



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Caracterización molecular de aislados humanos de *Cryptosporidium* spp. procedentes de 2 diferentes localizaciones de España

Luis Navarro-i-Martínez^{a,*}, Alexandre J. da Silva^b, José Llovo Taboada^c, Carmen del Águila^d, Norman J. Pieniazek^b y Fernando J. Bornay-Llinares^a

^a División de Parasitología, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Alicante, España

^b Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, Estados Unidos

^c Servicio de Microbiología e Parasitología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), Santiago de Compostela, La Coruña, España

^d Departamento de Biología, Universidad San Pablo CEU, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 5 de julio de 2012

Aceptado el 3 de noviembre de 2012

On-line el 27 de diciembre de 2012

Palabras clave:

Cryptosporidium

C. hominis

C. parvum

C. meleagridis

Cryptosporidiosis

Diagnóstico

Caracterización molecular

España

RESUMEN

Las técnicas de diagnóstico molecular por PCR permiten distinguir entre las diferentes especies de *Cryptosporidium* morfológicamente idénticas capaces de infectar a humanos. De las 23 especies actualmente reconocidas en el género, al menos 9 son capaces de infectar a humanos. Por ello, y debido a que la intensidad de las manifestaciones clínicas, la patogenicidad, la excreción de ooquistes y la incidencia varían entre ellas, la realización de estudios moleculares es crucial para una mejor comprensión de la epidemiología de la criptosporidiosis humana.

En el presente trabajo se analizan muestras procedentes de 2 estudios independientes: uno formado por 23 muestras procedentes de Madrid y otro compuesto por 72 muestras procedentes de La Coruña, todas ellas positivas para *Cryptosporidium* spp. por métodos microscópicos y pertenecientes a casos aislados de criptosporidiosis.

Para la identificación a nivel de especie se utilizaron las regiones de diagnóstico descritas para el ADNr 18S y las regiones de diagnóstico del gen de la COWP.

De las 95 muestras analizadas, se consiguió extraer y amplificar ADN en 77 casos, en los que las especies causantes de la infección fueron: *C. parvum* (40 casos: 2 Madrid y 38 La Coruña), *C. hominis* (30 casos: 10 Madrid y 20 La Coruña) y *C. meleagridis* (2 casos: uno Madrid y uno La Coruña). En otros 5 casos fue imposible detectar la especie responsable de la infección, aunque se confirmara su positividad por PCR (4 Madrid y uno La Coruña). Los genotipos aislados en estos pacientes se correlacionaron con los hallados en animales de las mismas regiones.

Publicado por Elsevier España, S.L.

Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated in humans in two different locations in Spain

ABSTRACT

Molecular PCR based diagnostic techniques have enabled us to distinguish between the different, morphologically identical, *Cryptosporidium* species that can infect humans. Of the 23 recognized species in the genus, at least 9 are able to infect humans. As the intensity of the clinical manifestations, pathogenicity, excretion of oocysts, and incidence, are different between this species, molecular studies are crucial for a better understanding of the epidemiology of human cryptosporidiosis.

Samples from two independent studies are analyzed in this publication. One included 23 samples from Madrid, and the other, 72 samples from La Coruña. All of them positive for *Cryptosporidium* spp. by microscopic methods and belonging to isolated cases of human cryptosporidiosis.

For the identification of the species responsible for the infection, the 18S rDNA diagnostic region and the COWP gene diagnostic regions were used.

Out of the 95 samples tested, in 77 cases we were able to extract and amplify DNA. In those cases the species responsible for the infection were: *C. parvum* (40 cases, 2 Madrid and 38 La Coruña), *C. hominis*

Keywords:

Cryptosporidium

C. hominis

C. parvum

C. meleagridis

Cryptosporidiosis

Diagnosis

Molecular characterization

Spain

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lnavarro@umh.es (L. Navarro-i-Martínez).

(30 cases, 10 Madrid and 20 La Coruña) and *C. meleagridis* (2 cases, 1 Madrid and 1 La Coruña). In 5 samples it was impossible to detect the species responsible for the infection, but their positivity was confirmed by PCR (4 Madrid and 1 La Coruña). The genotypes of the isolates from patients correlated well with animals from the same regions.

© 2012 Published by Elsevier España, S.L.

Introducción

El género *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Eucoccidiorida) incluye varias especies de coccidios parásitos que infectan células epiteliales, preferentemente del tracto digestivo, de un amplio número de vertebrados, incluyendo mamíferos, aves, peces y reptiles. Actualmente se reconocen 23 especies válidas^{1–7}, además de haber varios genotipos pendientes de clasificación definitiva. Debido a las pequeñas diferencias morfométricas de sus ooquistes y a la baja especificidad de hospedador de las distintas especies del género, la identificación a nivel de especie requiere del uso de técnicas moleculares de amplificación por PCR¹.

La criptosporidiosis humana, lejos de ser una infección poco usual, es relativamente común, con tasas de seroprevalencia que alcanzan el 25–35% en EE. UU.⁸ o el 20% en el Reino Unido⁹.

Durante años se consideró la criptosporidiosis como una antropozoonosis que implicaba principalmente a humanos y rumiantes, con *C. parvum* y *C. hominis* como únicos responsables de la infección. Sin embargo, aunque estas especies causan el 90% de los casos¹⁰, se han descrito infecciones por *C. felis*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, *C. cuniculus* o *Cryptosporidium* genotipo de mono¹¹, entre otros. *C. meleagridis*, descrito tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunosuprimidos, es considerado un parásito emergente^{10,12}. Esta situación ha creado cierta controversia sobre el papel de los animales en la transmisión humana. Por un lado, varios estudios de subgenotipado sugieren que algunas de las infecciones por *C. parvum* tienen como origen a los mismos humanos. Por otro lado, otras especies y/o genotipos propios de animales afectan en menor medida a humanos, tanto inmunosuprimidos como inmunocompetentes^{13,14}. En determinados países en vías de desarrollo, algunas especies inusuales pueden alcanzar hasta el 20% de los casos humanos estudiados¹⁴.

Debido a que la intensidad de las manifestaciones clínicas, la patogenicidad, el grado de excreción de ooquistes, la implicación en brotes hídricos y la incidencia varían entre las distintas especies¹⁴, es importante su correcta identificación para conocer el riesgo para la salud pública de la criptosporidiosis, así como el papel de las especies de *Cryptosporidium* presentes en animales, que pueden actuar como reservorio, y en el medio ambiente. Para ello se han desarrollado diversas técnicas de diagnóstico molecular, incluyendo técnicas de PCR-secuenciación, PCR-RFLP, RealTime-PCR, etc., que utilizan como dianas, entre otras, diversas regiones conservadas del ADN, como el ADNr 18S, ITS o el gen de la *Cryptosporidium oocyst wall protein* (COWP) para el diagnóstico a nivel de especie, o regiones más variables como los microsatélites ML1 y ML2 o el gen de la gp60 para la caracterización molecular a nivel de genotipo y subgenotipo¹.

En España, la presencia de especies del género *Cryptosporidium* está bien documentada, tanto en humanos como en otros animales y el medio ambiente¹. Sin embargo, los estudios moleculares llevados a cabo en muestras humanas son escasos, habiéndose demostrado la presencia en Zaragoza de *C. hominis* y *C. parvum*, además de una infección por *C. meleagridis* y otra por *C. felis* en niños¹⁵; y la presencia de *C. hominis* en Álava¹⁶.

Métodos

Se estudiaron un total de 95 muestras fecales humanas procedentes de distintos hospitales españoles y que contenían ooquistes

de *Cryptosporidium* sp. previamente identificados mediante métodos microscópicos (tinciones de Kinyoun y auramina) e inmunológicos (IFD Merifluor *Cryptosporidium*, Meridian Diagnostics y ELISA Immunocard STAT, Meridian Diagnostics). De ellas, 23 muestras procedían de varios hospitales de la comunidad autónoma de Madrid, todos ellos pacientes VIH+ con diarrea (13 niños y 10 adultos). Estas muestras procedían de una colección perteneciente a la Universidad San Pablo-CEU de Madrid, incluidas en un estudio de microsporidios realizado en 1996¹⁷. Otras 72 muestras procedían del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, CHUS), La Coruña, pertenecientes a residentes en la provincia. De ellas, 69 pertenecían a individuos inmunocompetentes (62 niños y 7 adultos), una a un adulto VIH+ y 2 muestras de una probable infección nosocomial en lactantes. Todas ellas tomadas entre 2000 y 2003. Para la realización de las técnicas moleculares se utilizaron alícuotas de estas muestras conservadas a -80 °C.

Para el proceso de rotura del ooquiste y la purificación del ADN obtenido se utilizó el kit comercial Fast DNA kit y el disruptor FP120 (QBioGene, Inc., Vista, California) según las recomendaciones de Da Silva et al.¹⁸. En todas las muestras se analizaron 3 loci diferentes: la región de diagnóstico del gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (ADNr 18S)¹⁹ y los fragmentos codificantes de las regiones N-terminal y C-terminal de la COWP²⁰, según las condiciones de amplificación por PCR previamente descritas^{19,20}. La visualización de los productos de amplificación se realizó tras electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Estos productos de amplificación fueron purificados utilizando el StrataPrep PCR Purification kit® (Stratagene, Inc., La Jolla, California), secuenciados en ambos sentidos utilizando el BigDye Terminator kit® (Applied Biosystems, Foster City, California) y leídos en un secuenciador automático ABI-prism 3100 (Applied Biosystems).

La identificación de las especies presentes se llevó a cabo mediante el alineamiento de las secuencias de ADN obtenidas y su comparación con las secuencias publicadas en la base de datos del GenBank para las distintas especies de *Cryptosporidium*. Este proceso fue llevado a cabo con la aplicación informática SeqMan II program package® (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin).

Resultados

De las 95 muestras estudiadas, se amplificó al menos uno de los 3 loci estudiados en 77 muestras, el 81,1% de los casos (17 de Madrid y 60 de La Coruña). En las 18 muestras restantes (18,9%) no se obtuvo ningún producto de amplificación (6 de Madrid y 12 de La Coruña).

De las 77 muestras positivas, en 5 casos fue imposible determinar la especie responsable de la infección, ya que no se pudo obtener ninguna secuencia legible para ninguno de los loci analizados; en 40 se obtuvieron secuencias correspondientes a *C. parvum*; en 30 correspondientes a *C. hominis*, y otros 2 casos presentaban secuencias coincidentes con *C. meleagridis* (tabla 1). Los resultados obtenidos para cada uno de los 3 loci analizados se resumen en la tabla 2.

Para los casos de infección por *C. hominis*, de las 30 muestras positivas, en la región amplificada del ADNr 18S se obtuvieron

Tabla 1Resultados obtenidos para las 95 muestras analizadas y especies de *Cryptosporidium* halladas

	Total	Madrid		La Coruña		VIH+	
		VIH+		Inmunocompetente			
		Niño	Adulto	Niño	Adulto		
Total negativos	18 (18,9%)	4	2	10	2		
Total positivos	77 (81,1%)	9	8	54	5	1	
Distribución por especies							
<i>C. parvum</i>	40 (51,9%)	2		34	3	1	
<i>C. hominis</i>	30 (39%)	6	4	18	2		
<i>C. meleagridis</i>	2 (2,6%)	1		1			
Desconocida	5 (6,5%)		4	1			

18 amplicones cuyas secuencias se correspondían con la publicada con número de GenBank AF093489 como *C. parvum* genotipo humano, renombrada como *C. hominis*. En las 2 regiones de diagnóstico del gen de la COWP todos los fragmentos obtenidos mostraron secuencias correspondientes con la publicada para *C. hominis* con número de GenBank XM661099, 28 amplicones en la región N-terminal y 16 en la región C-terminal.

Para los casos de infección por *C. parvum*, de las 40 muestras positivas en el fragmento de diagnóstico del ADNr 18S se obtuvieron 2 secuencias distintas. Catorce aislados poseían una secuencia correspondiente con la publicada con número de GenBank L16996, para *C. parvum* genotipo bovino, que denominamos tipo A (**tabla 3**). Otras 17 mostraban una delección de 3 bases en las posiciones 648 a 650 (TGA), y una substitución T a C en la posición 663 y A a T en la posición 689, y que se correspondían con la secuencia publicada como ADNr 18S tipo B de *C. parvum* genotipo 2 con número de GenBank AF308600 (**tabla 3**). En cuanto a los fragmentos que codifican para las regiones N-terminal y C-terminal de la COWP, las secuencias encontradas se correspondían con la publicada para *C. parvum* genotipo bovino con número de GenBank Z22537, 37 en la región N-terminal y 12 en la región C-terminal.

Los 2 casos de infección por *C. meleagridis* fueron diagnosticados en 2 niñas de 6 y 8 años procedentes de Valladolid y La Coruña (datos clínicos en **tabla 4**). En la región de diagnóstico del ADNr 18S se obtuvieron secuencias idénticas a la publicada para *C. meleagridis* con número de GenBank AF248759. En la región N-terminal de la COWP, las 2 secuencias obtenidas fueron idénticas a la secuencia de *C. meleagridis* con número de GenBank AY166840. Sin embargo, en la región C-terminal de la COWP se obtuvieron 2 resultados distintos. Mientras que la paciente 2 presentaba una secuencia coincidente con la publicada para *C. meleagridis* con número de GenBank EU310392, la paciente 1 presentaba una secuencia idéntica a

la publicada con número de GenBank XM661099 para *C. hominis*, sugiriendo la presencia de una infección mixta. Con el fin de descartar una posible contaminación, se realizaron 2 extracciones y amplificaciones adicionales a partir de la muestra original, obteniendo resultados idénticos en todas ellas.

Discusión

En España se ha informado, dentro de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, de al menos 1.812 casos de infección desde 1995^{21–23}. Además, se han publicado diversos estudios en población adulta y en niños, tanto en inmunocompetentes como en inmunosuprimidos, y asimismo se han detectado varios brotes epidémicos¹. Estos estudios han sido realizados mayoritariamente en población en riesgo que presentaba sintomatología o en la que ya se sospechaba la infección. Con todo ello, los datos epidemiológicos acerca de la criptosporidiosis son escasos y sesgados, ya que son pocos los hospitales que declaran la presencia de *Cryptosporidium*, al no realizar su diagnóstico de forma rutinaria. Por ello los datos deben ser tomados con cautela, y cabe considerar que los datos reales de infección pueden ser mayores que los publicados, tanto por subnotificación como por la falta de universalización de los test diagnósticos en los laboratorios de microbiología. Hasta finales de los años noventa la detección se realizaba básicamente utilizando métodos microscópicos. Más recientemente se han utilizado diversas técnicas moleculares para el diagnóstico, sobre todo en muestras procedentes de animales y ambientales, habiéndose corroborado la presencia en nuestro país de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. bovis*, *C. bovis-like*, *C. baileyi*, *C. andersoni*, *C. varanii* y los genotipos de cerdo, ratón y tortuga¹.

Los resultados globales obtenidos en el presente estudio muestran una mayor prevalencia de *C. parvum*, como ha ocurrido

Tabla 2

Resultados obtenidos para las muestras en cada locus analizado según la especie responsable de la infección

	Total		Madrid			La Coruña		
	Madrid	La Coruña	18S	N-term	C-term	18S	N-term	C-term
Desconocida ^a	4	1	Neg	0	4	0	1	1
			ND	4	0	1	0	0
<i>C. parvum</i>	2	38	Neg	0	0	0	1	22
			ND	0	0	9	2	6
			Pos	2	2	29	35	10
<i>C. hominis</i>	10	20	Neg	0	1	2	1	6
			ND	0	0	2	0	4
			Pos	10	9	16	19	10
<i>C. meleagridis</i>	1	1	Neg	0	0	0	0	0
			ND	0	0	0	0	0
			Pos	1	1	C.h ^b	1	1

18S: resultados obtenidos en la región de diagnóstico del ADNr 18S; C-term: resultados obtenidos en la región de diagnóstico C-terminal del gen de la COWP; N-term: resultados obtenidos en la región de diagnóstico N-terminal del gen de la COWP; ND: PCR positiva pero no se obtuvo una secuencia legible; Neg: PCR negativa para el locus en concreto, aunque positiva para uno de los otros 2 analizados; Pos: PCR positiva y secuencia legible comparable con las publicadas en genbank.

^a Especie no determinada, aunque se obtuvo un resultado positivo por PCR.

^b Secuencia correspondiente con GenBank #XM661099 para *C. hominis*.

Tabla 3Secuencias obtenidas en el ADNr 18S de los aislados diagnosticados como *C. parvum*

	Total	Madrid	La Coruña		VIIH+ Adulto
		VIIH+	Inmunocompetente	VIIH+ Adulto	
		Niño	Niño	Adulto	
No secuencia (PCR positiva)	9		6	3	
<i>C. parvum</i> tipo A	17	2	15		
<i>C. parvum</i> tipo B	14		13		1
Total	40	2	34	3	1

normalmente en Europa. Sin embargo, un estudio publicado en humanos procedentes de Zaragoza muestra una mayor prevalencia de *C. hominis* frente a *C. parvum*¹⁵. Aunque en Gran Bretaña sigue habiendo una mayor frecuencia de *C. parvum*²⁴, varios estudios publicados en otros países europeos muestran esta tendencia de aumento de la frecuencia de *C. hominis*, como ocurre en Estados Unidos y en Australia²⁵. Si analizamos nuestros datos según el área, observamos que las muestras procedentes de Madrid, pertenecientes a pacientes VIIH-positivos, presentan una mayor proporción de infección por *C. hominis*, mientras que en La Coruña la especie más abundante es *C. parvum*. Esta distinta distribución podría deberse a la dispersión rural y ganadera del área sanitaria que cubre el CHUS, que hace más factible un predominio de la especie zoonótica, en comparación con el área eminentemente urbana de Madrid, como se ha observado en otros estudios¹⁴. Sin embargo, es necesario un estudio más amplio y minucioso de los genotipos y subgenotipos presentes para diferenciar entre los casos de zoonosis y los casos de infección antropónota por *C. parvum*.

Entre los aislados donde se detectó la presencia de *C. parvum*, en la región de diagnóstico del ADNr 18S se hallaron 2 secuencias distintas, nombradas como tipo A y tipo B. Este gen presenta 5 copias en el genoma del parásito, por lo que en un mismo oociste podría presentar ambas secuencias. Sin embargo, es difícil demostrar tanto este hecho como que una misma secuencia esté presente en las 5 copias de un oociste mientras que la otra lo esté en las 5 copias de otro oociste distinto. De este modo, aunque no podemos asegurar que todos los alelos presentes en una población de parásitos sean el mismo, sí podemos admitir, debido a la calidad de las secuencias obtenidas en cada una de las muestras, que la mayoría de las copias presentes en esa población de parásitos es el secuenciado para la muestra, independientemente de su distribución en cada oociste concreto, siendo por tanto representativo de la misma.

En lo referente a las muestras positivas para *C. parvum* que presentan la secuencia tipo B (14 casos) es importante remarcar

que este es el primer estudio realizado en España que indica su presencia, ya descrita en humanos inmunocompetentes e inmunosuprimidos en Francia²⁶. En España ya se conocía la presencia de esta misma secuencia en animales procedentes de distintas regiones, donde se ha encontrado en bovinos, ovinos y caprinos^{27–29}. Este hecho indica la presencia de este genotipo tanto en el ciclo de transmisión zoonótico como en el antropónoto en nuestro país.

Finalmente, las 2 muestras positivas para *C. meleagridis* representan el 2,6% de los pacientes estudiados, datos mayores que los observados en Zaragoza (0,98%)¹⁵ y el Reino Unido, implicando a 2.411 pacientes (tanto inmunocompetentes como VIIH+, adultos y niños), donde se obtuvo un valor del 0,9%²⁴. En Portugal se han descrito prevalencias entre el 4,7%³⁰ y el 10,34%³¹, todas en pacientes VIIH+. Por cercanía geográfica, es de suponer que la prevalencia en España debe de ser más próxima a la de Portugal que a la obtenida en el Reino Unido. Sin embargo, el bajo número de muestras estudiadas en la península Ibérica hace tomar estos datos con cautela, ya que pueden llevar a una estimación errónea de la prevalencia real de *C. meleagridis* en nuestro país.

El estudio de 3 loci para el diagnóstico ha permitido detectar un caso de coinfección por *C. meleagridis* y *C. hominis* en la paciente 1. La coinfección con distintas especies de *Cryptosporidium* ha sido descrita previamente por otros autores, siendo un hecho ampliamente demostrado²⁴.

La manifestación típica de infección por *Cryptosporidium* spp. es la diarrea aguda o crónica en individuos inmunocompetentes o inmunodeprimidos, respectivamente. Las manifestaciones del paciente 2 (VIIH+) correspondían con estos síntomas. Sin embargo, el paciente 1 (inmunocompetente) presentaba dolor abdominal asociado a estreñimiento, que aun siendo un síntoma atípico, había sido informado previamente³². Tras un mes, las heces de ambos pacientes fueron negativas para *Cryptosporidium* sp.

Aunque la ruta de infección de *C. meleagridis* en humanos no está clara, se ha demostrado la presencia del parásito en mascotas y en el

Tabla 4Datos clínicos de los pacientes positivos para *C. meleagridis*

	Paciente 1	Paciente 2
Localización	San Cristóbal de Mallón, Negreira (A Coruña), área rural	Tudela de Duero (Valladolid), área rural
Año de recolección	2000	1996
Edad	8 años	6 años
Sexo	Niña	Niña
Estado inmunológico	IC	VIIH+; CD4: 50/mm ³
Diagnóstico microscópico	Auramina	Kinyoun Auramina
Diagnóstico inmunológico	IFD EIA	IFD
Carga parasitaria	Bajo nivel de excreción: 1–5 × campo (100×)	Alto nivel de excreción: > 5 × campo (400×)
Contacto con animales y/o aguas no tratadas	Perros, gatos, vacas, gallinas, pollos; agua de manantial	ND
Manifestaciones clínicas	Dolor abdominal recurrente, estreñimiento	Malabsorción intestinal, diarrea crónica, CDC:C3
Evolución	Tras 1 mes: sin excreción de oocistos	Tras 1 mes: sin diarrea, sin excreción de oocistos

EIA: ensayo comercial ELISA Immunocard STAT (Meridian Diagnostics, Inc.); IC: inmunocompetente; IFD: ensayo comercial de immunofluorescencia Merifluor *Crypto-Giardia* (Meridian Diagnostics, Inc.); ND: no hay datos.

medio ambiente^{33,34}. En este estudio las pacientes han mantenido un contacto frecuente con animales y/o áreas rurales (tabla 4), lo que permite suponer que la infección puede haber ocurrido por un contacto accidental con los ooquistes en el medio ambiente.

Por ello es necesario un examen más detallado de los factores de riesgo en casos de infección con especies inusuales de *Cryptosporidium*, para poder tener un mejor conocimiento del ciclo de transmisión en nuestro país. Esto implica la realización de nuevos estudios que permitan comprender mejor la epidemiología y las rutas de infección responsables de la criptosporidiosis humana en España. Y sobre todo, es necesario establecer la importancia en salud pública de las distintas especies, genotipos y subgenotipos pertenecientes a este género, no solo de *C. parvum* y *C. hominis*.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Navarro-i-Martinez L, del Aguila C, Bornay-Llinares FJ. *Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2011;29:135-43.
2. Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*. 2010;124:90-7.
3. Fayer R, Santin M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol*. 2009;164:192-200.
4. Robinson G, Wright S, Elwin K, Hadfield SJ, Katzer F, Bartley PM, et al. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Morphology, biology and phylogeny. *Int J Parasitol*. 2010;40:1539-48.
5. Fayer R, Santin M, Macarisin D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol*. 2010;172:23-32.
6. Ren X, Zhao J, Zhang L, Ning C, Jian F, Wang R, et al. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol*. 2012;130:274-81.
7. Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Crouch ND, Chalmers RM. *Cryptosporidium viatorum* n. sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int J Parasitol*. 2012;42:675-82.
8. Chappell CL, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2002;15:523-7.
9. Millar BC, Finn M, Xiao L, Lowery CJ, Dooley JSG, Moore JE. *Cryptosporidium* in foodstuffs—an emerging aetiological route of human foodborne illness. *Trends Food Sci Tech*. 2002;13:168-87.
10. Caccio SM. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia*. 2005;47:185-92.
11. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*. 2010;124:80-9.
12. Chalmers RM, Robinson G, Elwin K, Hadfield SJ, Xiao L, Ryan U, et al. *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:829-30.
13. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:72-97.
14. Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;52:309-23.
15. Llorente MT, Clavel A, Goni MP, Varea M, Seral C, Becerril R, et al. Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol Int*. 2007;56:201-5.
16. Cardona GA, Carabin H, Goni P, Arriola L, Robinson G, Fernandez-Crespo JC, et al. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Alava. North of Spain. *Sci Total Environ*. 2011;412-413:101-8.
17. Del Aguila C, Navajas R, Gurbindo D, Ramos JT, Mellado MJ, Fenoy S, et al. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44:84S-5S.
18. Da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura IN, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mol Diagn*. 1999;4:57-64.
19. Tiangtip R, Jongwutwises S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop Med Int Health*. 2002;7:357-64.
20. Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;150:209-17.
21. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiological monitoring of the cryptosporidiosis in Spain. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 2003;11:277-84.
22. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Changes in the system of microbiological information in the year 2009. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 2008;16:261-72.
23. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. ISCIII, 2012 [consultado 9 Oct 2012]. Disponible en: www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/vigilancias-alertas.shtml
24. Leoni F, Amar C, Nichols G, Pedraza-Díaz S, McLauchlin J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J Med Microbiol*. 2006;55 Pt 6:703-7.
25. Nichols G, Chalmers R, Lake I, Sopwith W, Regan M, Hunter P, et al. Cryptosporidiosis: A report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. *Drinking Water Inspectorate (DWI)*, London, 2006. [Consultado 15 Oct 2010]. Disponible en: www.dwi.gov.uk/research/completed-research/reports/DWI10.2.201.pdf
26. Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelievre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3472-80.
27. Navarro-i-Martinez L, Bornay-Llinares FJ, Rueda C, del Aguila C, da Silva AJ, Oleaga A, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. from animals in Spain. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50 Suppl:553-4.
28. Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, del Cacho E, Sanchez-Acedo C. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology*. 2008;135:1613-20.
29. Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Hadfield SJ, del Cacho E, Sanchez-Acedo C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:6026-31.
30. Alves M, Matos O, Antunes F. Multilocus PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium* isolates from HIV-infected patients from Portugal. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001;95:627-32.
31. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2744-7.
32. Reese NC, Current WL, Ernst JV, Bailey WS. Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. *Am J Trop Med Hyg*. 1982;31:226-9.
33. Nakamura AA, Simoes DC, Antunes RG, da Silva DC, Meireles MV. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;166:47-51.
34. Feng Y, Li N, Duan L, Xiao L. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *J Clin Microbiol*. 2009;47:153-7.