucleotídicas de los productos obtenidos mediante la técnica de PCR, se realizó una secuenciación de los mismos de acuerdo con el procedimiento de Sanger y col. (1977).

Previamente a la reacción de secuenciación, los productos se purificaron en columnas de centrifugación StrataPrep® PCR Purification Kit (Stratagene) o Quantum Prep® PCR Kleen Spin Columns (Bio-Rad Laboratories). La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando CEQ™-Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, Estados Unidos); 50-500 ng de ADN; y 3,2 pmoles del cebador correspondiente (PCOWPIF o PCOWPIR). El programa de termociclado consistió en una desnaturalización a 96°C durante 20 segundos; una hibridación a 50°C durante 20 segundos; y 4 minutos de elongación a 60°C, repitiéndose este ciclo un total de 30 veces. Cada muestra se secuenció en ambas direcciones por duplicado.

Los productos de la reacción de secuenciación se separaron y analizaron en un secuenciador automático CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc.). Las secuencias obtenidas se examinaron y solaparon utilizando los programas informáticos BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (©1997-2004, Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, California, Estados Unidos) y Chromas v.2.3 (©1998-2004, Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia) y se compararon con otras secuencias de especies/genotipos de *Cryptosporidium* depositadas en el GenBank (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) usando el programa BLAST v.2.2.12 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Las relaciones filogenéticas entre las secuencias nucleotídicas obtenidas en el estudio y las depositadas en el GenBank se evaluaron utilizando el programa Treecon v.1.3b (©1994-2001, Yves Van de Peer, Departamento de Biología, Universidad de Konstanz, Konstanz, Alemania), que permitió la construcción de árboles filogenéticos basados en las distancias genéticas calculadas mediante el modelo bi-paramétrico de Kimura (1980), empleando a *C. muris* para enraizar los árboles.

### **1.5. Análisis estadístico**

El programa informático GraphPad InStat v.3.05 (©1992-2000, GraphPad Software Inc., San Diego, California, Estados Unidos) se empleó para el análisis estadístico. Los tests de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y Exacto de Fisher se utilizaron para evaluar las asociaciones entre los diferentes parámetros considerados a lo largo del presente estudio. Los resultados se consideraron significativos para  $P < 0,05$ .

## 2. ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN NATURAL

### **2.1. Detección y determinación de la viabilidad ooquistica de *Cryptosporidium* spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano**

#### 2.1.1. Muestras

Se investigó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano, proporcionados por la Unidad de Control de Moluscos (UCM) del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela y procedentes de diversas empresas depuradoras ubicadas en el litoral gallego. Entre los meses de octubre de 2000 y septiembre de 2001, se analizaron un total de 241 muestras: 107 de mejillón *M. galloprovincialis*; 68 de almejas pertenecientes a las especies *T. decussatus*; *R. philippinarum*; *V. pulestra*; y *D. exoleta*; 42 de ostra *O. edulis* y 24 de berberecho *C. edule*.

La UCM nos proporcionó además los datos correspondientes al origen de las muestras, tiempo de duración del proceso de depuración a que habían sido sometidas y los datos microbiológicos de cada una de ellas expresados en número más probable (NMP) de coliformes fecales (CF). De acuerdo con la directiva 91/492 de la Unión Europea [DOCE (núm. L 268) de 24 de septiembre de 1991], las muestras se clasificaron como pertenecientes a: i) categoría A, menos de 300 CF/100 g; ii) categoría B, entre 300 y 6000 CF/100 g; y iii) categoría C, más de 6000 CF/100 g de carne y líquido intervalvar.

#### 2.1.2. Detección y determinación de la viabilidad ooquistica

Sobre el sedimento obtenido de cada una de las 241 muestras procesadas como se describe en el Apartado 1.3., se aplicó la técnica de IFD utilizando la prueba comercial Monofluo<sup>®</sup> Kit *Cryptosporidium* (Sanofi Diagnostics Pasteur) que emplea un anticuerpo monoclonal específico frente a un epitopo de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* marcado con isotiocianato de fluoresceína. La identificación ooquistica se realizó de acuerdo con los criterios propuestos por Graczyk y col. (1998b) (Apartado 1.3.1.).

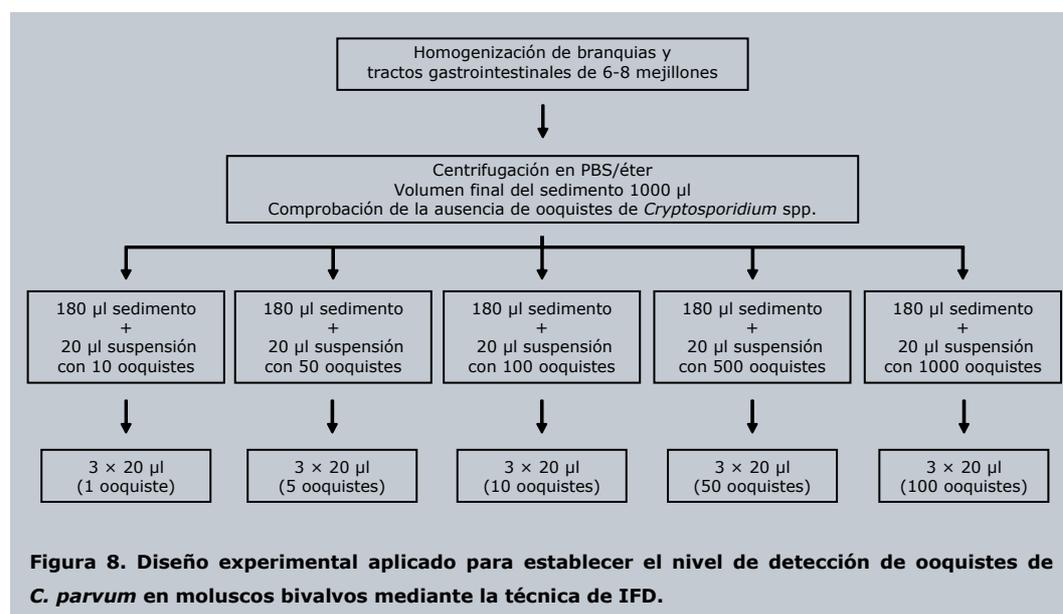
Para determinar la viabilidad ooquistica, la técnica propuesta por Campbell y col. (1992) y descrita en el Apartado 1.2.1., se modificó de acuerdo con Dowd y Pillai (1997), incluyendo un ensayo de IFD con el fin de facilitar la identificación ooquistica. De esta forma, tras la tinción con IP, los ooquistes se lavaron con PBS 0,04M pH 7,2 y se incubaron

con 10 µl del anticuerpo monoclonal en cámara húmeda, a 37°C, durante 30 minutos. Los ooquistes se identificaron individualmente mediante IFD y a continuación se examinaron para la inclusión/exclusión del colorante IP con un microscopio de epifluorescencia equipado con contraste diferencial de interferencia (DIC) y filtro verde de banda ancha (excitación 510-550 nm; barrera 590 nm), cuantificándose las proporciones de ooquistes IP positivos (inviabiles); IP negativos (potencialmente viables) y paredes ooquisticas.

## 2.2. Determinación de los niveles de detección de ooquistes de *C. parvum* en moluscos bivalvos mediante las técnicas de IFD y PCR

### 2.2.1. Evaluación de la técnica de IFD

Se utilizaron muestras de mejillón *M. galloprovincialis* procesadas como se describe en el Apartado 1.3. y en las que se comprobó la ausencia de contaminación por *Cryptosporidium* spp. mediante las técnicas de IFD (Merifluor® *Cryptosporidium*/*Giardia* test, Meridian Bioscience Inc.) y de PCR anteriormente descritas. A continuación, se aplicó el siguiente diseño experimental (Figura 8): alícuotas de 180 µl del sedimento obtenido a partir de las muestras se contaminaron con 20 µl de unas suspensiones en PBS 0,04M pH 7,2 que contenían 0; 10; 50; 100; 500; y 1000 ooquistes purificados de *C. parvum* (Apartado 1.1.).



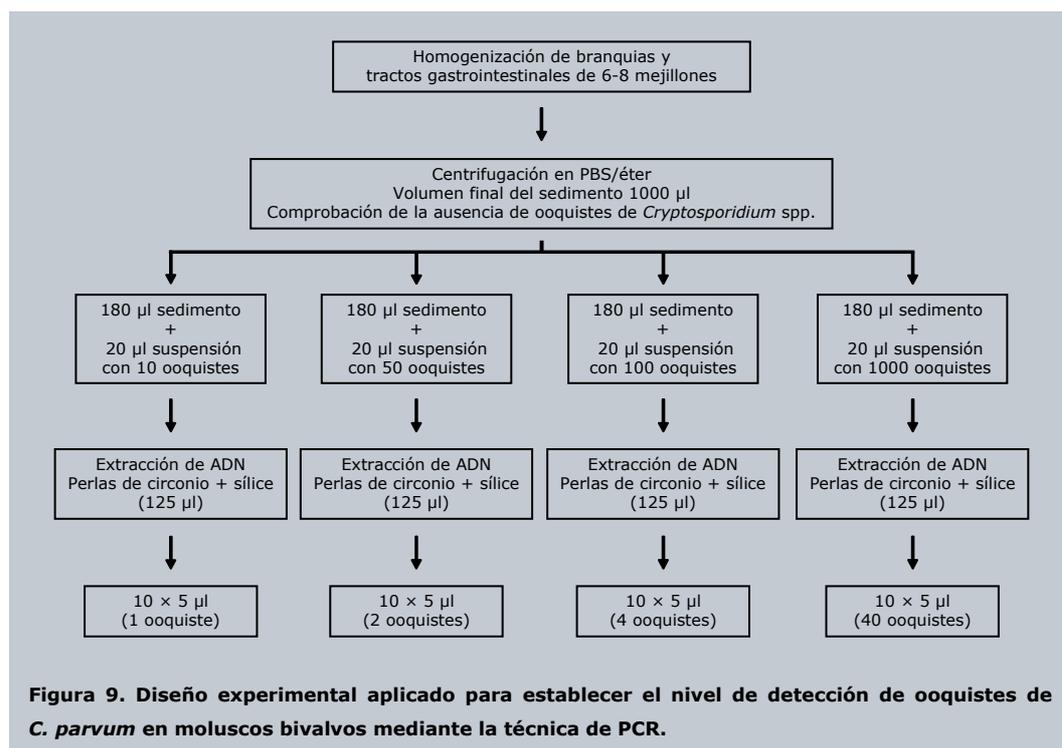
Gotas de 20  $\mu$ l del sedimento contaminado se dispusieron en portaobjetos, se secaron a temperatura ambiente y se incubaron con 40  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal en cámara húmeda, a 37°C, durante 30 minutos. Usando un microscopio de epifluorescencia equipado con filtro azul de banda ancha, se contabilizó, por triplicado, el número de ooquistes presentes en 20  $\mu$ l del sedimento contaminado. Los porcentajes de detección mediante la técnica de IFD se establecieron teniendo en cuenta que el número teórico de ooquistes presentes en ese volumen es 0; 1; 5; 10; 50; y 100 ooquistes.

### 2.2.2. Evaluación de la técnica de PCR

Previa aplicación de un diseño experimental, se investigó la presencia de inhibidores de la técnica de PCR en el ADN extraído de los moluscos bivalvos. Para ello y aplicando la metodología descrita anteriormente, volúmenes de una solución de ADN obtenida a partir de ooquistes purificados de *C. parvum* se mezclaron con volúmenes de otra solución de ADN extraída del sedimento obtenido a partir de 6-8 mejillones (*M. galloprovincialis*). Se establecieron las siguientes diluciones del ADN parasitario: 1:5; 1:10; 1:50; 1:100; 1:500; y 1:1000. Paralelamente y como control, se realizaron las mismas diluciones del ADN parasitario en agua para biología molecular. Se aplicó la técnica de PCR con muestras de todas la diluciones.

#### - Diseño experimental

Al igual que en el Apartado 2.2.1., se utilizaron muestras de mejillón *M. galloprovincialis*, en las que se comprobó la ausencia de contaminación por *Cryptosporidium* spp. mediante las técnicas de IFD y de PCR. A continuación, se aplicó el siguiente diseño experimental (Figura 9): alícuotas de 180  $\mu$ l del sedimento obtenido a partir de las muestras se contaminaron con 20  $\mu$ l de unas suspensiones en PBS 0,04M pH 7,2 que contenían 0; 10; 50; 100; y 1000 ooquistes purificados de *C. parvum*. Utilizando la metodología descrita, se procedió a la extracción del ADN cryptosporidial presente en los sedimentos contaminados y se realizó la técnica de PCR, siendo cada muestra amplificada 10 veces. Teniendo en cuenta que el volumen de la solución de ADN extraído de los sedimentos de mejillón contaminados fue de 125  $\mu$ l y que en cada ensayo de la técnica de PCR se emplearon 5  $\mu$ l, el número teórico de ooquistes que se detectaría en cada una de las reacciones de amplificación sería de 1; 2; 4; y 40 ooquistes para las respectivas dosis contaminantes.



### 2.3. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano

#### 2.3.1. Muestras

Para este estudio, realizado en el Food Safety Microbiology Laboratory (Centre for Infections, Health Protection Agency, Reino Unido), se seleccionaron 49 de las 241 muestras de moluscos bivalvos analizadas en el Apartado 2.1. (22 de mejillón, 18 de almejas y 9 de ostra) y en las que previamente se había investigado la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante la técnica de IFD. Además, se analizaron 18 muestras de mejillón *M. galloprovincialis* y 18 de berberecho *C. edule* procedentes del noroeste de Inglaterra y proporcionadas por el Laboratorio de Salud Pública de Preston (Reino Unido) y dos muestras de mejillón *Perna canaliculus* originarias de Nueva Zelanda. De estas muestras tan solo se dispuso de 25 ml de un homogenizado utilizado en los análisis bacteriológicos que, tras ser filtrado a través de mallas, se sometió al mismo proceso de concentración difásica aplicado al resto de las muestras.

### 2.3.2. Técnicas moleculares

Todas las muestras se sometieron al proceso de extracción de ácidos nucleicos y a la técnica de PCR descritos en el Apartado 1.3.2. Las especies y genotipos de *Cryptosporidium* se determinaron mediante las técnicas de RFLP y secuenciación (Apartado 1.4.). En aquellas muestras en las que se detectaron mezclas de especies/genotipos de *Cryptosporidium*, se utilizó una técnica de clonación para elucidar los resultados. Así, los fragmentos de ADN amplificados mediante la PCR a partir de estas muestras se purificaron usando columnas de centrifugación StrataPrep<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Stratagene) y posteriormente se clonaron en el plásmido pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> usando el sistema de clonación TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Brevemente, una alícuota de 2 µl del producto purificado obtenido mediante la técnica de PCR se ligó al plásmido (incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente) y se implantó en células químicamente competentes de *E. coli* (One Shot<sup>®</sup> TOP10, Invitrogen) mediante "shock" térmico. A continuación, las células se cultivaron a 37°C en placas de agar Luria-Bertani (Apéndice) conteniendo 50 µg/ml de ampicilina y 40 µl de una disolución en dimetilformamida de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido) a una concentración de 40 mg/ml. Al cabo de aproximadamente 12 horas, diez colonias blancas o ligeramente azuladas, procedentes de cada una de las muestras, se resuspendieron en 50 µl de agua para biología molecular y se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente, un volumen de 1 µl de estas suspensiones se utilizó en la segunda etapa de la técnica de PCR empleando los cebadores PCOWPIF y PCOWPIR. Los productos de la amplificación positivos para *Cryptosporidium* fueron posteriormente caracterizados mediante las técnicas de RFLP y secuenciación como se describe en los apartados anteriores.

### **2.4. *Cryptosporidium* y *Giardia* en zonas de cultivo de moluscos bivalvos**

Entre los meses de enero y junio de 2004, se recogieron muestras ambientales y biológicas en cuatro estuarios gallegos conocidos colectivamente como Rías Baixas, importantes zonas de producción de moluscos bivalvos y en cuyos márgenes se ubican destacados núcleos poblacionales. Algunos datos sobre la geografía física de las Rías Baixas, así como la localización de los puntos de muestreo se reflejan en la Tabla 8 y en la Figura 10, respectivamente.

El Instituto Nacional de Meteorología del Ministerio de Medio Ambiente nos proporcionó los datos de precipitaciones recogidos en la estación meteorológica núm. 1484C localizada en Pontevedra (8° 36' 59" O, 42° 26' 24" N; altitud 107 m) y el Instituto

Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de la Xunta de Galicia nos facilitó los parámetros oceanográficos de temperatura y salinidad del agua de mar durante el período de estudio.

**Tabla 8. Algunos datos sobre la geografía física de las Rías Baixas.**

Ría	Muros-Noia	Arousa	Pontevedra	Vigo
Longitud (Km)	12	26	23	33
Longitud de costas (Km)	58	131	46	71
Superficie (Km <sup>2</sup> )	120	230	145	175
Volumen (millones m <sup>3</sup> )	2700	4300	3450	3100
Profundidad máxima (m)	46	65	40	42
Profundidad media (m)	22	19	24	18

#### 2.4.1. Muestras ambientales

##### - Aguas fluviales

Se tomaron muestras de agua de siete de los principales ríos que desembocan en los estuarios objeto de estudio: ríos Tambre y Traba en la Ría de Muros-Noia; ríos Ulla y Umia en la Ría de Arousa; Río Lérez en la Ría de Pontevedra; y ríos Verdugo y Lagares en la Ría de Vigo (Figura 10). Previamente, se contactó con las distintas empresas de abastecimiento de aguas que poseen sistemas de captación localizados en el tramo final de los citados ríos. Una vez obtenido el consentimiento por parte de las mismas, se procedió, en las propias unidades de captación y con ayuda de sistemas de bombeo de la propia planta, al filtrado de un volumen comprendido entre 20-30 litros de agua utilizando el equipo Filtra-Max (IDEXX, Laboratorios Inc., Westbrook, Maine, Estados Unidos). En dos ocasiones, ríos Tambre y Lagares, las muestras se tomaron directamente de la boca de los ríos y una vez en el laboratorio se filtraron empleando una bomba peristáltica (Masterflex® L/S®, Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos). En todos los casos el protocolo seguido constó de las siguientes etapas:

##### Filtración

La unidad de filtrado, constituida por anillos de gomaespuma y discos, se introduce en la cápsula de filtración que se conecta a la bomba de agua. Transcurrido el tiempo necesario para la filtración del volumen de agua establecido, los orificios de entrada y salida de la cápsula se sellan con tapones de goma y los filtros se trasladan al laboratorio, procesándose en un tiempo no superior a 24 horas.

#### Elución de los filtros de gomaespuma

El equipo consta de dos cámaras, una superior de elución y otra inferior de concentración, en cuyo fondo existe un soporte poroso sobre el que se coloca un filtro de membrana de 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 73 mm de diámetro (IDEXX). Ambas cámaras están conectadas entre sí mediante una varilla de aspiración. El filtro se coloca en la cámara superior de elución y mediante un sistema de bombeo que expande y comprime los anillos de gomaespuma se procede a su lavado mediante un líquido de elución (Apéndice).

#### Concentración de la muestra

El líquido eluido se concentra mediante filtración a través de la membrana existente en el fondo de la cámara de concentración hasta un volumen final de 20 ml con ayuda de un agitador magnético y una bomba de vacío manual.

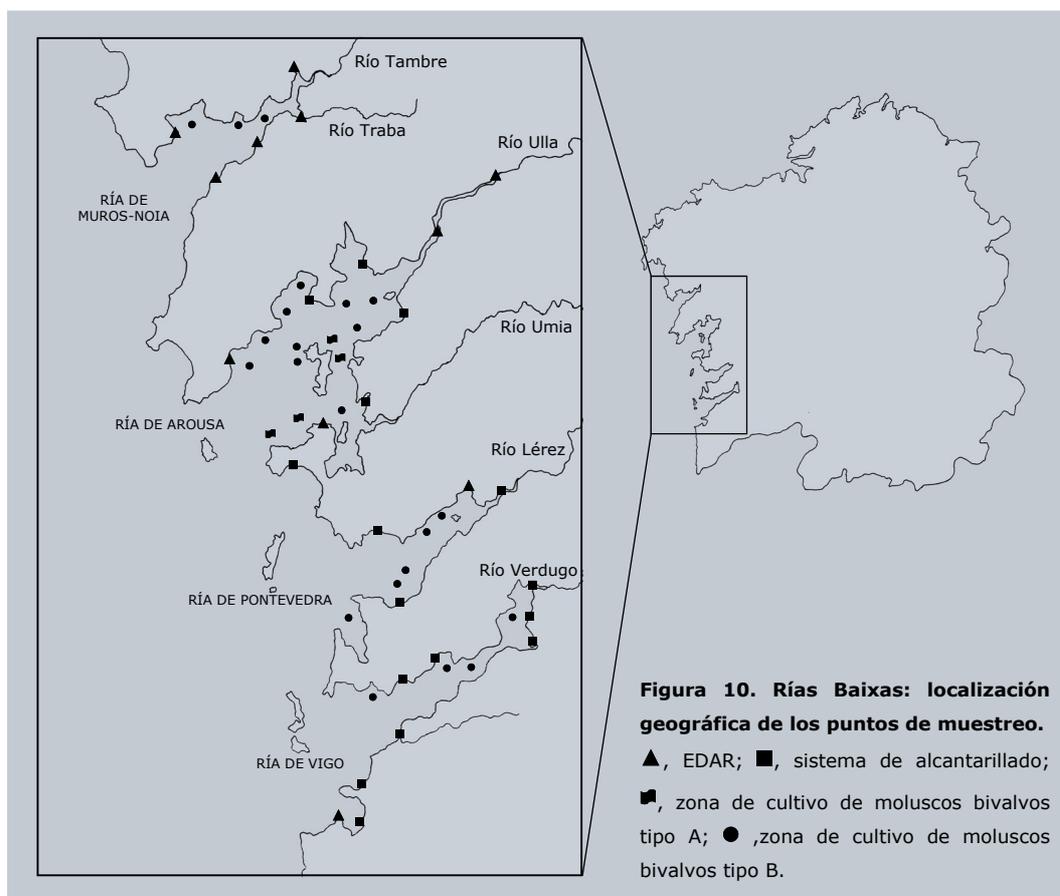
#### Elución de la membrana

Finalmente, la membrana colocada al inicio del proceso se introduce en una bolsa autosellable de polietileno Minigrip (IDEXX) conteniendo 5 ml de líquido de elución y se lava manualmente. La solución procedente de este lavado se añade al concentrado obtenido anteriormente.

#### - Aguas residuales

Con el consentimiento de las autoridades municipales y de las empresas responsables, se procedió a la recogida de aguas residuales procedentes de los núcleos poblacionales situados en los márgenes de los estuarios analizados. Las muestras consistieron en el efluente final de 16 estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y en aguas residuales brutas recogidas directamente de la red de alcantarillado en 11 localidades que carecían de EDAR. En ambos casos, el volumen recogido fue aproximadamente de 2 litros. Una vez en el laboratorio y previa incorporación de Tween 20 (Sigma-Aldrich Co.) a una concentración del 0,01%, se procedió a realizar directamente las etapas de concentración y elución de la membrana descritos con anterioridad.

Independientemente de su origen (fluvial o residual), cuando las muestras presentaron una turbidez  $\geq 1$  UNF, el concentrado obtenido se centrifugó a  $1500 \times g$  durante 15 minutos y el sedimento fue clarificado mediante separación inmunomagnética (IMS) utilizando el sistema Aureon CG Kit (Aureon Biosystems GmbH, Viena, Austria):



- El sedimento se resuspendió en 5 ml de agua destilada y se transfirió a un tubo leighton.
- Se adicionaron 5 ml de tampón A-IMS Buffer™, 100 µl de una suspensión de partículas paramagnéticas *Cryptosporidium A-Beads* y 100 µl de una suspensión de *Giardia A-Beads*. El conjunto se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente en un agitador rotativo MXIC1 (DynaL Biotech ASA, Oslo, Noruega).
- A continuación, el tubo se acopló a un soporte magnético MagnetOn 4T™ y se agitó suavemente durante un minuto. El sobrenadante se eliminó por decantación.
- Se añadió 1 ml de tampón de lavado IT-Wash Buffer™ y de nuevo se agitó suavemente durante 30 segundos. El sobrenadante se eliminó por aspiración.
- Seguidamente, se agregaron 50 µl de HCl 50mM. El tubo se agitó vigorosamente dos veces durante 15 segundos con un intervalo de 30 segundos y se acopló de nuevo al soporte magnético. Transcurridos 10 segundos, el sobrenadante se recuperó por aspiración.

#### 2.4.2. Muestras biológicas

Durante el período de estudio establecido, la UCM nos proporcionó 184 muestras no depuradas de mejillón *M. galloprovincialis* con un tamaño de valva de 8,21 × 4,07 cm ( $\pm 0,46 \times 0,23$ ) y los datos correspondientes a la calidad microbiológica de las mismas y de la zona de muestreo (Figura 10) clasificada como se especifica en la Tabla 4 del Apartado 5.1. de la Revisión Bibliográfica. De acuerdo con la directiva 91/492 de la Unión Europea [DOCE (núm. L 268) de 24 de septiembre de 1991], las muestras de mejillón se clasificaron como pertenecientes a: i) categoría A, menos de 230 *E. coli* /100 g; ii) categoría B, entre 230 y 4600 *E. coli* /100 g; y iii) categoría C, más de 4600 *E. coli* /100 g de carne y líquido intervalvar. Todas las muestras estuvieron constituidas por 6-8 mejillones y se procesaron como se describe en el Apartado 1.3.

#### 2.4.3. Detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y de quistes de *Giardia* spp.

Un volumen comprendido entre 0,5-1,0 ml del concentrado obtenido tras el procesamiento de las muestras ambientales (aguas fluviales y residuales) se filtró a través de membranas de nitrocelulosa de 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). Sobre las mismas se aplicó una técnica de IFD (Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, Meridian Bioscience Inc.) y el número de ooquistes/quistes retenidos se cuantificó mediante microscopía de epifluorescencia. De igual forma, mediante la técnica de IFD se cuantificaron los ooquistes/quistes existentes en los sedimentos obtenidos a partir de las muestras biológicas.

#### 2.4.4. Identificación de especies/genotipos de *Cryptosporidium*

Empleando la metodología descrita en los apartados correspondientes, se caracterizaron molecularmente los aislados de *Cryptosporidium* procedentes de la totalidad de las muestras de mejillón y de aquellas muestras ambientales en las que mediante la técnica de IFD se visualizaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

### 3. ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL

Los estudios de contaminación experimental se realizaron en instalaciones del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela destinadas al cultivo y mantenimiento de moluscos bivalvos. Se utilizaron semillas de dos especies, *O. edulis* y *T. decussatus*, con un tamaño de valva comprendido entre 5-7 mm (aproximadamente 8 meses de edad) que fueron suministradas por el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo

(Lugo) y por el Centro de Experimentación en Acuicultura de Couso (A Coruña), pertenecientes a la Red de Centros de Investigación Mariña de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia.

Las semillas se mantuvieron a lo largo de los estudios en tanques de 60 litros con agua de mar natural, a una temperatura constante de  $15\pm 3^{\circ}\text{C}$  y con aireación controlada. El alimento consistió en una mezcla formada en igual proporción por cinco especies de microalgas: *Tetraselmis suecica*; *Skeletonema costatum*; *Phaeodactylum tricornutum*; *Chaetoceros calcitrans*; y *Monochrysis lutheri*. La contaminación experimental se realizó con distintos aislados de ooquistes purificados de *C. parvum* (Figura 12).

### **3.1. Supervivencia de *C. parvum* en dos especies de moluscos bivalvos: *O. edulis* y *T. decussatus***

En este estudio se utilizaron 120 semillas de ostra (*O. edulis*) y 120 semillas de almeja (*T. decussatus*) que se mantuvieron independientemente en dos tanques durante 31 días bajo las condiciones descritas anteriormente. Cada uno de los tanques se contaminó con  $60\times 10^6$  ooquistes purificados de *C. parvum*, alcanzándose una concentración aproximada de  $1\times 10^6$  ooquistes/l.

Diariamente, entre los días 1 y 10 post-contaminación, se analizaron dos muestras constituidas por 10 ostras y 10 almejas respectivamente, que se procesaron como se describe a continuación:

- Apertura de las valvas y extracción de la totalidad del cuerpo del molusco.
- Homogenización mediante un homogenizador de barras Ultra-Turrax® T8 (IKA® Werke GmbH & Co. KG).
- Concentración en PBS 0,04M pH 7,2/éter etílico (2:1) por centrifugación a  $1250 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos.
- Lavados con PBS 0,04M pH 7,2 ( $1250 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos).

El sedimento obtenido se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de HBSS (Sigma-Aldrich Co.) y sobre esta suspensión se aplicaron las técnicas de detección (IFD) y viabilidad ooquistica (IP) descritas anteriormente para los estudios de contaminación natural. Además, los días 10 y 31 post-contaminación, se procesaron diez semillas de cada especie, cuyos sedimentos se utilizaron para determinar la infectividad ooquistica mediante bioensayos en ratón (Apartado 1.2.2.).

### 3.2. *C. parvum* en *T. decussatus*

Se estudió el tránsito de ooquistes de *C. parvum* a través de semillas de almeja *T. decussatus*. Para ello, 60 semillas se mantuvieron en tanques con 20 litros de agua de mar natural durante 10 días. El alimento, una mezcla de microalgas, se añadió al tanque al inicio y transcurridos cinco días con el fin de estimular la filtración e inducir la ingestión de los ooquistes.

El tanque se contaminó con  $20 \times 10^6$  ooquistes purificados de *C. parvum* (aproximadamente  $1 \times 10^6$  ooquistes/l). A las 24 horas post-contaminación, se sacrificaron 10 ejemplares para confirmar la presencia de ooquistes que se detectaron mediante la técnica de IFD (Monofluo<sup>®</sup> Kit *Cryptosporidium*, Sanofi Diagnostics Pasteur) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Diariamente, se recogieron cinco semillas, cuyo cuerpo se sometió al siguiente protocolo histológico:

- Fijación durante 4-5 horas en solución fijadora de Bouin (Apéndice) (Hernández Córdova, 2001).
- Deshidratación mediante alcoholes etílicos de distinta graduación:
  - Tres lavados de 1 hora en alcohol etílico 70% [saturado con carbonato de litio para la tinción tricrómica de Gomori modificada por Wheatley (1951)].
  - Un lavado durante 1 hora en alcohol etílico 96%.
  - Dos lavados de 1 hora en alcohol etílico 100%.
- Aclarado mediante dos lavados de 30 minutos en xilol.
- Impregnación en parafina, tres baños de 1 hora (62-64°C) (Paraplast Plus, Sherwood Medical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos).
- Inclusión en parafina. Los bloques obtenidos se conservaron a temperatura ambiente.

A partir de estos bloques, previamente enfriados a 4°C, se realizaron cortes de 3 µm de grosor con un microtomo manual (Rotary Microtome HM-340E, Microm Internacional GmbH, Walldorf, Alemania). Antes de aplicar las técnicas de tinción e inmunohistoquímicas, los cortes se desparafinaron y rehidrataron:

- Introducción en un horno (62-64°C) de los cortes dispuestos en portaobjetos durante 12 horas.
- Dos lavados de 5 minutos en xilol.
- Rehidratación con alcoholes etílicos de distinta graduación:

Dos lavados de 5 minutos en alcohol etílico 100%.

Un lavado de 5 minutos en alcohol etílico 96%.

Un lavado de 5 minutos en alcohol etílico 80%.

- Un lavado de 5 minutos en agua destilada.

La detección de los ooquistes de *C. parvum* se realizó mediante una técnica de IFD (Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, Meridian Bioscience Inc.). Paralelamente y para facilitar la identificación de los distintos tejidos, se llevó a cabo una tinción tricrómica de Gomori modificada por Wheatley (1951):

- Tinción durante 90 segundos con tricrómico de Wheatley (Apéndice).

- Lavado en solución B (Apéndice) durante 10 segundos.

- Enjuague con alcohol etílico 96%.

- Lavado durante 5 minutos en alcohol etílico 96%.

- Lavado durante 5 minutos en alcohol etílico 100%.

- Dos lavados de 5 minutos en xilol.

- Montaje con Depex™ (Serva, Heidelberg, Alemania).

- Observación al microscopio (40×; 100×).

### **3.3. Transmisión de *C. parvum* entre especies de moluscos bivalvos**

Se estudió la liberación de ooquistes de *C. parvum* a partir de semillas vivas y muertas y su posterior captación por semillas de distinta especie. Para ello, se dispuso de 100 semillas de ostra (*O. edulis*) y 100 semillas de almeja (*T. decussatus*), que se mantuvieron independientemente en tanques de 60 litros bajo las condiciones descritas anteriormente.

Muestras constituidas por 20 ejemplares de cada una de las especies se colocaron en dos acuarios de un litro con agua de mar natural y se contaminaron con  $20 \times 10^6$  ooquistes purificados de *C. parvum*. Transcurridas 24 horas, 10 ejemplares de cada una de las especies se sacrificaron y se procesaron como se describe en el Apartado 3.1. Sobre los sedimentos resuspendidos en HBSS (Sigma-Aldrich Co.) se aplicaron las técnicas de detección de IFD (Monofluo® Kit *Cryptosporidium*, Sanofi Diagnostics Pasteur) y

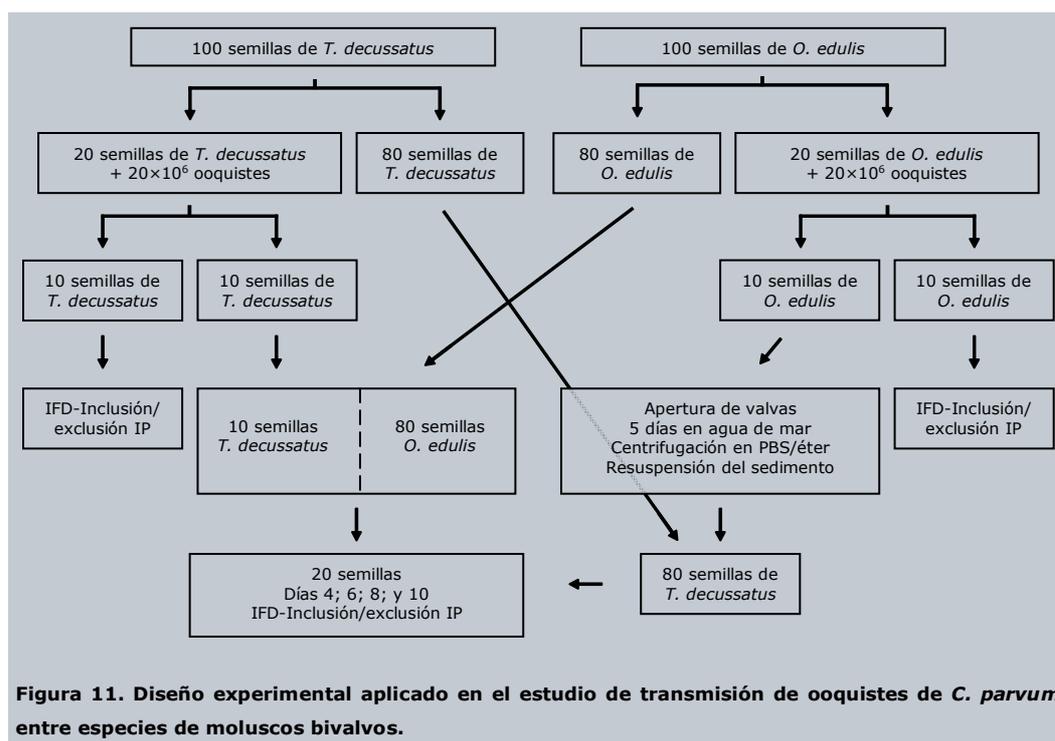
determinación de la viabilidad ooquistica (inclusión/exclusión IP) descritas en el Apartado 2.1.2. Las 10 semillas restantes de cada una de las especies se utilizaron en el siguiente diseño experimental (Figura 11):

- Diez semillas de almeja previamente contaminadas y 80 semillas de ostra no contaminadas se instalaron en un tanque de 60 litros separadas por una malla de tamaño de poro de 0,5 mm. Los días 4; 6; 8; y 10 post-contaminación, se determinó la presencia y la viabilidad ooquistica en 20 semillas de ostra inicialmente no contaminadas.

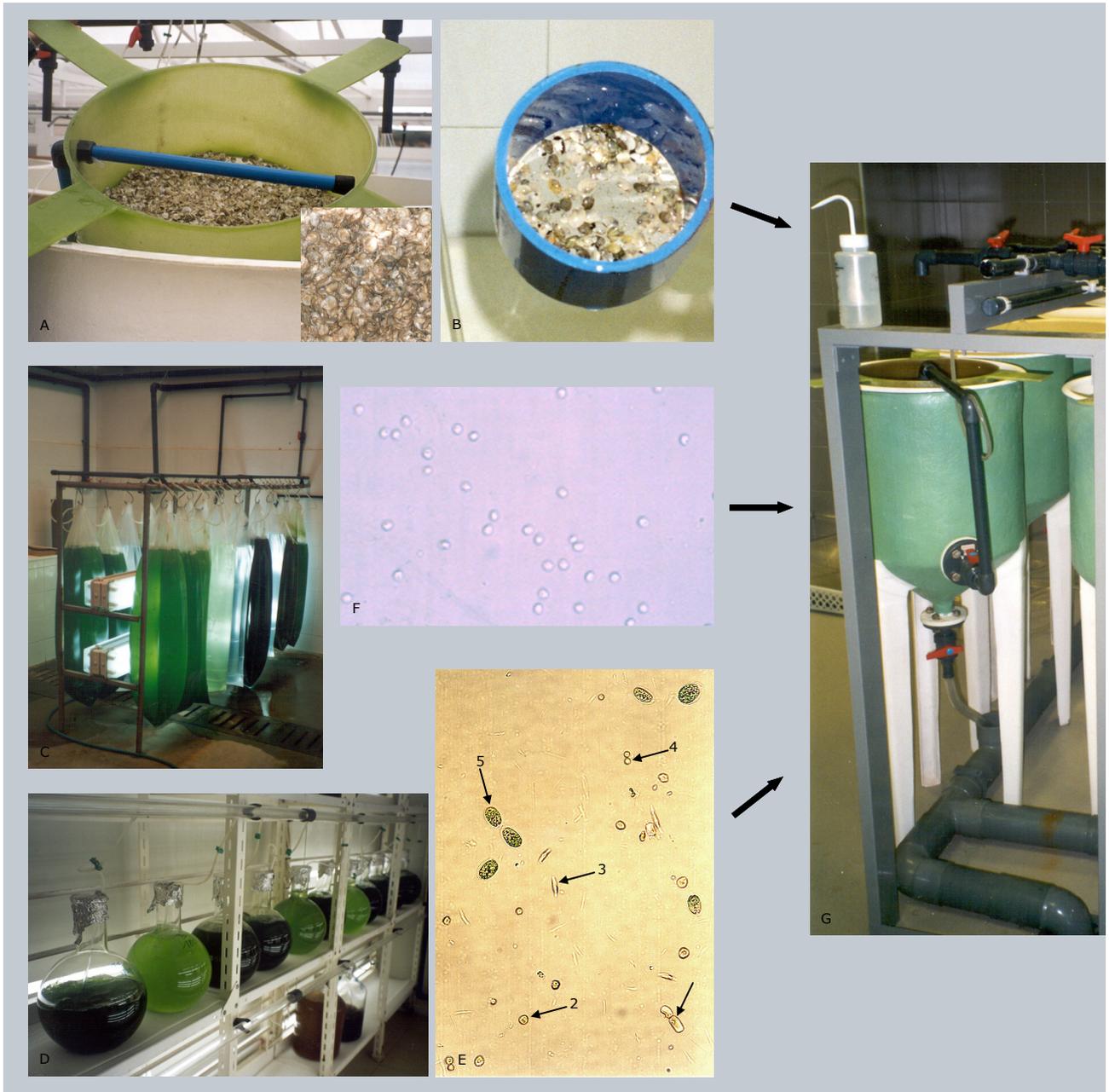
- Diez semillas de ostra previamente contaminadas se sacrificaron por apertura de las valvas y se mantuvieron en 50 ml de agua de mar a  $15\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 5 días. Transcurrido este tiempo, los 50 ml de agua de mar se filtraron a través de mallas con un tamaño de poro de 150 y 45  $\mu\text{m}$ . El líquido filtrado se concentró en PBS 0,04M pH 7,2/éter etílico (2:1) (1250  $\times$  g, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos). El sedimento obtenido se resuspendió en agua destilada y se adicionó a un tanque con 60 litros de agua de mar que contenía 80 semillas de almeja no contaminadas. Los días 4; 6; 8; y 10 post-contaminación, se determinó la presencia y la viabilidad ooquistica en 20 semillas de ostra inicialmente no contaminadas.

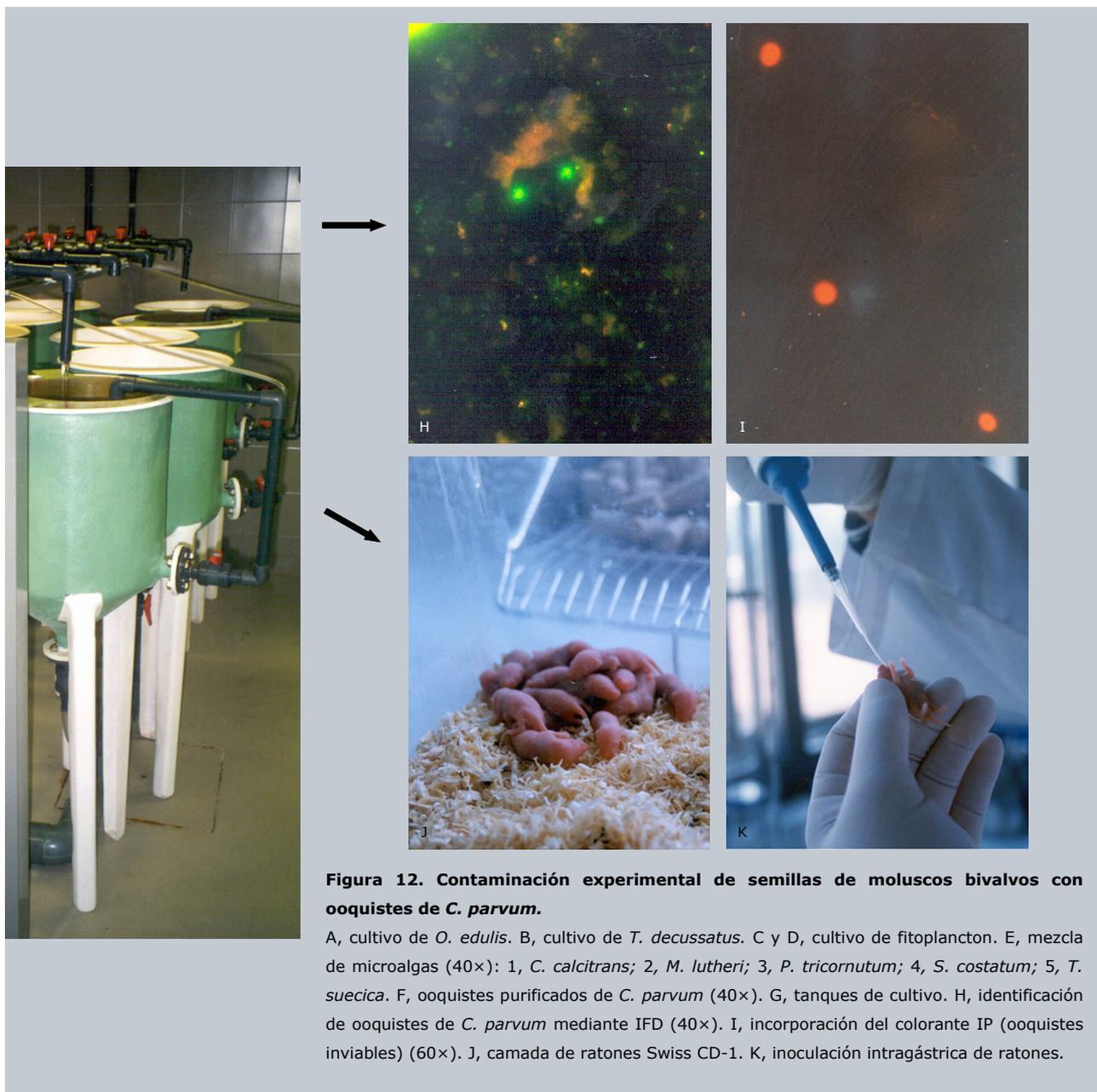
### **3.4. ¿Es *Cryptosporidium* infectante después de cocinar los mejillones al vapor?**

En un mercado local se adquirió una bolsa de mejillones vivos (*M. galloprovincialis*) de un tamaño de valva comprendido entre 7,5-9 cm de largo y 3,5-4 cm de ancho, debidamente envasados y etiquetados para el consumo humano. Una vez en el laboratorio y para comprobar la presencia/ausencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., ocho ejemplares se procesaron y analizaron mediante las técnicas de IFD (Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, Meridian Bioscience, Inc.) y de PCR como se describe en el Apartado 1.3. Comprobada la ausencia de contaminación natural, 13 ejemplares se colocaron en un tanque de 40 litros con agua de mar natural, a  $15\pm 3^{\circ}\text{C}$  y aireación constante, que se contaminó con  $13\times 10^6$  ooquistes purificados de *C. parvum*. Transcurridas 24 horas, los mejillones se retiraron y se colocaron en una olla metálica cuyo fondo se cubrió con agua obtenida de la red municipal (0,5-1 cm de nivel). El conjunto se calentó durante el tiempo necesario para que los moluscos abriesen sus valvas. Durante el proceso se monitorizó la temperatura mediante la inserción en el interior del molusco de una sonda flexible 3K1200 (Omega Engineering Inc., Stamford, Connecticut, Estados Unidos) conectada a un termómetro Temp 3JKT (Eutech Instruments Pte. Ltd., Ayer Rajah Crescent, Singapur). Inmediatamente después, las branquias y los tractos gastrointestinales de cada uno de los mejillones se diseccionaron y se procesaron como se describe para las muestras



utilizadas en los estudios de contaminación natural (Aparatado 2.1.). El sedimento se resuspendió en 3 ml de PBS 0,04M pH 7,2 y se cuantificó el número de ooquistes mediante la técnica de IFD. Alícuotas de 100  $\mu$ l de esta suspensión se inocularon intragástricamente a 26 ratones recién nacidos Swiss CD-1. Como control de infectividad, otros 20 ratones recién nacidos se inocularon con  $2,5 \times 10^4$  ooquistes del aislado original [dosis establecida en estudios previos y superior a la necesaria para conseguir implantar la infección en la totalidad de los animales (Villacorta Martínez de Maturana, 1989)]. A los siete días pi se evaluó la infectividad ooquistica como se describe en el apartado 1.2.2.







RESULTADOS



## 1. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN NATURAL

### **1.1. Detección y determinación de la viabilidad ooquistica de *Cryptosporidium* spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano**

Durante el período comprendido entre los meses de octubre de 2000 y septiembre de 2001, se investigó la presencia y viabilidad ooquistica de *Cryptosporidium* spp. en 241 muestras de moluscos bivalvos destinados al consumo humano y suministradas por la UCM que además proporcionó los datos relativos al origen de las muestras, tiempo de duración del proceso de depuración a que habían sido sometidas y los datos microbiológicos de cada una de ellas expresados en NMP de CF por 100 g de carne y líquido intervalvar.

Mediante la técnica de IFD (Monofluo<sup>®</sup> Kit *Cryptosporidium*, Sanofi Diagnostics Pasteur) y aplicando los criterios propuestos por Graczyk y col. (1998b), se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 83 muestras de las 241 analizadas, representando un 34,4% de contaminación. De las 83 muestras positivas, 44 (53,0%) contenían ooquistes potencialmente viables detectados utilizando la técnica de Campbell y col. (1992) modificada de acuerdo con Dowd y Pillai (1997).

Teniendo en cuenta la especie de molusco analizada, el mayor porcentaje de contaminación se detectó en ostra (54,8%). En mejillón, almeja y berberecho, los porcentajes de contaminación fueron respectivamente del 32,7%; 29,4%; y 20,8%, respectivamente. El mayor porcentaje de viabilidad ooquistica se obtuvo en muestras de almeja y berberecho (ambas con un 60%). En muestras de mejillón y ostra, la viabilidad ooquistica fue del 51,4% y 47,8%, respectivamente (Tabla 9).

Considerando el origen de las muestras, se detectó contaminación por ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 69 de las 203 muestras procedentes del litoral gallego (34,0% de contaminación y 49,3% de viabilidad ooquistica); de las 38 muestras procedentes de otros países de la Unión Europea, 14 (36,8%) estaban contaminadas y el 71,4% (10 muestras) presentaban ooquistes potencialmente viables (Tabla 10).

**Tabla 9. Contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos destinados al consumo humano.**

Molusco bivalvo	Núm. de muestras		
	Analizadas	Contaminadas (%)	Con ooquistes viables (%)
Mejillón	107	35 (32,7)	18 (51,4)
Almeja	68	20 (29,4)	12 (60,0)
Ostra	42	23 (54,8)	11 (47,8)
Berbercho	24	5 (20,8)	3 (60,0)

En cuanto a las muestras procedentes del litoral gallego, se detectaron moluscos bivalvos contaminados en todas las zonas de muestreo con excepción de la Ría de Ortigueira, de la que se dispuso tan solo de dos muestras de almeja. En el resto de las rías se observó que al menos una muestra de cada una de las especies analizadas estaba contaminada con la excepción de una muestra de almeja procedente de la ría de A Coruña (Tabla 10).

**Tabla 10. Contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos procedentes de Galicia (España) y de otros países pertenecientes a la Unión Europea.**

Origen	Núm. de muestras		
	Analizadas	Contaminadas (%)	Con ooquistes viables (%)
<b>Muestras procedentes de las costas gallegas</b>			
Ría de Ortigueira	2	0 (0)	0 (0)
Ría de Ferrol	7	6 (85,7)	1 (16,7)
Ría de Ares-Betanzos	3	2 (66,7)	1 (50,0)
Ría de A Coruña	2	1 (50,0)	0 (0)
Ría de Muros-Noia	10	6 (60,0)	4 (66,7)
Ría de Arousa	148	39 (26,4)	20 (51,3)
Ría de Pontevedra	21	10 (47,6)	6 (60,0)
Ría de Vigo	10	5 (50,0)	2 (40,0)
Total	203	69 (34,0)	30 (49,3)
<b>Muestras procedentes de otros países de la Unión Europea</b>			
Italia	30	10 (33,3)	8 (80,0)
Irlanda	2	2 (100)	0 (0)
Portugal	1	0 (0)	0 (0)
Reino Unido	5	2 (40,0)	2 (100)
Total	38	14 (36,8)	10 (71,4)

Se comprobó una ausencia de correlación ( $\chi^2$ ,  $P=0,20$ ) entre las muestras contaminadas con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. no depuradas y las sometidas a distintos tiempos de depuración (entre uno y más de 14 días). Así, de las 54 muestras no depuradas, 23 estaban contaminadas (42,6%) vs 60 (32,1%) de las 187 muestras sometidas al proceso de depuración. Independientemente del tiempo de depuración, los porcentajes de viabilidad ooquistica estuvieron entorno al 50% en la mayoría de las muestras contaminadas. En la Tabla 11 0.se reflejan los distintos tiempos de depuración, expresados en días, al que habían sido sometidas las muestras analizadas, así como los porcentajes de contaminación y viabilidad ooquistica detectados.

**Tabla 11. Tiempos de depuración y contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos destinados al consumo humano.**

Depuración (días)	Núm. de muestras		
	Analizadas	Contaminadas (%)	Con ooquistes viables (%)
0 (no depuradas)	54	23 (42,6)	12 (52,2)
1	25	6 (24,0)	3 (50,0)
2	44	13 (29,5)	10 (76,9)
3	35	11 (31,4)	5 (45,5)
4	29	8 (27,6)	4 (50,0)
5	18	6 (33,3)	3 (50,0)
6	13	6 (46,2)	3 (50,0)
7	8	3 (37,5)	0 (0)
8-14	13	6 (46,2)	3 (50,0)
>14	2	1 (50,0)	1 (100)

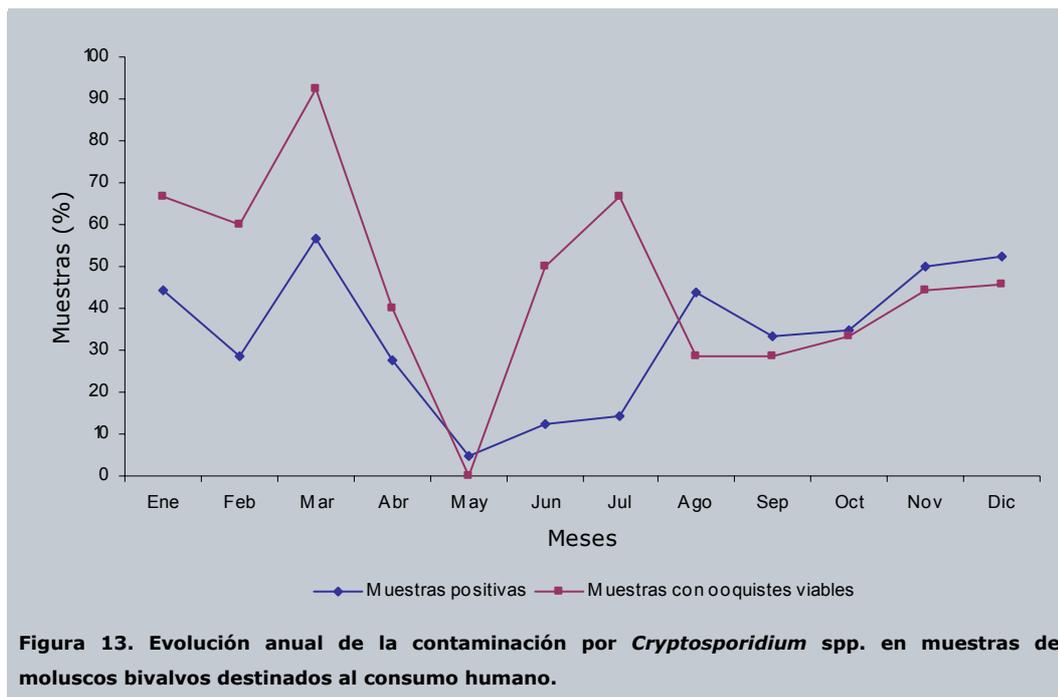
Tampoco se observó correlación ( $\chi^2$ ,  $P=0,85$ ) entre los niveles de contaminación microbiológica expresados como NMP de CF por 100 g de carne y líquido intervalvar y la contaminación por *Cryptosporidium* spp. detectados en los moluscos bivalvos analizados. De las 206 muestras pertenecientes a la categoría A, 71 (34,5%) estaban contaminadas, observándose ooquistes potencialmente viables en 39 (54,9%). En la categoría B, el 36,4% de las muestras presentaban contaminación, conteniendo ooquistes viables el 41,7%. En ninguna de las dos muestras clasificadas como categoría C se detectó contaminación (Tabla 12).

**Tabla 12. Contaminación por *Cryptosporidium* spp. en muestras de moluscos bivalvos clasificadas de acuerdo con los estándares de la Unión Europea.**

Categoría microbiológica <sup>a</sup>	Núm. de muestras		
	Analizadas	Contaminadas (%)	Con ooquistes viables (%)
A (<300)	206	71 (34,5)	39 (54,9)
B (300-6000)	33	12 (36,4)	5 (41,7)
C (>6000)	2	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup>NMP de CF/100g de carne y líquido intervalvar

Al relacionar los porcentajes de contaminación por *Cryptosporidium* spp. obtenidos en los moluscos bivalvos con los meses del año en los que se realizaron los muestreos, se observó que los valores más bajos de contaminación correspondieron a las muestras analizadas en los meses de mayo, junio y julio (5,0%; 12,5%; y 14,3%, respectivamente), alcanzándose los valores más elevados de contaminación en los meses de marzo, diciembre y noviembre (56,5%; 52,4%; y 50,0%, respectivamente). La viabilidad ooquistica detectada tuvo un patrón de comportamiento similar, con un máximo en marzo (92,3%) y fue nula en mayo (0,0%) (Figura 13).



**Figura 13. Evolución anual de la contaminación por *Cryptosporidium* spp. en muestras de moluscos bivalvos destinados al consumo humano.**

## 1.2. Determinación de los niveles de detección de ooquistes de *C. parvum* en moluscos bivalvos mediante las técnicas de IFD y PCR

### 1.2.1. Evaluación de la técnica de IFD

Aplicando el diseño experimental mostrado en la Figura 8, se realizaron tres ensayos en los que se analizaron por triplicado y mediante IFD (Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia*, Meridian Bioscience Inc.) alícuotas de 20 µl del sedimento obtenido de muestras de mejillón *M. galloprovincialis* contaminadas experimentalmente con un número teórico de 0; 1; 5; 10; 50; y 100 ooquistes purificados de *C. parvum*.

En la Tabla 13 se muestran los promedios del número de ooquistes cuantificado por triplicado en cada uno de los tres ensayos realizados y los porcentajes de recuperación ooquistica calculados con respecto al número teórico de ooquistes contaminantes. Se observa que para las dosis teóricas de 1; 5; 10; 50; y 100 ooquistes, los valores medios obtenidos fueron de 0,7; 3,6; 6,7; 37,6; y 77,2 ooquistes, respectivamente. Los porcentajes de recuperación ooquistica oscilaron entre un 67,0% para la dosis teórica de 10 ooquistes y un 77,2% para la correspondiente a 100 ooquistes teóricos. Excepto para la dosis teórica de un ooquiste, que se logró detectar en 3 de los 9 ensayos, para las restantes dosis al menos un ooquiste fue observado en la totalidad del los ensayos. En ninguno de los ensayos realizados con sedimentos no contaminados se detectaron ooquistes de *C. parvum*.

**Tabla 13. Resultados de la técnica de IFD aplicada sobre sedimentos de mejillones (*M. galloprovincialis*) experimentalmente contaminados con ooquistes purificados de *C. parvum*.**

Ensayo	Núm. teórico de ooquistes				
	100	50	10	5	1
Primer ensayo	69,7*	32,7	6,3	3,0	0,3
Segundo ensayo	95,7	50,3	8,7	4,0	1,7
Tercer ensayo	66,3	29,7	5,0	3,7	0,0
Promedio	77,2	37,6	6,7	3,6	0,7
Porcentaje de recuperación	77,2	75,1	67,0	71,1	70,0

\*Promedio de ooquistes determinados en los tres replicados de cada ensayo

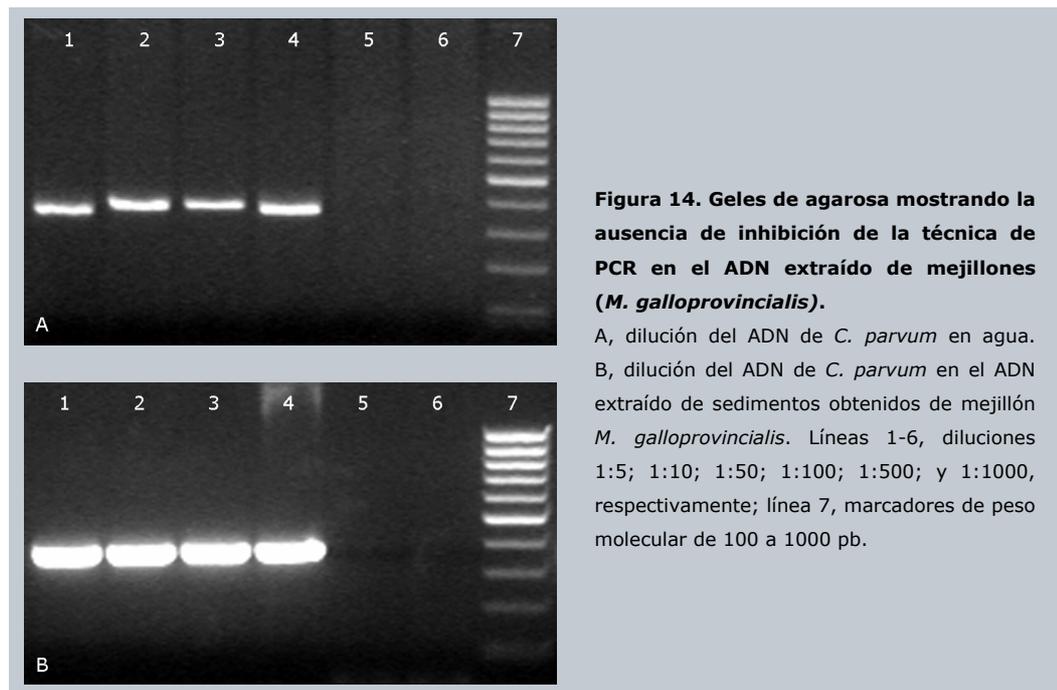
### 1.2.2. Evaluación de la técnica de PCR

El análisis mediante PCR de diluciones del ADN procedente de una suspensión de  $10^5$  ooquistes purificados de *C. parvum* en soluciones de ADN extraído de los moluscos, permitió confirmar la ausencia de inhibición al comprobarse la no existencia de diferencias tanto en la presencia como en la intensidad de las bandas visualizadas mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% (p/v) conteniendo 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio con respecto a las diluciones control realizadas con ADN del parásito en agua (Tabla 14; Figura 14).

**Tabla 14. Investigación de la existencia de inhibidores de la técnica de PCR en la detección de *C. parvum* en mejillones (*M. galloprovincialis*).**

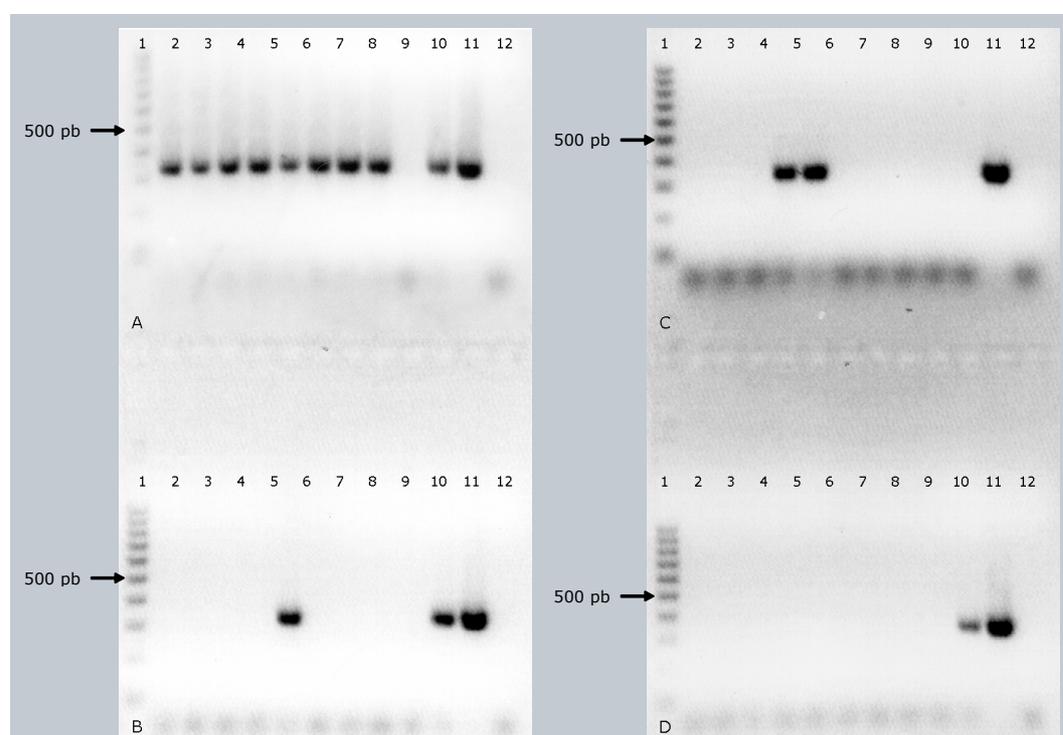
	Sin diluir	Dilución del ADN de <i>C. parvum</i>					
		1:5	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1000
Control (en agua)	+	+	+	+	+	-	-
ADN <i>M. galloprovincialis</i>	-	+	+	+	+	-	-

(+), amplificación positiva; (-), no amplificación



Aplicando el diseño experimental mostrado en la Figura 9, se realizó la técnica de PCR con el ADN extraído de suspensiones obtenidas a partir de sedimentos de mejillones *M. galloprovincialis* contaminados con 0; 10; 50; 100; y 1000 ooquistes purificados de *C. parvum*. Cada muestra se amplificó 10 veces y, considerando los volúmenes utilizados, el cálculo se estableció para un número teórico de 0; 1; 2; 4; y 40 ooquistes para las respectivas dosis contaminantes.

Se observó una reducción de la reproducibilidad de la técnica de PCR a medida que el número teórico de ooquistes disminuyó. Así, para 40 ooquistes teóricos, el ADN correspondiente se amplificó en el 90% de las reacciones, mientras que en el caso de un ooquiste teórico solamente se consiguió amplificar el ADN en el 10% de las reacciones (Figura 15).



**Figura 15. Resultados obtenidos mediante la técnica de PCR aplicada a sedimentos de mejillones (*M. galloprovincialis*) experimentalmente contaminados con ooquistes purificados de *C. parvum*.**

A, 40 ooquistes teóricos. B, 4 ooquistes teóricos. C, 2 ooquistes teóricos. D, un ooquiste teórico. Línea 1, marcadores de peso molecular de 100 a 1000 pb; líneas 2-10, distintos replicados para cada una de las dosis contaminantes; línea 11, control positivo; línea 12, control negativo.

### 1.3. Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp. en distintas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano

De las 241 muestras de distintas especies de moluscos bivalvos examinadas mediante IFD y cuyos resultados se muestran en el Apartado 1.1., se seleccionaron al azar 49 (22 de mejillón, 18 de almeja y 9 de ostra). Además, se analizaron 20 muestras de mejillón (18 de *M. galloprovincialis* y dos de *P. canaliculus*) y 18 de berberecho (*C. edule*) disponibles en el Food Safety Microbiology Laboratory (Centre for Infections, Health Protection Agency, Reino Unido), centro donde se realizó el estudio, y que habían sido procesadas con fines bacteriológicos. Sobre todas las muestras se aplicó la técnica de PCR descrita anteriormente en el Apartado 2.3.2. de Material y Métodos.

Mediante IFD, se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 28 de las muestras naturalmente contaminadas procedentes de España (56%), amplificándose el ADN cryptosporidial en 22 de las mismas (44%). En las 38 muestras procedentes del Reino Unido, de las que no se dispuso de resultados de IFD, se amplificó el ADN cryptosporidial en 4 muestras (11%), correspondiendo 3 muestras a mejillón y una a berberecho (Tabla 15).

**Tabla 15. Detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras de moluscos bivalvos mediante las técnicas de IFD y PCR.**

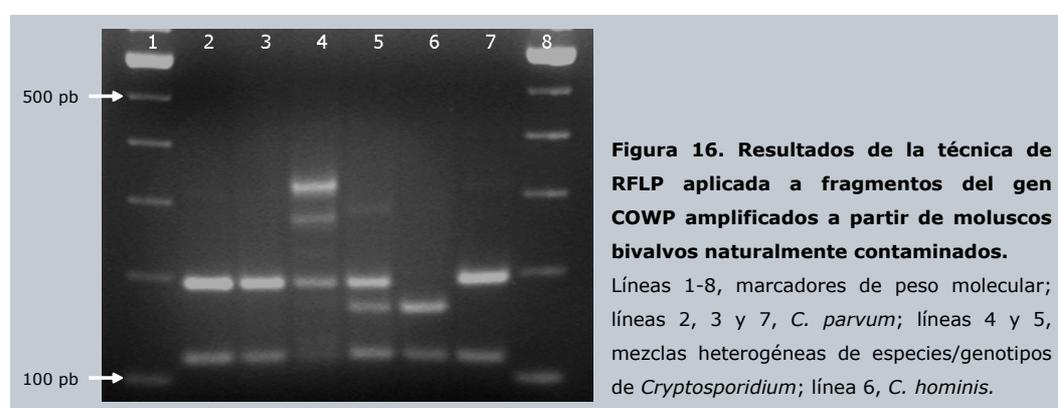
Especie (n)	IFD positivas	PCR positivas
Muestras de España		
Mejillón (22)	12	8
Almeja (18)	10	9
Ostra (9)	6	5
Total (49)	28 (56%)	22(44%)
Muestras del Reino Unido		
Mejillón (20)	ND	3
Berberecho (18)	ND	1
Total (38)	ND	4 (11%)
ND: No determinado		

La relación existente entre los resultados obtenidos mediante las técnicas de IFD y PCR en las muestras procedentes de España se refleja en la Tabla 16. Se comprobó una asociación significativa entre los resultados obtenidos por ambas técnicas (Test Exacto de Fisher,  $P=0,019$ ).

**Tabla 16. Relación entre los resultados obtenidos mediante las técnicas de IFD y PCR en la detección de *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos.**

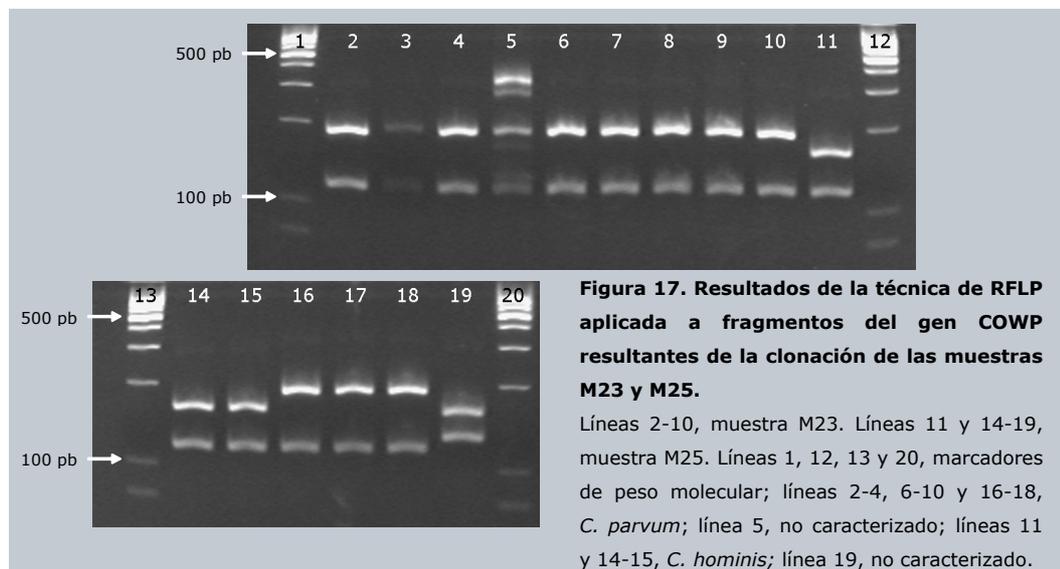
Resultados de IFD	Resultados de PCR		Total
	Muestras positivas	Muestras negativas	
Muestras positivas	17	11	28
Muestras negativas	5	16	21
Total	22	27	49

El análisis mediante RFLP permitió identificar *C. parvum* en 23 de las 26 muestras en las que se amplificó el fragmento del gen COWP; *C. hominis* en una muestra [M31 (=mejillón)] y en dos muestras [M23 (=almeja) y M25 (=ostra)] se observaron patrones electroforéticos indicativos de mezclas heterogéneas de especies/genotipos de *Cryptosporidium* (Figura 16).



Los productos obtenidos mediante PCR de las muestras M23 y M25 se purificaron y posteriormente se clonaron como se describe en el Apartado 2.3.2. de Material y Métodos. Diez colonias blancas o ligeramente azuladas procedentes de la clonación de cada una de las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos y a continuación, se sometieron a la segunda etapa de la técnica de PCR empleando los cebadores PCOWPIF y PCOWPIR. Se comprobó la presencia del fragmento diana en 7 y 9 de las 10 colonias seleccionadas para las muestras M23 y M25, respectivamente. El análisis mediante RFLP confirmó la existencia de mezclas heterogéneas de especies/genotipos de *Cryptosporidium*: en 6 de las 7 colonias en las que se realizó con éxito la clonación del fragmento del gen COWP amplificado en la muestra M23, el análisis mediante PCR-RFLP de éste mostró patrones de electroforesis compatibles con *C. parvum* (M23A); el fragmento del gen COWP presente en la otra colonia

exhibió un patrón electroforético no identificado previamente (M23B). Cinco de las 9 colonias procedentes de la clonación de la muestra M25 y positivas a *Cryptosporidium*, presentaron un patrón de RFLP característico de *C. parvum* (M25A); 3 colonias manifestaron patrones correspondientes a *C. hominis* (M25B); y en una colonia se reveló, de nuevo, un patrón no identificado previamente (M25C) (Figura 17).



Los productos finales obtenidos mediante PCR en la totalidad de las muestras (26) se purificaron y secuenciaron como se describe en el Apartado 1.4.2. de Material y Métodos. Las secuencias obtenidas en el presente estudio se compararon con las secuencias correspondientes a especies/genotipos de *Cryptosporidium* depositadas en el GenBank (Tabla 17). Se comprobó que de las 23 muestras inicialmente caracterizadas como *C. parvum* mediante RFLP, 22 (9 de mejillón; 8 de almeja; 4 de ostra y una de berberecho) presentaron una secuencia idéntica a la de *C. parvum* de origen bovino depositada en el GenBank (núm. de acceso AF266273); la muestra restante (M87=mejillón) presentó una similitud del 99% y tres diferencias con la secuencia mencionada (Figura 18). La secuencia correspondiente a la muestra M31, en la que se identificó *C. hominis* mediante RFLP, tuvo una similitud del 100% con la de *C. hominis* depositada en el GenBank (núm. de acceso AF481960) (Figura 18). En la muestra M23, se obtuvieron dos secuencias: una idéntica a la de *C. parvum* (núm. de acceso AF266273), correspondiente al patrón electroforético M23A, y otra con una similitud del 99% y una diferencia nucleotídica con respecto a la misma secuencia y correspondiente al patrón electroforético M23B (Figura 18). La secuenciación de

los productos obtenidos por PCR, previa clonación de la muestra M25, permitió distinguir tres secuencias: una con una similitud del 99% y una diferencia nucleotídica con la secuencia de *C. parvum* (AF266273) (M25A); otra idéntica a *C. hominis* (núm. de acceso AF481960) (M25B) y una última (M25C) con un 99% de similitud y dos diferencias nucleotídicas con respecto a la secuencia de *C. hominis* (núm. de acceso AF481960) (Figura 18).

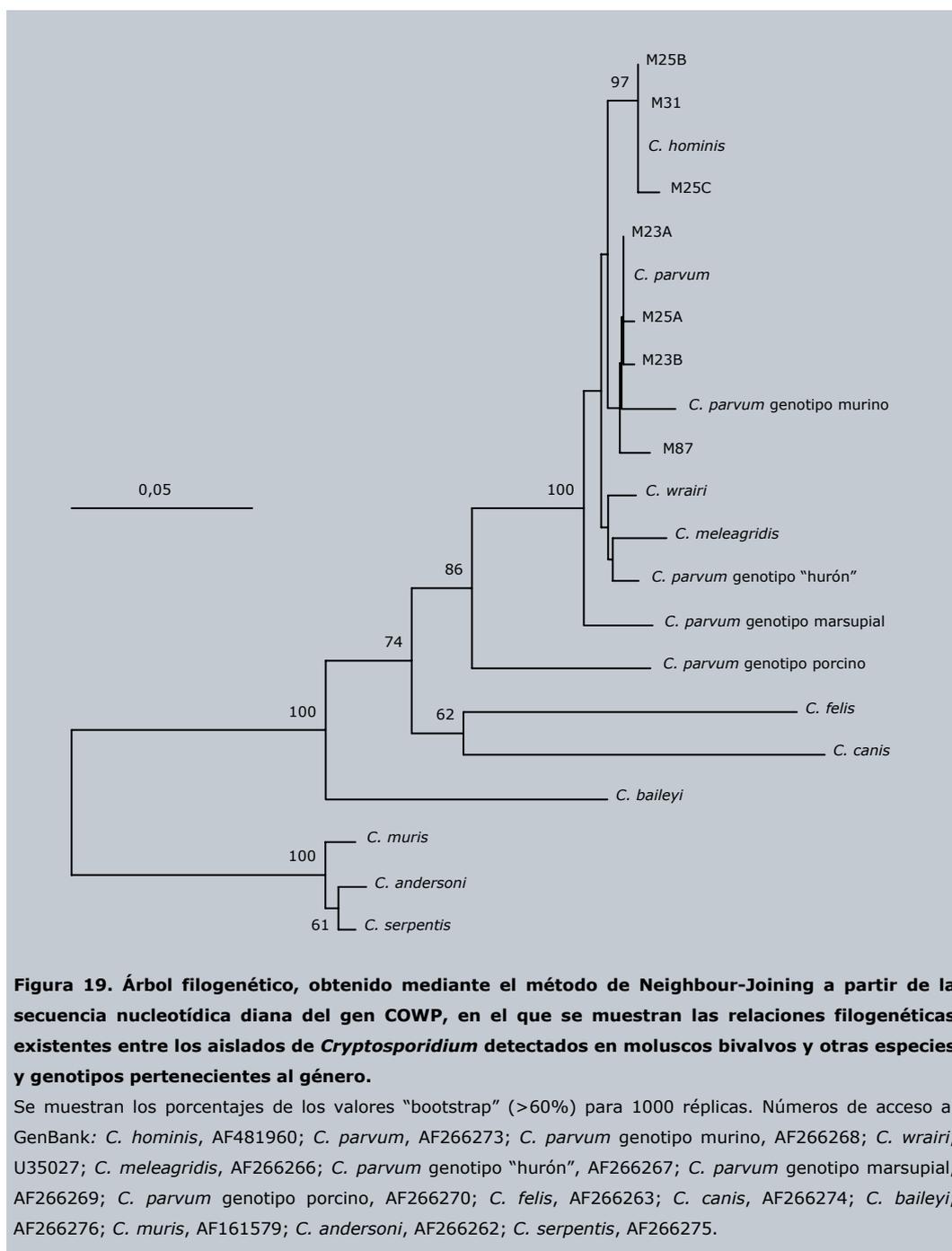
**Tabla 17. Caracterización molecular de aislados de *Cryptosporidium* spp. obtenidos en muestras de moluscos bivalvos.**

Núm. de Muestras	RFLP	Secuenciación (similitud con núm. de acceso GenBank)
22	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (100%, AF266273)
1 (M87)	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (99%, AF266273)(3 diferencias nucleotídicas)
1 (M31)	<i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i> (100%, AF481960)
1 (M23) <sup>b</sup>	M23A <sup>a</sup> : <i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (100%, AF266273)
	M23B <sup>a</sup> : NC	<i>C. parvum</i> (99%, AF266273)(una diferencia nucleotídica)
1 (M25) <sup>b</sup>	M25A <sup>a</sup> : <i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i> (99%, AF266273)(una diferencia nucleotídica)
	M25B <sup>a</sup> : <i>C. hominis</i>	<i>C. hominis</i> (100%, AF481960)
	M25C <sup>a</sup> :NC	<i>C. hominis</i> (99%, AF481960) (dos diferencias nucleotídicas)

<sup>a</sup>Patrones electroforéticos.  
<sup>b</sup>Los productos de PCR se clonaron y diversos clones se secuenciaron.  
 NC, no caracterizado.

En la Figura 19 se muestran las relaciones filogenéticas existentes entre las secuencias obtenidas en el presente estudio y las correspondientes a especies/genotipos de *Cryptosporidium* depositadas en el GenBank.





**Figura 19. Árbol filogenético, obtenido mediante el método de Neighbour-Joining a partir de la secuencia nucleotídica diana del gen COWP, en el que se muestran las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* detectados en moluscos bivalvos y otras especies y genotipos pertenecientes al género.**

Se muestran los porcentajes de los valores "bootstrap" (>60%) para 1000 réplicas. Números de acceso al GenBank: *C. hominis*, AF481960; *C. parvum*, AF266273; *C. parvum* genotipo murino, AF266268; *C. wrairi*, U35027; *C. meleagridis*, AF266266; *C. parvum* genotipo "hurón", AF266267; *C. parvum* genotipo marsupial, AF266269; *C. parvum* genotipo porcino, AF266270; *C. felis*, AF266263; *C. canis*, AF266274; *C. baileyi*, AF266276; *C. muris*, AF161579; *C. andersoni*, AF266262; *C. serpentis*, AF266275.

#### 1.4. *Cryptosporidium* y *Giardia* en zonas de cultivo de moluscos bivalvos

1.4.1. Detección de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en muestras ambientales y biológicas procedentes de las Rías Baixas

El estudio realizado sobre la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en muestras ambientales y biológicas recogidas entre los meses de enero y junio de 2004 en los estuarios denominados colectivamente Rías Baixas demostró, previa aplicación de la técnica de IFD sobre los distintos tipos de muestras procesadas como se describe en el apartado correspondiente, una amplia distribución de las formas infectantes de ambos enteroparásitos en las distintas muestras analizadas (Tabla 18).

**Tabla 18. Detección mediante la técnica de IFD de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en muestras ambientales y biológicas procedentes de las Rías Baixas.**

Tipo de muestra (n)	Núm. de muestras positivas (%)	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
Aguas fluviales (7)	5 (71,4)	6 (85,7)
Aguas residuales depuradas (16)	8 (50,0)	14 (87,5)
Aguas residuales brutas (11)	7 (63,6)	10 (90,9)
Mejillones <i>M. galloprovincialis</i> (184)	42 (22,8)	77 (41,8)

Los resultados obtenidos, indicando la zona de muestreo, el número de muestras ambientales y biológicas analizadas en cada una de ellas, así como los datos cualitativos y cuantitativos hallados para ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. se muestran en la Tabla 19. Con la excepción de dos ríos que desembocan en la Ría de Muros-Noia y de una muestra de agua residual bruta obtenida en la Ría de Vigo, los resultados demuestran la existencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. en todos los tipos de muestra analizados en las cuatro rías estudiadas. Se observa una gran variabilidad entre los valores cuantitativos detectados para ambos parásitos (*i.e.* el caso de las aguas residuales depuradas procedentes de la Ría de Vigo, en las que se detectaron concentraciones que oscilaron entre 7,0 y 1386,7 quistes de *Giardia* spp. por litro de agua). Además, se comprobó un predominio de *Giardia* spp. vs *Cryptosporidium* spp., no sólo atendiendo al tipo de muestra analizada sino también en las concentraciones detectadas, con la salvedad de las muestras biológicas en las que *Cryptosporidium* spp. presentó valores superiores.

**Tabla 19. Contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de muestras ambientales y biológicas recogidas en zonas de cultivo de moluscos bivalvos (Rías Baixas).**

Zona de muestreo	Tipo de muestra (n)	Núm. de muestras positivas (rango)	
		<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
Ría de Muros-Noia	Aguas fluviales (2)	0 (0)	1 (1,0) <sup>a</sup>
	Aguas residuales depuradas	ND	ND
	Aguas residuales brutas (5)	2 (1,6-7,5) <sup>a</sup>	4 (9,8-279,0) <sup>a</sup>
Ría de Arousa	Mejillones (24)	5 (25,0-50,0) <sup>b</sup>	9 (1,0-10,0) <sup>b</sup>
	Aguas fluviales (2)	2 (7,3-8,4) <sup>a</sup>	2 (9,8-29,3) <sup>a</sup>
	Aguas residuales depuradas (4)	4 (36,0-96,8) <sup>a</sup>	4 (83,2-598,4) <sup>a</sup>
	Aguas residuales brutas (4)	4 (150,0-1091,2) <sup>a</sup>	4 (268,0-1800,0) <sup>a</sup>
Ría de Pontevedra	Mejillones (121)	23 (25,0-250,0) <sup>b</sup>	46 (1,0-19,0) <sup>b</sup>
	Aguas fluviales (1)	1 (1,8) <sup>a</sup>	1 (6,3) <sup>a</sup>
	Aguas residuales depuradas (4)	3 (112,0-154,0) <sup>a</sup>	4 (136,0-2541,0) <sup>a</sup>
	Aguas residuales brutas (1)	1 (67,0) <sup>a</sup>	1 (1433,0) <sup>a</sup>
Ría de Vigo	Mejillones (25)	11 (25,0-150,0) <sup>b</sup>	15 (1,0-8,0) <sup>b</sup>
	Aguas fluviales (2)	2 (1,0-17,0) <sup>a</sup>	2 (0,4-21,3) <sup>a</sup>
	Aguas residuales depuradas (8)	1 (520,0) <sup>a</sup>	6 (7,0-1386,7) <sup>a</sup>
	Aguas residuales brutas (1)	0 (0)	1 (29,0) <sup>a</sup>
	Mejillones (14)	3 (50,0-275,0) <sup>b</sup>	7 (1,0-3,0) <sup>b</sup>

ND: No disponible.

<sup>a</sup>Ooquistes/quistes cuantificados por litro de muestra de agua.

<sup>b</sup>Ooquistes/quistes cuantificados en 40 µl del sedimento obtenido de 6-8 mejillones.

Cuando se evaluaron los porcentajes de contaminación obtenidos para ambos parásitos en las muestras biológicas con respecto a la calidad microbiológica de la zona de cultivo, se observó un incremento en la contaminación a medida que aumentan los niveles de contaminación bacteriana (Tabla 20). Sin embargo, sólo se detectó una asociación estadísticamente significativa para la existencia de quistes de *Giardia* spp. (Test Exacto de Fisher,  $P=0,026$ ).

**Tabla 20. Contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de muestras biológicas clasificadas de acuerdo con la calidad microbiológica de la zona de cultivo.**

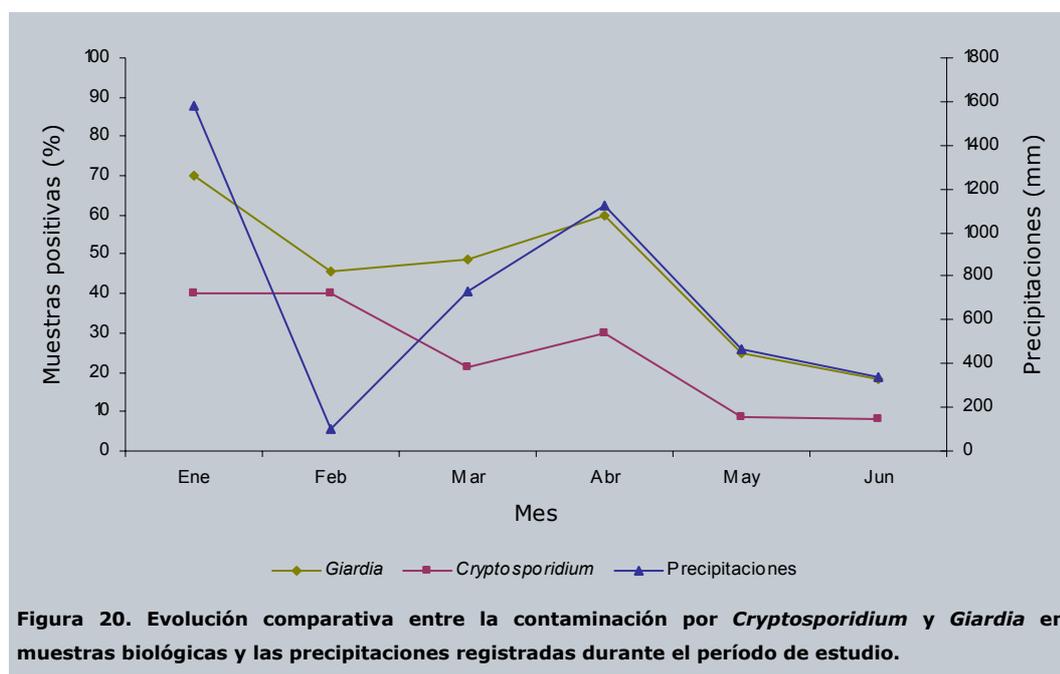
Categoría microbiológica de la zona de cultivo (n)	Núm. muestras contaminadas (%)	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
A (47)	10 (21,3)	13 (27,7)
B (137)	32 (23,4)	64 (46,7)

De igual forma, se constató un comportamiento similar entre la contaminación parasitaria y la bacteriana detectada en la muestra biológica, estableciéndose una asociación estadísticamente significativa entre ambas sólo para el caso de *Giardia* spp. ( $\chi^2$ ,  $P=0,008$ ) (Tabla 21).

**Tabla 21. Contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. de muestras biológicas clasificadas de acuerdo con su calidad microbiológica.**

Categoría microbiológica de la muestra (n)	Núm. muestras contaminadas (%)	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
A (135)	27 (20,0)	53 (39,2)
B (40)	11 (27,5)	17 (42,5)
C (9)	4 (44,4)	7 (77,7)

Se comprobó una asociación significativa ( $P<0,001$ ) entre la existencia de ambos parásitos en los moluscos bivalvos analizados. En la Figura 20 se reflejan los porcentajes de contaminación detectados en las muestras biológicas para *Cryptosporidium* y *Giardia*, así como las precipitaciones recogidas en los meses del estudio. La contaminación por *Giardia* presenta una evolución similar a la de las precipitaciones registradas; en el caso de *Cryptosporidium* esta similitud no se produce en los dos primeros meses del muestreo.

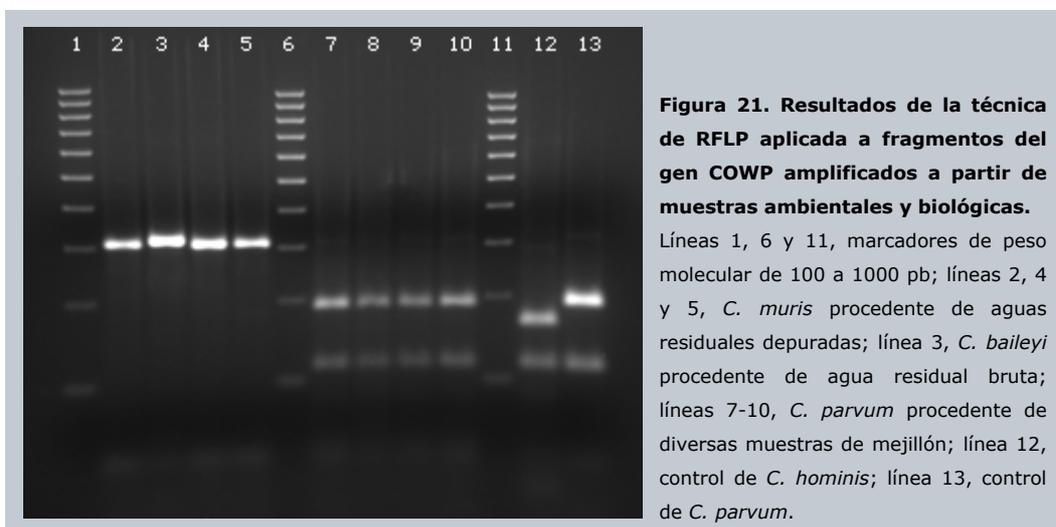


**Figura 20. Evolución comparativa entre la contaminación por *Cryptosporidium* y *Giardia* en muestras biológicas y las precipitaciones registradas durante el período de estudio.**

#### 1.4.2. Identificación de especies/genotipos de *Cryptosporidium*

Se intentó identificar la especie/genotipo de *Cryptosporidium* contaminante en 5 de las 7 muestras de aguas fluviales, 8 de las 16 muestras de aguas residuales depuradas y en 7 de las 11 aguas residuales brutas en las que previamente se identificaron y cuantificaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp., además de en la totalidad de las muestras biológicas examinadas (184). Todas las muestras, independientemente de su origen, se sometieron al proceso de extracción del ADN descrito en el Apartado 1.3.2. de Material y Métodos, para su posterior empleo en las técnicas de caracterización molecular (Apartado 1.4. de Material y Métodos).

No se logró amplificar el ADN cryptosporidial en ninguna de las muestras fluviales, a pesar de que aquéllas con una turbidez  $\geq 1$  UNF se sometieron a un tratamiento de clarificación mediante IMS (Aureon Biosystems GmbH) previo a la extracción del ADN. De las 8 muestras de agua residual depurada, en 3 se obtuvieron resultados positivos mediante la técnica de PCR. La aplicación de las técnicas de RFLP y secuenciación del fragmento amplificado del gen COWP permitió identificar a *C. muris* como la especie contaminante en las 3 muestras (similitud del 100% con la secuencia de *C. muris* depositada en el GenBank bajo el núm. de acceso AF266264). En tan solo una de las 7 muestras de agua residual bruta se obtuvieron resultados exitosos, comprobando que el aislado previamente detectado por IFD correspondió a *C. baileyi* (similitud del 100% con la secuencia de *C. baileyi* depositada en el GenBank bajo el núm. de acceso AF266276) (Figura 21).



Por lo que respecta a las 184 muestras biológicas, en 42 se detectó contaminación por *Cryptosporidium* spp. mediante la técnica de IFD. Sin embargo, tan solo se logró amplificar el ADN del parásito en 26 muestras, 14 de las cuales fueron también positivas por la técnica de IFD. *C. parvum* se identificó por RFLP y secuenciación en la totalidad de las muestras (Figura 21) (similitud del 100% con la secuencia de *C. parvum* depositada en el GenBank bajo el núm. de acceso AF266273).

## 2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL

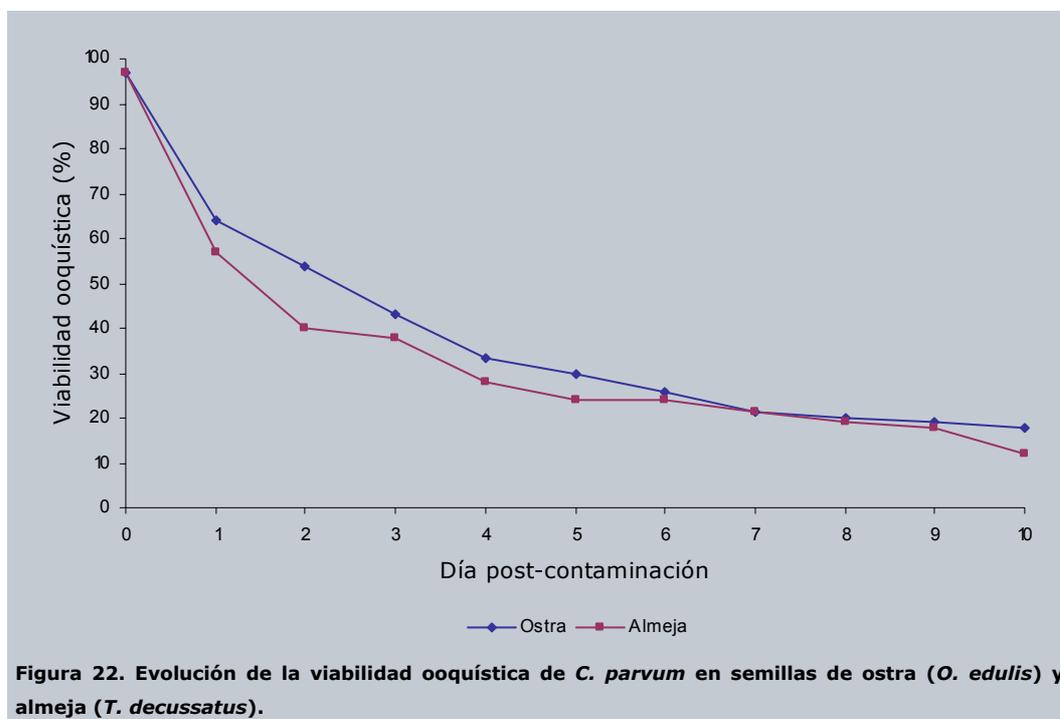
### **2.1. Supervivencia de *C. parvum* en dos especies de moluscos bivalvos: *O. edulis* y *T. decussatus***

Se contaminaron experimentalmente 120 semillas de ostra *O. edulis* y 120 semillas de almeja *T. decussatus* con ooquistes de un aislado de *C. parvum* cuya viabilidad fue del 97% determinada mediante la técnica de inclusión/exclusión de colorantes vitales fluorogénicos descrita por Campbell y col. (1992) (Apartado 1.2.1.). Las semillas se mantuvieron en tanques independientes durante los 31 días que duró el estudio. Entre los días 1 y 10 post-contaminación, se analizaron dos muestras constituidas por 10 semillas de ostra y almeja respectivamente, sobre cuyos sedimentos se aplicó una técnica de IFD para visualizar los ooquistes. La viabilidad se determinó mediante la inclusión/exclusión del colorante IP de acuerdo con Dowd y Pillai (1997).

La evolución de la viabilidad de ooquistes de *C. parvum* en el interior de las semillas fue independiente de la especie de molusco contaminada. En ambos casos, se observó un fuerte descenso de la viabilidad ooquistica durante los cuatro primeros días, alrededor del 70% (97% original vs 30% a los cuatro días post-contaminación). A partir del día cuatro y hasta el día 10 post-contaminación, la pérdida de la viabilidad ooquistica fue progresiva, hasta alcanzar el último día del estudio valores del 12% y 18% para los ooquistes retenidos en semillas de almeja y ostra, respectivamente (Figura 22).

La inoculación intragástrica de los sedimentos obtenidos de semillas de almeja y ostra el día 10 post-contaminación a dos camadas de ratones recién nacidos Swiss CD-1, reveló, mediante la aplicación de la técnica de IFD, que todos los animales inoculados estaban infectados a los siete días pi. De igual forma, se comprobó el mantenimiento de la infectividad ooquistica a los 31 días post-contaminación. Así, 3 de los 5 animales inoculados con ooquistes recuperados de semillas de ostra y 4 de los 9 ratones inoculados con los recuperados de semillas de almeja estaban parasitados.

El análisis del agua de uno de los tanques donde se habían aclimatado los moluscos mostró, a las 24 horas, un descenso del 97,5% en el número de ooquistes en suspensión. De esta forma, la concentración de un litro de agua de mar por centrifugación ( $1250 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos) permitió cuantificar  $0,025 \times 10^6$  ooquistes/l cuando la concentración inicial establecida fue de  $1 \times 10^6$  ooquistes/l.



## 2.2. *C. parvum* en *T. decussatus*

Mediante exámenes histológicos se estudió el tránsito de ooquistes de *C. parvum* a través de semillas de almeja *T. decussatus*. Las 60 semillas utilizadas se colocaron en un tanque con agua de mar natural contaminada con  $20 \times 10^6$  ooquistes purificados de *C. parvum* y se mantuvieron bajo las condiciones descritas anteriormente durante los diez días que duró el ensayo. Transcurridas 24 horas, se sacrificaron 10 ejemplares y sobre el sedimento obtenido de la totalidad del cuerpo se aplicó la técnica de IFD (Monofluo<sup>®</sup> Kit *Cryptosporidium*, Sanofi Diagnostics Pasteur) para confirmar la captación y retención de las formas parasitarias. El análisis cuantitativo realizado demostró la existencia de un valor medio de  $2,85 \times 10^5$  ooquistes/semilla, lo que supone una captación del 86% de los ooquistes añadidos ( $3,3 \times 10^5$  ooquistes/semilla).

Diariamente y hasta el final del ensayo, 5 ejemplares se procesaron histológicamente como se describe en el Apartado correspondiente. Se realizaron cortes de 3 µm de grosor a distintas alturas del cuerpo del molusco y, sobre las secciones obtenidas, se aplicaron las técnicas de tinción tricrómica de Wheatley (1951) y de IFD. La tinción tricrómica fue ineficaz en la detección de ooquistes en el tejido contaminado. Sin embargo, tuvo gran utilidad en la identificación de la región anatómica observada en los cortes histológicos y sobre cuyos equivalentes se detectaron ooquistes mediante la técnica de IFD.

Se comprobó la presencia de formas parasitarias en diferentes tejidos: sifones, branquias, estómago, hepatopáncreas e intestino. El mayor número de ooquistes se detectó en el intestino: a las 24 horas post-contaminación se visualizaron más de 10 ooquistes por campo microscópico 40× y en varias ocasiones durante el experimento se observaron entre 5-10 ooquistes (días 2; 4; 6; 7; y 10 post-contaminación). Todos los días que duró el ensayo se hallaron ooquistes en esta localización anatómica (Tabla 22).

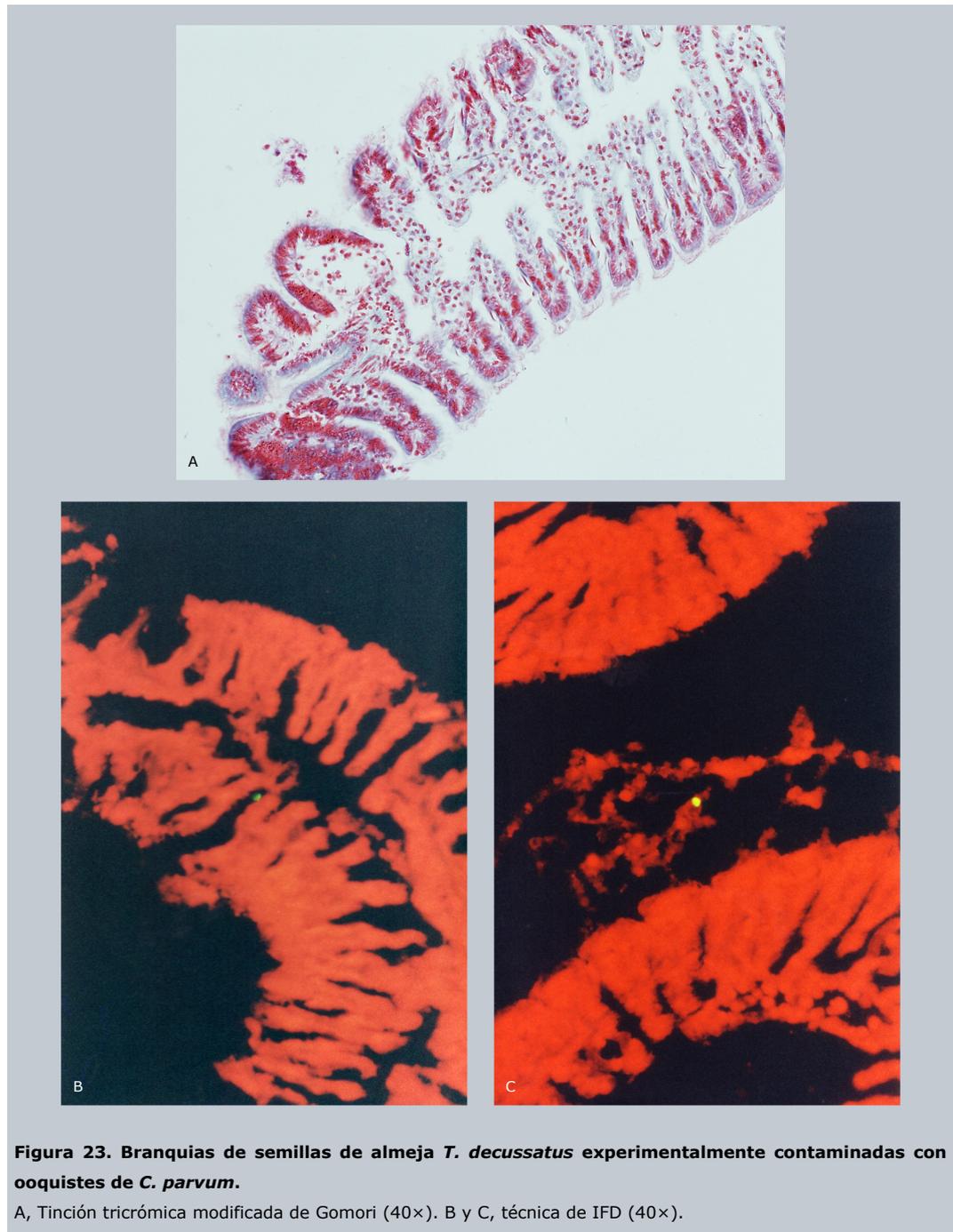
**Tabla 22. Localización de ooquistes de *C. parvum* en distintos tejidos de almejas (*T. decussatus*) experimentalmente contaminadas.**

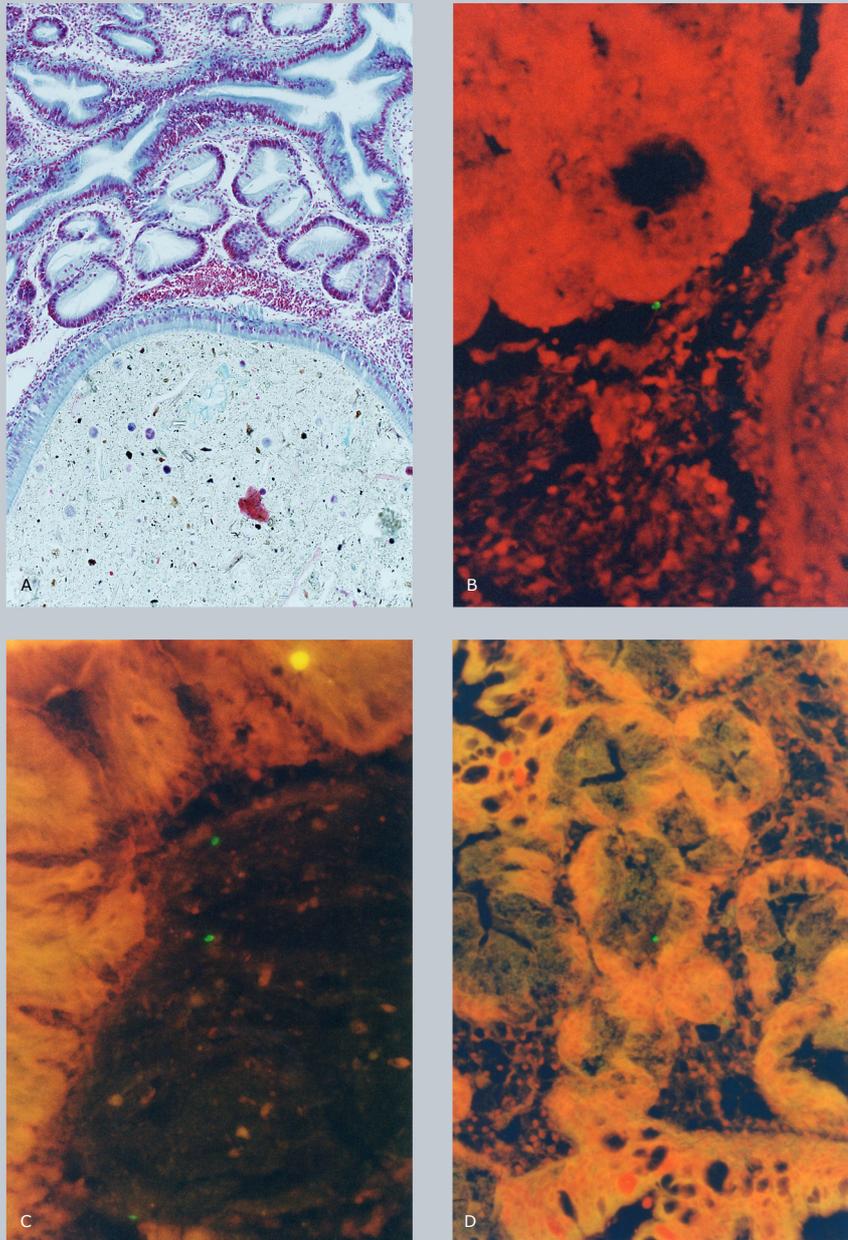
Localización	Tiempo post-contaminación (días)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sifones	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Branquias	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Hepatopáncreas	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Estómago	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Intestino	+++	++	+	++	+	++	++	+	+	++

(-) = ningún ooquiste; (+) = <5 ooquistes; (++) = 5-10 ooquistes; (+++) = >10 ooquistes.

Promedio del número de ooquistes por campo microscópico 40× determinado al observar tres cortes histológicos realizados a distintos niveles en cada uno de los cinco ejemplares procesados diariamente.

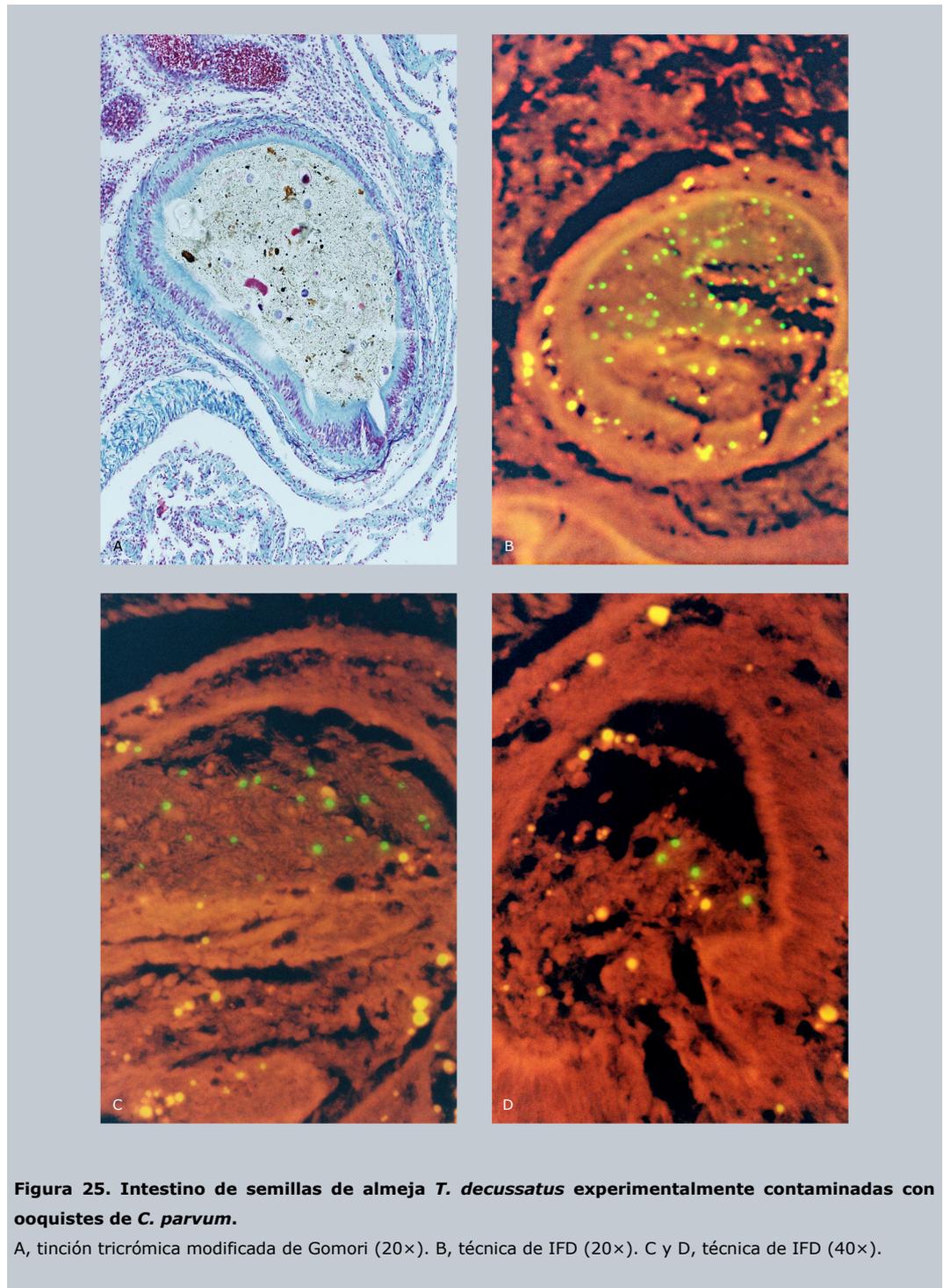
En las branquias se observaron ooquistes consecutivamente desde el día 2 hasta el día 8 post-contaminación, aunque siempre en un número no superior a 5 ooquistes por campo microscópico 40×. En este tejido, los ooquistes se localizaron tanto en los espacios interfilamentares como en el mucus branquial (Tabla 22). En menor medida, los ooquistes de *C. parvum* contaminantes se detectaron en el estómago, en los sifones y en el hepatopáncreas. En ningún momento del estudio se observó, mediante las técnicas utilizadas, que las formas parasitarias fuesen internalizadas por células del molusco, manteniéndose los ooquistes libres o mezclados con los contenidos estomacal y/o intestinal, sin atravesar los epitelios branquial y/o gastrointestinal (Figuras 23-25).





**Figura 24. Estómago y hepatopáncreas de semillas de almeja *T. decussatus* experimentalmente contaminadas con ooquistes de *C. parvum*.**

A, tinción tricrómica modificada de Gomori (20×). B y C, ooquistes en estómago (IFD, 40×). D, ooquiste en hepatopáncreas (IFD, 20×).



**Figura 25. Intestino de semillas de almeja *T. decussatus* experimentalmente contaminadas con ooquistes de *C. parvum*.**

A, tinción tricrómica modificada de Gomori (20×). B, técnica de IFD (20×). C y D, técnica de IFD (40×).

### 2.3. Transmisión de *C. parvum* entre especies de moluscos bivalvos

Aplicando el diseño experimental mostrado en la Figura 11, se evaluó la liberación de ooquistes de *C. parvum* a partir de semillas vivas y muertas y su posterior captación por semillas de distinta especie.

Muestras constituidas por 20 ejemplares de cada una de las especies (*O. edulis* y *T. decussatus*) se colocaron en dos acuarios de un litro con agua de mar natural contaminada con  $20 \times 10^6$  ooquistes purificados de *C. parvum*, cuya viabilidad fue del 98% detectada mediante la inclusión/exclusión de colorantes vitales fluorogénicos (Campbell y col., 1992). Transcurridas 24 horas, se analizaron los sedimentos obtenidos a partir de 10 ejemplares de cada una de las especies, detectándose la presencia de ooquistes mediante la técnica de IFD. Aplicando la técnica de inclusión/exclusión del colorante IP se comprobó un descenso de la viabilidad ooquistica en ambas especies: 98% inicial vs 60%. Paralelamente y mediante centrifugación a  $1250 \times g$ , a 4°C, durante 5 minutos, se concentró el volumen de agua de mar en el que se mantuvieron las semillas (2 litros), comprobando un descenso del 76-77% en el número de ooquistes de *C. parvum* en suspensión.

El ensayo de transmisión de ooquistes de *C. parvum* entre especies coexistentes vivas demostró (Tabla 23):

- Una disminución en el número de ooquistes retenidos por la especie de molusco receptora a medida que se prolonga el tiempo de contacto.
- Una pérdida inicial de la viabilidad ooquistica (60% en especie donante vs 18% en especie receptora a los cuatro días del inicio del estudio).
- Un mantenimiento en la especie receptora de la viabilidad ooquistica entorno al 20% hasta el final del ensayo (día 10 post-contaminación).

Cuando se evaluó la transmisión de ooquistes de *C. parvum* entre semillas de ostra muertas a semillas de almeja receptoras, se observó (Tabla 23):

- Una disminución en el número de ooquistes retenidos por la especie de molusco receptora hasta una ausencia de contaminación al final del ensayo (día 10 post-contaminación).
- Aunque la viabilidad ooquistica se mantuvo inicialmente entre un 16-17%, ninguno de los 4 ooquistes cuantificados el día 8 post-contaminación se mantenían viables.

**Tabla 23. Transmisión experimental de ooquistes de *C. parvum* entre dos especies de moluscos bivalvos (*O. edulis* y *T. decussatus*).**

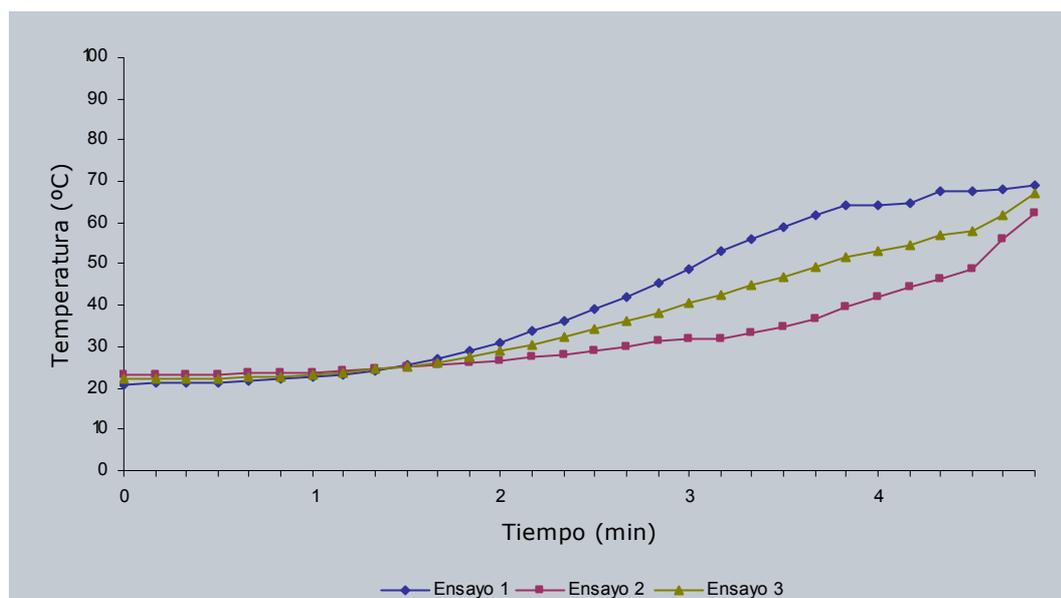
Día post-contaminación	Almejas vivas -> Ostras		Ostras muertas -> almejas	
	Núm. ooquistes <sup>a</sup>	Viabilidad (%)	Núm. ooquistes <sup>a</sup>	Viabilidad (%)
4	57	18,0	24	16,6
6	20	23,0	17	17,0
8	16	20,0	4	0,0
10	15	20,0	0	0,0

<sup>a</sup>Número de ooquistes cuantificados en 10 µl del sedimento obtenido a partir de 20 ejemplares de la semilla de molusco receptora.

#### **2.4. ¿Es *Cryptosporidium* infectante después de cocinar los mejillones al vapor?**

Considerando que los mejillones al vapor representan un plato típico en algunos países, se evaluó experimentalmente si este método culinario inactiva las formas infectantes de *C. parvum*. Se comprobó mediante las técnicas de IFD y PCR la ausencia de contaminación natural por *Cryptosporidium* spp. en 8 ejemplares de mejillones vivos (*M. galloprovincialis*) procedentes de una bolsa debidamente envasada y etiquetada para el consumo humano. A continuación, 13 ejemplares se aclimataron en un tanque con agua de mar natural contaminada con  $13 \times 10^6$  ooquistes purificados de *C. parvum*. Al cabo de 24 horas, tiempo durante el cual los mejillones son capaces de captar y retener las formas infectantes del parásito, como se demostró en los apartados anteriores de los estudios de contaminación experimental, los mejillones se colocaron en una olla metálica aplicando calor hasta la total apertura de las valvas (Figura 26).

Inmediatamente después, se diseccionaron las branquias y tractos gastrointestinales y se sometieron a los procesos de homogenización y concentración difásica descritos anteriormente. Mediante la técnica de IFD se cuantificó el número de ooquistes existentes en el sedimento resuspendido en 3 ml de PBS 0,04M pH 7,2, siendo el valor obtenido de  $2 \times 10^4$  ooquistes/ml. Alícuotas de 100 µl de esta suspensión se inocularon intragástricamente a 26 ratones Swiss CD-1 recién nacidos y la infectividad ooquistica se evaluó a los 7 días pi, comprobándose que la mitad de estos animales estaban infectados con una intensidad de infección similar a la obtenida en la camada control (Tabla 24).



**Figura 26. Evolución de la temperatura interna de los mejillones durante el proceso de cocinado al vapor.**

**Tabla 24. Efecto del vapor sobre la infectividad de ooquistes de *C. parvum* recuperados de mejillones (*M. galloprovincialis*) experimentalmente contaminados.**

Camada (n)	Dosis (ooquistes/100 $\mu$ l)	Ratones infectados (%)	Intensidad de infección <sup>a</sup>
Control (20)	$2,5 \times 10^4$	100	$17,6 \pm 6,7$
Ensayo (26)	$2,0 \times 10^3$	50	$16,1 \pm 9,3$

<sup>a</sup>Media del número de ooquistes  $\pm$  DE  $\times 10^5$ /totalidad del intestino homogenizado.

DISCUSIÓN



La repercusión de las enfermedades transmitidas por los alimentos en la salud pública y el fuerte impacto económico que ocasionan hacen que la seguridad alimentaria sea uno de los objetivos prioritarios de los organismos competentes en las distintas administraciones. El reciente incremento de estas enfermedades se relaciona estrechamente con los cambios sociales experimentados en los últimos años y que pueden sintetizarse en los siguientes aspectos: i) aumento de poblaciones susceptibles, entre las que se incluyen los ancianos y los enfermos inmunocomprometidos; ii) cambios experimentados en los hábitos alimenticios; iii) existencia de un cierto relajamiento en el control sanitario de productos alimentarios importados, algunos de ellos procedentes de regiones endémicas; y iv) desplazamientos de la población a zonas de alto riesgo (Macpherson, 2005). Consecuentemente, es prioritario diseñar y desarrollar programas que abarquen todas las fases de la cadena alimentaria, desde la producción primaria (agricultores, ganaderos y pescadores) hasta la transformación, distribución y venta de los alimentos, sin obviar la educación sanitaria del consumidor.

Las enfermedades emergentes/reemergentes ocasionadas por protozoos intestinales de transmisión hídrica, como *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*, han sido recientemente asociadas con diversos brotes de transmisión alimentaria (Slifko y col., 2000; Graczyk, 2003). En la actualidad, las protozoosis adquiridas a través de los alimentos están subestimadas, identificándose un agente etiológico protozoario en menos de la mitad de los brotes infecciosos por contaminación alimentaria (Cliver, 1987; Casemore, 1991). La ausencia de medios de cultivo estandarizados que permitan recuperar un número pequeño de ooquistes/quistes y confirmar posteriormente su viabilidad, dificulta la demostración de este tipo de transmisión.

Los moluscos bivalvos son muy apreciados en la alimentación, constituyendo una excelente fuente de nutrientes al aportar proteínas de alto valor biológico (similares a las de la carne y los huevos), un contenido variado en minerales, oligoelementos y vitaminas y lípidos poliinsaturados. Con el fin de garantizar la salubridad de estos alimentos, su producción y comercialización están estrictamente legisladas debido a que estos organismos se alimentan por filtración, pudiendo concentrar agentes tóxicos y/o infecciosos existentes

en el ambiente en el que se desarrollan. No obstante, episodios autolimitados de gastroenteritis de etiología no determinada continúan siendo habituales entre los consumidores.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran el alto grado de contaminación por *Cryptosporidium* spp. (34,4%) que presentan diversas especies de moluscos bivalvos destinadas al consumo humano. El hecho de que la contaminación por *Cryptosporidium* spp. se detectase en todas las zonas de muestreo (no se considera la Ría de Ortigueira ante el escaso número de muestras disponibles) pone de manifiesto los elevados niveles de contaminación fecal de origen humano y/o animal existentes en las aguas litorales en las que se cultivan estos moluscos.

Diversos autores denunciaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas costeras (Johnson y col., 1995; Ferguson y col., 1996; Smith y Grimason, 2003) y en diferentes especies de moluscos bivalvos (Tabla 3), demostrando la amplia distribución de las formas infectantes del parásito en aguas marinas. Así, comprobamos que un 36,8% de las muestras importadas de la costa adriática italiana, del Reino Unido y de Irlanda estaban naturalmente contaminadas.

Los porcentajes de contaminación obtenidos en ostra y mejillón (54,8% y 32,7%, respectivamente) fueron superiores a los hallados en especies de almeja (29,3%) y berberecho (20,8%). Considerando las características anatómicas y fisiológicas inherentes a las distintas especies de moluscos bivalvos analizadas, las diferencias observadas en los niveles de contaminación podrían atribuirse además, a los sistemas de cultivo empleados en su producción. Mientras que las ostras y los mejillones se cultivan habitualmente en cuerdas suspendidas de bateas, las almejas y los berberechos se producen en parques situados en zonas intermareales, permaneciendo diariamente y durante ciertos períodos de tiempo no cubiertos por el agua [en las rías gallegas, las mareas son de tipo semidiurno, es decir, cada 24 horas hay dos pleamares y dos bajamares, oscilando el cambio de nivel entre la bajamar y la pleamar entre 2 y 4 metros (Corral, 1992)].

Por otra parte, la baja velocidad de sedimentación que presentan los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (0,5  $\mu\text{m}/\text{segundo}$ ) (Rose y col., 1997) favorece su permanencia en suspensión en el agua de mar, facilitando así su posible filtración por especies de moluscos bivalvos que habitan en la columna de agua, a diferencia de las especies bentónicas. Además, y a pesar de existir todavía vertidos incontrolados de aguas residuales a los arenales, la mayoría de este tipo de aguas son expulsadas, previo tratamiento, mediante

emisarios marinos a zonas alejadas de las playas pero próximas a los polígonos de bateas donde se cultivan las ostras y los mejillones. Es de destacar el hecho de que los mayores niveles de contaminación por *Cryptosporidium* spp. se detectaron en ostra (54,8%), representando un mayor riesgo de infección para la población humana ya que este bivalvo se consume normalmente crudo.

Diversos estudios demostraron la capacidad de los ooquistes de *C. parvum* para sobrevivir en aguas marinas durante largos períodos de tiempo (Fayer y col., 1998, 1998a; Tamburrini y Pozio, 1999) y así, se comprobó que ooquistes de *C. parvum* se mantuvieron infectantes para ratones recién nacidos después de permanecer en agua de mar con una salinidad del 35‰, a 18°C, durante 40 días (Freire-Santos y col., 1999, 2000).

La incorporación a la técnica de IFD, empleada en este estudio para la identificación de ooquistes, del colorante vital fluorogénico IP, indicativo de la integridad de la pared ooquistica, permitió determinar individualmente la viabilidad de cada uno de los ooquistes detectados. De esta forma, comprobamos que un 53,0% de las muestras contaminadas presentaban ooquistes viables y por lo tanto potencialmente infectantes. Aunque el estudio fue cualitativo (ausencia/presencia y viabilidad ooquistica), en algunas ocasiones se determinó el número de formas parasitarias. Así, en el sedimento obtenido de una muestra constituida por seis ejemplares de ostra *O. edulis*, se cuantificaron 38 ooquistes de los cuales 21 fueron impermeables al colorante IP y por lo tanto potencialmente viables (datos no mostrados). Independientemente de los resultados cuantitativos y considerando la baja dosis mínima infectante establecida por diversos autores y relacionada tanto con la virulencia del aislado como con el estado inmunitario del hospedador (Newman y col., 1994; Eisenberg y col., 1998), la existencia de contaminación en estos moluscos ya es suficiente para evidenciar el riesgo de infección por parte del consumidor.

A este respecto, en el estudio experimental en el que se evaluó la supervivencia de ooquistes de *C. parvum* captados por semillas de dos especies de moluscos bivalvos de interés comercial (*O. edulis* y *T. decussatus*), se comprobó un brusco descenso de la viabilidad ooquistica durante los cuatro primeros días de permanencia del parásito en la especie hospedadora (97% vs 30%). A partir de este momento y hasta el día 10 post-contaminación, se observó una pérdida progresiva de dicha viabilidad, oscilando entre un 12-18% en el citado día, pero comprobándose posteriormente la existencia de ooquistes infectantes al lograr implantar la parasitación en ratones lactantes los días 10 y 31 post-contaminación.

Como se ha comentado en el apartado correspondiente (Apartado 2.2. de la Revisión Bibliográfica), la digestión en los moluscos bivalvos puede ser extracelular, mediante enzimas digestivos liberados en el estómago, o bien intracelular por células digestivas existentes en el hepatopáncreas. Además, la presencia de hemocitos libres, tanto en el estómago como en el intestino, favorece la digestión intracelular de ciertas partículas alimenticias (Gosling, 2003). El notable descenso observado en la viabilidad ooquistica durante los primeros días del estudio podría ser debido al efecto conjunto de ambos procesos.

Estudios de microscopía electrónica revelaron que la pared ooquistica de *C. parvum* presenta una estructura trilaminar. La capa externa es continua y de grosor uniforme, estando constituida básicamente por glucoproteínas. La capa central, aparentemente rígida, está formada por lípidos y posiblemente sea la responsable de las propiedades ácido-resistentes del ooquiste. La lámina interna está compuesta por glucoproteínas de estructura filamentosa (Bonin y col., 1991; Harris y Petry, 1999). En un estudio realizado por Harris y Petry (1999) se evaluó la acción de tres proteasas sobre la pared ooquistica, comprobándose una progresiva eliminación de la capa interna filamentosa, fundamentalmente por la acción de la proteinasa K y en menor medida por la tripsina. La presencia en el estómago de los moluscos bivalvos de enzimas del tipo de las esterasas (importantes en la digestión lipídica); fosfatasa, tanto ácida como alcalina; y endopeptidasas, como la tripsina, podría justificar parcialmente esta pérdida de viabilidad (Gosling, 2003).

Diversos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demostraron la fagocitosis de ooquistes de *C. parvum* por hemocitos de diferentes especies de moluscos bivalvos. Graczyk y col. (1997a) observaron, transcurridos 120 minutos de incubación, que un 81,6% de los ooquistes presentes en el medio fueron fagocitados por el 93,0% de los hemocitos de una almeja de agua dulce (*C. fluminea*). Estos autores también comprobaron la internalización de ooquistes marcados con anticuerpos monoclonales unidos a fluoresceína por parte de monocapas de hemocitos de la ostra *C. virginica* y observaron que se produce una pérdida de fluorescencia de la pared ooquistica a medida que aumenta el tiempo de contacto, por lo que sugieren que ésta se desintegra con el paso del tiempo (Graczyk y col., 1997b). Sin embargo, Fayer y col. (1997a) y Graczyk y col. (1998a) demostraron que ooquistes retenidos en los hemocitos fueron infectantes para ratones neonatales BALB/c.

En el estudio histológico planteado para dilucidar el tránsito de los ooquistes de *C. parvum* a través de semillas de almeja *T. decussatus* y realizado durante diez días

consecutivos, no observamos la internalización de las formas parasitarias por ningún tipo de células del molusco (la hemolinfa no se extrajo debido al pequeño tamaño de las semillas). Sin embargo, detectamos la presencia de ooquistes de *C. parvum* tanto en el mucus como en los espacios interfilamentares de las branquias. Esta ubicación, referida por diversos autores en diferentes especies de moluscos bivalvos (Fayer y col., 1997a; Graczyk y col., 1998a; Tamburrini y Pozio, 1999; Freire-Santos y col., 2001), podría justificar la existencia de un cierto número de ooquistes viables capaces de provocar la infección en ratones lactantes al cabo de 31 días de permanencia en el molusco.

Considerando que el proceso de depuración consiste básicamente en la "limpieza" del tracto gastrointestinal de los moluscos bivalvos cuando se provoca la filtración de grandes volúmenes de agua de mar libre de microorganismos patógenos y así convertirlos en aptos para el consumo humano [BOE (núm. 86) de 10 de abril de 1999], la ineficacia de dicho proceso en la total eliminación de las formas infectantes de *Cryptosporidium* spp. es un resultado importante obtenido en nuestro estudio y previamente observado por Freire-Santos y col. (2000a). De esta forma, comprobamos que 60 muestras de las 187 (32,1%) que habían sido sometidas a distintos tiempos de depuración presentaban ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Habitualmente, las empresas depuradoras someten los moluscos bivalvos a este proceso durante al menos 48 horas, período que puede ser modificado bajo diversas circunstancias. Así, dispusimos de muestras que permanecieron en la planta desde tres días hasta más de 14 días consecutivos. Sin embargo, detectamos muestras contaminadas independientemente de los tiempos empleados en el proceso. La ineficacia del método de depuración utilizado puede ser debida a las posibles localizaciones extraintestinales del parásito descritas anteriormente en nuestro estudio experimental y por diversos autores (en el tejido branquial y en la hemolinfa). Observaciones similares fueron realizadas por Schwab y col. (1998), quienes demostraron la existencia del virus Norwalk en el músculo aductor y en la hemolinfa de diversas especies de ostras y almejas. Los autores comprobaron que tiempos de depuración de 48 horas fueron eficaces para la eliminación de bacterias (95% de reducción) pero insuficientes para disminuir los niveles del virus Norwalk (7% de reducción). De igual forma, Muniain-Mujika y col. (2002) sugieren, al evaluar la dinámica de la depuración vírica en moluscos bivalvos, que tratamientos de depuración superiores a cinco días pueden ser necesarios para garantizar la calidad sanitaria de estos moluscos.

Sin embargo, otros autores demostraron experimentalmente que los ooquistes de *C. parvum* captados por mejillones son liberados al medio en 48 horas, planteando la posibilidad de que tiempos de depuración iguales o superiores a 72 horas pueden ser suficientes para eliminar totalmente las formas parasitarias del interior de los moluscos (Gómez-Bautista y col., 2000). Recientemente y también de forma experimental, Ramos y col. (2005) comprobaron, en distintas especies de moluscos bivalvos, que el proceso de depuración durante 24 horas es eficaz. Los autores no observaron formas parasitarias en los moluscos pero sí en el agua de la depuradora.

Por otra parte, el estudio histológico realizado demostró que los ooquistes de *C. parvum* se encuentran principalmente libres o mezclados con el contenido intestinal de las semillas de las especies experimentalmente contaminadas, pudiendo ser eliminados con las heces. En un estudio similar realizado con la almeja de agua dulce *C. fluminea*, Graczyk y col. (1998a) comprobaron, al aspirar las heces de los ejemplares del fondo del acuario, que el mayor número de ooquistes se eliminó los días 2 y 3 post-exposición. También, observaron que éstos se presentaban agrupados y siempre incluidos en las heces. En nuestro estudio no pudimos analizar el material fecal debido al pequeño tamaño de las semillas utilizadas (aproximadamente 7 veces inferior al de los ejemplares utilizados por los citados autores).

Además de la presencia constante de ooquistes en el intestino durante el tiempo que duró el ensayo, observamos un incremento en el número de formas parasitarias los días 6 y 7 post-contaminación. Este hecho podría relacionarse con la estimulación del proceso de filtración ante un segundo aporte de nutrientes realizado el día cinco del estudio. La capacidad de filtración de una semilla de *T. decussatus* oscila entre 0,50-0,75 litros/hora, por lo que el agua del acuario en el que se mantuvieron (20 litros) pudo haber sido filtrada varias veces en 24 horas. Además, la capacidad de vaciado del contenido intestinal depende en gran medida de la disponibilidad de alimento, pudiendo ser de tan solo 12 minutos cuando éste es abundante (Albentosa Verdú, 1994). Estas particularidades fisiológicas justificarían las observaciones realizadas a nivel intestinal y que podrían ser consecuencia de repetidas contaminaciones. El último día del ensayo, los ooquistes, aunque emitieron una fluorescencia verde brillante, presentaron un aspecto colapsado, lo que podría ser indicativo de una pérdida de viabilidad atribuida a la repetida acción de los enzimas digestivos como sugieren Graczyk y col. (2003) para los quistes de *Giardia* sp. retenidos en moluscos bivalvos.

Estos resultados, presencia constante de ooquistes en el intestino, pueden relacionarse con los obtenidos en el estudio experimental de transmisión de ooquistes de *C. parvum* entre especies de moluscos bivalvos. Así, no sólo comprobamos la contaminación de especies libres del parásito al coexistir con otras experimentalmente contaminadas, sino también una evolución de la viabilidad ooquistica en la especie receptora semejante a la obtenida en el estudio de supervivencia de ooquistes de *C. parvum* en moluscos bivalvos. Resultados similares fueron obtenidos cuando el estudio se realizó a partir de ejemplares muertos y previamente contaminados. Sin embargo, en este ensayo comprobamos una notable pérdida de la viabilidad ooquistica en la especie receptora, e incluso no detectamos ooquistes el día ocho del estudio. En un trabajo previo, Freire Santos (2000) observa la existencia de un gran número de esporozoítos libres en ejemplares de almeja *R. philippinarum* experimentalmente contaminados y que murieron espontáneamente. El autor atribuye este hallazgo al brusco descenso del pH detectado durante la putrefacción del molusco, descenso que puede alterar la integridad de la pared ooquistica, la cual actúa como barrera protectora de los esporozoítos.

Los resultados de estos estudios experimentales demuestran la dispersión ambiental de las formas parasitarias por los moluscos bivalvos. La detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en estos organismos después de haber sido sometidos a largos períodos de depuración, podría ser debido no sólo a la localización extraintestinal del parásito sino también a otras situaciones relacionadas con la propia planta depuradora. Como hemos comentado, los moluscos bivalvos que van a ser sometidos al proceso de depuración se colocan en bandejas para ser introducidos posteriormente en estanques que se llenarán con agua de mar generalmente clorada. Diversos autores comprobaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas costeras y la ineficacia de los tratamientos de cloración y ozonización del agua en la inactivación del parásito (Peeters y col., 1989; Korich y col., 1990; Johnson y col., 1995; Ferguson y col., 1996; Smith y Grimason, 2003). Ante estas observaciones, se plantea la posibilidad de que el agua marina utilizada para depurar puede ser responsable de la contaminación de los moluscos en la planta depuradora. Además, nuestros resultados experimentales sugieren la posibilidad de que también se produzca una contaminación de ciertos ejemplares a partir de otros ya contaminados. Así, en diferentes estudios realizados en estas instalaciones, se comprobó la importancia que tienen las dimensiones y la forma de los estanques, el tipo de suelo y la circulación del agua para evitar posteriores recontaminaciones bacterianas (Cuña Casabellas, 1992a). También, la demostración experimental de que los moluscos muertos

pueden contribuir a diseminar la contaminación es un hecho a tener en cuenta, ya que durante el proceso de depuración existe un porcentaje de mortalidad variable.

Un hallazgo obtenido en el presente estudio y que puede repercutir directamente en la salud pública es la ausencia de una correlación entre los niveles de contaminación microbiológica y la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las muestras analizadas. De acuerdo con la legislación vigente, los moluscos bivalvos pertenecientes a la categoría A (menos de 300 CF por 100 g de carne y líquido intervalvar en una prueba de NMP) pueden ser destinados directamente al consumo humano. En nuestro trabajo comprobamos que de las 206 muestras clasificadas microbiológicamente como pertenecientes a esta categoría, 71 (34,5%) estaban contaminadas, detectándose ooquistes viables en 39 (54,9%). Coincidiendo con Scott y col. (2002), quienes consideran que la eficacia de los indicadores tradicionales para predecir la contaminación fecal de origen humano y/o animal y el subsecuente riesgo para la salud pública es limitada, este resultado apoya la necesidad de incluir otros parámetros microbiológicos y/o parasitarios con el fin de garantizar la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos.

La realización del estudio epidemiológico durante tan solo un año, la diversidad en número y origen geográfico de las muestras y el hecho de que tan solo 54 de las 241 muestras analizadas procediesen directamente de la zona de cultivo (tiempo de depuración de 0 horas), son factores limitantes para valorar correctamente las posibles fluctuaciones estacionales de la contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos, por lo que los resultados deben ser juzgados prudentemente. De todas formas, comprobamos un mayor porcentaje de muestras contaminadas durante los meses de marzo, diciembre y noviembre, en los que se registraron abundantes lluvias que ocasionaron inundaciones en determinadas localidades. Diversos autores observaron una mayor incidencia de la infección humana y animal en épocas de lluvia y el comentado brote hídrico de Milwaukee se relacionó con las intensas precipitaciones que tuvieron lugar con anterioridad en la zona (Casemore, 1990; Clavel y col., 1996; Mac Kenzie y col., 1994). El número de muestras con ooquistes viables mantuvo un comportamiento similar, detectándose un máximo en marzo y un mínimo en mayo. Los elevados valores de viabilidad obtenidos en junio y julio no son significativos ante el escaso número de muestras contaminadas durante esos meses (2/16 y 3/21, respectivamente).

Desde el punto de vista de la salud pública, la interpretación de los resultados obtenidos sería incompleta si no intentásemos identificar la especie/genotipo de *Cryptosporidium* contaminante de los moluscos bivalvos, ya que no todas las descritas

infectan al hombre. Las especies de *Cryptosporidium* parasitan a una gran variedad de animales vertebrados, principalmente a rumiantes domésticos, que durante la fase aguda de la infección eliminan al ambiente millones de formas de resistencia a través de sus heces. Además, en la mayoría de las ocasiones, los ooquistes de las distintas especies/genotipos no pueden ser diferenciados por su tamaño, forma e incluso características de tinción, siendo necesario recurrir a una metodología basada en la técnica de PCR para su identificación molecular (Xiao y col., 2004).

Sin embargo, la aplicación de estas técnicas a muestras ambientales, clínicas y alimentarias puede presentar problemas ante la existencia de un gran número de sustancias potencialmente inhibitoras de la reacción (Wilson, 1997). Los moluscos bivalvos acumulan, a partir del agua que filtran, diversos agentes microbianos, compuestos orgánicos e inorgánicos, además de poseer una amplia variedad de enzimas, lípidos, polisacáridos, proteínas, etc. que han sido identificados como inhibidores de la técnica de PCR (Rossen y col., 1992; Wilson, 1997). En el presente estudio, siguiendo los protocolos de extracción del ADN y de la técnica de PCR descritos en el apartado correspondiente, comprobamos la ausencia de inhibición de la reacción con el ADN extraído de sedimentos obtenidos de moluscos y contaminados con ADN cryptosporidial. Paralelamente, al comparar mediante las técnicas de IFD y PCR los niveles de detección de ooquistes de *C. parvum* en sedimentos obtenidos a partir de mejillones (*M. galloprovincialis*) experimentalmente contaminados con diferente número de ooquistes, observamos que mediante ambas técnicas conseguimos detectar tan solo un ooquiste en el volumen analizado (20  $\mu$ l y 5  $\mu$ l, respectivamente). Para este número teórico, visualizamos ooquistes de *C. parvum* en 3 de los 9 ensayos y logramos amplificar el ADN correspondiente en una de las 10 réplicas realizadas. Los resultados obtenidos por la técnica de IFD en nuestro estudio fueron superiores a los hallados por Fayer y col. (2002), quienes detectan 1 ó 2 ooquistes en 200  $\mu$ l de los lavados branquiales contaminados experimentalmente con un número teórico de 20 ooquistes de *C. parvum*. En un reciente estudio, Miller y col. (2005a) evaluaron diferentes métodos para detectar *Cryptosporidium* spp. en mejillones (*M. californianus*) experimentalmente contaminados, concluyendo que el más sensible es el procedimiento de IFD convencional previa concentración de las muestras mediante inmunoseparación magnética.

Cuando aplicamos la técnica de PCR a las 49 muestras seleccionadas al azar de las 241 previamente analizadas mediante la técnica de IFD, comprobamos una correlación positiva entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos. De igual forma, Fayer y

col. (2003) concluyen que ninguno de los dos métodos puede ser considerado superior al otro en cuanto a su capacidad para detectar la contaminación por *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos. Sin embargo, observamos una discrepancia de resultados en 16 muestras. El mayor número de muestras positivas hallado tras la aplicación de la técnica de IFD (11 IFD+ vs 11 PCR-) puede ser debido a la adquisición del anticuerpo monoclonal por parte de ooquistes vacíos que fueron posteriormente confirmados mediante otros tipos de técnicas microscópicas. La posible existencia de reacciones cruzadas provocada por la presencia de microalgas y de diversos organismos patógenos de los moluscos bivalvos fue evaluada por Rodgers y col. (1995) y Graczyk y col. (1998b). Ante las observaciones realizadas, estos últimos autores propusieron unos criterios para confirmar la identificación ooquistica, criterios utilizados en nuestro estudio y que fueron complementados con la utilización de colorantes vitales fluorogénicos y otras técnicas microscópicas.

Un factor que puede afectar a los resultados obtenidos por ambas técnicas es la antigüedad de los ooquistes contaminantes. Diversos autores comprobaron que la salinidad y el tiempo afectan significativamente a la viabilidad ooquistica (Freire-Santos y col., 1999, 2000) y en nuestro estudio comprobamos un brusco descenso de dicha viabilidad en moluscos contaminados experimentalmente. Además, en condiciones naturales los ooquistes están expuestos a una serie de factores que pueden alterar la composición antigénica de su pared, impidiendo la unión de los anticuerpos y por tanto su visualización mediante la técnica de IFD. Recientemente, en un interesante estudio, Graczyk y col. (2004) detectan ooquistes de *C. parvum* en mejillones cebra (*D. polymorpha*) combinando el método de IFD convencional con técnicas fluorescentes de hibridación *in situ* (FISH). Así, los autores pueden distinguir los ooquistes intactos (viables) de los ooquistes no viables (paredes ooquisticas) y de otros ooquistes no viables identificados por FISH pero no mediante IFD. Por otra parte, Sturbaum y col. (2002) y Miller y col. (2005a), cuando analizaron diversas muestras ambientales mediante la técnica de PCR, comprobaron la existencia de reacciones cruzadas con el ADN de ciertos dinoflagelados e invertebrados, sugiriendo que estos resultados positivos deben ser confirmados posteriormente mediante técnicas de secuenciación. En el presente estudio, todas las muestras positivas obtenidas mediante la técnica de PCR fueron posteriormente secuenciadas, confirmando la contaminación por especies pertenecientes al género *Cryptosporidium*.

Debido a que los moluscos bivalvos pueden estar contaminados con mezclas heterogéneas de especies/genotipos de *Cryptosporidium*, el análisis molecular de estas muestras presenta a menudo ciertas dificultades (Reed y col., 2002). La técnica de RFLP es

de gran valor para analizar muestras en las que la diversidad genética es relativamente baja (McLauchlin y col., 2000). Sin embargo, en muestras ambientales, la secuenciación del ADN es esencial para confirmar los resultados hallados mediante la técnica de RFLP ante la posibilidad de una mayor diversidad genética. Utilizando esta metodología, en dos muestras observamos patrones electroforéticos indicativos de la existencia de mezclas heterogéneas de especies/genotipos de *Cryptosporidium*, que necesitaron, para ser resueltas, un proceso posterior de clonación de los fragmentos de ADN amplificados. La combinación de las técnicas de RFLP, clonación y secuenciación del ADN nos permitió confirmar, en la totalidad de las muestras, la existencia de dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *C. hominis*, actualmente consideradas responsables de la mayoría de las infecciones humanas (Cacciò y col., 2005). Estos hallazgos sugieren que los moluscos bivalvos representan una potencial fuente de infección humana, especialmente cuando se consumen crudos o poco cocinados. Por otra parte, la identificación de ciertas secuencias nucleotídicas no coincidentes con las depositadas en el GenBank podría ser indicativa, entre otras posibilidades, de la existencia de hospedadores reservorios actualmente no descritos.

La presencia de formas infectantes de protozoos enteropatógenos humanos en los moluscos bivalvos está estrechamente relacionada con la contaminación microbiológica de las áreas de cultivo, situadas habitualmente en zonas intermareales o próximas a la costa. En Galicia, estas zonas de cultivo se encuentran localizadas en las rías, antiguos valles fluviales que reciben el aporte de aguas dulces procedentes de ríos que en su recorrido atraviesan núcleos urbanos y zonas ganaderas. El estudio realizado en muestras ambientales y biológicas recogidas en las Rías Baixas, importantes zonas de producción de moluscos bivalvos, reveló un alto grado de contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp.

La utilización del método 1623 recomendado por la USEPA para la detección de ambos enteroparásitos en muestras hídricas (USEPA, 2001), permitió demostrar la contaminación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en 5 (71,5%) y en 6 (85,7%) muestras respectivamente, de los 7 ríos principales que desembocan en los estuarios analizados. Observamos además, que los niveles de contaminación por *Giardia* spp. fueron superiores a los obtenidos para *Cryptosporidium* spp. (1,0-29,3 quistes/l vs 1,0-17,0 ooquistes/l).

Numerosos trabajos epidemiológicos, realizados como consecuencia de los brotes hídricos ocasionados por *Cryptosporidium* y *Giardia*, demostraron una amplia distribución de ambos parásitos en aguas superficiales (LeChevallier y col., 1991; Roach y col., 1993; Ong

y col., 1996; Ono y col., 2001; Lemarchand y Lebaron, 2003; Hörman y col., 2004a). Sin embargo, es difícil establecer comparaciones válidas entre los porcentajes e intensidades de contaminación debido a las distintas metodologías empleadas (Clancy y col., 1994), a los factores propios de las diferentes zonas geográficas analizadas (Hansen y Ongerth, 1991) y a los diversos períodos del año durante los que se realizaron los estudios (Rose y col., 1991).

Por otra parte, la importante contribución de los animales domésticos y salvajes a la contaminación ambiental por formas infectantes de ambos patógenos está ampliamente reconocida (Fayer, 2004; Fayer y col., 2004; Appellbee y col., 2005). En Galicia, destaca por su importancia el sector ganadero bovino destinado a la producción lechera y cárnica. En un interesante estudio, realizado por Castro Hermida (2002), se demostró que la cryptosporidiosis neonatal bovina es endémica en esta región y recientemente se comprobó una alta prevalencia e intensidad de parasitación por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis* en rumiantes domésticos (ganaderías bovina, ovina y caprina) (Castro-Hermida y col. 2005, 2005a). Los abundantes residuos generados en las granjas son frecuentemente utilizados y/o eliminados sin tratamiento previo, constituyendo la principal fuente de contaminación ambiental. La elevada pluviosidad característica de esta región asociada a ciertas prácticas ganaderas facilitan el arrastre de las formas infectantes de estos parásitos a cauces de agua. Además, al ser *Cryptosporidium* y *Giardia* parásitos ubicuos que infectan a una amplia variedad de hospedadores vertebrados, ciertos animales salvajes pueden actuar como reservorios de la infección (Zhou y col., 2004; Appelbee y col., 2005; Cacciò y col., 2005). En nuestro laboratorio, al analizar muestras fecales de nutria (*Lutra lutra*) recogidas en 161 puntos de la geografía gallega, comprobamos que este animal, que desarrolla sus actividades vitales en las proximidades de cursos de agua, también está parasitado por *Cryptosporidium* y *Giardia* (Méndez-Hermida y col., 2005a).

La contaminación de origen parasitario detectada en los ríos es una de las razones por las que *Cryptosporidium* y *Giardia* pueden ser identificados en los moluscos bivalvos. Considerando que estas aguas son utilizadas habitualmente para abastecer de agua potable a la población y ciertas características de las formas infectantes de estos protozoos (capacidad para soportar distintas presiones ambientales, resistencia a los desinfectantes empleados y pequeño tamaño), además de las bajas dosis infectantes, los resultados obtenidos ponen de manifiesto el riesgo de potenciales brotes hídricos en la población.

Como se demostró varios años después del brote hídrico de cryptosporidiosis ocurrido en Milwaukee (Peng y col., 1997), no se puede obviar la contaminación ambiental

de origen humano. En la actualidad y a nivel mundial, hay un notable descenso en las reservas de agua dulce debido al incremento del consumo humano y a la disminución de las precipitaciones registradas en algunas regiones (Karl y col., 1995). Consecuentemente, en los países industrializados es cada vez más frecuente el uso, con fines industriales, agrícolas e incluso domésticos, de aguas residuales depuradas como fuente alternativa de aguas no potables. Para ello, las aguas deben presentar unos niveles bajos de contaminación química y/o microbiológica, de forma que no supongan un problema de salud pública (Asano y Cotruvo, 2004). A este respecto, sólo en algunos estados de los Estados Unidos, Australia, Canadá y Reino Unido existe una reglamentación sobre la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en aguas recreacionales y de bebida. Con excepción del Reino Unido, en la Unión Europea no existe ninguna legislación que regule la existencia de ambos parásitos tanto en aguas naturales como reutilizables, a pesar de la existencia de numerosos estudios que evidencian la importancia de considerar su presencia en aguas naturales (Rose, 1997; Cacciò y col., 2003; Asano y Cotruvo, 2004).

Otro motivo por el cual es posible detectar *Cryptosporidium* y *Giardia* en moluscos bivalvos es el vertido de aguas residuales brutas o depuradas a zonas de cultivo, que en nuestra área de estudio se encuentran rodeadas de importantes núcleos de población y de interés turístico. Cuando analizamos los efluentes finales de 16 plantas depuradoras de aguas residuales ubicadas en los márgenes de las rías, detectamos ooquistes de *Cryptosporidium* en 8 (50,0%) y quistes de *Giardia* en 14 (87,5%), con unas concentraciones que oscilaron entre 36,0-520,0 ooquistes/l y 7,0-2541,0 quistes/l, respectivamente. En dos recientes estudios, realizados en plantas depuradoras que utilizaban como tratamiento secundario los fangos activados y la sedimentación, se evaluó la eficacia de estos tratamientos en la retención de las formas infectantes de ambos parásitos (Cacciò y col., 2003; Montemayor y col., 2005). Los autores comprobaron la existencia de formas parasitarias en todos los efluentes secundarios a pesar de detectar unos porcentajes de retención comprendidos entre el 96,2-99,1% para ooquistes de *Cryptosporidium* y entre el 87,0-98,4% para quistes de *Giardia*. La mayoría de las EDAR analizadas en nuestro estudio utilizan los mismos sistemas de tratamiento, por lo que los porcentajes de retención serían similares. Además, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, en el que se simulaban las condiciones de una planta depuradora, se comprobó la capacidad de los fangos activados para retener entre un 80-84% de los ooquistes de *Cryptosporidium* contaminantes (Villacorta-Martínez de Maturana y col., 1992). Evidentemente, cuando se analizaron aguas residuales brutas procedentes de municipios carentes de EDAR o sometidas tan solo a un tratamiento primario, los niveles de

contaminación por ambos parásitos fueron superiores. De esta forma, de los 11 lugares de muestreo, identificamos ooquistes de *Cryptosporidium* en 7 (63,6%) y quistes de *Giardia* en 10 (90,9%). Las concentraciones detectadas oscilaron entre 1,6-1091,2 ooquistes/l y 9,8-1800,0 quistes/l, respectivamente.

Considerando que la contaminación de los ríos puede tener un origen humano y/o animal, mientras que la detectada en aguas residuales urbanas es fundamentalmente de origen humano, los resultados obtenidos sugieren un predominio de la giardiosis sobre la cryptosporidiosis en la población. Esta opinión está además apoyada por los datos extraídos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Sanidad y Consumo (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003, 2005). En ellos se constata que, durante el período comprendido entre 1995-2004, se comunicaron 989 casos de cryptosporidiosis frente a 5619 casos de giardiosis. Siendo los mecanismos de transmisión de ambas parasitosis similares, esta diferencia podría atribuirse a la ausencia de un diagnóstico sistemático en muestras clínicas y ambientales, originando una subestimación de la prevalencia de la cryptosporidiosis. Al revisar los datos, comprobamos que sólo 10 Comunidades Autónomas notificaron casos de cryptosporidiosis y únicamente dos (Aragón y Canarias) mantuvieron regularmente esta notificación durante el período de estudio. Ante esta situación, creemos necesario potenciar el control de esta parasitosis, promoviendo tanto su declaración a través del Sistema de Información Microbiológico como su investigación en brotes diarreicos de etiología desconocida. Sería conveniente, también, la coordinación entre las autoridades responsables para vigilar la presencia de estos parásitos en la red de abastecimiento de aguas y en zonas recreacionales.

Por otra parte, la capacidad de los moluscos bivalvos para acumular diversos contaminantes hace que hayan sido empleados como indicadores biológicos de la calidad sanitaria de las zonas en las que se desarrollan. Los recuentos de coliformes fecales y totales son criterios ampliamente utilizados como indicadores para establecer la calidad sanitaria de aguas superficiales, recreacionales y áreas de cultivo de moluscos bivalvos, aunque otros microorganismos han sido propuestos como indicadores alternativos (Griffin y col., 2001; Scott y col., 2002). Sin embargo, la contaminación por protozoos de transmisión hídrica no siempre se relaciona con los niveles de coliformes fecales (Rose, 1997; Graczyk y col., 2000). De esta forma, aguas supuestamente "limpias" (considerando los recuentos de coliformes fecales) pueden estar contaminadas por parásitos entéricos humanos (Rippey, 1994; Wallace y col., 1999; Graczyk y Schwab, 2000). En nuestro estudio, cuando utilizamos el mejillón *M. galloprovincialis* como bioindicador de contaminación fecal,

comprobamos que los porcentajes de muestras contaminadas por *Cryptosporidium* y *Giardia* aumentan a medida que se incrementan los recuentos de *E. coli*, pero solo se establece una asociación significativa con la presencia de quistes de *Giardia*. En muestras ambientales comprobamos un predominio, tanto cualitativo como cuantitativo, de la contaminación por *Giardia* sobre la ocasionada por *Cryptosporidium*. Sin embargo, en muestras biológicas, a pesar de obtener un mayor número de muestras contaminadas por *Giardia*, observamos concentraciones superiores de ooquistes de *Cryptosporidium*. Este hecho lo atribuimos a las diferencias existentes en el tamaño de las formas parasitarias.

Aunque hasta la fecha no se han relacionado casos humanos de cryptosporidiosis con el consumo de moluscos bivalvos crudos o poco cocinados, *C. parvum* fue identificado en la mayoría de los estudios en los que los aislados de *Cryptosporidium* procedentes de estos moluscos fueron caracterizados genéticamente. También han sido identificados *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. andersoni* y *C. baileyi* (Fayer y col., 2002; Fayer y col., 2003; Graczyk, 2003; Traversa y col., 2004; Miller y col., 2005, 2005b). Cuando utilizamos los mejillones como indicador biológico de contaminación fecal, identificamos *C. parvum* en las 26 muestras positivas mediante la técnica de PCR. Este resultado ratifica los obtenidos en el estudio epidemiológico realizado con moluscos bivalvos destinados al consumo humano.

Sin embargo, el empleo de técnicas moleculares para analizar aguas superficiales es complicado ante la presencia de inhibidores de la técnica de PCR, los cuáles pueden ser extraídos conjuntamente con el ADN del parásito, inhibiendo su amplificación o reduciendo la sensibilidad del método (Tebbe y Vahjen, 1993; Yeates y col., 1997). Además, la presencia en las muestras ambientales de ciertos organismos puede ocasionar reacciones cruzadas y por lo tanto reducir la especificidad de la técnica (Xiao y col., 2000a; Miller y col., 2005a). Tal vez sean estos los motivos por los que tan solo hemos conseguido identificar dos especies de *Cryptosporidium* en cuatro muestras hídricas. *C. muris* en el efluente final de tres plantas depuradoras y *C. baileyi* en una muestra de agua residual bruta. Distintas especies de roedores que habitan en las proximidades de la red de alcantarillado pudieron ser la fuente de contaminación por *C. muris* (Xiao y col., 2001) y los vertidos procedentes de granjas o mataderos avícolas y más probablemente aves que frecuentan las áreas costeras, el origen de *C. baileyi* (Pavlassek, 1993; Smith y col., 1993).

Una vez demostrado que los moluscos bivalvos representan una potencial fuente de infección humana por *Cryptosporidium* y al constituir los mejillones al vapor un plato típico en ciertos países, finalmente nos planteamos comprobar si este método culinario inactiva

las formas infectantes de *C. parvum*. Los resultados obtenidos en ratones lactantes (modelo experimental reconocido como el más adecuado para valorar la infectividad ooquistica) demostraron que el empleo de vapor no elimina totalmente la capacidad infectante de los ooquistes de *C. parvum*. Este hallazgo, importante desde el punto de vista de la salud pública, debe ser interpretado prudentemente para evitar cualquier tipo de repercusión que afectase al sector industrial. Sin embargo y ante la gravedad que puede adquirir la cryptosporidiosis en enfermos inmunocomprometidos y de igual forma que en determinados países se recomienda hervir y/o filtrar el agua de bebida habitualmente o cuando presenta una cierta turbidez (Macpherson, 2005), consideramos necesario que este grupo de población disponga de la suficiente información para ser consciente del riesgo que supone la ingestión de moluscos bivalvos crudos o poco cocinados.

CONCLUSIONES



### **Primera**

La presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en los moluscos bivalvos y en las aguas superficiales analizadas demuestra la amplia contaminación ambiental que por estos enteropatógenos existe en Galicia.

### **Segunda**

Considerando las semejanzas epidemiológicas entre las infecciones causadas por *Cryptosporidium* y *Giardia* y ciertas características de sus formas infectantes, la presencia de ambos enteropatógenos en aguas superficiales, que pueden ser utilizadas con distintos fines, plantea la posibilidad del desencadenamiento de brotes hídricos en la población humana.

### **Tercera**

Siendo *C. parvum* y *C. hominis* las especies responsables de la mayoría de los casos de cryptosporidiosis humana, su identificación en los moluscos bivalvos de interés comercial pone de manifiesto el riesgo que para la salud pública supone su consumo crudo o poco cocinado.

### **Cuarta**

Al comprobar la ineficacia del proceso de depuración y la existencia de ooquistes viables de *Cryptosporidium* spp. en los moluscos bivalvos, que de acuerdo con la legislación vigente pueden ser destinados directamente al consumo humano, creemos necesaria la inclusión de otros parámetros microbiológicos y/o parasitarios con el fin de garantizar la calidad sanitaria de estos alimentos.

### **Quinta**

La demostración experimental de la transmisión de ooquistes de *C. parvum* entre especies de moluscos bivalvos coexistentes sugiere el establecimiento de medidas de control cuando nuevos organismos se introducen en áreas libres de contaminación.

### **Sexta**

Los resultados obtenidos, tanto en los estudios histológicos como en los epidemiológicos realizados con moluscos bivalvos, aconsejan la utilización de los tejidos branquial y gastrointestinal para evitar la infravaloración de los niveles de contaminación por *Cryptosporidium* spp. Podemos concluir, también, que las técnicas de IFD, complementada con otros tipos de técnicas microscópicas, y de PCR son adecuadas para detectar el parásito en estos alimentos.

### **Séptima**

Ante la gravedad que adquiere la cryptosporidiosis en enfermos inmunocomprometidos y la baja dosis mínima infectante, es necesario que este tipo de población disponga de la suficiente información para ser consciente del riesgo que supone la ingestión de moluscos bivalvos.

### **Octava**

La obtención en muestras de moluscos bivalvos de secuencias nucleotídicas de especies/genotipos de *Cryptosporidium* no coincidentes con las previamente descritas, podría ser indicativa de la existencia de hospedadores actualmente no identificados, por lo que la caracterización molecular de los aislados de *Cryptosporidium* es necesaria para identificar las especies que pudiesen infectar al hombre y determinar las fuentes de contaminación.

### **Novena**

Finalmente, la interpretación global de los resultados obtenidos pone de manifiesto la necesidad de una coordinación entre los distintos organismos responsables con el fin de vigilar la presencia de estos parásitos en el ambiente y establecer las medidas preventivas y de control adecuadas para minimizar el riesgo de infección en la población humana.

## BIBLIOGRAFÍA



**Adams, R.B.; Guerrant, R.L.; Zu, S.; Fang, G. y Roche, J.K. 1994.** *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an *in vitro* model. *Journal of Infectious Diseases*, **169**: 170-177.

**Aji, T.; Flanigan, T.; Marshall, R.; Kaetzel, C. y Aikawa, M. 1991.** Ultrastructural study of asexual development of *Cryptosporidium parvum* in human intestinal cell line. *Journal of Protozoology*, **38**: 82S-84S.

**Albentosa Verdú, M. 1994.** Evaluación de dietas vivas e inertes para el cultivo de la almeja fina *Ruditapes decussatus* mediante parámetros fisiológicos y bioquímicos. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 242 pp.

**Altekruse, S.F.; Yang, S.; Timbo, B.B. y Angulo, F.J. 1999.** A multi-state survey of consumer food-handling and food-consumption practices. *American Journal of Preventive Medicine*, **16**: 216-221.

**Álvarez-Pellitero, P. y Sitjà-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.

**Amar, C.F.L. 2003.** Development of molecular methods for the detection and characterization of human gastrointestinal pathogens from smears fixed on glass microscope slide. Tesis Doctoral. Universidad de Greenwich. 261 pp.

**Anderson, B.C.; Donndelinger, T.; Wilkins, R.M. y Smith, J. 1982.** Cryptosporidiosis in a veterinary student. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **180**: 408-409.

**Appelbee, A.J.; Thompson, R.C. y Olson, M.E. 2005.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. *Trends in Parasitology*, **21**: 370-376.

**Appleton, H. y Pereira, M.S. 1977.** A possible virus aetiology in outbreaks of food poisoning from cockles. *Lancet*, **1**: 780-781.

**Ares-Mazás, E.; Gómez-Couso, H. y Paniagua-Crespo, E. 2004.** Feeding process of *Acanthamoeba* on *Cryptosporidium* oocysts. En: IX European Multicolloquium of Parasitology. S. Mas-Coma, M.D. Bargues, J.G. Esteban y M.A. Valero (Eds.). Valencia, L.R., pág. 224.

**Archer, D.L. y Kvenberg, J.E. 1985.** Incidence and costs of foodborne diarrheal disease in the United States. *Journal of Food Protection*, **48**: 887-894.

**Argenzio, R.A.; Liacos, J.A.; Levy, M.L.; Meuten, D.J.; Lecce, J.G. y Powell, D.W. 1990.** Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology*, **98**: 1129-1140.

**Argenzio, R.A.; Lecce, J. y Powell, D.W. 1993.** Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. *Gastroenterology*, **104**: 440-447.

**Arkush, K.D.; Miller, M.A.; Leutenegger, C.M.; Gardner, I.A.; Packham, A.E.; Heckerroth, A.R.; Tenter, A.M.; Barr, B.C. y Conrad, P.A. 2003.** Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, **33**: 1087-1097.

**Arrowood, M.J.; Jaynes, J.M. y Healey, M.C. 1991.** *In vitro* activities of lytic peptides against the sporozoites of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 224-227.

**Armson, A.; Reynoldson, J.A. y Thompson, R.C.A. 2003.** A review of chemotherapeutic approaches to the treatment of *Cryptosporidium*. *En: Cryptosporidium: from molecules to disease*. R.C.A. Thompson, A. Armson y U.M. Ryan (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 395-403.

**Asano, T. y Cotruvo, J. 2004.** Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater: health and regulatory considerations. *Water Research*, **38**: 1941-1951.

**Aygun, G.; Yilmaz, M.; Yasar, H.; Aslan, M.; Polat, E.; Midilli, K.; Ozturk, R. y Altas, K. 2005.** Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated?. *Journal of Hospital Infection*, **60**: 283-285.

**Barnes, D.A.; Bonnin, A.; Huang, J.X.; Gousset, L.; Wu, J.; Gut, J.; Doyle, P.; Dubremetz, J.F.; Ward, H. y Petersen, C. 1998.** A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **96**: 93-110.

**Barta, J.R. 2001.** Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Veterinary Parasitology*, **101**: 175-186.

**Barwick, R.S.; Mohammed, H.O.; White, M.E. y Bryant, R.B. 2003.** Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. *Preventive Veterinary Medicine*, **59**: 1-11.

**Baxby, D.; Hart, C.A. y Taylor, C. 1983.** Human cryptosporidiosis: a possible case of hospital cross infection. *British Medical Journal*, **287**: 1760-1761.

**Bayne, B.L. y Hawkins, A.J.S. 1992.** Ecological and physiological aspects of herbivory in benthic suspension-feeding molluscs. *En: Plant-animal interactions in the marine benthos*. D.M. John, S.J. Hawkins y J.H. Price (Eds.). Clarendon Press, Oxford, pp. 265-288.

**Bayne, B.L.; Widdows, J. y Thompson, R.J. 1976.** Physiology II. *En: Marine mussels: their ecology and physiology*. B.L. Bayne (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 207-270.

**Benenson, M.W.; Takafuji, E.T.; Lemon, S.M.; Greenup, R.L. y Sulzer, A.J. 1982.** Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *New England Journal of Medicine*, **307**: 666-669.

**Benhamou, Y.; Kapel, N.; Hoang, C.; Matta, H.; Meillet, D.; Magne, D.; Raphael, M.; Gentilini, M.; Opolon, P. y Gobert, J.G. 1995.** Inefficacy of intestinal secretory immune response to *Cryptosporidium* in acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology*, **108**: 627-635.

**Bern, C.; Hernández, B.; López, M.B.; Arrowood, M.J.; de Mejia, M.A.; de Merida, A.M.; Hightower, A.W.; Venczel, L.; Herwaldt, B.L. y Klein, R.E. 1999.** Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 766-774.

**Besser-Wiek, J.W.; Forfang, J.; Hedberg, C.W.; Korlath, J.A.; Osterholm, M.T.; Sterling, C.R. y García, L. 1996.** Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum* - Minnesota, 1995. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **45**: 783-784.

**Blagburn, B.L. y Current, W.L. 1983.** Accidental infection of a researcher with human *Cryptosporidium*. *Journal of Infectious Diseases*, **148**: 772-773.

**Blagburn, B.L. y Soave, R. 1997.** Prophylaxis and chemotherapy: human and animal. *En: Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. R. Fayer (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 111-128.

**Blanshard, C.; Jackson, A.M.; Shanson, D.C.; Francis, N. y Gazzard, B.G. 1992.** Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Quarterly Journal of Medicine*, **85**: 813-823.

**Blewett, D.A. 1989.** Quantitative techniques in *Cryptosporidium* research. *En: Proceedings of the First International Workshop on Cryptosporidiosis*. K.W. Angus y D.A. Blewett (Eds.). Moredun Research Institute, Edimburgo, pp. 85-96.

**Boletín Oficial del Estado (BOE)** (núm. 67) de 18 de marzo de 1988. Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo de 1988, sobre la protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos.

**Boletín Oficial del Estado (BOE)** (núm. 256) de 25 de octubre de 1990. Convenio Europeo de 18 de marzo de 1986, ratificado por Instrumento el 2 de agosto de 1989, sobre la protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos.

**Boletín Oficial del Estado (BOE)** (núm. 86) de 10 de abril de 1999. Real Decreto 571/1999, de 9 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos.

**Boletín Oficial del Estado (BOE)** (núm. 45) de 21 de febrero de 2003. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo.

**Boletín Oficial del Estado (BOE)** (núm. 249) de 18 de octubre de 2005. Orden APA/3228/2005, de 22 de septiembre, por la que se hacen públicas las nuevas relaciones de zonas de producción de moluscos y otros invertebrados marinos en el litoral español.

**Bonnin, A.; Dubremetz, J.F. y Camerlynck, P. 1991.** Characterization and immunolocalization of an oocyst wall antigen of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa). *Parasitology*, **103**: 171-177.

**Bonnin, A.; Ojcius, D.M.; Souque, P.; Barnes, D.A.; Doyle, P.S.; Gut, J.; Nelson, R.G.; Petersen, C. y Dubremetz, J.F. 2001.** Characterization of a monoclonal antibody reacting with antigen-4 domain of gp900 in *Cryptosporidium parvum* invasive stages. *Parasitology Research*, **87**: 589-592.

**Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-van Dillen, P.M.E. y van der Noordaa, J. 1990.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 495-503.

**Bowie, W.R.; King, A.S.; Werker, D.H.; Isaac-Renton, J.L.; Bell, A.; Eng, S.B. y Marion, S.A. 1997.** Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet*, **350**: 173-177.

**Brett, M.M. 2003.** Food poisoning associated with biotoxins in fish and shellfish. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **16**: 461-465.

**Brett, M.S.; Short, P. y McLauchlin, J. 1998.** A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *International Journal of Food Microbiology*, **43**: 223-229.

**Brusca, C.R. y Brusca, J.G. 2002.** Phylum Mollusca. *En: Invertebrates*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, pp. 701-769.

**Butt, A.A.; Aldridge, K.E. y Sanders, C.V. 2004.** Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infectious Diseases*, **4**: 201-212.

**Cacciò, S.M.; De Giacomo, M.; Aulicino, F.A. y Pozio, E. 2003.** *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3393-3398.

**Cacciò, S.M.; Thompson, R.C.; McLauchlin, J. y Smith, H.V. 2005.** Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, **21**: 430-437.

**Callahan, K.M.; Taylor, D.J. y Sobsey, M.D. 1995.** Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water Science and Technology*, **31**: 189-193.

**Cama, V.A.; Bern, C.; Sulaiman, I.M.; Gilman, R.H.; Ticona, E.; Vivar, A.; Kawai, V.; Vargas, D.; Zhou, L. y Xiao, L. 2003.** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**: 531S-533S.

**Campbell, A.T.; Robertson, L.J. y Smith, H.V. 1992.** Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3488-3493.

**Carballeira, A.; Devesa, C.; Retuerto, R.; Santillán, E. y Uceda, F. 1983.** Bioclimatología de Galicia. Fundación Pedro Barrié de la Maza-Conde de Fenosa, A Coruña, 391 pp.

**Cárcamo, C.; Hooton, T.; Wener, M.H.; Weiss, N.S.; Gilman, R.; Arevalo, J.; Carrasco, J.; Seas, C.; Caballero, M. y Holmes, K.K. 2005.** Etiologies and manifestations of persistent diarrhea in adults with HIV-1 infection: a case-control study in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, **191**: 11-19.

**Carpenter, C.; Fayer, R.; Trout, J. y Beach, M.J. 1999.** Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*, **5**: 579-584.

**Carreno, R.A.; Martin, D.S. y 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**: 899-904.

**Casemore, D.P. 1989.** Sheep as a source of human cryptosporidiosis. *Journal of Infection*, **19**: 101-104.

**Casemore, D.P. 1990.** Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiology and Infection*, **104**: 1-28.

**Casemore, D.P. 1991.** Foodborne protozoal infection. *En: Foodborne Illness, a Lancet Review.* W.M. Waite y J.P. Arbutnott (Eds.). Edward Arnold, Londres, pp. 108-119.

**Casemore, D.P.; Wright, S.E. y Coop, R.L. 1997.** Cryptosporidiosis – Human and animal epidemiology. *En: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis.* R. Fayer (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 65-92.

**Castro Hermida, J.A. 2002.** Cryptosporidiosis animal: prevalencia, factores de riesgo y tratamiento con  $\beta$ -ciclodextrina. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 190 pp.

**Castro-Hermida, J.A.; Carro-Corral, C.; Rodríguez-Picallo, I.; González-Warleta, M. y Mezo, M. 2005.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in farmed sheep and goats in Galicia. A preliminary study. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **12**: 344.

**Castro-Hermida, J.A.; Carro-Corral, C.; Rodríguez-Picallo, I.; González-Warleta, M. y Mezo, M. 2005a.** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia. A preliminary study. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **12**: 346.

**Cevallos, A.M.; Bhat, N.; Verdon, R.; Hamer, D.H.; Stein, B.; Tzipori, S.; Pereira, M.E.; Keusch, G.T. y Ward, H.D. 2000.** Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection *in vitro* by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. *Infection and Immunity*, **68**: 5167-5175.

**Chalmers, R.M. 2003.** *Cryptosporidium* as a public health challenge. *En: Cryptosporidium: from molecules to disease*. R.C.A. Thompson, A. Armson y U.M. Ryan (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 97-112.

**Chalmers, R.M.; Sturdee, A.P.; Mellors, P.; Nicholson, V.; Lawlor, F.; Kenny, F. y Timpson, P. 1997.** *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. *Letters in Applied Microbiology*, **25**: 380-384.

**Chappell, C.L.; Okhuysen, P.C. y White, A.C. 2003.** *Cryptosporidium parvum*: infectivity, pathogenesis and host-parasite relationship. *En: Cryptosporidium: from molecules to disease*. R.C.A. Thompson, A. Armson y U.M. Ryan (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 19-49.

**Chauret, C.; Nolan, K.; Chen, P.; Springthorpe, S. y Sattar, S. 1998.** Aging of *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water and their susceptibility to disinfection by chlorine and monochloramine. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**: 1154-1160.

**Chen, X.M.; Levine, S.A.; Tietz, P.; Krueger, E.; Jefferson, M.A.; Jefferson, D.M.; Mahle, M. y LaRusso, N.F. 1998.** *Cryptosporidium parvum* is cytopathic for cultured human biliary epithelia via an apoptotic mechanism. *Hepatology*, **28**: 906-913.

**Chen, X.M.; Levine, S.A.; Splinter, P.L.; Tietz, P.S.; Jobin, A.L.; Jobin, C.; Gores, G.J.; Paya, C.V. y LaRusso, N.F. 2001.** *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology*, **120**: 1774-1783.

**Clancy, J.L.; Gollnitz, W.D. y Tabib, Z. 1994.** Commercial labs: how accurate are they?. *Journal of the American Water Works Association*, **86**: 89-97.

**Clavel, A.; Olivares, J.L.; Fleta, J.; Castillo, J.; Varea, M.; Ramos, F.J.; Arnal, A.C. y Quílez, J. 1996.** Seasonality of cryptosporidiosis in children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **15**: 77-79.

**Clavel, A.; Doiz, O.; Morales, S.; Varea, M.; Seral, C.; Castillo, F.J.; Fleta, J.; Rubio, C. y Gómez-Lus, R. 2002.** House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitologica*, **49**: 163-164.

- Cliver, D.O. 1987.** Foodborne disease in the United States. 1946-1986. *International Journal of Food Microbiology*, **4**: 269-277.
- Cole, R.A.; Lindsay, D.S.; Howe, D.K.; Roderick, C.L.; Dubey, J.P.; Thomas, N.J. y Baeten, L.A. 2000.** Biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains obtained from Southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Journal of Parasitology*, **86**: 526-530.
- Coombs, G.H. 1999.** Biochemical peculiarities and drug targets in *Cryptosporidium parvum*: lessons from other coccidian parasites. *Parasitology Today*, **15**: 333-338.
- Cordell, R.L. y Addiss, D.G. 1994.** Cryptosporidiosis in child care settings: a review of the literature and recommendations for prevention and control. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **13**: 310-317.
- Corral, J. 1992.** Las rías gallegas. En: Las rías gallegas como ecosistema. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 26-31.
- Corso, P.S.; Kramer, M.H.; Blair, K.A.; Addiss, D.G.; Davis, J.P. y Haddix, A.C. 2003.** Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, **9**: 426-431.
- Cotte, L.; Rabodonirina, M.; Chapuis, F.; Bailly, F.; Bissuel, F.; Raynal, C.; Gelas, P.; Persat, F.; Piens, M.A. y Trepo, C. 1999.** Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, **180**: 2003-2008.
- Cozon, G.; Biron, F.; Jeannin, M.; Cannella, D. y Revillard, J.P. 1994.** Secretory IgA antibodies to *Cryptosporidium parvum* in AIDS patients with chronic cryptosporidiosis. *Journal of Infectious Diseases*, **169**: 696-699.
- Cuña Casasbellas, M.A. 1992.** Anatomía e fisioloxía de moluscos en relación á ingestión de alimento. En: Depuración de moluscos. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 24-30.
- Cuña Casasbellas, M.A. 1992a.** Unidades estruturais na planta depuradora. En: Depuración de moluscos. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 38-44.
- Current, W.L. 1983.** Human cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine*, **309**: 1326-1327.
- Current, W.L. y Garcia, L.S. 1991.** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**: 325-358.
- Current, W.L.; Reese, N.C.; Ernst, J.V.; Bailey, W.S.; Heyman, M.B. y Weinstein, W.M. 1983.** Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *New England Journal of Medicine*, **308**: 1252-1257.

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

**D'Antonio, R.G.; Winn, R.E.; Taylor, J.P.; Gustafson, T.L.; Current, W.L.; Rhodes, M.M.; Gary, G.W. y Zajac, R.A. 1985.** A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Annals of Internal Medicine*, **103**: 886-888.

**Dascomb, K.; Frazer, T.; Clark, R.A.; Kissinger, P. y Didier, E. 2000.** Microsporidiosis and HIV. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, **24**: 290-292.

**Deng, M.; Nuanualsuwan, S. y Cliver, D.O. 2001.** Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by bacterial strains. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**: 37S-39S.

**Deng, M.; Lancto, C.A. y Abrahamsen, M.S. 2004.** *Cryptosporidium parvum* regulation of human epithelial cell gene expression. *International Journal for Parasitology*, **34**: 73-82.

**Deng, M.; Rutherford, M.S. y Abrahamsen, M.S. 2004a.** Host intestinal response to *Cryptosporidium parvum*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**: 869-884.

**Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE)** (núm. L 268) de 24 de septiembre de 1991. Directiva 91/492/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos.

**Diario Oficial de la Unión Europea** (núm. L 283) de 31 de octubre de 2003. Decisión 2003/774/CE de la Comisión, de 30 de octubre de 2003, por la que se aprueban algunos tratamientos para inhibir la proliferación de microorganismos patógenos en los moluscos bivalvos y en los gasterópodos marinos.

**Didier, E.S.; Stovall, M.E.; Green, L.C.; Brindley, P.J.; Sestak, K. y Didier, P.J. 2004.** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*, **126**: 145-166.

**Dillingham, R.A.; Lima, A.A. y Guerrant, R.L. 2002.** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, **4**: 1059-1066.

**Donnelly, J.K. y Stentiford, E.I. 1997.** The *Cryptosporidium* problem in water and food supplies. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, **30**: 111-120.

**Dowd, S.E. y Pillai, S.D. 1997.** A rapid viability assay for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cyst for use in conjunction with indirect fluorescent antibody detection. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**: 658-662.

**Drinking Water Inspectorate (DWI). 2003.** Standard operating protocol for the monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in treated water supplies to satisfy the water supply (water quality)

regulations 2000, SI No. 3184 England and the water supply (water quality) regulations 2001, SI No. 3911 (W.323) Wales. Drinking Water Inspectorate, Londres, pp. 61.

**Dryjanski, J.; Gold, J.W.; Ritchie, M.T.; Kurtz, R.C.; Lim, S.L. y Armstrong, D. 1986.** Cryptosporidiosis. Case report in a health team worker. *American Journal of Medicine*, **80**: 751-752.

**Duong, T.H.; Dufillot, D.; Koko, J.; Nze-Eyo'o, R.; Thuilliez, V.; Richard-Lenoble, D. y Kombila, M. 1995.** Cryptosporidiose digestive chez le jeune enfant en zone urbaine au Gabon. *Santé*, **5**: 185-188.

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

**Durán Neira, C.; Acuña Castroviejo, R. y Caamaño, J.S. 1990.** El mejillón: biología, cultivo y comercialización. Fundación Caixa Galicia, A Coruña, 183 pp.

**Egger, M.; Nguyen, X.M.; Schaad, U.B. y Krech, T. 1990.** Intestinal cryptosporidiosis acquired from a cat. *Infection*, **18**: 177-178.

**Egger, M.; Mausezahl, D.; Odermatt, P.; Marti, H.P. y Tanner, M. 1990a.** Symptoms and transmission of intestinal cryptosporidiosis. *Archives of Disease in Childhood*, **65**: 445-447.

**Ehigiator, H.N.; Romagnoli, P.; Borgelt, K.; Fernández, M.; McNair, N.; Secor, W.E. y Mead, J.R. 2005.** Mucosal cytokine and antigen-specific responses to *Cryptosporidium parvum* in IL-12p40 KO mice. *Parasite Immunology*, **27**: 17-28.

**Eisenberg, J.N.; Seto, E.Y.; Colford, J.M.; Olivieri, A. y Spear, R.C. 1998.** An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. *Epidemiology*, **9**: 255-263.

**el-Sibaei, M.M.; Rifaat, M.M.; Hameed, D.M. y el-Din, H.M. 2003.** Nosocomial sources of cryptosporidial infection in newly admitted patients in Ain Shams University Pediatric Hospital. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **33**: 177-188.

**Elliot, D.A. y Clark, D.P. 2000.** *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infection and Immunity*, **68**: 2315-2322.

**Escalante, A.A. y Ayala, F.J. 1995.** Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, **92**: 5793-5797.

**Esteban, J.G.; Aguirre, C.; Flores, A.; Strauss, W.; Anglés, R. y Mas-Coma, S. 1998.** High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**: 50-55.

**Fayer, R. 1994.** Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2732-2735.

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

**Fayer, R. 2004a.** Infectivity of microsporidia spores stored in seawater at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, **90**: 654-657.

**Fayer, R. y Nerad, T. 1996.** Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 1431-1433.

**Fayer, R.; Trout, J. y Nerad, T. 1996.** Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43**: 64S.

**Fayer, R.; Speer, C.A. y Dubey, J.P. 1997.** The general biology of *Cryptosporidium*. En: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. R. Fayer (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 1-41.

**Fayer, R.; Lewis, E.J.; Trout, J.M. y Graczyk, T.K. 1997a.** Potential role of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2086-2088.

**Fayer, R.; Trout, J.M. y Jenkins, M.C. 1998.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, **84**: 1165-1169.

**Fayer, R.; Graczyk, T.K.; Lewis, E.J.; Trout, J.M. y Farley, C.A. 1998a.** Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 1070-1074.

**Fayer, R.; Morgan, U. y Upton, S.J. 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1305-1322.

**Fayer, R.; Trout, J.M.; Walsh, E. y Cole, R. 2000a.** Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **47**: 161-163.

**Fayer, R.; Trout, J.M.; Xiao, L.; Morgan, U.M.; Lal, A.A. y Dubey, J.P. 2001.** *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*, **87**: 1415-1422.

**Fayer, R.; Trout, J.M.; Lewis, E.J.; Xiao, L.; Lal, A.; Jenkins, M.C. y Graczyk, T.K. 2002.** Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research*, **88**: 998-1003.

**Fayer, R.; Trout, J.M.; Lewis, E.J.; Santin, M.; Zhou, L.; Lal, A.A. y Xiao, L. 2003.** Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitology Research*, **89**: 141-145.

- Fayer, R.; Dubey, J.P. y Lindsay, D.S. 2004.** Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology*, **20**: 531-536.
- Fayer, R.; Santin, M. y Xiao, L. 2005.** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, **91**: 624-629.
- Ferguson, C.M.; Coote, B.G.; Ashbolt, N.J. y Stevenson, I.M. 1996.** Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Research*, **30**: 2045-2054.
- Figueiras, F.G.; Labarta, U. y Fernández Reiriz, M.J. 2002.** Coastal upwelling, primary production and mussel growth in the Rías Baixas of Galicia. *Hydrobiologia*, **484**: 121-131.
- Flanigan, T.P.; Aji, T.; Marshall, R.; Soave, R.; Aikawa, M. y Kaetzel, C. 1991.** Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infection and Immunity*, **59**: 234-239.
- Flanigan, T.; Whalen, C.; Turner, J.; Soave, R.; Toerner, J.; Havlir, D. y Kotler, D. 1992.** *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Annals of Internal Medicine*, **116**: 840-842.
- Flanigan, T.P.; Ramratnam, B.; Graeber, C.; Hellinger, J.; Smith, D.; Wheeler, D.; Hawley, P.; Heath-Chiozzi, M.; Ward, D.J.; Brummitt, C. y Turner, J. 1996.** Prospective trial of paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS. *American Journal of Medicine*, **100**: 370-372.
- Fleta-Zaragozano, J.; Clavel, A.; Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C. y Gracia-Casanova, M. 1994.** Human cryptosporidiosis acquired from a pet lamb. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **13**: 935-936.
- Follet-Dumoulin, A.; Guyot, K.; Duchatelle, S.; Bourel, B.; Guilbert, F.; Dei-Cas, E.; Gosset, D. y Cailliez, J.C. 2001.** Involvement of insects in the dissemination of *Cryptosporidium* in the environment. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**: S36.
- Forney, J.R.; Yang, S. y Healey, M.C. 1996.** Interaction of the human serine protease inhibitor alpha-1-antitrypsin with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology*, **82**: 496-502.
- Forney, J.R.; Yang, S. y Healey, M.C. 1996a.** Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Parasitology*, **82**: 889-892.
- Forney, J.R.; Yang, S.; Du, C. y Healey, M.C. 1996b.** Efficacy of serine protease inhibitors against *Cryptosporidium parvum* infection in a bovine fallopian tube epithelial cell culture system. *Journal of Parasitology*, **82**: 638-640.
- Fox, L.M. y Saravolatz, L.D. 2005.** Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical Infectious Diseases*, **40**: 1173-1180.

**Freire Santos, F. 2000.** *Cryptosporidium* en organismos acuáticos y factores ambientales que influyen en la viabilidad oocústica. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 227 pp.

**Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A. M.; Vergara-Castiblanco, C. A. y Ares-Mazás, M. E. 1999.** Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Veterinary Parasitology*, **87**: 1-7.

**Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A.M.; Vergara-Castiblanco, C.A. y Ares-Mazás, E. 2000.** Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Veterinary Parasitology*, **89**: 253-259.

**Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A. M.; Vergara-Castiblanco, C. A.; Ares-Mazás, E.; Álvarez-Suárez, E. y García-Martín, O. 2000a.** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *Journal of Parasitology*, **86**: 853-854.

**Freire-Santos, F.; Oteiza-López, A.M.; Castro-Hermida, J.A.; García-Martín, O. y Ares-Mazás, M. E. 2001.** Viability and infectivity of oocysts recovered from clams *Ruditapes philippinarum*, experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Research*, **87**: 428-430.

**Fuhrman, J.A. 1999.** Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Lancet*, **399**: 541-548.

**Gantzer, C.; Dubois, E.; Crance, J.M.; Billaudel, S.; Kopecka, H.; Schwartzbrod, L.; Pommepeuy, M. y Le Guyadery, F. 1998.** Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. *Oceanologica Acta*, **21**: 983-992.

**Gatell, J.M.; Clotet, B. y Podzamozzer, D. 1996.** Historia natural y clasificación de la infección por VIH-1. En: Guía Práctica del SIDA. Masson Ed., Barcelona, 26 pp.

**Gatti, S.; Cevini, C.; Bruno, A.; Bernuzzi, A.M. y Scaglia, M. 1993.** Cryptosporidiosis in tourists returning from Egypt and the Island of Mauritius. *Clinical Infectious Diseases*, **16**: 344-345.

**Gelletlie, R.; Stuart, J.; Soltanpoor, N.; Armstrong, R. y Nichols, G. 1997.** Cryptosporidiosis associated with school milk. *Lancet*, **350**: 1005-1006.

**Giangaspero, A.; Molini, U.; Iorio, R.; Traversa, D.; Paoletti, B. y Giansante, C. 2005.** *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, **69**: 203-212.

**Göebel, E. y Brandler, U. 1982.** Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogony of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice. *Protistologica*, **18**: 331-334.

**Goh, S.; Reacher, M.; Casemore, D.P.; Verlander, N.Q.; Charlett, A.; Chalmers, R.M.; Knowles, M.; Pennington, A.; Williams, J.; Osborn, K. y Richards, S. 2005.** Sporadic

cryptosporidiosis decline after membrane filtration of public water supplies, England, 1996-2002. *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 251-259.

**Gómez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L. M.; Tabarés, E.; López-Rodas, V. y Costas, E. 2000.** Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 1866-1870.

**Gómez-Couso, H.; Méndez-Hermida, F.; Castro-Hermida, J.A.; Pereira-Lorenzo, A. y Ares-Mazás, E. 2004.** Report about an outbreak of cryptosporidiosis in a nursery centre of Santiago de Compostela (NW-Spain). En: IX European Multicolloquium of Parasitology. S. Mas-Coma, M.D. BARGUES, J.G. Esteban y M.A. Valero (Eds.). Valencia, L.R., pág. 486.

**Goodgame, R.W.; Genta, R.M.; White, A.C. y Chappell, C.L. 1993.** Intensity of infection in AIDS-associated cryptosporidiosis. *Journal of Infectious Diseases*, **167**: 704-709.

**Goodgame, R.W.; Kimball, K.; Ou, C.N.; White, A.C.; Genta, R.M.; Lifschitz, C.H. y Chappell, C.L. 1995.** Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis. *Gastroenterology*, **108**: 1075-1082.

**Gookin, J.L.; Allen, J.; Chiang, S.; Duckett, L. y Armstrong, M.U. 2005.** Local peroxynitrite formation contributes to early control of *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, **73**: 3929-3936.

**Gosling, E.M. 2003.** Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Books, Oxford, 443 pp.

**Graczyk, T.K. 2003.** Human waterborne parasites in molluscan shellfish. *Journal of Parasitology*, **89**: 57S-61S.

**Graczyk, T.K. y Schwab, K.J. 2000.** Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. *Current Gastroenterology Reports*, **2**: 305-309.

**Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R. y Conn, D.B. 1997.** *In vitro* phagocytosis of *Giardia duodenalis* cysts by hemocytes of the Asian freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Parasitology Research*, **83**: 743-745.

**Graczyk, T.K.; Fayer, R.; Cranfield, M.R. y Conn, D.B. 1997a.** *In vitro* interactions of Asian freshwater clam (*Corbicula fluminea*) hemocytes and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2910-2912.

**Graczyk, T.K.; Fayer, R.; Lewis, E.J.; Farley, C.A. y Trout, J.M. 1997b.** *In vitro* interactions between hemocytes of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 and *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Parasitology*, **83**: 949-952.

**Graczyk, T.K.; Ortega, Y.R. y Conn, D.B. 1998.** Recovery of waterborne oocysts of *Cyclospora cayetanensis* by Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**: 928-932.

**Graczyk, T.K.; Fayer, R.; Cranfield, M.R. y Conn, D.B. 1998a.** Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 427-430.

**Graczyk, T.K.; Farley, C.A.; Fayer, R.; Lewis, E.J. y Trout, J.M. 1998b.** Detection of *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia* cyst in the tissues of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) carrying principal oyster infectious disease. *Journal of Parasitology*, **84**: 1039-1042.

**Graczyk, T.K.; Cranfield, M.R.; Fayer, R. y Bixler, H. 1999.** House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61**: 500-504.

**Graczyk, T.K.; Fayer, R.; Conn, D.B. y Lewis, E.J. 1999a.** Evaluation of the recovery of waterborne *Giardia* cysts by freshwater clams and cyst detection in clam tissue. *Parasitology Research*, **85**: 30-34.

**Graczyk, T.K.; Fayer, R.; Lewis, E.J.; Trout, J.M. y Farley, C.A. 1999b.** *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research*, **85**: 518-521.

**Graczyk, T.K.; Thompson, R.C.A.; Fayer, R.; Adams, P.; Morgan, U.M. y Lewis, E.J. 1999c.** *Giardia duodenalis* cysts of genotype A recovered from clams in the Chesapeake Bay subestuary, Rhode river. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61**: 526-529.

**Graczyk, T.K.; Evans, B.M.; Shiff, C.J.; Karreman, H.J. y Patz, J.A. 2000.** Environmental and geographical factors contributing to contamination of watershed with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Environmental Research*, **82**: 263-271.

**Graczyk, T.K.; Fayer, R.; Knight, R.; Mhangami-Ruwende, B.; Trout, J.M.; Da Silva, A.J. y Pieniazek, N.J. 2000a.** Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **63**: 178-183.

**Graczyk, T.K.; Fayer, R.; Lewis, E.J.; Higgins, J.A.; Jenkins, M.C.; Thompson, R.C.A.; Xiao, L.; Adams, P.; Morgan, U.M. y Lal, A.A. 2000b.** *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts in molluscan shellfish. *Acta Parasitologica*, **45**: 148.

**Graczyk, T.K.; Marcogliese, D.J.; de Lafontaine, Y.; Da Silva, A.J.; Mhangami-Ruwende, B. y Pieniazek, N.J. 2001.** *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. *Parasitology Research*, **87**: 231-234.

**Graczyk, T.K.; Conn, D.B.; Marcogliese, D.J.; Graczyk, H. y De Lafontaine, Y. 2003.** Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitology Research*, **89**:107-112.

**Graczyk, T.K.; Grimes, B.H.; Knight, R.; Da Silva, A.J.; Pieniazek, N.J. y Veal, D.A. 2003a.** Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**: 228-232.

**Graczyk, T.K.; Conn, D.B.; Lucy, F.; Minchin, D.; Tamang, L.; Moura, L.N.S. y Da Silva, A.J. 2004.** Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitology Research*, **93**: 385-391.

**Griffin, D.W.; Lipp, E.K.; McLaughlin, M.R. y Rose, J.B. 2001.** Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. *BioScience*, **51**: 817-825.

**Guerra, A. 2002.** La ostricultura. Técnicas de producción y cultivo. En: Impulso, desarrollo y potenciación de la ostricultura en España. Dirección: E. Polanco; Coordinación: J. Fernández Polanco y M.S. Ruesga. Fundación Alfonso Martín Escudero, Madrid, pp. 37-73.

**Hadad-Meléndez, P.; Fernández-Abascal, H.; Millán-Marcelo, J.C.; Ramos-García, A. y Núñez-Fernández, F. 1993.** Infección por *Cryptosporidium* sp. en individuos cubanos infectados por el VIH. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **45**: 55-58.

**Halliday, M.L.; Kang, L.Y.; Zhou, T.K.; Hu, M.D.; Pan, Q.C.; Fu, T.Y.; Huang, Y.S. y Hu, S.L. 1991.** An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *The Journal of Infectious Diseases*, **164**: 852-859.

**Hansen, J.S. y Ongerth, J.E. 1991.** Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2790-2795.

**Harada, M. 1995.** Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, **25**: 1-24.

**Harp, J.A.; Fayer, R.; Pesch, B.A. y Jackson, G.J. 1996.** Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 2866-2868.

**Harper, C.M.; Cowell, N.A.; Adams, B.C.; Langley, A.J. y Wohlsen, T.D. 2002.** Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Communicable Diseases Intelligence*, **26**: 449-450.

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

**Hauschild, A.H.W. y Bryan, F.L. 1980.** Estimate of food and waterborne illnesses in Canada and United States. *Journal of Food Protection*, **43**: 435-440.

**Heine, J. 1982.** An easy technique for the demonstration of *Cryptosporidia* in faeces. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, **29**: 324-327.

**Heine, J.; Moon, H.W. y Woodmansee, D.B. 1984.** Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infection and Immunity*, **43**: 856-859.

**Heisz, M.; Chauret, C.; Chen, P.; Springthorpe, S. y Sattar, S.A. 1997.** *In vitro* survival of *Cryptosporidium* oocysts in natural waters. En: Proceedings of the International Symposium on Waterborne *Cryptosporidium*. C. Fricker, J.L. Clancy y P.A. Rochelle (Eds.). American Water Works Association, Denver, pp. 171-175.

**Hellard, M.; Hocking, J.; Willis, J.; Dore, G. y Fairley, C. 2003.** Risk factors leading to *Cryptosporidium* infection in men who have sex with men. *Sexually Transmitted Infections*, **79**: 412-414.

**Hernández Córdova, G.A. 2001.** Ciclo de vida de *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989). Ciclo de vida interno en la almeja *Ruditapes decussatus* (L.). I: Formas infectantes, vías de penetración y células diana en el hospedador. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 238 pp.

**Hewitt, R.G.; Yiannoutsos, C.T.; Higos, E.S.; Carey, J.T.; Geiseler, P.J.; Soave, R.; Rosenberg, R.; Vazquez, G.J.; Wheat, L.J.; Fass, R.J.; Antoninievic, Z.; Walawander, A.L.; Flanigan, T.P. y Bender, J.F. 2000.** Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trial Group. *Clinical Infectious Diseases*, **31**: 1084-1092.

**Hijjawi, N.S.; Meloni, B.P.; Ryan, U.M.; Olson, M.E. y Thompson, R.C. 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**: 1719-1726.

**Hijjawi, N.S.; Meloni, B.P.; Ng'anzo, M.; Ryan, U.M.; Olson, M.E.; Cox, P.T.; Monis, P.T. y Thompson, R.C. 2004.** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, **34**: 769-777.

**Hojlyng, N.; Holten-Andersen, W. y Jepsen, S. 1987.** Cryptosporidiosis: a case of airborne transmission. *Lancet*, **2**: 271-272.

**Hommer, V.; Eichholz, J. y Petra, F. 2003.** Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 359-364.

**Hörman, A.; Korpela, H.; Sutinen, J.; Wedel, H. y Hänninen, M.L. 2004.** Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *International Journal for Parasitology*, **34**: 1337-1346.

**Hörman, A.; Rimhanen-Finne, R.; Maunula, L.; von Bonsdorff, C.H.; Torvela, N.; Heikinheimo, A. y Hänninen, M.L. 2004a.** *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 87-95.

**Huamanchay, O.; Genzlinger, L.; Iglesias, M. y Ortega, Y.R. 2004.** Ingestion of *Cryptosporidium* oocysts by *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Parasitology*, **90**: 1176-1178.

**Hunter, P.R. y Nichols, G. 2002.** Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 145-154.

**Hutin, Y.J.; Sombardier, M.N.; Liguory, O.; Sarfati, C.; Derouin, F.; Modai, J. y Molina, J.M. 1998.** Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case control study. *Journal of Infectious Diseases*, **178**: 904-907.

**Instituto Gallach. 1994.** El relieve. *En*: Geografía de España (vol. III). Grupo Editorial Océano, Barcelona, pp. 444-507.

**Instituto Gallach. 1994a.** Galicia. *En*: Geografía de España (vol. VII). Grupo Editorial Océano, Barcelona, pp. 1252-1352.

**Irwin, P.J. 2002.** Companion animal Parasitology: a clinical perspective. *International Journal for Parasitology*, **32**: 581-593.

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

**Izumi, T.; Itoh, Y.; Yagita, K.; Endo, T. y Ohyama, T. 2004.** Brackish water benthic shellfish (*Corbicula japonica*) as a biological indicator for *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **72**: 29-37.

**Jaykus, L.A.; Hemard, M.T. y Sobsey, M.D. 1994.** Human enteric pathogenic viruses. *En*: Environmental indicators and shellfish safety. C.R. Hackney y M.D. Pierson (Eds.). Chapman and Hall, Nueva York, pp. 92-153.

**Jenkins, M.C. 2004.** Present and future control of cryptosporidiosis in humans and animals. *Expert Review of Vaccines*, **3**: 669-671.

**Jenkins, M.C.; Fayer, R.; Tilley, M. y Upton, S.J. 1993.** Cloning and expression of a cDNA encoding epitopes shared by 15- and 60 kilodalton proteins of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity*, **61**: 2377-2382.

**Jenkins, M.; Walker, M.J.; Bowman, D.D.; Anthony, L.C. y Ghiorse, W.C. 1999.** Use of a sentinel system for field measurements of *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in soil and animal waste. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1998-2005.

**Jenkins, M.; Trout, J.M.; Higgins, J.; Dorsch, M.; Veal, D. y Fayer, R. 2003.** Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research*, **89**: 1-5.

**Joe, A.; Verdon, R.; Tzipori, S.; Keusch, G.T. y Ward, H.D. 1998.** Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to human intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, **66**: 3429-3432.

**Johnson, D. C.; Reynolds, K. A.; Gerba, C. P.; Pepper, I. L. y Rose, J. B. 1995.** Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. *Water Science and Technology*, **31**: 439-442.

**Jokipii, L.; Pohjola, S. y Jokipii, A.M. 1985.** Cryptosporidiosis associated with traveling and giardiasis. *Gastroenterology*, **89**: 838-842.

**Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). 2005.** Estadísticas de Acuicultura por Comunidades Autónomas. <http://www.mapa.es/jacumar/estadisticas/ccaa.asp>. Accedido: 4 de julio de 2005.

**Kamel, A.G.; Maning, N. y Arulmainathan, S. 1994.** Cryptosporidiosis among HIV positive intravenous drugs users in Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **25**: 650-653.

**Karl, T.R.; Knight, R.W. y Plummer, N. 1995.** Trends in high frequency climate variability in the twenty century. *Nature*, **377**: 217-220.

**Khrantsov, N.V.; Tilley, M.; Blunt, D.S.; Montelone, B.A. y Upton, S.J. 1995.** Cloning and analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a protein with homology to cytoplasmic form Hsp70. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **42**: 416-422.

**Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.

**Kiyosawa, K.; Gibo, Y.; Sodeyama, T.; Furuta, K.; Imai, H.; Yoda, H.; Koike, Y.; Yoshizawa, K. y Furuta, S. 1987.** Possible infectious causes in 651 patients with acute viral hepatitis during a 10-year period (1976-1985). *Liver*, **7**: 163-168.

**Koch, K.L.; Phillips, D.J.; Aber, R.C. y Current, W.L. 1985.** Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. *Annals of Internal Medicine*, **102**: 593-596.

**Koff, R.S.; Grady, G.F.; Chalmers, T.C.; Mosley, J.W. y Swartz, B.L. 1967.** Viral hepatitis in a group of Boston hospitals. III. Importance of exposure to shellfish in a non-epidemic period. *New England Journal of Medicine*, **276**: 703-710.

**Korich, D.G.; Mead, J.R.; Madore, M.S.; Sinclair, M.A. y Sterling, C.R. 1990.** Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1423-1428.

**Koudela, B. y Modry, D. 1998.** New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitologica*, **45**: 93-100.

**Labarta, U. 2004.** El mejillón, un paradigma bioeconómico. *En: Bateiros, mar, mejillón. Una perspectiva bioeconómica.* U. Labarta, M.J. Fernández Reiriz, A. Pérez Camacho y E. Pérez Corbacho. Fundación Caixa Galicia, Santiago de Compostela, pp 19-47.

**Laberge, I.; Griffiths, M.W. y Griffiths, M.W. 1996.** Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *International Journal of Food Microbiology*, **32**: 1-26.

**Langer, R.C. y Riggs, M.W. 1999.** *Cryptosporidium parvum* apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, **67**: 5282-5291.

**Langer, R.C.; Schaefer, D.A. y Riggs, M.W. 2001.** Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the *Cryptosporidium parvum* sporozoite ligand CSL. *Infection and Immunity*, **69**: 1661-1670.

**Laurent, F.; Eckmann, L.; Savidge, T.C.; Morgan, G.; Theodos, C.; Naciri, M. y Kagnoff, M.F. 1997.** *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infection and Immunity*, **65**: 5067-5073.

**Laurent, F.; Kagnoff, M.F.; Savidge, T.C.; Naciri, M. y Eckmann, L. 1998.** Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> production. *Infection and Immunity*, **66**: 1787-1790.

**Laurent, F.; McCole, D.; Eckmann, L. y Kagnoff, M.F. 1999.** Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection*, **2**: 141-148.

**LeChevallier, M.W. y Norton, W.D. 1995.** *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in raw and finished water. *Journal of the American Water Works Association*, **87**: 54-68.

**LeChevallier, M.W.; Norton, W.D. y Lee, R.G. 1991.** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2610-2616.

**LeChevallier, M.W.; Norton, W.D. y Lee, R.G. 1991a.** *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2617-2621.

**Lee, S.H.; Levy, D.A.; Craun, G.F.; Beach, M.J. y Calderon, R.L. 2002.** Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1999-2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, **51**: 1-47.

**Lees, D. 2000.** Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, **59**: 81-116.

**Lehrer, S.B.; Ayuso, R. y Reese, G. 2003.** Seafood allergy and allergens: a review. *Marine Biotechnology*, **5**: 339-348.

**Leitch, G.J. y He, Q. 1994.** Arginine-derived nitric oxide reduces fecal oocysts shedding in nude mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infection and Immunity*, **62**: 5173-5176.

**Lemarchand, K. y Lebaron, P. 2003.** Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiology Letters*, **218**: 203-209.

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

**Lewis, I.J.; Hart, C.A. y Baxby, D. 1985.** Diarrhoea due to *Cryptosporidium* in acute lymphoblastic leukemia. *Archives of Disease in Childhood*, **60**: 60-62.

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

**Lindsay, D.S.; Phelps, K.K.; Smith, S.A.; Flick, G.; Sumner, S.S. y Dubey, J.P. 2001.** Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**: 197S-198S.

**Lindsay, D.S.; Collins, M.V.; Mitchell, S.M.; Cole, R.A.; Flick, G.J.; Wetch, C.N. y Dubey, J.P. 2003.** Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in sea water. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **50**: 687S-688S.

**Lindsay, D.S.; Collins, M.V.; Mitchell, S.M.; Wetch, C.N.; Rosypal, A.C.; Flick, G.J.; Zajac, A.M.; Lindquist, A. y Dubey, J.P. 2004.** Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Parasitology*, **90**: 1054-1057.

**Lozano-León, A; Torres, J.; Osorio, C.R. y Martínez-Urtaza, J. 2003.** Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, **226**: 281-284.

**Lumb, R.; Smith, K.; O'Donoghue, P.J. y Lanser, J.A. 1988.** Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitology Research*, **74**: 531-536.

**Ma, P.; Kaufman, D.L.; Helmick, C.G.; D'Souza, A.J. y Navin, T.R. 1985.** Cryptosporidiosis in tourists returning from the Caribbean. *New England Journal of Medicine*, **312**: 647-648.

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

**Macpherson, C.N.L. 2005.** Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1319-1331.

**Madore, M.S.; Rose, J.B.; Gerba, C.P.; Arrowood, M.J. y Sterling, C.R. 1987.** Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and selected surface waters. *Journal of Parasitology*, **73**: 702-705.

**Maillot, C.; Gargala, G.; Delaunay, A.; Ducrotte, P.; Brasseur, P.; Ballet, J.J. y Favennec, L. 2000.** *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF- $\beta$ , IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitology Research*, **86**: 947-949.

**Manabe, Y.C.; Clark, D.P.; Moore, R.D.; Lumadue, J.A.; Dahlman, H.R.; Belitsos, P.C.; Chaisson, R.E. y Sears, C.L. 1998.** Cryptosporidiosis in patients with AIDS: correlates of disease and survival. *Clinical Infectious Diseases*, **27**: 536-542.

**Mancassola, R.; Répérant, J.M.; Naciri, M. y Chartier, C. 1995.** Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 75-78.

**Mancassola, R.; Richard, A. y Naciri, M. 1997.** Evaluation of decoquinate to treat experimental cryptosporidiosis in kids. *Veterinary Parasitology*, **69**: 31-37.

**Mansfield, L.S. y Gajadhar, A.A. 2004.** *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Veterinary Parasitology*, **126**: 73-90.

**Martino, P.; Gentile, G.; Caprioli, A.; Baldassarri, L.; Donelli, G.; Arcese, W.; Fenu, S.; Micozzi, A.; Venditti, M. y Mandelli, F. 1988.** Hospital-acquired cryptosporidiosis in a bone marrow transplantation unit. *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 647-648.

**Marcial, M.A. y Madara, J.L. 1986.** *Cryptosporidium*: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology*, **90**: 583-594.

**Martínez-Urtaza, J.; Lozano-León, A.; DePaola, A.; Ishibashi, M.; Shimada, K.; Nishibuchi, M. y Liébana, E. 2004.** Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 4672-4678.

**Martínez-Urtaza, J.; Saco, M.; de Novoa, J.; Pérez-Piñeiro, P.; Peiteado, J.; Lozano-León, A. y García-Martín, O. 2004a.** Influence of environmental factors and human activity on the of *Salmonella* serovars in a marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 2089-2097.

**Mascaró, C.; Arnedo, T. y Rosales, M.J. 1994.** Respiratory cryptosporidiosis in a bovine. *Journal of Parasitology*, **80**: 334-336.

**Mathison, B.A. y Ditrach, O. 1999.** The fate of *Cryptosporidium parvum* oocysts ingested by dung beetles and their possible role in the dissemination of cryptosporidiosis. *Journal of Parasitology*, **85**: 678-681.

**McCole, D.F.; Eckmann, L.; Laurent, F. y Kagnoff, M.F. 2000.** Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, **68**: 1710-1713.

**McLauchlin, J.; Pedraza-Díaz, S.; Amar-Hoetzeneder, C. y Nichols, G.L. 1999.** Genetic characterisation of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 3153-3158.

**McLauchlin, J.; Amar, C.; Pedraza-Díaz, S. y Nichols, G.L. 2000.** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**: 3984-3990.

**McLaughlin, J.B.; DePaola, A.; Bopp, C.A.; Martinek, K.A.; Napolilli, N.P.; Allison, C.G.; Murray, S.L.; Thompson, E.C.; Bird, M.M. y Middaugh, J.P. 2005.** Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *New England Journal of Medicine*, **353**: 1463-1470.

**Meisel, J.L.; Perera, D.R.; Meligro, C. y Rubin, C.E. 1976.** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, **70**: 1156-1160.

**Mele, A.; Rosmini, F.; Zampieri, A. y Gill, O.N. 1986.** Integrated epidemiological system for acute viral hepatitis in Italy (SEIEVA): description and preliminary results. *European Journal of Epidemiology*, **2**: 300-304.

**Mele, A.; Pasquini, P. y Pana, A. 1991.** Hepatitis A in Italy: epidemiology and suggestions for control. *Italian Journal of Gastroenterology*, **23**: 341-343.

**Mele, R.; Gomez Morales, M.A.; Tosini, F. y Pozio, E. 2003.** Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* and *in vivo* models. *International Journal for Parasitology*, **33**: 757-764.

**Mele, R.; Morales, M.A.G.; Tosini, F. y Pozio, E. 2004.** *Cryptosporidium parvum* at different development stages modulates host cell apoptosis *in vitro*. *Infection and Immunity*, **72**: 6061-6067.

**Méndez, G. y Rey, D. 2000.** Perspectiva histórica del conocimiento geológico de las rías gallegas. *Journal of Iberian Geology*, **26**: 21-44.

**Méndez-Hermida, F.; Gómez-Couso, H. y Ares-Mazás, E. 2005.** *Artemia* is capable of spreading viable *Cryptosporidium* oocysts. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **12**: 238.

**Méndez-Hermida, F.; Gómez-Couso, H.; Romero Suances, R. y Ares-Mazás, E. 2005a.** Preliminary data about *Cryptosporidium* and *Giardia* in otters (*Lutra lutra*). *Acta Parasitológica Portuguesa*, **12**: 260.

**Millard, P.S.; Gensheimer, K.F.; Addiss, D.G.; Sosin, D.M.; Beckett, G.A.; Houck-Jankoski, A. y Hudson, A. 1994.** An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *Journal of the American Medical Association*, **272**: 1592-1596.

**Miller, M.A.; Gardner, I.A.; Kreuder, C.; Paradies, D.M.; Worcester, K.R.; Jessup, D.A.; Dodd, E.; Harris, M.D.; Ames, J.A.; Packham, A.E. y Conrad, P.A. 2002.** Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *International Journal for Parasitology*, **32**: 997-1006.

**Miller, S.A.; Rosario, C.L.; Rojas, E. y Scorza, J.V. 2003.** Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Tropical Medicine and International Health*, **8**: 342-347.

**Miller, W.A.; Atwill, E.R.; Gardner, I.A.; Miller, M.A.; Fritz, H.M.; Hedrick, R.P.; Melli, A.C.; Barnes, N.M. y Conrad, P.A. 2005.** Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *International Journal for Parasitology*, **35**: 673-684.

**Miller, W.A.; Gardner, I.A.; Atwill, E.R.; Leutenegger, C.M.; Miller, M.A.; Hedrick, R.P.; Melli, A.C.; Barnes, N.M. y Conrad, P.A. 2005a.** Evaluation of methods for improved detection of *Cryptosporidium* spp. in mussels (*Mytilus californianus*). *Journal of Microbiological Methods* (en prensa).

**Miller, W.A.; Miller, M.A.; Gardner, I.A.; Atwill, E.R.; Harris, M.; Ames, J.; Jessup, D.; Melli, A.; Paradies, D.; Worcester, K.; Olin, P.; Barnes, N. y Conrad, P.A. 2005b.** New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast. *International Journal for Parasitology*, **35**: 1103-1113.

**Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). 1999.** Borrador del libro blanco de la acuicultura en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, 534 pp.

**Ministerio de Sanidad y Consumo. 2003.** Vigilancia epidemiológica de la cryptosporidiosis en España. *Boletín Epidemiológico*, **11**: 277-284.

**Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005.** Microorganismos notificados al Sistema de Información Microbiológica. <http://193.146.50.130/htdocs/ve/ve.htm>. Accedido: 8 de diciembre de 2005.

**Mitschler, R.R.; Welte, R. y Upton, S.J. 1994.** A comparative study of lipid compositions of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) and Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **41**: 8-12.

**Monge, R. y Chinchilla, M. 1996.** Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. *Journal of Food Protection*, **59**: 202-203.

**Montemayor, M.; Valero, F.; Cofre, J. y Lucena, F. 2005.** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *Journal of Applied Microbiology*, **99**: 1455-1462.

**Montero, I. 1971.** Sistemática. Clave de Pelecípodos. En: Moluscos bivalvos españoles. Universidad de Sevilla, Sevilla, pp. 30-119.

**Moore, R.; Tzipori, S.; Giffiths, J.K.; Johnson, K.; De Montigny, L. y Lomakina, I. 1995.** Temporal changes in permeability and structure of piglet ileum after site-specific infection by *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology*, **108**: 1030-1039.

**Morgan, U.M.; Xiao, L.; Fayer, R.; Lal, A.A. y Thompson, R.C. 1999.** Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1733-1751.

**Morgan, U.M.; Xiao, L.; Fayer, R.; Lal, A.A. y Thompson, R.C. 2000.** Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. *Contributions to Microbiology*, **6**: 116-139.

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

**Morris, J.G. 2003.** Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clinical Infectious Diseases*, **37**: 272-280.

**Morrison, D.A. y Ellis, J.T. 1997.** Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of Apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution*, **14**: 428-441.

**Muniain-Mujika, I.; Girones, R.; Tofino-Quesada, G.; Calvo, M. y Lucena, F. 2002.** Depuration dynamics of viruses in shellfish. *Internacional Journal of Food Microbiology*, **77**: 125-133.

**Murphy, A.M.; Grohmann, G.S.; Christopher, P.J.; Lopez, W.A.; Davey, G.R. y Millsom, R.H. 1979.** An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. *Medical Journal of Australia*, **2**: 329-333.

**Naciri, M. e Yvoré, P. 1989.** Efficacité du lactate d'halofuginone dans le traitement de la cryptosporidiose chez l'agneau. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **165**: 823-826.

**Naciri, M.; Mancassola, R.; Yvore, P. y Peeters, J.E. 1993.** The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Veterinary Parasitology*, **45**: 199-207.

**Nasser, A.M. 1994.** Prevalence and fate of hepatitis A virus in water. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **24**: 281-323.

**Navarrete, S.; Stetler, H.C.; Ávila, C.; García Aranda, J.A. y Santos-Preciado, J.I. 1991.** An outbreak of *Cryptosporidium* diarrhea in a pediatric hospital. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **10**: 248-250.

**Nebrija, E.A. 1951.** Vocabulario español-latino. Facsímil de la edición de 1495. Real Academia Española, Madrid, fol. XCr.

**Negm, A.Y. 2003.** Human pathogenic protozoa in bivalves collected from local markets in Alexandria. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **33**: 991-998.

**Nesterenko, M.V.; Tilley, M. y Upton, S.J. 1995.** A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. *Microbios*, **83**: 77-88.

**Nesterenko, M.V.; Woods, K y Upton, S.J. 1999.** Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1454**: 165-173.

**Newman, R.D.; Zu, S.X.; Wuhib, T.; Lima, A.A.; Guerrant, R.L. y Sears, C.L. 1994.** Household epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Annals of Internal Medicine*, **120**: 500-505.

**Nime, F.A.; Burek, J.D.; Page, D.L.; Holscher, M.A. y Yardley, J.H. 1976.** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, **70**: 592-598.

**O'Donoghue, P.J. 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, **25**: 139-195.

**O'Hara, S.P.; Yu, J.R. y Lin, J.J. 2004.** A novel *Cryptosporidium parvum* antigen, CP2, preferentially associated with membranous structures. *Parasitology Research*, **92**: 317-327.

**O'Mahony, M.C.; Gooch, C.D.; Smyth, D.A.; Thrussell, A.J.; Bartlett, C.L.R. y Noah, N.D. 1983.** Epidemic hepatitis A from cockles. *Lancet*, **1**: 518-520.

**Ojcius, D.M.; Perffetini, J.L.; Bonnin, A. y Laurent, F. 1999.** Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. *Microbes and Infection*, **1**: 1163-1168.

**Okhuysen, P.C. y Chappell, C.L. 2002.** *Cryptosporidium* virulence determinants- are we there yet?. *International Journal for Parasitology*, **32**: 517-525.

**Okhuysen, P.C.; DuPont, H.; Sterling, C. y Chappell, C. 1994.** Arginine aminopeptidase, an integral membrane protein of the *Cryptosporidium parvum* sporozoite. *Infection and Immunity*, **62**: 4667-4670.

**Okhuysen, P.C.; Chappell, C.L.; Crabb, J.H.; Sterling, C.R. y DuPont, H.L. 1999.** Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases*, **180**: 1275-1281.

**Olson, M.E.; Goh, J.; Phillips, M.; Guselle, N. y McAllister, T.A. 1999.** *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocysts survival in water, soil, and cattle feces. *Journal of Environmental Quality*, **28**: 1991-1996.

**Ong, C.; Moorehead, W.; Ross, A. e Isaac-Renton, J. 1996.** Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 2798-2805.

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

**Ono, K.; Tsuji, H.; Rai, S.K.; Yamamoto, A.; Masuda, K.; Endo, T.; Hotta, H.; Kawamura, T. y Uga, S. 2001.** Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in western Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 3832-3836.

**Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2005.** Total production 1950-2003. <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>. Accedido: 24 de noviembre de 2005.

**Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2005a.** Aquaculture production: quantities 1950-2003. <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>. Accedido: 24 de noviembre de 2005.

**Ortega, Y.R.; Roxas, C.R.; Gilman, R.H.; Miller, N.J.; Cabrera, L.; Taquiri, C. y Sterling, C.R. 1997.** Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57**: 683-686.

**Palit, A.; Sur, D.; MitraDhar, K. y Saha, M.R. 2005.** Asymptomatic cryptosporidiosis in a periurban slum setting in Kolkata, India - a pilot study. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **58**: 110-111.

**Palmer, S.R. y Biffin, A.H. 1990.** Cryptosporidiosis in England and Wales: prevalence and clinical and epidemiological features. *British Medical Journal*, **300**: 774-777.

**Panciera, R.J.; Thomassen, R.W. y Garner, F.M. 1971.** Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, **8**: 479-484.

**Patel, S.; Pedraza-Díaz, S. y McLauchlin, J. 1998.** The molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. *Communicable Disease and Public Health*, **1**: 231-233.

**Pavlašek, I. 1993.** The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Veterinarni Medicina*, **38**: 629-638.

**Pedersen, C.; Danner, S.; Lazzarin, A.; Glauser, M.P.; Weber, R.; Katlama, C.; Barton, S.E. y Lundgren, J.D. 1996.** Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. *Genitourinary Medicine*, **72**: 128-131.

**Peeters, J.E.; Mazás, E.A.; Masschelein, W.J.; Villacorta Martínez de Maturana, I. y Debacker, E. 1989.** Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 1519-1522.

**Penas, E. 1986.** Modelo preliminar del ecosistema de la plataforma continental de Galicia. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, **3**: 43-56.

**Peng, M.M.; Xiao, L.; Freeman, A.R.; Arrowood, M.J.; Escalante, A.A.; Weltman, A.C.; Ong, C.S.; Mac Kenzie, W.R.; Lal, A.A. y Beard, C.B. 1997.** Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, **3**: 567-573.

**Pérez Camacho, A. 1992.** Biología. *En*: Cultivo del mejillón en la batea. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 16-22.

**Pérez Camacho, A. 1992a.** El cultivo en batea. *En*: Cultivo del mejillón en la batea. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 39-45.

**Pérez Camacho, A. 1992b.** Fases del cultivo de almejas. *En*: Cultivo de almejas en playa. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 18-26.

**Pérez Camacho, A. 1992c.** Cultivo de ostra en playa. *En*: Cultivo de almejas en playa. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 33-37.

**Pérez Camacho, A. y Cuña Casasbellas, M.A. 1992.** Cultivo da ostra en batea. *En*: Cultivo de bivalvos en batea. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), A Coruña, pp. 15-22.

**Perkins, S.L. y Keller, A.K. 2001.** Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology*, **87**: 870-876.

**Perryman, A.L.; Jasmer, D.P.; Riggs, M.W.; Bohnet, S.G.; McGuire, T.C. y Arrowood, M.J. 1996.** A cloned gene of *Cryptosporidium parvum* encodes neutralization-sensitive epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **80**: 137-147.

**Petersen, C. 1992.** Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*, **15**: 903-909.

**Petersen, C.; Gut, J.; Doyle, P.S.; Crabb, J.H.; Nelson, R.G. y Leech, J.H. 1992.** Characterization of a >900,000-M(r) *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostral immunoglobulin. *Infection and Immunity*, **60**: 5132-5138.

**Pettoello-Mantovani, M.; Di Martino, L.; Dettori, G.; Vajro, P.; Scotti, S.; Ditullio, M.T. y Guandalini, S. 1995.** Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: a prospective study. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **14**: 1042-1047.

**Pina, S.; Jofre, J.; Emerson, S.U.; Purcell, R.H. y Girones, R. 1998.** Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis B is not endemic. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4485-4488.

**Pokorny, N.J.; Weir, S.C.; Carreno, R.A.; Trevors, J.T. y Lee, H. 2002.** Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. *Journal of Parasitology*, **88**: 641-643.

**Pollok, R.C.G.; McDonald, V.; Kelly, P. y Farthing, M.J. 2003.** The role of *Cryptosporidium parvum*-derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. *Parasitology Research*, **90**: 181-186.

**Potasman, I.; Alona, P. y Odeh, M. 2002.** Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*, **35**: 921-928.

**Pretty, J.N.; Brett, C.; Gee, D.; Hine, R.E.; Mason, C.F.; Morison, J.I.L.; Raven, H.; Rayment, M.D. y van der Bijl, G. 2000.** An assessment of the total external costs of UK agriculture. *Agriculture Systematic*, **65**: 113-136.

**Puech, M.C.; McNulty, J.M.; Lesjak, M.; Shaw, N.; Heron, L. y Watson, J.M. 2001.** A statewide outbreak of cryptosporidiosis in New South Wales associated with swimming at public pools. *Epidemiology and Infection*, **126**: 389-396.

**Puerta Henche, B. 1995.** Biología de los moluscos bivalvos. *En: La depuración de los moluscos bivalvos*. Fundación Caixa Galicia, Santiago de Compostela, pp. 33-45.

**Putignani, L.; Tait, A.; Smith, H.V.; Horner, D.; Tovar, J.; Tetley, L. y Wastling, J.M. 2004.** Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, **129**: 1-18.

**Ramos, P.; Pereira da Fonseca, I.M.; Ruano, F.; Duarte, A.; Correia da Costa, J.M.; Almeida, A.C.; Falsão, M.L. y Fazendeiro, M.I. 2005.** Evaluation of commercial depuration in bivalves species experimentally contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **12**: 52.

**Real Academia Española (RAE). 1970.** Diccionario de la Lengua Española. Decimanovena edición. Real Academia Española, Madrid, pág. 1148.

**Redlinger, T.; Corella-Barud, V.; Graham, J.; Galindo, A.; Avitia, R. y Cardenas, V. 2002.** Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico border. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **66**: 794-798.

**Reed, C.; Sturbaum, G.D.; Hoover, P.J. y Sterling, C.R. 2002.** *Cryptosporidium parvum* mixed genotypes detected by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 427-429.

**Reese, N.C.; Current, W.L.; Ernst, J.V. y Bailey, W.S. 1982.** Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **31**: 226-229.

**Richards, G.P. 1985.** Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United States: requisite for development of viral guidelines. *Journal of Food Protection*, **48**: 815-823.

**Riggs, M.W. 2002.** Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response. *Microbes and Infection*, **4**: 1067-1080.

**Riggs, M.W.; Stone, A.L.; Yount, P.A.; Langer, R.C.; Arrowood, M.J. y Bentley, D.L. 1997.** Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of *Cryptosporidium parvum* sporozoites and merozoites. *Journal of Immunology*, **158**: 1787-1795.

**Riggs, M.W.; McNeil, M.R.; Perryman, L.E.; Stone, A.L.; Scherman, M.S. y O'Connor, R.M. 1999.** *Cryptosporidium parvum* sporozoite pellicle antigen recognised by a neutralizing monoclonal antibody is a  $\beta$ -mannosylated glycolipid. *Infection and Immunity*, **67**: 1317-1322.

**Riordan, C.E.; Langreth, S.G.; Sánchez, L.B.; Kayser, O. y Keithly, J.S. 1999.** Preliminary evidence for a mitochondrion in *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46**: 52S-55S.

**Rippey, S.R. 1994.** Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, **7**: 419-425.

**Roach, P.D.; Olson, M.E.; Whitley, G. y Wallis, P.M. 1993.** Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 67-73.

**Robertson, L.J. y Gjerde, B. 2001.** Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection*, **64**: 1793-1798.

**Robertson, L. J.; Campbell, A. T. y Smith, H. V. 1992.** Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3494-3500.

**Robertson, I.D.; Irwin, P.J.; Lymbery, A.J. y Thompson, R.C. 2000.** The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1369-1377.

**Robertson, L.J.; Johannessen, G.S.; Gjerde, B.K. y Loncarevic, S. 2002.** Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, **75**: 119-126.

**Robinson, P.; Okhuysen, P.C.; Chappell, C.L.; Lewis, D.E.; Shahab, I.; Lahoti, S. y White, A.C. 2000.** Transforming growth factor  $\beta$ 1 is expressed in the jejunum after experimental *Cryptosporidium parvum* infection in humans. *Infection and Immunity*, **68**: 5405-5407.

**Roche, J.K.; Martins, J.C.A.; Cosme, R.; Fayer, R. y Guerrant, R.L. 2000.** Transforming growth factor  $\beta$ 1 ameliorates intestinal epithelial barrier disruption by *Cryptosporidium parvum* *in vitro* in the absence of mucosal T lymphocytes. *Infection and Immunity*, **68**: 5635-5644.

**Rodgers, M.R.; Flanigan, D.J. y Jakubowski, W. 1995.** Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 3759-3763.

**Roos, R. 1956.** Hepatitis epidemic transmitted by oysters. *Svenska Lakartidningen*, **53**: 989-1003.

**Rosales, M.J.; Pérez Cordón, G.; Sánchez Moreno, M. y Marín Sánchez, C. 2005.** Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica*, **96**: 64.

**Rose, J.B. 1997.** Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annual Reviews of Public Health*, **18**: 135-161.

**Rose, J.B. y Slifko, P.R. 1999.** *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. *Journal of Food Protection*, **62**: 1059-1070.

**Rose, J.B.; Cifirino, A.; Madore, M.S.; Gerba, C.P.; Sterling, C.R. y Arrowood, M.J. 1986.** Detection of *Cryptosporidium* from wastewater and freshwater environments. *Water Science and Technology*, **18**: 233-239.

**Rose, J.B.; Gerba, C.P. y Jakubowski, W. 1991.** Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environmental Science and Technology*, **2**: 1393-1400.

**Rose, J.B.; Lisle, J.T. y LeChevallier, M. 1997.** Waterborne cryptosporidiosis: incidente, outbreaks and treatment strategies. En: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. R. Fayer (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 93-109.

**Rossen, L.; Norskov, P.; Holmstrom, K. y Rasmussen, O.F. 1992.** Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, **17**: 37-45.

**Ryan, U.M.; Xiao, L.; Read, C.; Sulaiman, I.M.; Monis, P.; Lal, A.A.; Fayer, R. y Pavlasek, I. 2003.** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, **89**: 809-813.

**Ryan, U.M.; Monis, P.; Enemark, H.L.; Sulaiman, I.; Samarasinghe, B.; Read, C.; Buddle, R.; Robertson, I.; Zhou, L.; Thompson, R.C. y Xiao, L. 2004.** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology*, **90**: 769-773.

**Salamina, G. y D'Argenio, P. 1998.** Shellfish consumption and awareness of risk of acquiring hepatitis A among Neapolitan families – Italy, 1997. *Eurosurveillance*, **3**: 97-98.

**Sanger, F.; Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**: 5463-5467.

**Schets, F.M.; van den Berg, H.H.J.L.; Verschoor, F.; Engels, G.B.; Lodder, W.J.; van Pelt-Heerschap, H.M.L.; van der Giessen, J.W.B.; de Roda Husman, A.M. y van der Poel, W.H.M. 2003.** Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Portuguese oysters (*Crassostrea gigas*) grown in the Oosterschelde, the Netherlands. En: *Cryptosporidium parvum* in food and water. G. Duffy (Ed.). Teagasc, The National Food Centre, Dublin, pág. 121.

**Schwab, K.J.; Neill, F.H.; Estes, M.K.; Metcalf, T.G. y Atmar, R.L. 1998.** Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *Journal of Food Protection*, **61**: 1674-1680.

**Scott, T.M.; Rose, J.B.; Jenkins, T.M.; Farrah, S.R. y Lukasik, J. 2002.** Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 5796-5803.

**Seydel, K.B.; Zhang, T.; Champion, G.A.; Fichtenbaum, C.; Swanson, P.E.; Tzipori, S.; Griffiths, J.K. y Stanley, S.L. 1998.** *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal xenografts in SCID mice induces production of human tumor necrosis factor alpha and interleukin-8. *Infection and Immunity*, **66**: 2379-2382.

**Sisson, G.; Goodwin, A.; Raudonikiene, A.; Hughes, N.J.; Mukhopadhyay, A.K.; Berg, D.E. y Hoffman, P.S. 2002.** Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 2116-2123.

**Slavin, D. 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, **65**: 262-266.

**Slifko, T.R.; Smith, H.V. y Rose, J.B. 2000.** Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, **30**: 1379-1393.

**Smith, H.V. y Rose, J.B. 1998.** Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today*, **14**: 14-22.

**Smith, H.V. y Grimason, A.M. 2003.** *Giardia* and *Cryptosporidium*. En: The handbook of water and wastewater microbiology. D. Mara y N.J. Horan (Eds.). Academic Press, Oxford, pp. 696-755.

**Smith, H.V. y Corcoran, G.D. 2004.** New drugs and treatment for cryptosporidiosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **17**: 557-564.

**Smith, H.V.; Brown, J.; Coulson, J.C.; Morris, G.P. y Girdwood, R.W. 1993.** Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in *Larus* spp. gulls. *Epidemiology and Infection*, **110**: 135-143.

**Solórzano-Santos, F.; Penagos-Paniagua, M.; Meneses-Esquivel, R.; Miranda-Navales, M.G.; Leanos-Miranda, B.; Angulo-González, D. y Fajardo-Gutiérrez, A. 2000.** *Cryptosporidium parvum* infection in malnourished and non malnourished children without diarrhea in a Mexican rural population. *Revista de Investigación Clínica*, **52**: 625-631.

**Sorber, C.A. 1983.** Removal of viruses from wastewater and effluent by treatment processes. En: Viral pollution of the environment. G. Berg (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 39-52.

**Sorvillo, F.J.; Lieb, L.E.; Kerndt, P.R. y Ash, L.R. 1994.** Epidemiology of cryptosporidiosis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles County. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **51**: 326-331.

**Spano, F.; Putignani, L.; Naitza, S.; Puri, C.; Wright, S. y Crisanti, A. 1998.** Molecular cloning and expression analysis of a *Cryptosporidium parvum* gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **92**: 147-162.

**Sprinz, E.; Mallman, R.; Barcellos, S.; Silbert, S.; Schestatsky, G. y Bem David, D. 1998.** AIDS-related cryptosporidial diarrhoea: an open study with roxithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **41**: 85S-91S.

**Steele, M.I.; Kuhls, T.L.; Nida, K.; Meka, C.S.; Halabi, I.M.; Mosier, D.A.; Elliott, W.; Crawford, D.L. y Greenfield, R.A. 1995.** A *Cryptosporidium parvum* genomic region encoding hemolytic activity. *Infection and Immunity*, **63**: 3840-3845.

**Sterling, C.R.; Seegar, K. y Sinclair, N.A. 1986.** *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, **153**: 380-381.

**Stibbs, H.H. y Ongerth, J.E. 1986.** Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*, **24**: 517-521.

**Stille, W.B.; Kunkel, B. y Nerger, K. 1972.** Oyster-transmitted hepatitis. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **97**: 145-147.

**Stockis, A.; Deroubaix, X.; Lins, R.; Jeanbaptiste, B.; Calderon, P. y Rossignol, J.F. 1996.** Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **34**: 349-351.

**Strong, W.B.; Gut, J. y Nelson, R.G. 2000.** Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and Immunity*, **68**: 4117-4134.

**Sturbaum, G.D.; Klonicki, P.T.; Marshall, M.M.; Jost, B.H.; Clay, B.L. y Sterling, C.R. 2002.** Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters and their limitations. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2991-2996.

**Suárez Piñeiro, A. y Soto López, I. 2004.** Pesca. *En*: Galicia 2005. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, pp. 269-295.

**Szostakowska, B.; Kruminis-Lozowska, W.; Racewicz, M.; Knight, R.; Tamang, L.; Mjyak, P. y Graczyk, T.K. 2004.** *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3742-3744.

**Tamburrini, A. y Pozio, E. 1999.** Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology*, **29**: 711-715.

**Tang, Y.W.; Wang, J.X.; Xu, Z.Y.; Guo, Y.F.; Qian, W.H. y Xu, J.X. 1991.** A serologically confirmed case-control study of a large outbreak of hepatitis A in China associated with consumption of clams. *Epidemiology and Infection*, **107**: 651-658.

**Tarver, A.P.; Clark, D.P.; Diamond, G.; Russell, J.P.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Cohen, K.S.; Jones, D.E.; Sweeney, R.W.; Wines, M.; Hwang, S. y Bevins, C.L. 1998.** Enteric

$\beta$ -defensin: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, **66**: 1045-1056.

**Tebbe, C.C. y Vahjel, W. 1993.** Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 2657-2665.

**Terajima, J.; Tamura, K.; Hirose, K.; Izumiya, H.; Miyahara, M.; Konuma, H. y Watanabe, H. 2004.** A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. *Microbiology and Immunology*, **48**: 49-52.

**Torne, J.; Miralles, R.; Tomas, S. y Saballs, P. 1988.** Typhoid fever and acute non-A non-B hepatitis after shellfish consumption. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **7**: 581-582.

**Torre Enciso, E. 1954.** Contribución al conocimiento morfológico y tectónico de la Ría de La Coruña. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, **52**: 21-51.

**Torre Enciso, E. 1958.** Estado actual del conocimiento de las rías gallegas. Homenaje a R. Otero Pedrayo. Editorial Galaxia, Vigo, pp. 237-250.

**Tosini, F.; Cacciò, S.; Tamburrini, A.; La Rosa, G. y Pozio, E. 1999.** Identification and characterization of three antigenic proteins from *Cryptosporidium parvum* sporozoites using a DNA library expressing poly-histidine tagged peptides. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1925-1933.

**Tosini, F.; Agnoli, A.; Mele, R.; Morales, M.A.G. y Pozio, E. 2004.** A new modular protein of *Cryptosporidium parvum*, with ricin B and LCCL domains, expressed in the sporozoite invasive stage. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **134**: 137-147.

**Traversa, D.; Giangaspero, A.; Molini, U.; Iorio, R.; Paoletti, B.; Otranto, D. y Giansante, C. 2004.** Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from *Chamelea gallina* clams in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 4367-4370.

**Tyzzar, E.E. 1907.** A sporozoa found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, **5**: 12-13.

**Tyzzar, E.E. 1910.** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research*, **23**: 487-509.

**Tyzzar, E.E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv der Protistenkunde*, **26**: 394-418.

**Tyzzar, E.E. 1929.** Coccidiosis in a gallinaceous birds. *American Journal of Higiene*, **10**: 269-383.

**Tzipori, S. y Griffiths, J.K. 1998.** Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Advances in Parasitology*, **40**: 5-36.

**Tzipori, S. y Ward, H. 2002.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, **4**: 1047-1058.

**Tzipori, S.; Angus, K.W.; Campbell, I. y Gray, E.W. 1980.** *Cryptosporidium*: evidence for a simple-species genus. *Infection and Immunity*, **30**: 884-886.

**Ungar, B.L.P. 1990.** Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). En: Cryptosporidiosis in man and animals. J.P. Dubey, C.A. Speer y R. Fayer (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 59-84.

**Ungar, B.L.P.; Soave, R.; Fayer, R. y Nash, T.E. 1986.** Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *Journal of Infectious Diseases*, **153**: 570-578.

**United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2001.** Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency, Washington, 52 pp.

**Upton, S.J. 2003.** *Cryptosporidium*: they probably taste like chicken. En: *Cryptosporidium*: from molecules to disease. R.C.A. Thompson, A. Armson y U.M. Ryan (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 3-10.

**Vergara Castiblanco, C.A. 1999.** Estudio inmunológico de la cryptosporidiosis humana en Colombia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 270 pp.

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

**Villacorta, I.; Ares, M.E.; Pérez del Molino, L.; Bajo, T. y Fandiño Salorio, L. 1988.** Cryptosporidiosis experimental en ratones. *Revista Ibérica de Parasitología*, **48**: 133-137.

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

**Villacorta-Martínez de Maturana, I.; Ares-Mazás, M.E.; Durán-Oreiro, D. y Lorenzo-Lorenzo, M.J. 1992.** Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3514-3516.

**Viu, M.; Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E. y López-Bernad, F. 2000.** Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, **90**: 163-170.

**Von Richthofen, F. 1886.** Führer für Forschungsreisende. Oppenheim, Berlín, 745 pp.

**Wallace, B.J.; Guzewich, J.J.; Cambridge, M.; Altekrose, S. y Morse, D.L. 1999.** Seafood-associated outbreaks in New York, 1980-1994. *American Journal of Preventive Medicine*, **17**: 48-54.

**Waters, W.R. y Harp, J.A. 1996.** *Cryptosporidium parvum* infection in T-cell receptor (TCR)- $\alpha$ - and TCR- $\delta$ -deficient mice. *Infection and Immunity*, **64**: 1854-1857.

**Wheatley, W.B. 1951.** A rapid staining procedure for intestinal amoeba and flagellates. *American Journal of Clinical Pathology*, **21**: 990-991.

**White, A.C.; Chappell, C.L.; Hayat, C.S.; Kimball, K.T.; Flanigan, T.P. y Goodgame, R.W. 1994.** Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial. *Journal of Infectious Diseases*, **170**: 419-424.

**Widmer, G.; Carraway, M. y Tzipori, S. 1996.** Water-borne *Cryptosporidium*: a perspective from the USA. *Parasitology Today*, **12**: 286-290.

**Widmer, G.; Corey, E.A.; Stein, B.; Griffiths, J.K. y Tzipori, S. 2000.** Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development *in vitro*. *Journal of Parasitology*, **86**: 922-928.

**Wilson, I.G. 1997.** Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3741-3751.

**Woods, K.M.; Tilley, M.; Iseli, A.; Upton, S.J.; Montelone, B.A. y Khrantsov, N.V. 1999.** Sequence of the gene encoding hsp90e from *Cryptosporidium parvum*. *DNA Sequence*, **10**: 339-342.

**Wright, A.C.; Hill, R.T.; Johnson, J.A.; Roghman, M.C.; Colwell, R.R. y Morris, J.G. 1996.** Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 717-724.

**Xiao, L.; Alderisio, K.; Limor, J.; Royer, M. y Lal, A.A. 2000.** Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5492-5498.

**Xiao, L.; Morgan, U.M.; Fayer, R.; Thompson, R.C. y Lal, A.A. 2000a.** *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today*, **16**: 287-292.

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

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

**Yarlett, N.; Martínez, M.P.; Zhu, G.; Keithly, J.S.; Woods, K. y Upton, S.J. 1996.** *Cryptosporidium parvum*: polyamine biosynthesis from agmatine. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **43**: 73S.

**Yeates, C.; Gillings, M.R.; Davinson, A.D.; Altavilla, N. y Veal, D.A. 1997.** PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology*, **25**: 303-307.

**Yoder, J.S.; Blackburn, B.G.; Craun, G.F.; Hill, V.; Levy, D.A.; Chen, N.; Lee, S.H.; Calderon, R.L. y Beach, M.J. 2004.** Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water-United States, 2001-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **53**: 1S-22S.

**Zaalouk, T.K.; Bajaj-Elliott, M.; George, J.T. y McDonald, V. 2004.** Differential regulation of  $\beta$ -defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, **72**: 2772-2779.

**Zerpa, R. y Huicho, L. 1994.** Childhood cryptosporidial diarrhea associated with identification of *Cryptosporidium* sp. in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **13**: 546-548.

**Zhou, L.; Fayer, R.; Trout, J.M.; Ryan, U.M.; Schaefer, F.W. y Xiao, L. 2004.** Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 7574-7577.

**Zhu, G.; Keithly, J.S. y Philippe, H. 2000.** What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*?. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 1673-1681.

**Zhu, G.; Marchewka, M.J. y Keithly, J.S. 2000a.** *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*, **146**: 315-321.

**Zuckerman, U.; Gold, D.; Shelef, G.; Yuditsky, A. y Arman, R. 1997.** Microbial degradation of *Cryptosporidium parvum* by *Serratia marcescens* with high chitinolytic activity. *En: Proceedings of the International Symposium on Waterborne Cryptosporidium*. C. Fricker, J.L. Clancy y P.A. Rochelle (Eds.). American Water Works Association, Denver, pp. 297-304.



RESUMEN



## ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN NATURAL

Durante el período comprendido entre los meses de octubre de 2000 y septiembre de 2001, se investigó la presencia y la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 241 muestras de moluscos bivalvos destinados al consumo humano suministradas por la Unidad de Control de Moluscos del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela. Mediante una técnica de IFD, a la que se incorporó el colorante vital fluorogénico yoduro de propidio, se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 83 muestras (34,4% de contaminación). De ellas, 44 (53,0%) contenían ooquistes potencialmente viables. Considerando el origen de las muestras, se detectó contaminación en 69 de las 203 muestras recogidas en el litoral gallego (34,0% de contaminación y 49,3% de viabilidad ooquistica) y en 14 de las 38 muestras procedentes de otros países de la Unión Europea (36,8% de contaminación y 71,4% de viabilidad ooquistica). Se comprobó una ausencia de correlación ( $\chi^2$ ,  $P=0,20$ ) entre la contaminación por *Cryptosporidium* spp. y el proceso de depuración al que fueron sometidas algunas de las muestras (entre uno y más de 14 días). Tampoco se observó una asociación significativa ( $\chi^2$ ,  $P=0,85$ ) entre los niveles de contaminación microbiológica y de contaminación por *Cryptosporidium* spp. detectados en los moluscos bivalvos analizados.

Previamente a la caracterización molecular de los aislados de *Cryptosporidium* spp., se confirmó la ausencia de inhibidores de la técnica de PCR en el ADN extraído de los moluscos y contaminado con ADN cryptosporidial. Además, utilizando 49 muestras de moluscos bivalvos seleccionadas al azar de las 241 analizadas con anterioridad, se comprobó una asociación significativa (Test Exacto de Fisher,  $P=0,019$ ) entre los resultados obtenidos mediante las técnicas de IFD y de PCR. La combinación de las técnicas de RFLP, clonación y secuenciación del ADN permitió identificar la existencia de *C. parvum* y *C. hominis*, especies actualmente consideradas responsables de la mayoría de las infecciones humanas.

El estudio realizado en muestras hídricas (7 ríos, 16 aguas residuales depuradas y 11 aguas residuales brutas) y en 184 muestras biológicas (mejillón *M. galloprovincialis*)

recogidas en cuatro estuarios (Rías Baixas), importantes zonas de producción de moluscos bivalvos y de interés turístico, demostró una amplia contaminación ambiental por *Cryptosporidium* y *Giardia*. Mediante la técnica de IFD se comprobó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 5 muestras de agua fluvial (71,4%); en 8 aguas residuales depuradas (50,0%); en 7 aguas residuales brutas (63,6%) y en 42 muestras biológicas (22,8%). De igual forma, se detectaron quistes de *Giardia* spp. en 6 muestras fluviales (85,7%); en 14 aguas residuales depuradas (87,5%); en 10 aguas residuales brutas (90,9%) y en 77 muestras de mejillón (41,8%). Se observó una gran variabilidad entre los valores cuantitativos hallados para ambos parásitos y un predominio de *Giardia* spp. vs *Cryptosporidium* spp., no sólo en el tipo de muestra analizada sino también en las concentraciones detectadas, con la salvedad de las muestras biológicas en las que *Cryptosporidium* spp. presentó valores superiores de concentración.

Se demostró un incremento en la contaminación por ambos enteroparásitos a medida que aumentan los niveles de contaminación bacteriana, tanto en la muestra biológica como en la zona de cultivo. Sin embargo, sólo se comprobó una asociación estadísticamente significativa con la existencia de quistes de *Giardia* spp. (Test Exacto de Fisher,  $P=0,026$ ;  $\chi^2$ ,  $P=0,008$ ).

La caracterización molecular de los aislados de *Cryptosporidium* spp. en las muestras ambientales y biológicas, permitió identificar a *C. muris* como la especie contaminante en tres muestras de agua residual depurada; a *C. baileyi* en una muestra de agua residual bruta y a *C. parvum* en la totalidad de las muestras biológicas positivas mediante la técnica de PCR (n=26).

#### ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL

Los estudios de contaminación experimental se realizaron en las instalaciones del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela destinadas al cultivo y mantenimiento de moluscos bivalvos. Se utilizaron semillas de dos especies, *O. edulis* y *T. decussatus*, con un tamaño de valva comprendido entre 5-7 mm (aproximadamente 8 meses de edad) que fueron suministradas por el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (Lugo) y por el Centro de Experimentación en Acuicultura de Couso (A Coruña), pertenecientes a la Red de Centros de Investigación Mariña de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia. Las semillas se mantuvieron a lo largo de los estudios en tanques de 60 litros con agua de mar natural, a una temperatura constante de

15±3°C y con aireación controlada. El alimento consistió en una mezcla formada en igual proporción por cinco especies de microalgas y la contaminación experimental se realizó con distintos aislados de ooquistes purificados de *C. parvum*.

Se evaluó la supervivencia de ooquistes de *C. parvum* captados por las dos especies de moluscos bivalvos anteriormente citadas, comprobándose un fuerte descenso de la viabilidad ooquistica durante los cuatro primeros días del estudio (97% vs 30%). A partir del día cuatro y hasta el día 10 post-contaminación, la pérdida de la viabilidad ooquistica fue progresiva, hasta alcanzar el último día del ensayo valores del 12% y 18% para los ooquistes retenidos por las semillas de almeja y ostra, respectivamente. La inoculación intragástrica de los sedimentos obtenidos de semillas de almeja y de ostra el día 10 post-contaminación a dos camadas de ratones recién nacidos Swiss CD-1, reveló que todos los animales inoculados estaban infectados a los siete días post-inoculación. De igual forma, se comprobó el mantenimiento de la infectividad ooquistica a los 31 días post-contaminación.

Mediante exámenes histológicos se estudió el tránsito de ooquistes de *C. parvum* a través de semillas de almeja *T. decussatus*. Durante los 10 días que duró el ensayo, se visualizaron ooquistes en el intestino: a las 24 horas se cuantificaron más de 10 ooquistes por campo microscópico 40× y en varias ocasiones durante el experimento se observaron entre 5 y 10 ooquistes (días 2; 4; 6; 7; y 10 post-contaminación). En las branquias también se detectaron ooquistes, desde el día 2 hasta el día 8 post-contaminación consecutivamente y siempre en un número no superior a 5 ooquistes por campo microscópico 40×. En este tejido, los ooquistes se localizaron tanto en los espacios interfilamentares como en el mucus branquial. En menor medida, los ooquistes de *C. parvum* se encontraron en el estómago, en los sifones y en el hepatopáncreas. En ningún momento del estudio se observó, mediante las técnicas utilizadas, que las formas parasitarias fuesen internalizadas por células del molusco, manteniéndose los ooquistes libres o mezclados con los contenidos estomacal y/o intestinal, sin atravesar los epitelios branquial y/o gastrointestinal.

Por otra parte, se evaluó la liberación de ooquistes de *C. parvum* a partir de semillas vivas y muertas y su posterior captación por semillas de distinta especie. Cuando se estudió la transmisión de ooquistes entre especies coexistentes vivas, se observó en la especie receptora una disminución en el número de formas parasitarias y un mantenimiento de la viabilidad ooquistica entorno al 20%. Sin embargo, en los estudios de transmisión a partir de semillas muertas, se comprobó una disminución tanto en el número de ooquistes

como en su viabilidad en la especie de molusco receptora, hasta su desaparición antes de finalizar el estudio.

Habiendo comprobado que los moluscos bivalvos representan una potencial fuente de infección humana por *Cryptosporidium* y siendo los mejillones al vapor un plato típico en ciertos países, finalmente se estudió, de forma experimental, si este método culinario inactiva las formas infectantes del parásito. Los resultados obtenidos en ratones lactantes demostraron que el empleo de vapor no elimina totalmente la capacidad infectante de los ooquistes de *C. parvum*.

APÉNDICE



**Tampón fosfato salino (PBS) 0,04M pH 7,2**

Fosfato monopotásico 0,04M	5,65g/l	76 ml
Fosfato disódico 0,04M	5,44 g/l	24 ml
Cloruro sódico 0,04M	2,34 g/l	100 ml
Ajustar a pH 7,2 y conservar a temperatura ambiente.		

**Gradiente de Percoll®**

Las soluciones de Percoll® de distintas densidades se preparan a partir de Percoll® de densidad 1,13 g/l (Sigma-Aldrich Co.) mediante la adición de agua destilada estéril en función del índice de refracción.

Densidad	Índice de refracción	Volumen (ml)	
		Agua	Percoll®
1,01	1,3340	1,9	0,1
1,05	1,3398	1,3	0,7
1,09	1,3460	0,5	1,5
1,13	1,3520	0	2

**Solución verde malaquita al 0,16%**

Verde malaquita (Merck KGaA, Darmstad, Alemania)	0,16 g
Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich Co.)	0,1 g
Agua destilada	100 ml

**Solución de trabajo de 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI)**

DAPI (Sigma-Aldrich Co.)	2 mg
Metanol absoluto	1 ml

**Solución de trabajo de ioduro de propidio (IP)**

IP (Sigma-Aldrich Co.)	1 mg
PBS 0,1M pH 7,2	1 ml

**Tampón de lisis L6 (Severn Biotech Ltd., Kidderminster, Reino Unido)**

Tiocianato de guanidina 10M en Tris-HCl 0,1M (pH 6,4)

EDTA 0,2M (pH 8)

Triton X-100 2% (p/v)

**Tampón de lavado L2 (Severn Biotech Ltd.)**

Tiocianato de guanidina 10M en Tris-HCl 0,1M (pH 6,4)

**Oligonucleótidos utilizados en la primera fase de la amplificación del fragmento del gen cryptosporidial COWP mediante la técnica de PCR (Amar, 2003)**

	Secuencia	Especie/genotipo diana	Posición y número en el GenBank
PCOWPF	(Igual mezcla de 6 oligonucleótidos)		
	5'-GTGTACAGTCTGATACTGCACC-3'	<i>C. andersoni</i>	61-82 en AF266262
		<i>C. muris</i>	58-79 en AF266264
	5'-GTGTACAGTCTGACACTGCACC-3'	<i>C. serpentis</i>	61-82 en AF266275
	5'-GTGTTCAATCAGATACTGCCCC-3'	<i>C. baileyi</i>	61-82 en AF266276
	5'-GCGTACAGTCAGATACTGCTCC-3'	<i>C. felis</i>	61-82 en AF266263
	5'-GTGTTCAATCAGACACAGCTCC-3'	<i>C. meleagridis</i>	419-440 en AF266266
		<i>C. parvum</i>	
		<i>C. hominis</i>	1000-1021 en Z22537
		<i>C. wrairi</i>	61-82 en AF266271
	5'-GTGTACAATCAGATACCGCTCC-3'	<i>C. canis</i>	77-98 en AF266274
PCOWPR	(Igual mezcla de 6 oligonucleótidos)		
	5'-GGACATACTGGTTGTGTTG-3'	<i>C. andersoni</i>	472-490 en AF266262
		<i>C. serpentis</i>	472-490 en AF266275
		<i>C. muris</i>	469-487 en AF266264
	5'-GGACATATAGGTTGAGTTG-3'	<i>C. baileyi</i>	472-490 en AF266276
	5'-GGACATACTGGTTGAGTTG-3'	<i>C. felis</i>	472-490 en AF266263
	5'-GGGCATACAGTTGTGTTG-3'	<i>C. meleagridis</i>	830-848 en AF266266
	5'-GGGCAGACAGTTGAGTTG-3'	<i>C. parvum</i>	
		<i>C. hominis</i>	1411-1429 en Z22537
		<i>C. wrairi</i>	472-490 en AF266271
	5'-GGACAAACAGTTGAGTTG-3'	<i>C. canis</i>	488-506 en AF266274

**Oligonucleótidos utilizados en la segunda fase de la amplificación del fragmento del gen cryptosporidial COWP mediante la técnica de PCR (Amar, 2003)**

	Secuencia	Especie/genotipo diana	Posición y número en el GenBank
PCOWPIF	(Igual mezcla de 5 oligonucleótidos)		
	5'-CCTCCCAACCCTGAATGTCC-3'	<i>C. andersoni</i>	81-100 en AF266262
		<i>C. serpentis</i>	81-100 en AF266275
		<i>C. muris</i>	78-97 en AF266264
	5'-CCACCTAACCCAGAATGTCC-3'	<i>C. baileyi</i>	81-100 en AF266276
	5'-CCACCAAACCCAGAATGTCC-3'	<i>C. felis</i>	81-100 en AF266263
	5'-CCTCCTAATCCAGAATGTCC-3'	<i>C. meleagridis</i>	439-458 en AF266266
		<i>C. parvum</i>	
		<i>C. hominis</i>	1020-1039 en Z22537
		<i>C. wrairi</i>	81-100 en AF266271
	5'-CCACCAAATCCAGAATGTCC-3'	<i>C. canis</i>	97-115 en AF266274
PCOWPIR	(Igual mezcla de 6 oligonucleótidos)		
	5'-GGGCACTCCTTAGCTGGAGC-3'	<i>C. andersoni</i>	402-421 en AF266262
		<i>C. muris</i>	399-418 en AF266264
	5'-GGGCATTCTTAGCTGGAGC-3'	<i>C. serpentis</i>	402-421 en AF266275
	5'-GGACATTCTTTGCAGGAGC-3'	<i>C. baileyi</i>	402-421 en AF266276
	5'-GGACATTCTTTCGAGGAGC-3'	<i>C. felis</i>	402-421 en AF266263
	5'-GGGCATTCTTTGCAGGAGC-3'	<i>C. meleagridis</i>	523-542 en AF266266
		<i>C. parvum</i>	
		<i>C. hominis</i>	1020-1039 en Z22537
		<i>C. wrairi</i>	402-421 en AF266271
	5'- GGGCACTCTTTGCAGGAGC-3'	<i>C. canis</i>	418-437 en AF266274

**Tampón TAE 1x (Bio-Rad Laboratories)**

Tris 40mM

Ácido acético 20mM

EDTA 1mM, pH 8,3

**Placas de agar Luria-Bertani**

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH 7,0; autoclavar, repartir en placas y conservar a 4°C.

**Líquido de elución de los filtros de gomaespuma**

PBS 0,04M, pH 7,2  
Tween<sup>®</sup> 20 (Sigma-Aldrich, Co.) 0,01% (p/v)

**Solución fijadora de Bouin**

Solución saturada de ácido pícrico en agua de mar artificial	75 ml
Formaldehído 40%	25 ml
Ácido acético glacial	5 ml

**Tricrómico de Wheatley**

Cromotrope 2r	0,6 g
Verde brillante (light green SF)	0,15 g
Verde rápido (fast green FCF)	0,15 g
Ácido fosfotúngstico	0,7 g
Ácido acético	10 g
Agua destilada	10 ml

**Solución B**

Etanol 90% al 10% en ácido acético



