

## CRIPTOSPORIDIOSIS

---

### RESUMEN

**Descripción de la enfermedad:** La criptosporidiosis es el trastorno que deriva de la infección por el protozoo *Cryptosporidium*. Tras la infección, el ciclo de vida de *Cryptosporidium*, que incluye fases asexuales y fases sexuales, termina en un único hospedador, produciendo ooquistes esporulados. Existen al menos 32 especies “válidas” de *Cryptosporidium*, algunas de las cuales causan enfermedad en el ser humano, en el ganado, en aves de corral y en aves cinegéticas, así como en animales de compañía. *Cryptosporidium parvum* infecta principalmente el tracto gastrointestinal y causa diarrea en animales de producción antes del destete. La mortalidad suele ser baja, pero en ocasiones pueden tener lugar brotes graves. Los animales destetados y adultos no suelen presentar signos de la enfermedad, pero pueden excretar ooquistes que pueden contaminar el entorno y facilitar la posterior transmisión. *Cryptosporidium parvum* es una de las principales causas de criptosporidiosis humana zoonótica. *Cryptosporidium andersoni* infecta las glándulas digestivas del abomaso de terneros mayores y de ganado bovino adulto, así como de camellos bactrianos. Algunas vacas infectadas presentan una reducción en la producción de leche y una escasa ganancia de peso, pero no diarrea. *Cryptosporidium baileyi* afecta principalmente a las vías respiratorias altas, la bolsa de Fabricio, la cloaca, los riñones y los ojos de aves gallináceas, y ha causado brotes y mortalidades en unidades de producción de aves cinegéticas y de corral. *Cryptosporidium meleagridis* afecta básicamente al íleon de pavipollos y de aves cinegéticas, y puede causar enteritis, diarrea y muerte, y *C. galli* infecta el epitelio superficial, ductal y glandular del proventrículo de gallinas adultas y de ciertas aves salvajes.

**Identificación del agente:** Para establecer un diagnóstico es necesaria la identificación a nivel de laboratorio. Lo habitual es llevar a cabo una observación microscópica de los ooquistes, aplicando a frotis fecales una tinción de Ziehl-Neelsen con solución de alcohol ácido, auramina con fenol o inmunofluorescente. También se utilizan mucho los enzimoanálisis, pero pueden proporcionar poca especificidad. Por otra parte, cada vez se dispone de más pruebas de diagnóstico molecular. La especie infectante no se puede identificar ni por la morfología de los ooquistes ni por el resultado de las pruebas basadas en anticuerpos, pero sí con un análisis del ADN amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La mayoría de casos de criptosporidiosis en ganado mamífero de corta edad están causados por *C. parvum*, que también es la especie zoonótica más importante. No existe ningún proceso de subtipificación estandarizado, pero la secuenciación del gen gp60 podría dar información relevante para el estudio de un brote. Se están elaborando sistemas de subtipificación multilocus pero todavía no están estandarizados. Los ooquistes pueden sobrevivir en entornos húmedos durante muchos meses, y tiene lugar una transmisión mediante el alimento y el agua. No obstante, resulta difícil aplicar la genotipificación a las pequeñas cantidades de ooquistes que por lo general se hallan en el alimento, el agua y el medio ambiente.

**Requisitos para las vacunas:** No se dispone de ninguna vacuna comercial contra la criptosporidiosis.

### A. INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es el trastorno causado por la infección por el protozoo *Cryptosporidium*. La infección del tracto gastrointestinal es la más habitual, y el síntoma más importante es la diarrea. En algunos hospedadores,

sobre todo en las aves, tiene lugar una infección respiratoria. También pueden resultar infectados otros puntos del organismo, algo que también es más frecuente en las aves y en animales inmunocomprometidos.

## 1. Agente causal

La criptosporidiosis está causada por protozoos del género *Cryptosporidium*, que clásicamente se ha clasificado en el filo Apicomplexa, clase Sporozoasida, subclase Coccidiasina, orden Eucoccidiorida y familia *Cryptosporidiidae*. Pero una revisión de la clasificación de los Eucariotas sitúa a *Cryptosporidium* en los siguientes grupos jerárquicos, por orden descendiente: Diaphoretickes; Sar (Stramenopiles, Alveolata y Radiolaria) supergrupo; Alveolata; y por último Conoidasida donde *Cryptosporidium* se clasifica de manera independiente de *Coccidia* y de *Gregarinasina* (Adl et al., 2012). En el momento de redactar este texto (julio de 2015), había 26 especies de *Cryptosporidium* con características biológicas y genéticas descritas formalmente (Tabla 1).

Para establecer un diagnóstico de criptosporidiosis es necesario determinar el género a nivel de laboratorio, pero para diferenciar entre especies y subespecies de *Cryptosporidium* serán necesarios métodos moleculares, puesto que muchos de los tamaños de los ooquistes son similares (Tabla 1) y hay pocos antígenos que permitan distinguir entre especies. En el pasado, muchas “especies” se describían en base a una premisa de especificidad de hospedador que en general era falsa (Fayer, 2010). Se ha observado que en el ganado, las aves de corral y las aves cinegéticas, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. baileyi* y *C. meleagridis* causan morbilidad y brotes de enfermedad. En el ser humano, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* y *C. cuniculus* se consideran las principales especies patógenas causantes de casos esporádicos y de brotes (Tabla 1). La mayoría de casos de criptosporidiosis en mamíferos de producción de corta edad probablemente estén causados por *C. parvum*, que también es la amenaza zoonótica más importante para el ser humano. Además, en los animales se han identificado más de 40 “genotipos” de *Cryptosporidium* a partir de una secuenciación del ADN, pero no se dispone de suficientes datos biológicos para determinar las especies (Fayer, 2010). En el ser humano, también se han hallado alguna vez el genotipo I de caballo, mofeta y ardilla, y el genotipo del mono *C. hominis*.

Para *C. molnari* y para especies y genotipos similares a los de *Cryptosporidium* que infectan a los peces se ha propuesto un nuevo género, denominado *Piscicryptosporidium*, aunque se precisa una mayor caracterización genética y biológica para determinar si *Piscicryptosporidium* es un género válido.

Tabla 1. Diferencias entre las especies del género *Cryptosporidium*

Especies de <i>Cryptosporidium</i>	Tamaño medio de los ooquistes (µm) <sup>a</sup>	Principal/es hospedador/es	Lugar de infección habitual	Infecciones observadas en seres humanos
<i>C. andersoni</i>	7.4 × 5.5	Ganado bovino	Estómago	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. baileyi</i>	6.2 × 4.6	Aves de corral	Vías respiratorias altas	No
<i>C. bovis</i> (anteriormente, genotipo bovino B)	4.9 × 4.6	Ganado bovino	Intestino delgado	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. canis</i> (anteriormente, genotipo canino)	5.0 × 4.7	Perros	Intestino delgado	Sí, en ocasiones
<i>C. cichlidis</i> (anteriormente, genotipo 1 o de tipo <i>C. molnari</i> )	4.6 × 4.4	Tilapia	Estómago	No
<i>C. cuniculus</i> (anteriormente genotipo de los conejos)	5.6 × 5.4	Conejos, humanos	Intestino delgado	Sí, en ocasiones. Un brote transmitido por agua
<i>C. ducismarci</i>		Tortugas	Intestino	No
<i>C. erinacei</i>	4.9 × 4.4	Erizos	Intestino delgado	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. fayeri</i> (anteriormente genotipo marsupial I)	4.9 × 4.3	Marsupiales	Intestino	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. felis</i>	4.6 × 4.0	Gatos	Intestino delgado	Sí, en ocasiones
<i>C. fragile</i>	6.2 × 5.5	Sapo de púas negras	Estómago	No

Especies de <i>Cryptosporidium</i>	Tamaño medio de los ooquistes ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	Principal/es hospedador/es	Lugar de infección habitual	Infecciones observadas en seres humanos
<i>C. galli</i>	8.3 × 6.3	Pollos	Proventrículo	No
<i>C. hominis</i> (anteriormente denominado genotipo humano <i>C. parvum</i> , genotipo 1, y genotipo H)	4.9 × 5.2	Humanos	Intestino delgado	Sí, a menudo. Se comunican brotes con frecuencia
<i>C. huwi</i>	4.6 × 4.4	Guppy	Estómago	No
<i>C. macropodum</i> (anteriormente marsupial genotipo II)	5.4 × 4.9	Canguro gris oriental	Intestino	No
<i>C. meleagridis</i>	5.2 × 4.6	Aves, mamíferos	Intestino	Sí, la frecuencia depende del contexto. Un brote relacionado con una explotación y uno relacionado con un colegio
<i>C. molnari</i>	4.7 × 4.5	Espáridos	Intestino	No
<i>C. muris</i>	7.0 × 5.0	Roedores	Estómago	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. parvum</i> (a veces también se denomina genotipo bovino, genotipo II, y genotipo B)	5.0 × 4.5	Humanos, ganado mamífero no destetado	Intestino delgado	Sí, a menudo y se comunican brotes con frecuencia
<i>C. proliferans</i>	7.7 × 5.3	Roedores	Estómago	No
<i>C. ryanae</i> (anteriormente genotipo de tipo ciervo)	3.7 × 3.2	Ganado bovino		No
<i>C. reichenbachklinkei</i> (anteriormente genotipo piscine 2)	3.4 × 3.4	Gurami	Estómago	No
<i>C. rubeyi</i>	4.7 × 4.3	Ardillas de tierra		No
<i>C. scrofarum</i> (anteriormente genotipo porcino II)	5,2 × 4,8	Cerdos	Intestino delgado	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. serpentis</i>	6,2 × 5,3	Reptiles	Estómago	No
<i>C. suis</i> (anteriormente genotipo porcino I)	4,6 × 4,2	Cerdos	Intestino delgado	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. tyzzeri</i> (anteriormente mouse genotipo I)	4,6 × 4,2	Ratones	Intestino delgado	Sí, pero muy infrecuentes
<i>C. ubiquitum</i> (anteriormente cervine genotipo)	5,0 × 4,7	Varios mamíferos	Intestino delgado	Sí, en ocasiones
<i>C. viatorum</i>	5,4 × 4,7	Humanos		Sí, en ocasiones
<i>C. varanii</i> (syn. <i>C. saurophilum</i> )	4,8 × 4,7	Reptiles	Intestino	No
<i>C. wrairi</i>	5,4 × 4,6	Cobayas	Intestino delgado	No
<i>C. xiaoi</i> (anteriormente genotipo de tipo <i>C. bovis</i> o <i>C. bovis</i> procedente de ovejas o <i>C. agni</i> )	3,9 × 3,4	Ovejas, cabras		No

<sup>a</sup>Extraído de los artículos originales en los que se describen las especies.

## 2. Descripción de la enfermedad en los animales

Santin (2013) llevó a cabo una revisión sobre las infecciones clínicas y subclínicas en los animales.

*Cryptosporidium parvum* es una causa importante de diarrea en animales de producción de corta edad antes del destete, como terneros, corderos, cabritos, alpacas y potros. Además de los problemas relacionados con el bienestar animal, conduce a consecuencias negativas para la productividad. Animales adultos sanos también pueden excretar ooquistes, a menudo en grandes cantidades, constituyendo así un posible reservorio para la infección y la contaminación medioambiental.

Las infecciones por *Cryptosporidium parvum* en el ganado bovino se consideran endémicas a nivel mundial. La prevalencia y la gravedad de la enfermedad son máximas durante la segunda semana de vida. Los estadios endógenos infectan los enterocitos de la parte distal del intestino delgado, del ciego y del colon. Las principales alteraciones anatomopatológicas son atrofia de vellosidades, acortamiento de microvellosidades y desprendimiento de enterocitos. Los animales afectados suelen recuperarse en un plazo máximo de 2 semanas tras la aparición de los signos de enfermedad. Los signos clínicos pueden abarcar desde una infección entre leve y subclínica, en los animales de más edad, hasta una diarrea grave en los más jóvenes, y puede causar distintos grados de deshidratación, abatimiento, anorexia, fiebre y pérdida de condición corporal. En general, la mortalidad es baja a no ser que la enfermedad tenga lugar en forma de infección mixta con otros agentes patógenos, como *Escherichia coli* o rotavirus, aunque se pueden observar brotes graves de criptosporidiosis.

Las infecciones por *Cryptosporidium parvum* de los pequeños rumiantes (ovejas y cabras) suelen causar una diarrea neonatal que en ocasiones se relaciona con una alta mortalidad y morbilidad, sobre todo en el caso de infección concomitantes o carencias nutricionales y de manejo. En las yeguas, se ha observado un aumento de la excreción de ooquistes en el periodo periparto.

Aunque *C. parvum* parece ser patógeno para los lechones, y causar falta de apetito, abatimiento, vómitos o diarrea, *C. suis* y *C. scrophaeum* son las especies más frecuentes. No obstante, la infección natural no parece conducir a enfermedad, y los signos clínicos de criptosporidiosis en los cerdos parecen estar relacionados con una infección por distintas especies o genotipos de *Cryptosporidium* o con una infección simultánea por otros enteropatógenos.

El ganado y los animales de compañía también pueden resultar infectados por otras especies de *Cryptosporidium*.

En los terneros, después del destete por lo general *Cryptosporidium bovis* y *C. ryanae* son más frecuentes que *C. parvum*, pero las infecciones por estas especies del ganado bovino adaptadas al hospedador todavía no se han asociado a enfermedad ni a signos histológicos o anatomopatológicos. *Cryptosporidium andersoni* coloniza las glándulas digestivas del abomaso de terneros de más edad y de ganado bovino adulto. El ganado bovino infectado no presenta diarrea pero puede excretar ooquistes durante varios meses. Algunas reses infectadas presentan una menor ganancia de peso que los animales control no infectados, y en un estudio se comprobó que en las vacas lecheras la infección puede interferir con la producción de leche.

*Cryptosporidium ubiquitum* y *C. xiaoi* infectan a corderos y cabritos. *Cryptosporidium ubiquitum* es prevalente en corderos post-destetados, y existe un informe de participación de *C. parvum* en brotes de diarrea, y en un estudio los corderos con *C. ubiquitum* presentaban mayores puntuaciones de consistencia fecal. La infección por *Cryptosporidium xiaoi* se ha relacionado con brotes de diarrea neonatal en cabritos.

*Cryptosporidium canis* es la especie que con mayor frecuencia infecta a los perros y, aunque la infección suele ser asintomática, se ha relacionado con diarrea grave, malabsorción y pérdida de peso, sobre todo en los animales más jóvenes.

*Cryptosporidium felis* es la especie que con mayor frecuencia infecta a los gatos, a menudo en ausencia de signos clínicos, aunque en algunos casos la infección se ha relacionado con diarrea persistente. Es más probable que los gatos con otros parásitos entéricos, o infectados por el virus de la leucemia felina, desarrollen criptosporidiosis, y esta deberá incluirse en el diagnóstico diferencial de todos los casos de diarrea felina crónica.

*Cryptosporidium* es un agente patógeno primario de pollos, pavos y codornices, y causa una enfermedad respiratoria y/o intestinal que comporta morbilidad y mortalidad. Las aves de corral pueden resultar afectadas por tres posibles especies: *C. baileyi*, *C. meleagridis* and *C. galli*, según las revisiones de Current (1997) y Ryan (2010).

*Cryptosporidium baileyi* suele infectar las vías respiratorias altas, aunque el tracto renal, la bolsa de Fabricio y la cloaca, mientras que la tráquea y la conjuntiva son lugares de infección menos frecuentes. La infección intestinal no suele dar lugar a lesiones macroscópicas ni a signos manifiestos de enfermedad, pero la criptosporidiosis de los pollos y de las aves cinegéticas, como el lagópodo común, pueden dar lugar a una morbilidad grave y, en ocasiones, a mortalidad. Inicialmente, la enfermedad grave cursa con estornudos y tos, seguidos de extensión de la cabeza para facilitar la respiración. Las principales alteraciones anatomopatológicas relacionadas con esta enfermedad en los pollos de corta edad son la desciliación e hiperplasia de las células epiteliales, un engrosamiento de la mucosa y la secreción de un exudado mucocelular hacia el interior de las vías respiratorias.

Los signos graves de enfermedad respiratoria pueden durar hasta 4 semanas tras la infección. La criptosporidiosis de los pavos, causada por *Cryptosporidium baileyi*, es similar a la que se observa en los pollos. Las cepas de *C. baileyi* aisladas de pollos causan infección en otras aves. Se ha observado criptosporidiosis respiratoria e intestinal en codornices de producción causada por *C. baileyi*, con unas alteraciones anatomopatológicas similares a las que se describen en los pollos. Infectar a pollos por vía oral con 100 ooquistes de *C. baileyi* puede dar lugar a una criptosporidiosis intestinal (Current, 1997).

*Cryptosporidium meleagridis* infecta a pavos, a otras aves de corral y al ser humano. Las principales alteraciones anatomopatológicas son atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas y acortamiento de microvellosidades.

*Cryptosporidium galli* causa enfermedad en las gallinas adultas y en algunas aves salvajes y exóticas. A diferencia de las fases del ciclo de vida de *C. meleagridis* y de *C. baileyi*, la infección por *C. galli* se limita a las células epiteliales del proventrículo. Los signos clínicos consisten en un erizado del plumaje, en el hecho de que el ave esconda la cabeza bajo el ala, la sensibilidad a los estímulos externos y retrasos en el crecimiento. La histopatología de cortes de pinzones teñidos con hematoxilina/eosina ha puesto de manifiesto una necrosis e hiperplasia de las células epiteliales glandulares del proventrículo, así como una infiltración de células inflamatorias mixta hacia el interior de la lámina propia del proventrículo, relacionada con grandes cantidades de ooquistes adheridos a la superficie de las células epiteliales glandulares.

Los brotes de esta enfermedad en aves cinegéticas (como faisanes, perdices o lagópodos) indican que la criptosporidiosis debe incluirse en el listado de enfermedades respiratorias y entéricas respecto a las cuales se realizan pruebas en estas aves. Pueden hallarse tanto *C. meleagridis* como *C. baileyi*.

No se sabe qué grado de importancia tienen las infecciones por *Cryptosporidium* para la acuicultura y el bienestar animal, aunque en se ha observado morbilidad y mortalidad en criaderos en los que había una alta prevalencia de la infección (Garbor *et al.*, 2011).

### 3. Riesgo para la salud humana

Según la revisión publicada por Chalmers y Davies (2010), la criptosporidiosis humana suele ser una enfermedad gastrointestinal aguda y autolimitante que se caracteriza por una diarrea acuosa, rampas abdominales, vómitos, fiebre baja y pérdida de apetito. Los síntomas pueden durar hasta 1 mes, durante el cual tienen lugar recaídas en alrededor de un tercio de los casos. La infección por *Cryptosporidium* se ha asociado a secuelas a largo plazo, pero se precisa más investigación. Los pacientes con inmunodeficiencia grave pueden sufrir una criptosporidiosis crónica, grave e intratable que conduzca a una mortalidad considerable. En los niños con malnutrición, la infección causa una morbilidad y una mortalidad considerables (Kotloff *et al.*, 2013). Además de las especies zoonóticas de *Cryptosporidium* (Tabla 1), *C. hominis* también es una causa importante de enfermedad gastrointestinal en el ser humano. Aunque sí se dispone de algunos datos sobre las infecciones por *C. hominis* en los ganados bovino y ovino, no existen pruebas de que esta infección se mantenga en los rebaños o manadas o de que se transmita entre estos, así como tampoco de signos clínicos en los animales.

### 4. Transmisión

La transmisión tiene lugar por vía feco-oral y en ella pueden intervenir elementos como alimento o agua de bebida contaminados. *Cryptosporidium parvum* es muy infeccioso para ganado de corta edad y personas jóvenes; el ganado de más edad puede quedar infectado y excretar ooquistes que podrán transmitirse a otros hospedadores susceptibles. La transmisión de *C. hominis* se considera antroponótica. La infectividad de cada cepa es distinta, y la susceptibilidad está influida por factores relacionados con el hospedador (Borad y Ward 2010; Flores y Okhuysen, 2009; Yang *et al.*, 2010). En modelos de dosis-respuesta se observa que existe una probabilidad alta de infección de personas y de ganado aun no destetado por cifras muy bajas de ooquistes de *C. parvum*, y también que existe una relación entre los anticuerpos pre-existentes y la protección frente a la infección.

Los ooquistes pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo (más de 6 meses) en entornos fríos y húmedos, así como en fómites, como las puertas, equipamiento y utensilios de las explotaciones. Los ooquistes se pueden transmitir tras un contacto directo con heces de un animal infectado, o por el contacto con fómites contaminados, o por ingestión de alimento o agua contaminados. Las prácticas ganaderas que probablemente potenciarán la transmisión de la criptosporidiosis son los partos de vacas u ovejas en el interior de las instalaciones y la alimentación y cuidado de múltiples neonatos de forma conjunta, en cuyas condiciones se producirá un contacto directo entre animales de muy corta edad susceptibles y animales infectados. Puede producirse una transmisión entre madres clínicamente normales y neonatos lactantes, pero se sabe poco acerca de la intervención de los portadores. Si las heces, el estiércol de los establos y otros residuos contaminados se desechan en forma de vertederos de campo y los purines se esparcen, tras periodos de intensas lluvias o una vez se derrita la nieve puede tener lugar una contaminación por ooquistes de los cursos de agua y de los suministros de agua de bebida.

Ciertos mamíferos salvajes pueden actuar como hospedadores de *Cryptosporidium* spp. (Fayer, 2010; Xiao *et al.*, 2004), pero se sabe poco acerca de la importancia de su intervención en la transmisión de la infección al ganado en entornos pecuarios o del mantenimiento de dicha infección (Sturdee *et al.*, 1999). Los animales infectados en condiciones normales por especies de *Cryptosporidium* adaptadas al hospedador pueden actuar como vectores de otras especies, como *C. parvum*.

## 5. Diagnósticos diferenciales

Los diagnósticos diferenciales de *Cryptosporidium* son otros enteropatógenos que causan diarrea. Puede haber muchos, como otros parásitos, rotavirus, coronavirus, cepas patógenas de *E. coli* o *Salmonella* spp. La criptosporidiosis del ganado se confirma cuando se hallan cantidades significativas de ooquistes en heces diarreicas en ausencia de otros agentes patógenos, y aunque a menudo se ha supuesto que una co-infección puede conducir a una criptosporidiosis más grave (Lorenz *et al.*, 2011), no se dispone de ningún dato que respalde esta hipótesis. Las alteraciones gastrointestinales también pueden derivar de causas no infecciosas, como la enfermedad intestinal inflamatoria, en el caso del ser humano.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 2.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la criptosporidiosis y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
Microscopía convencional	n/a	n/a	n/a	+++	++	n/a
FAT	n/a	n/a	n/a	+++	++	n/a
Detección de antígeno por IC	n/a	n/a	n/a	+	+	n/a
Detección de antígeno por ELISA	n/a	n/a	n/a	+++	+++	n/a
PCR	n/a	n/a	n/a	+++	+++	n/a
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
Detección de anticuerpos por ELISA	n/a	n/a	n/a	n/a	++	n/a

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

FAT = prueba de fluorescencia directa; IC = inmunocromatografía;

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1 Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

## 1. Introducción a las pruebas disponibles

La confirmación de la infección suele realizarse a partir de la detección microscópica de ooquistes de *Cryptosporidium* en las heces (Casemore, 1991). Este microorganismo también se puede detectar en muestras de líquido intestinal, tejido o biopsias; asimismo, se pueden detectar antígenos en heces o líquido intestinal, y ácido nucleico mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de heces, líquido intestinal, tejido o biopsias. Para el diagnóstico histológico en biopsias o para la confirmación del diagnóstico postmórtem se puede emplear la tinción de hematoxilina/eosina.

La identificación a nivel de especie suele realizarse mediante una prueba de laboratorio de referencia, cuyo método habitual es la secuenciación del gen rRNA de la subunidad pequeña (SSU). Se emplean sistemas de subtipificación en estudios epidemiológicos de infecciones por *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* y *C. ubiquitum*. La diana genética habitual es el gen gp60. No existe ningún esquema de subtipificación multilocus estandarizado, y aunque se han descrito la secuenciación y el análisis del tamaño del fragmento de marcadores minisatélite y microsátélite (Xiao, 2010), deben armonizarse los algoritmos de selección, análisis y relación del marcador (Widmer y Caccio, 2015).

No se dispone de ninguna técnica de cultivo *in vitro* reproducible para amplificar la cantidad de parásitos antes de la identificación.

Las pruebas serológicas no son adecuadas para el diagnóstico, pero pueden emplearse para los estudios seroepidemiológicos de exposición.

## 2. Identificación de *Cryptosporidium*

### 2.1. Inocuidad y calidad

*Cryptosporidium* constituye un riesgo de laboratorio, de tal forma que todos los procedimientos de laboratorios que puedan generar aerosoles infecciosos deben realizarse en una cabina de bioseguridad. Las muestras pueden contener otros microorganismos patógenos y deben procesarse de acuerdo con este hecho. Para salvaguardar la salud de los trabajadores del laboratorio, todas las manipulaciones que se realicen en el mismo deben ejecutarse conforme a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se determinará a partir de un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

### 2.2. Obtención y envío de las muestras

Durante la infección aguda deben tomarse muestras para el diagnóstico preliminar. Si se sospecha que solo hay *Cryptosporidium*, la conservación a corto plazo de las heces a 4°C es adecuada porque permitirá mantener la morfología y la estructura antigénica de los ooquistes. También pueden conservarse durante más tiempo, pero entonces deberá hacerse a -20°C. Como alternativa, puede añadirse un volumen equivalente de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> al 5% para facilitar la conservación a temperatura ambiente. No obstante, si en el diagnóstico diferencial se incluyen otros parásitos, sobre todo trofozoítos, las heces deben examinarse cuanto antes. El deterioro de la morfología de otros estadios parasitarios y el sobrecrecimiento por otros microorganismos, sobre todo levaduras, puede reducirse añadiendo conservantes como formalina acuosa al 10% (v/v), mertiolato-yodo-formaldehído (MIF), acetato de sodio-ácido acético-formalina (SAF) y alcohol polivinílico (PVA). Debe plantearse la posibilidad de realizar pruebas de compatibilidad de los conservantes; por ejemplo, la formalina y el SAF en general son compatibles con los kits de enzimoimmunoanálisis (ELISA) y de inmunocromatografía (IC), pero deben consultarse las instrucciones de los fabricantes. Los conservantes pueden interferir con las pruebas basadas en PCR; las muestras fecales se pueden conservar en alcohol etílico al 90% para una posterior PCR. Las heces en conservante pueden requerir una concentración mediante un método reconocido antes de proceder a la microscopía, pero no resultará adecuada si se emplean kits de ELISA o de IC porque durante el proceso pueden perderse los antígenos solubles. Algunas heces pueden precisar un procesado adicional; por ejemplo, las heces muy líquidas pueden tener que concentrarse, las que contienen gran cantidad de grasas puede precisar un desengrasado, las mucoides puede precisar un tratamiento con KOH o ditiotreitól, y las ricas en fibra pueden precisar un tamizado para eliminar fibras.

Los procedimientos de empaquetado y envío de las muestras deben llevarse a cabo según lo que describen los Reglamentos de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA, 2003) para el transporte de mercancías peligrosas. Estos reglamentos se resumen en el Capítulo 1.1.2. *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico* y en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*.

## 2.3. Microscopía: preparación y tinción de las muestras

### 2.3.1. Preparación de frotis fecales (o de líquidos corporales adecuados)

Para la preparación de frotis, la mayoría de muestras no conservadas pueden depositarse directamente sobre portas antes de la tinción. Cada vez que se lleve a cabo este procedimiento, deberá incluirse un porta control positivo.

#### 2.3.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se debe trabajar con indumentaria protectora y guantes desechables. Se anota el número de referencia de la muestra en un porta con un rotulador indeleble<sup>2</sup>, y se emplea un porta distinto para cada muestra. En el caso de las heces con forma, se deposita 1 gota de solución salina (unos 50 µl) en el centro del porta.
- ii) En el caso de las heces líquidas (u otro líquido corporal adecuado) se deposita una gota (de unos 20 µl) directamente sobre el porta. En el caso de las heces con forma, se emplea la punta de un palito de madera limpio para tomar alrededor de 2 mg de muestra<sup>3</sup> y se emulsiona en la solución salina mezclando enérgicamente.
- iii) Se prepara un medio para frotis grueso con zonas de distintos grosores. Se debe asegurar que el frotis sea de la transparencia adecuada<sup>4</sup>.
- iv) El frotis se seca al aire a temperatura ambiente.
- v) Se fija el frotis<sup>5</sup> en metanol durante 3 minutos.
- vi) Se tiñe aplicando las técnicas de Ziehl–Neelsen o de auramina-fenol, como se describe más adelante.

### 2.3.2. Concentración de ooquistes por flotación a partir de muestras conservadas o líquidas

#### 2.3.2.1. Preparación de la solución de flotación

Para separar los ooquistes de los restos fecales se pueden emplear soluciones de sacarosa, sulfato de zinc o cloruro de sodio.

##### 2.3.2.1.1. Preparación de la solución de sacarosa o sulfato de zinc

Se prepara una solución de sacarosa (gravedad específica de 1,18) en un vaso de precipitados añadiendo 256 g de sacarosa a 300 ml de agua desionizada o bien una solución de sulfato de zinc (gravedad específica de 1,18) en un vaso de precipitados añadiendo 100 g de sulfato de zinc a 300 ml de agua desionizada. Se calienta la solución suavemente (<60°C) y se remueve continuamente sobre un agitador de placa caliente hasta que la sacarosa o el sulfato de zinc se hayan disuelto por completo. Esta solución se pone sobre hielo o en la nevera hasta que llegue a 4°C. Una vez enfriada, se vierte en una probeta de 500 ml y se ajusta la gravedad específica hasta 1,18 añadiendo suficiente agua desionizada fría (4°C). La solución se vierte a un frasco de vidrio con tapa de rosca, se etiqueta indicando la fecha y las iniciales y se conserva a 4°C hasta su uso.

##### 2.3.2.1.2. Preparación de una solución de sal saturada

Se prepara una solución de sal saturada (gravedad específica de 1,2) añadiendo unos 200 g de cloruro de sodio a 200 ml de agua desionizada. Esta solución se calienta suavemente (<60°C) y se remueve continuamente sobre un agitador de placa caliente. Se añaden pequeñas cantidades adicionales de cloruro de sodio (unos 10 g) a intervalos de 10 minutos hasta que la solución se sature. La solución de sal saturada se vierte en un frasco de vidrio limpio y se deja en el congelador o en una nevera hasta que llegue a los 4°C. La solución enfriada se vierte en una probeta de 500 ml y su gravedad específica se ajusta a 1,2 añadiendo agua desionizada fría (4°C). La solución de sal saturada se vierte en un frasco de vidrio con tapa de rosca, se etiqueta indicando la fecha y las iniciales y se conserva a 4°C hasta su uso.

---

2 Como alternativa, para marcar la parte grabada (esmerilada) de un porta de vidrio se puede emplear un lápiz.

3 En el caso de las heces sólidas, la muestra debe incluir partes tanto de la superficie como del interior de las heces.

4 Para este procedimiento se recomienda utilizar frotis moderadamente gruesos. Si el frotis es demasiado delgado o demasiado grueso, los ooquistes no se detectarán. Se puede considerar que un grosor aceptable es aquel a través del cual se pueden leer las manecillas del reloj o el texto impreso de esta página.

5 Los frotis fijados en metanol y secados al aire se pueden conservar a temperatura ambiente durante más de 6 meses antes de su tinción.



Como alternativa, puede emplearse un método frío; para saturar 4 litros de agua desionizada se precisan unos 1,5 kg de cloruro de sodio, y el cloruro de sodio debe añadirse en pequeñas cantidades con cuidado de no detener el agitador magnético y de mantener enérgica la agitación de la solución. Se sigue añadiendo cloruro de sodio hasta que se alcanza una gravedad específica de 1,2. La solución de sal saturada se vierte en frascos de vidrio con tapa de rosca, que se etiquetarán con la fecha y las iniciales y se conservarán a 4°C hasta su uso.

Antes de utilizar esta solución, debe mezclarse bien por inversión y dejar que repose durante 5 minutos.

### 2.3.2.2. Recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium* por flotación en centrífuga

#### 2.3.2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se debe trabajar con indumentaria protectora y guantes desechables. Se transfieren 1 a 2 g de heces<sup>6</sup> con un palito de madera o se pipetea 1 a 2 ml de heces líquidas en 10 ml de solución de flotación que se encontrarán en un tubo de centrífuga de 15 ml, y se mezclan enérgicamente.
- ii) La centrífuga se sitúa sobre una encimera con los portamuestras desplegados, se añade un tubo de compensación de peso, si es necesario, y se centrifuga a 1100 **g** durante 5 minutos<sup>7</sup>.
- iii) Se retiran los 2 ml de líquido del menisco (que contienen los ooquistes), se lavan 3 veces en agua desionizada y, por último, se suspenden en un volumen mínimo de agua desionizada.
- iv) El contenido re-suspendido se transfiere a un porta con una pipeta desechable, y se seca al aire.

### 2.3.3. Concentración de ooquistes por sedimentación en muestras conservadas o líquidas

Topos los pasos que puedan generar aerosoles (excepto la centrifugación) deben realizarse en una cabina de seguridad con protección para el técnico.

#### 2.3.3.1. Procedimiento analítico

- i) Se toma una muestra de entre 500 mg y 1 g de heces<sup>8</sup> con un palito de madera<sup>9</sup> y se deposita en un tubo de centrífuga limpio de 12-15 ml que contenga 7 ml de formalina al 10%. Si las heces son líquidas, se depositan alrededor de 750 µl en el tubo de centrífuga.
- ii) Se deshace bien la muestra y se emulsiona con el palito de madera.
- iii) La suspensión obtenida se filtra a través de un tamiz<sup>10</sup> de tal forma que caiga en un vaso de precipitados, y a continuación el filtrado se vierte de nuevo en el mismo tubo de centrífuga.
- iv) Se añaden 3 ml de acetato de etilo<sup>11</sup> a la solución formalinizada, la boca del tubo se sella con un tapón de caucho y la mezcla se agita enérgicamente durante 30 segundos. Durante este procedimiento, el tubo se invierte unas pocas veces y la presión generada se libera con cuidado retirando lentamente el tapón de caucho.
- v) El tubo se centrifuga a 1100 **g** durante 2 minutos<sup>12</sup>.
- vi) Se desprende el tapón de grasa con un palito de madera pasando el palito entre la pared interna del tubo y el tapón. Se desecha el tapón y el líquido que queda tanto por encima

---

6 En el caso de las heces sólidas, la muestra debe incluir partes tanto de la superficie como del interior de las heces.

7 Las velocidades de centrifugación superiores a 1100 **g** durante periodos de más de 5 minutos no son aconsejables porque algunos parásitos podrían deformarse o romperse y aplastarse.

8 Equivale al tamaño de un guisante.

9 La muestra debe incluir partes tanto de la superficie como del interior de las heces sólidas.

10 Un poro de 425 µm y un diámetro de 38 mm son los parámetros correspondientes a la malla 36 del sistema British Standard (BS 410-86) y a la malla 40 del sistema American Standard (ASTM E11-81). El borde del tamiz debe ajustarse perfectamente al borde del vaso de precipitados. Entre muestra y muestra, debe lavarse a fondo con agua de grifo abierto tanto el tamiz como el vaso.

11 Aunque el acetato de etilo es menos inflamable que el dietiléter, que se utilizaba antes, sigue siendo inflamable y por lo tanto el procedimiento debe realizarse en zonas bien ventiladas, y con la seguridad de que no haya llamas expuestas. Debe evitarse la inhalación y el contacto con la piel prolongados.

12 Las velocidades de centrifugación superiores a 1100 **g** durante periodos de más de 5 minutos no son aconsejables porque algunos parásitos podrían deformarse o romperse y aplastarse

como por debajo del mismo invirtiendo el tubo y conservando solo la última o las dos últimas gotas. Como este líquido contiene acetato de etilo, debe desecharse en un recipiente para residuos líquidos identificado y que pueda volver a sellarse.

- vii) El precipitado<sup>13</sup> se vuelve a suspender mediante agitación. El contenido re-suspendido se transfiere a un porta con una pipeta desechable, y se seca al aire.

Existen dispositivos comerciales para la concentración de huevos y larvas de helmintos y quistes y ooquistes de protozoos en los que se emplea el método de la formalina-éter.

## 2.3.4. Métodos de tinción

### 2.3.4.1. Tinción de Ziehl–Neelsen modificada (mZN)

- i) Carbol fucsina fuerte

Se disuelven 20 g de fucsina básica en 200 ml de metanol absoluto y se mezclan en un agitador magnético hasta que se disuelven. Se añaden 125 ml de fenol líquido (reactivo para propósitos generales [GPR; al 80% en agua destilada (p/p)]) con cuidado hasta que se mezclen bien, y se obtiene el volumen final con 1675 ml de agua desionizada. Se mezcla bien. Se filtra antes de su uso a través de un papel de filtro nº 1 de Whatman para eliminar los restos y se conserva en un frasco para reserva de reactivo. Se etiqueta con la fecha y las iniciales. Esta reserva de reactivo se conserva en un armario a oscuras a temperatura ambiente. También los hay a la venta. Cualquier concentración de fucsina básica de entre el 1% y el 3% es aceptable.

- ii) Metanol ácido al 1%

Se añaden con cuidado 20 ml de ácido clorhídrico concentrado a 1980 ml de metanol absoluto y se mezcla. Se transfiere a un frasco para reserva de reactivo, que se etiqueta con fecha e iniciales. Estas preparaciones también pueden comprarse.

- iii) Verde de malaquita al 0,4%

Se añaden 2 g de verde de malaquita a 480 ml de agua desionizada y se mezclan en un agitador magnético. Se filtra a través de papel de filtro nº 1 de Whatman de tal forma que caiga en un frasco para reserva de reactivo, que se etiqueta con fecha e iniciales. Estas preparaciones también pueden comprarse

#### 2.3.4.1.1. Procedimiento analítico

Cada vez que se lleve a cabo este procedimiento deberá incluirse un porta control positivo.

- i) Se debe trabajar con indumentaria protectora y guantes desechables. El frotis<sup>14</sup> secado al aire se fija en metanol durante 3 minutos.
- ii) Se sumerge o inunda el porta en carbol-fucsina fuerte frío y se tiñe durante 15 minutos.
- iii) Se enjuaga bien el porta en agua de grifo.
- iv) Se decolora en metanol ácido al 1% durante 10-15 segundos<sup>15</sup>.
- v) Se enjuaga el porta en agua de grifo.
- vi) Se aplica una contratinción con verde de malaquita al 0,4% durante 30 segundos.
- vii) Se enjuaga el porta en agua de grifo
- viii) Se seca el porta al aire.
- ix) Se examina para comprobar si contiene ooquistes observándolo de manera sistemática con un objetivo de x40 en un microscopio de campo claro. La presencia de ooquistes se confirma con objetivos de aceite de inmersión<sup>16</sup>.
- x) Se mide el tamaño y se comprueba la forma de los elementos teñidos de rojo empleando una retícula calibrada en el ocular.

13 Un precipitado demasiado grande indica alguna de las siguientes situaciones: que la centrifugación se ha realizado a una velocidad o durante un tiempo superiores a los recomendados, que se realizó una agitación insuficiente (paso iv), o que se ha tomado una muestra de heces demasiado grande.

14 Para este procedimiento se recomienda trabajar con frotis moderadamente gruesos.

15 Debe evitarse retirar en exceso la tinción.

16 El frotis se puede examinar con o sin cubreobjetos.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se tiñen de rojo sobre un fondo verde claro. El grado y proporción de la tinción varía en función de cada ooquiste. Además, las estructuras internas captan la tinción en grados variables. Algunas adquieren un aspecto amorfo, mientras que otras pueden presentar las características formas de media luna de los esporozoítos. Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* tienen aspecto de disco y miden 4–6 µm de diámetro. Los restos de levaduras y fecales se tiñen de un color rojo apagado. Algunas esporas bacterianas también pueden teñirse de rojo, pero estas son demasiado pequeñas como para causar confusión.

#### 2.3.4.2. Auramina-fenol

##### i) Auramina fenol (AP)

Se disuelven 3 g de fenol en 100 ml de agua desionizada y, lentamente, 0,3 g de Auramina O. Se filtra a través de un papel de filtro nº 1 de Whatman de tal forma que caiga en un frasco para reactivo de reserva. Este reactivo de reserva se etiqueta con fecha e iniciales. Se conserva a temperatura ambiente en un frasco de vidrio opaco con una tapa hermética. También resultan aceptables ciertas tinciones comerciales, como el reactivo de Lempert. Estas preparaciones también pueden comprarse.

##### ii) Metanol ácido al 3%

Se añaden con cuidado 60 ml de ácido clorhídrico concentrado a 1940 ml de metanol absoluto y se mezclan. Se transfiere a un frasco para reactivo de reserva, que se etiqueta con fecha e iniciales. También existen preparaciones comerciales.

##### iii) Permanganato de potasio al 0,1%

Se añaden 0,5 g de permanganato de potasio a los 499,5 ml de agua desionizada y se mezclan con un agitador magnético. Se filtra a través de un papel de filtro nº 1 de Whatman de tal forma que caiga en un frasco para reactivo de reserva. Este reactivo de reserva se etiqueta con fecha e iniciales. También existen preparaciones comerciales.

#### 2.3.4.2.1. Procedimiento analítico

Cada vez que se lleve a cabo este procedimiento debe incluirse un porta control positivo.

- i) Se fijan los frotis o concentrados<sup>17</sup> secados al aire en metanol absoluto durante 3 minutos.
- ii) Los portas se sumergen en AP durante 10 minutos.
- iii) Se enjuagan en agua de grifo para eliminar el exceso de tinción.
- iv) Se decoloran con alcohol ácido al 3% durante 5 minutos.
- v) Se aplica una contratinción en permanganato de potasio al 0,1% durante 30 segundos.
- vi) Se secan los portas al aire a temperatura ambiente<sup>18</sup>.
- vii) Se examinan para comprobar si contienen ooquistes empleando un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros de isotiocianato de fluoresceína (FIFC) o UV, observando el porta de forma sistemática con el objetivo de x20. La presencia de ooquistes se confirma con el objetivo de x40.
- viii) Se mide el tamaño y se comprueba la forma de los elementos fluorescentes empleando una retícula calibrada en el ocular (véase abajo)<sup>19</sup>.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. tienen una forma anular u ovoide y presentan una fluorescencia de color verde manzana brillante característica sobre un fondo oscuro. Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* son anulares y miden 4–6 µm de diámetro. Si se dispone de filtro UV, la preparación debe examinarse por este medio (excitación 355 nm, emisión 450 nm) porque los esporozoítos son más fáciles de ver bajo el filtro UV que bajo el filtro FITC. Bajo el filtro UV, los ooquistes presentan un color verde claro y los esporozoítos un color verde amarillo.

---

17 Para este procedimiento se recomienda trabajar con frotis moderadamente gruesos.

18 Los portas no deben secarse sobre papel absorbente porque algunos de estos papeles contienen fibras fluorescentes.

19 Los posibles ooquistes se miden aumentando lentamente el voltaje (intensidad lumínica) de la fuente de luz de campo claro de tal forma que puedan observarse a la vez tanto imágenes fluorescentes como de campo claro. Los objetos se pueden medir con la retícula del ocular.

### 2.3.4.3. Comunicación de los resultados del examen microscópico

Las muestras negativas deben indicarse con la frase: “NO se han observado ooquistes de *Cryptosporidium*”.

Las muestras positivas deben indicarse con la frase: “Se han observado ooquistes de *Cryptosporidium*”.

Se puede emplear un sistema de puntuación para las muestras positivas, que se basará en el número de ooquistes observados con el objetivo de x40. No obstante, el examen microscópico no puede considerarse una determinación cuantitativa porque los números de ooquistes varían bastante a lo largo de la infección.

+	=	menos de 1 por campo observado
++	=	1 a 10 ooquistes por campo observado
+++	=	11 o más ooquistes por campo observado

### 2.3.5. Métodos inmunológicos

Se ha comprobado que resultan útiles tres sistemas de detección inmunológica de antígenos de los ooquistes de *Cryptosporidium*: la microscopía de inmunofluorescencia (IFM), el ELISA y el IC, y existe gran variedad de kits comerciales. Los kits de IFM son más específicos en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* de frotis fecales que las tinciones convencionales, y pueden resultar también más sensibles para este fin (Chalmers y Katzer, 2013). Los límites de detección de ELISA y de IC se encuentran en el intervalo de entre  $3 \times 10^5$  a  $10^6$  ooquistes por ml (Anusz *et al.*, 1990; Smith, 2008), lo cual no indica una sensibilidad mayor que la de la microscopía convencional, pero sí una sensibilidad menor que la de la IFM. No obstante, el ELISA en formato de placa de 96 pocillos ofrece la ventaja de un análisis simplificado de grandes cantidades de muestras, mientras que la IC puede aplicarse fuera del laboratorio y con personal menos cualificado. Las reacciones positivas deberán confirmarse con otros métodos.

#### 2.3.5.1. Microscopía de inmunofluorescencia directa (dIFM)

En la dIFM, se emplea un MAb anti-*Cryptosporidium* conjugado a FITC (FITC-C-MAb) que reconoce epítopos de superficie de los ooquistes. No distingue entre diferentes especies de *Cryptosporidium*. La epifluorescencia que se genera al usar un sistema de filtro FITC hace que los ooquistes marcados presenten una fluorescencia de color verde manzana brillante. Los materiales que vienen con los kits comerciales no son siempre los mismos, pero pueden incluir controles positivos y negativos para ooquistes de *C. parvum*, MAb anti-*Cryptosporidium* marcado con FITC (a la dilución de trabajo; no sirve de nada diluirlo), y medio de montaje con glicerol que contenga un inhibidor del fotoblanqueo.

Cada vez que se lleve a cabo este procedimiento debe incluirse un porta control positivo y uno negativo (normalmente vienen con el kit). Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se pueden comprar a proveedores comerciales, a laboratorios veterinarios de diagnóstico a centros de investigación.

Tras teñir y montar los portas según las instrucciones del fabricante, se debe comprobar si las preparaciones contienen ooquistes examinándolas con el objetivo de x20 y confirmando el resultado con el de x40 de un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro FITC (longitud de onda máxima de la excitación: 490 nm, longitud de onda media de la emisión: 530 nm). Los ooquistes se miden con el objetivo de x100<sup>18</sup>. Si es necesario, los portas se pueden conservar a temperatura ambiente, en la oscuridad, hasta que se examinen.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son elementos redondos o ligeramente ovoides que presentan una fluorescencia de color verde manzana brillante bajo el filtro FITC. Los tamaños (longitud x anchura) se indican en la Tabla 1. A menudo, la fluorescencia es más intensa en la parte periférica, sin interrupciones visibles en la tinción de la pared del ooquiste. Si el kit incluye azul de Evans, que reduce la fluorescencia inespecífica, la fluorescencia de fondo será roja. Si incluye DAPI como contratinción, los núcleos presentarán una fluorescencia azul. La fluorescencia inespecífica es amarilla. Siempre debe tenerse en cuenta cómo es el control positivo y asegurarse de que el tamaño, la forma y el color del posible ooquiste coincidan con los de dicho control.

Los resultados deben presentarse igual que en el caso de la microscopía convencional (arriba). Los números se pueden registrarse tal como se hayan identificado anteriormente.

### 2.3.5.2. Detección de antígenos de *Cryptosporidium* mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Con el ELISA se puede demostrar la presencia de antígenos solubles de *Cryptosporidium* en las heces (coproantígeno). En función del kit comercial, los coproantígenos de *Cryptosporidium* se capturan y detectan empleando una mezcla de anticuerpos monoclonales y policlonales.

Los kits comerciales de ELISA que existen actualmente para la detección de antígeno contienen líneas de pocillos recubiertos de anticuerpo anti-*Cryptosporidium* para la captura de coproantígenos de *Cryptosporidium*, anticuerpos anti-*Cryptosporidium* para revelar la reacción que van conjugados a una enzima (a menudo peroxidasa de rábano), sustrato, sistema de revelado de cromógeno/sustrato y solución de parada (que inhibe una posterior catálisis enzimática cuando se añade a la mezcla de reacción). Estos kits están pensados para detectar antígenos de *C. parvum* en muestras de heces, pero también permiten detectar epitopos comunes de infecciones por otras especies de *Cryptosporidium*. En los kits comerciales se incluyen muestras control positivas y negativas. Los kits comerciales suelen contener todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis, y para su uso deben seguirse las instrucciones de los fabricantes. No sirve de nada diluir los reactivos del kit para aumentar el rendimiento. Suelen incluir también un método y una fórmula exhaustivos para el cálculo del valor umbral y la determinación de positividad o negatividad de las muestras. Los reactivos de los kits suelen conservarse a 4°C mientras no se utilizan. Todos los reactivos deben llegar a la temperatura ambiente antes de ser utilizados. El técnico siempre deberá determinar si es aplicable alguna contraindicación para emplear una prueba comercial o alguno de los fijadores de heces/muestra que se empleen en la misma. Dada la gran variedad de métodos descritos en los kits comerciales, en este capítulo no se incluye ningún método para la detección de coproantígeno, ni por ELISA ni por IC.

Las reacciones negativas deben indicarse con la frase: “NO se ha detectado antígeno de *Cryptosporidium*”.

Las reacciones positivas deben indicarse con la frase: “Se ha detectado antígeno de *Cryptosporidium*”.

Es aconsejable confirmar las reacciones positivas con una prueba de sensibilidad y especificidad iguales o superiores, como la dIFM o la PCR.

### 2.3.5.3. Detección de antígeno de *Cryptosporidium* mediante inmunocromatografía

En lugar de que sea la difusión molecular la que determina la rapidez de unión del antígeno de captura al antígeno, como en el caso del ELISA, que en condiciones normales requiere alrededor de una hora para completar una reacción, en la IC de flujo lateral la velocidad de unión del antígeno al anticuerpo de captura unido a la fase sólida aumenta por la acción de la capilaridad. Esta atrae rápidamente todo el líquido a través de una membrana encerrada en el casete de inmunocromatografía y reduce el tiempo necesario para el análisis, que pasa a ser horas a minutos o segundos. Los antígenos solubles de *Cryptosporidium* de la muestra problema son atraídos a través de la membrana y entran en contacto con anticuerpos inmovilizados generados contra antígenos de *Cryptosporidium*, a los que se unen, lo cual aumenta drásticamente la velocidad de interacción entre antígeno y anticuerpo. Las reacciones positivas son cualitativas y se manifiestan en forma de una banda de color en una ubicación específica de la membrana, que suele identificarse por una línea sobre el casete. El formato analítico puede variar según el kit comercial. El técnico siempre deberá determinar si es aplicable alguna contraindicación al uso de una prueba comercial o de alguno de los fijadores empleados.

La IC es una prueba cómoda y rápida para la detección de antígenos de *Cryptosporidium* en muestras de heces, aunque se han observado falsos positivos y, por lo tanto, todo resultado positivo deberá confirmarse con otro sistema. La sensibilidad es inferior a la observada para el ELISA, la dIFM y la PCR.

Las reacciones negativas deben indicarse con la frase: “NO se ha detectado antígeno de *Cryptosporidium*”.

Las reacciones positivas deben indicarse con la frase: “Se ha detectado antígeno de *Cryptosporidium*” y se ha confirmado empleando una prueba de una sensibilidad y especificidad iguales o superiores, como la dIFM o la PCR, cuyo resultado se presenta en el informe.

### 2.3.6. Métodos de reconocimiento del ácido nucleico

La PCR ofrece una mejor sensibilidad diagnóstica que la microscopía y que las pruebas inmunológicas para la detección de *Cryptosporidium* en las heces (de Waele *et al.*, 2011). El objetivo es hallar ADN de esporozoíto en los ooquistes. La sensibilidad observada en los métodos de PCR publicados puede oscilar entre 1 y 10<sup>6</sup> ooquistes, en función del número de copias de la diana génica, del grado de tratamiento del ooquiste, de la extracción y amplificación del ADN, y de los reactivos, procedimientos y plataformas empleados para la detección.

Las muestras fecales pueden contener muchos inhibidores de la PCR. Además de la bilirrubina y las sales biliares, ciertos polisacáridos complejos también son inhibidores considerables. Hervir las muestras fecales en polivinilpirrolidona (PVPP) al 10% antes de la extracción puede reducir la inhibición, pero puede no ser necesario si se realizan pasos de abrogación durante la extracción del ADN (por ejemplo, columnas de centrifugación) y durante la PCR (incluyendo seroalbúmina bovina o una mezcla original adecuada). Las heces o los ooquistes parcialmente purificados conservados en un volumen equivalente de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> al 5% y que vayan a analizarse mediante PCR debe lavarse con agua desionizada para eliminar el conservante residual antes de la extracción de ADN. En el caso de los ooquistes en suspensión, una serie de tres lavados, cada uno de los cuales seguido de centrifugación (1100 **g** durante 10 minutos), la eliminación del sobrenadante y la resuspensión del precipitado en agua desionizada deberían servir para minimizar la inhibición de la PCR.

No existe ningún método estándar para el tratamiento de los ooquistes y la extracción del ADN de los esporozoítos de *Cryptosporidium*. El ADN de *Cryptosporidium* se puede extraer o bien tras una purificación parcial de los ooquistes mediante una de las técnicas de flotación/sedimentación descritas anteriormente, o bien directamente a partir de los ooquistes que se hallan en las heces. Si la sedimentación con formol-acetato de etilo es la prueba de laboratorio de rutina, se pueden llevar a cabo concentrados de ooquistes adecuados para la lisis y una amplificación por PCR lavando los precipitados por centrifugación en agua desionizada. Las opciones de tratamiento de los ooquistes son el golpeado con perlas, los ciclos de congelación-descongelación, y el calentamiento o tratamiento químico/enzimático (Elwin *et al.*, 2012). Las opciones para la posterior extracción de ADN son las columnas de centrifugación, el Glass Milk y la resina Chelex, todas ellas comerciales.

Es preciso proceder con cautela al escoger los cebadores para la PCR porque algunos son específicos de género, mientras que otros son específicos de especie. Para la detección e identificación de *Cryptosporidium parvum* y de otras especies se han empleado PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis validadas (De Waele *et al.*, 2011).

Se están empezando a utilizar kits de PCR múltiple o único para la detección de conjuntos de agentes patógenos gastrointestinales (también para uso veterinario) en los que se emplean plataformas robóticas para la extracción del ADN, configuración de la prueba y detección de amplicones. Lo ideal es adaptar el tipo de agentes patógenos en cuestión a la población que se esté estudiando. Los loci que se incorporan en estas pruebas son los genes rRNA de la SSU y de la proteína de pared de ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP).

### 2.3.7 Detección de ooquistes en agua de bebida y en alimento

Existen métodos estándar para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en agua de bebida (por ejemplo, los de la Organización Internacional de Normalización [2006], la *Environment Agency* [2010] o la *Environmental Protection Agency* [2012]), que se basan en la filtración, elución, concentración, separación inmunomagnética e IFM de un volumen grande. La Organización Internacional de Normalización está desarrollando un método estándar para la detección de *Cryptosporidium* en verduras de hoja verde y en frutos del bosque blandos.

### 2.3.8. Tipificación y subtipificación para el rastreo de la enfermedad y su origen

En laboratorios especializados o de referencia a menudo se aplican sistemas moleculares para la discriminación a nivel de especie o subespecie con el fin de investigar la transmisión, determinar el origen de la infección o identificar factores específicos de riesgo.

El análisis de la secuencia del ADN del gen rRNA de la SSU de *Cryptosporidium* mediante los “cebadores Xiao/Jiang” (Xiao y Ryan, 2008) se considera cada vez más el método de referencia para la identificación a nivel de especie, ya que no todas las especies de *Cryptosporidium* se pueden identificar mediante procedimientos como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP); no obstante, la mayor parte de las especies

que actualmente se sabe que tienen importancia comercial a nivel pecuario pueden identificarse mediante PCR-RFLP empleando *Vspl* y *Sspl* (Xiao y Ryan, 2008). En el caso de las muestras bovinas, para la identificación de *C. andersoni* y de *C. muris* se puede incluir *Ddel*, y para diferenciar entre *C. parvum* y *C. bovis* o *C. ryanae* se puede incluir *MbolI* (Feng *et al.*, 2007). Para la investigación de muestras de agua o ambientales en las que pueda haber cualquier especie o genotipo es necesaria la secuenciación del amplicón. En trabajos recientes se ha confirmado la utilidad de los marcadores minisatélite y microsatélite para el estudio de la estructura de la población de *Cryptosporidium*, pero es necesario armonizar la totalidad del método, desde la elección del marcador hasta los algoritmos analíticos (Widmer y Caccio, 2015).

### 3. Pruebas serológicas

La mayor parte de las pruebas que se aplican a la detección de anticuerpos contra *Cryptosporidium* son ELISA en los que se emplean distintos extractos acuosos de antígenos nativos (por ejemplo, Hill *et al.*, 1990) o proteínas recombinantes (por ejemplo, Priest *et al.*, 2006) derivados de oocistos de *C. parvum*. Tienen escasa aplicación en cuanto a la vigilancia epidemiológica y los resultados deben interpretarse con cautela porque no están del todo validadas.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No existe ninguna vacuna comercial ni rigurosamente comprobada.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADL S.M., SIMPSON A.G., LANE C.E., LUKEŠ J., BASS D., BOWSER S.S., BROWN M.W., BURKI F., DUNTHORN M., HAMPL V., HEISS A., HOPPENRATH M., LARA E., LE GALL L., LYNN D.H., McMANUS H., MITCHELL E.A., MOZLEY-STANRIDGE S.E., PARFREY L.W., PAWLOWSKI J., RUECKERT S., SHADWICK R.S., SCHOCH C.L., SMIRNOV A. & SPIEGEL F.W. (2012). The revised classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59**, 429–493.
- ANUSZ K.Z., MASON P.H., RIGGS M.W. & PERRYMAN L.E. (1990). Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2770–2774.
- BORAD A. & WARD H. (2010). Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol.*, **5**, 507–519.
- CASEMORE D.P. (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. ACP Broadsheet 128: June 1991. *J. Clin. Pathol.*, **44**, 445–451.
- CHALMERS R.M. & DAVIES A.P. (2010). Mini review: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.*, **124**, 138–146
- CHALMERS R.M. & KATZER F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.*, **29** (5), 237–251.
- CURRENT W.L. (1997). Cryptosporidiosis. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L. R. & Saif Y.M. eds. Mosby-Wolfe, Mosby International, London, UK, 883–890.
- DE WAELE V., BERZANO M., BERKVEN D., SPEYBROECK N., LOWERY C., MULCAHY G.M. & MURPHY T.M. (2011). Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 76–84.
- ELWIN K., ROBINSON G., HADFIELD S.J., FAIRCLOUGH H.V., ITURRIZA-GÓMARA M. & CHALMERS R.M. (2012). A comparison of two approaches to extracting *Cryptosporidium* DNA from human stools as measured by a real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods* **89**, 38–40.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (2012) Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA, Office of Water, USA.
- FAYER R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.*, **124**, 90–97.
- FENG Y., ORTEGA Y., HE G., DAS P., ZHANG X., FAYER R., GATEI W., CAMA V. & XIAO L. (2007). Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotipo in bovines. *Vet. Parasitol.*, **144**, 1–9.

- FLORES J. & OKHUYSEN P.C. (2009). Host factors – genetics of susceptibility to infection with enteric pathogens. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **22**, 471–476.
- GABOR L.J., SRIVASTAVA M., TITMARSH J., DENNIS M., GABOR M. & LANDOS M. (2011). Cryptosporidiosis in intensively reared barramundi (*Lates calcarier*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **23**, 383–386.
- HILL B.D., BLEWETT D.A., DAWSON A.M. & WRIGHT S.E. (1990). Analysis of the kinetics, isotype and specificity of serum and coproantibody in lambs infected with *Cryptosporidium parvum*. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 76–81.
- INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (2003). Dangerous Goods Regulations, 44th Edition. International Air Transport Association, 800 Place Victoria, P.O. Box 113, Montreal, Quebec H4Z 1M1, Canada, 815 pp.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2006). ISO 15553:2006 Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. ISO, Geneva, Switzerland.
- KOTLOFF K.L., NATARO J.P., BLACKWELDER W.C., NASRIN D., FARAG T.H., PANCHALINGAM S., WU Y., SOW S.O., SUR D., BREIMAN R.F., FARUQUE A.S., ZAIDI A.K., SAHA D., ALONSO P.L., TAMBOURA B., SANOGO D, ONWUCHEKWA U., MANNA B., RAMAMURTHY T., KANUNGO S., OCHIENG J.B., OMORE R., OUNDO J.O., HOSSAIN A., DAS S.K., AHMED S., QURESHI S., QUADRI F., ADEGBOLA R.A., ANTONIO M., HOSSAIN M.J., AKINSOLA A., MANDOMANDO I., NHAMPOSSA T., ACÁCIO S., BISWAS K., O'REILLY C.E., MINTZ E.D., BERKELEY L.Y., MUHSEN K., SOMMERFELT H., ROBINS-BROWNE R.M. & LEVINE M.M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, **382**, 209–222.
- LORENZ I., FAGAN J. & MORE S.J. (2011). Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. *Ir. Vet. J.*, **64**, 9.
- PRIEST J.W., BERN C., XIAO L., ROBERTS J.M., KWON J.P., LESCANO A.G., CHECKLEY W., CABRERA L., MOSS D.M., ARROWOOD M.J., STERLING C.R., GILMAN R.H. & LAMMIE P.J. (2006). Longitudinal analysis of *Cryptosporidium* species-specific immunoglobulin G antibody responses in Peruvian children. *Clin. Vaccine Immunol.*, **13**, 123–131.
- RYAN U. (2010). *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Exp Parasitol.*, **124**, 113–120.
- SANTÍN M. (2013). Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *N.Z. Vet. J.* **61**, 1–10.
- SMITH H.V. (2008). Diagnostics. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, Florida, USA, 173–208.
- STURDEE A.P., CHALMERS R.M. & BULL S.A. (1999). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain *Vet. Parasitol.*, **80**, 273–280.
- THE ENVIRONMENT AGENCY (2010). The Microbiology of Drinking Water (2010) – Part 14: Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. The Environment Agency, Bristol, UK.
- WIDMER G. & CACCIO S.M. (2015). A comparison of sequence and length polymorphism for genotyping cryptosporidium isolates. *Parasitology*, Apr 20, 1–6. [Epub ahead of print]
- XIAO L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol.* **124**, 80–89.
- XIAO L., FAYER R., RYAN U. & UPTON S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 72–97.
- XIAO L. & RYAN U.M. (2008). Molecular epidemiology. In: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Second Edition, Fayer R. & Xiao L. eds. CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, Florida, USA, 387–410.
- YANG, Y-L. BUCK G.A. & WIDMER G. (2010). Cell sorting-assisted microarray profiling of host cell response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* **78**, 1040–1048.

\*  
\* \*

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2016.