

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



“Viabilidad de *Cryptosporidium spp* en el agua”

Por:

Juan Francisco Argaez González

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Septiembre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Viabilidad de *Cryptosporidium spp* en el agua

Por:

Juan Francisco Argaez González

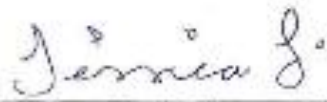
MONOGRAFIA

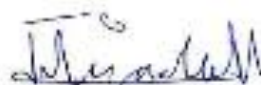
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


Aprobada por:


Dr. Ramón Alfredo Delgado González
Presidente


Dra. Jessica María Flores Salas
Vocal


Dra. Luz María Tejada Ugarte
Vocal


MVZ César Octavio Cruz Marmolejo
Vocal Suplente


M.C. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Septiembre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Viabilidad de *Cryptosporidium spp* en el agua

Por:

Juan Francisco Argaez González

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

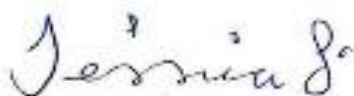
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



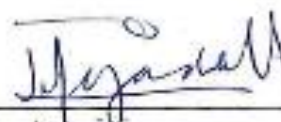
Dr. Ramón Alfredo Delgado González

Asesor Principal




Dra. Jessica María Flores Salas

Coasesor



Dra. Luz María Tejada Ugarte

Coasesor



M.C. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México

Septiembre 2021

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María Dolores González Cruz y Juan Francisco Arguez González por su apoyo incondicional, por dedicar su vida y su esfuerzo y confiar en que lo lograría.

A mis hermanas por animarme a seguir con mis estudios, por apóyame y aconsejarme en los momentos complicados.

A mis asesores Dr. Ramón Alfredo Delgado González, Dra. Jessica María Flores Salas, Dra. Luz María Tejada Ugarte y al MVZ César Octavio Cruz Marmolejo por dedicar su tiempo y esfuerzo en mi proceso de titulación.

A la MVZ. Adriana Morales Morales por su apoyo, paciencia y aprendizajes durante mi formación académica.

A mi Alma Mater y a todos los que la conforman, por otorgarme mi formación profesional.

A todos mis compañeros que estuvieron siempre apoyándome durante mi formación profesional.

A todos mis compañeros de la unidad de diagnóstico por animarme durante la elaboración del proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres María Dolores González Cruz y Juan Francisco Arguez Chan quienes me inspiraron a seguir estudiando y luchar por mis objetivos y metas, este logro es también de ellos.

A mis hermanas a quienes agradezco su confianza y su compañía durante toda mi formación académica.

RESUMEN

Cryptosporidium es un género de parásitos unicelulares capaces de infectar a una amplia gama de animales, incluyendo al hombre. Las especies de *Cryptosporidium* son miembros del filo Apicomplexa. Es un parásito entérico, que durante su ciclo de vida presenta etapas de reproducción sexual y asexual. Se reconocen más de 30 especies de *Cryptosporidium*, algunas específicas de huésped definido, mientras que otras infectan un rango de huéspedes más amplio, causando una enfermedad gastrointestinal de distribución mundial.

Se estima que las enfermedades transmitidas por el agua causan más de 2.2 millones de muertes por año y muchos casos de enfermedades gastrointestinales todos los días, en todo el mundo, tanto en países desarrollados como en los países subdesarrollo. *Cryptosporidium* se ha establecido como uno de los principales parásitos que afectan al hombre y animales mediante la transmisión por vía oral al ingerir agua contaminada, ya que la etapa infecciosa de *Cryptosporidium* se encuentra en la mayoría de las aguas. Un problema que presentan las plantas tratadoras de agua es la resistencia de los ooquistes a los desinfectantes utilizados habitualmente, para tratar el agua que llega al consumo humano. Debido a que hay diferentes especies su distribución es mundial, afectando principalmente a animales jóvenes e inmunodeprimidos, se estima una prevalencia en los grupos susceptibles a la infección por *Cryptosporidium spp* de 9.5% a nivel global, pero en países con una alta tasa de VIH puede ser mucho mayor principalmente en países africanos donde se ha encontrado hasta un 34%, causando múltiples brotes a lo largo de la historia.

El presente trabajo se elaboró con la finalidad de recabar información sobre la prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en fuentes de agua, recopilando artículos científicos.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, Viabilidad, Brotes, Agua, Prevalencia, Enfermedades emergentes.

ÍNDICE.

I.	Introducción.	1
II.	<i>Cryptosporidium spp.</i>	3
III.	Biología de la <i>Cryptosporidium spp.</i>	7
4.1.	Ciclo biológico intracelular.	10
4.2.	Ciclo biológico extracelular.	14
IV.	Criptosporidiosis.	16
V.	Biopelícula.	19
5.1.	Definición.	19
5.2.	Biopelículas y <i>Cryptosporidium</i> .	23
VI.	Contaminación del agua por <i>Cryptosporidium spp.</i>	25
6.1.	Brotos.	28
6.2.	Brotos en México.	34
6.3.	Contaminación del agua.	37
6.4.	Identificación de ooquistes en agua en diferentes regiones del mundo.	40
6.5.	Métodos de detección de ooquistes de <i>Cryptosporidium spp.</i>	42
VII.	Conclusión.	51
VIII.	Literatura citada.	51

Índice de figuras.

Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum* en medio sin células huésped. Modificado de Hijjawi *et al.* 2004. **¡Error! Marcador no definido.** Figura 2. Modelos diferentes de invasión. modificado de Guérin y Striepen, 2020. 11

Figura 3. Ciclo reproductivo de *Cryptosporidium spp* modificado de Bouzid *et al.*, 2013. **¡Error! Marcador no definido.** Figura 4. Parámetros que influyen en la retención y diseminación de ooquistes a partir de biopelículas. Modificado de Lefebvre *et al.*, 2021. 24

Figura 5. Distribución de casos confirmados de *Cryptosporidium* por cada 100000 habitantes por país de la Unión Europea en 2015. Modificado de Ongerth *et al.*, 2018.....32

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Especies de *Cryptosporidium* válidas confirmadas mediante análisis molecular. Modificado de Zahedi *et al.*, 2016. 5
Cuadro 2. Principales brotes. 33
Cuadro 3. Prevalencia *Cryptosporidium* en agua. 34
Cuadro 4. Ventajas y limitaciones de las técnicas utilizadas para evaluar la infectividad y la viabilidad. modificado de Rousseau *et al.*, 2018. 48

I. Introducción.

Cryptosporidium spp. pertenece a un género de parásitos unicelulares capaces de infectar a una amplia gama de animales y al hombre, debido a su potencial zoonótico (Bones *et al.*, 2018). Presenta una enfermedad gastrointestinal en humanos y animales de distribución mundial (Hlavsa *et al.*, 2017; Pumipuntu y Piratae, 2018). Existen más de 30 especies de *Cryptosporidium*, la mayoría afectan el tracto gastrointestinal excepto *Cryptosporidium baileyi* que puede llegar a afectar el sistema respiratorio de las aves (Li *et al.*, 2020). Tiene un ciclo de vida complejo que consta de una fase asexual (merogonía) y una fase sexual (gametogonía) que culmina en la formación de ooquistes (Wilke *et al.*, 2018).

La evaluación de la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* es crucial para evaluar la importancia para la salud pública de este importante protozoo zoonótico. La viabilidad se evalúa comúnmente en preparaciones húmedas después del pretratamiento con ácido y la tinción con tintes vitales fluorogénicos (Hamdy *et al.* 2019).

La baja dosis infecciosa de estos parásitos protozoarios significa que aumenta el riesgo asociado para la salud pública. El ID 50 (número de ooquistes necesarios para infectar al 50% de las personas expuestas) se estimó entre 10 y 83 ooquistes en adultos sanos para *Cryptosporidium*. La viabilidad y la infectividad de los ooquistes no se modifican visiblemente después de varias semanas de almacenamiento, La viabilidad de los esporozoitos se evaluó en función de su forma, estructura y motilidad (Jaskiewicz *et al.*, 2018) Cualquier modificación visible en la morfología, la integridad de la pared y el contenido interno de los ooquistes puede indicar una pérdida de viabilidad a nivel del parásito único (Hamdy *et al.* 2019).

Por lo cual puede contaminar la mayoría de las aguas superficiales de todo el mundo se ha notificado que la prevalencia de este microorganismo es variable, en función de las características socioeconómicas de la población, ya que es más frecuente en los lugares con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable, en las piscinas, en la eliminación de aguas residuales o con estrecho contacto con

animales (Hernández, Hernández y Cortés, 2018). En países latinoamericanos se han establecido cifras de prevalencia de ooquistes en el agua: en Brasil se determinó en un 18.7 %, en Argentina del 3.9 %, Costa Rica 4.3 %, Venezuela 10.8 %, Ecuador 11.2 %, Guatemala 13.8 %-16.7% en Haití y en Colombia de 33.2 % (García *et al.*, 2014). En México se estima que la tasa de prevalencia de *Cryptosporidium spp* es de 7.7%, superior al porcentaje reportado en Argentina y Vietnam (Galván *et al.*, 2019).

Debido a la resistencia y a la distribución mundial, las especies de *Cryptosporidium spp* han causado diversos brotes de a lo largo de la historia en la mayoría de los continentes. En 1993 *Cryptosporidium* se produjo un brote de criptosporidiosis en Milwaukee, este brote no solo fue la primera aparición significativa de *Cryptosporidium spp.* como un patógeno humano importante, sino también fue un enorme brote transmitido por el agua que afectó a miles de personas de una ciudad importante de América del Norte, con un costo asociado a la enfermedad estimado de US \$ 96,2 M y 100 muertes. Desde entonces, los brotes de criptosporidiosis ocurren regularmente en todo el mundo (Gargala, 2008; Zahedi *et al.*, 2018).

Un problema que han presentado las plantas tratadoras de agua es la asociación que tienen los ooquistes con biopelículas, se sugirió por primera vez después de un brote de criptosporidiosis transmitida por el agua que se produjo en el noroeste de Inglaterra en marzo de 2000. El equipo de control del brote sugirió cambiar el suministro de agua del área afectada por el brote para eliminar cualquier contaminación del agua de ooquiste. Sin embargo, los ooquistes permanecieron microscópicamente detectables en agua hasta 19 días después del cambio. Los investigadores plantearon la hipótesis de la retención y posterior liberación gradual de ooquiste, en la biopelícula, desarrollada en la superficie de las tuberías de distribución (Lefebvre *et al.*, 2021).

II. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium pertenece a un género de parásitos unicelulares capaces de infectar a una amplia gama de animales y al hombre (Bones *et al.*, 2018), debido a su potencial zoonótico (Ogendo *et al.*, 2017; Ayele *et al.*, 2018; Das *et al.*, 2019; Firoozi *et al.*, 2019; Dessì *et al.*, 2020). La presencia de esta enfermedad gastrointestinal es de notificación obligatoria en humanos (Hlavsa *et al.*, 2017).

Fue descrita en 1907 por Tyzzer. Más tarde en 1912 se reporta *Cryptosporidium parvum* con estadios de desarrollo sólo en el intestino delgado de ratones y ooquistes pequeños.

En 1955 se reporta *Cryptosporidium meleagridis* en pavos. Posteriormente en 1971 *Cryptosporidium* spp. fue asociado a diarreas en bovinos. En 1976, se reportó criptosporidiosis en humanos (Petrincová *et al.*, 2015). En 1977 informan por primera vez en forma completa *Cryptosporidium* en reptiles (Arrowood, 2002).

En 1990, gracias a las técnicas moleculares, se identifica y clasifica de manera más compleja hacia que especies y que hospedadores, son susceptibles a *Cryptosporidium*. Y en 1990 se reportan aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en humanos.

En 1991, establecen la criptosporidiosis como una de las infecciones entéricas más comunes en el humano. En 2001 se reportó estudios realizados en el Estado Zulia que sugieren que la transmisión de hombre a hombre es dominante, lo que favorece el predominio del genotipo humano. En 2002, se señala a *Cryptosporidium* como agente ubicuo en la naturaleza debido a asociaciones ecológicas y al agua como su principal agente de diseminación (De la Parte *et al.*, 2005).

Después de ser observada por primera vez en la mucosa gástrica de ratones asintomáticos por Tyzzer (Meinhardt, Casemore y Miller 1996; Xiao *et al.*, 2004; Bastidas y Rosales 2017). Fue clasificado junto con otros parásitos coccidios entéricos en el orden Eucoccidiida sobre la base de muchas similitudes en sus características morfológicas y ciclos de vida complejo (Ghazy *et al.*, 2015).

Sin embargo, investigaciones recientes han presenta varias peculiaridades morfológicas que separan a estas especies de otras coccidias, (Nocciolini *et al.*, 2018). Los datos moleculares que se han proporcionado en términos de vigilancia y biodiversidad han desafiado la percepción de lo que es *Cryptosporidium* en términos de sus relaciones filogenéticas, estos incluyen: la ubicación de *Cryptosporidium* dentro de la célula huésped, donde las etapas de desarrollo endógenas se limitan a las superficies apicales de las células epiteliales (intracelulares, pero extra citoplasmáticas). Los estudios del uso de secuenciación 18S demostró una relación filogenética más estrecha con los protozoos gregarios que con los coccidios por la etapa sexual en el ciclo de vida y presencia de organelo alimentador único en la base de la vacuola parasitófora que es similar al conoide de las gregarinas (Hijawi *et al.*, 2004) desde entonces se han complementado con observaciones de la biología del desarrollo y el metabolismo. Su clasificación ha sido modificada a Filo: Apicomplexa Clase: Gregarinasina Especie: *Cryptosporidium* (Clode *et al.*, 2015).

Los datos sobre la filogénica de *Cryptosporidium* ahora confirman que, al igual que sus parientes cercanos, es un Apicomplexa facultativamente epicelular es capaz de multiplicarse en un entorno libre de células huésped. Estos datos deben considerarse en el contexto de la reclasificación filogenética de coccidio a gregaria. Así ayudar a reconsiderar la biología y el comportamiento, o quizás ayudar a explicar la increíble diversidad genética, distribución y rango de hospedadores del parásito (Thompson, Koh y Clode, 2016).

Las Gregarinas son grupo diverso que se distingue por la existencia de un organelo especial llamado complejo apical, formado íntegramente por géneros parasitarios que afectan a una amplia variedad de invertebrados y vertebrados (Kováčiková *et al.*; 2017; Sarkar, Kundu y Bandyopadhyay, 2020). Se han clasificado en tres órdenes: Archigregarinorida, Eugregarinorida y Neogregarinorida (Carreno *et al.*, 1999). Las eugregarinas se dividen en dos grupos: gregarinas septadas o cefalinas y gregarinas aseptadas o acefalinas. Las gregarinas son probablemente polifiléticas y algunas 'eugregarinas' y todas las 'neogregarinas' (ambas abandonadas como taxones) están más estrechamente relacionadas con *Cryptosporidium* y Rhytidocystidae que a los archigregarinos. (Sarkar *et al.*, 2020).

Cuadro 1. Especies de *Cryptosporidium* válidas confirmadas mediante análisis molecular. Modificado de Zahedi *et al.*, 2016.

Especie	Autor	Huésped	Huésped	Reportado en Humanos
<i>C. rubeyi</i>	Li <i>et al.</i> , 2015.	<i>Spermophilus beecheyi</i> (ardilla de tierra de California)	Ardillas	Ninguno reportado
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero <i>et al.</i> , 2004, Costa <i>et al.</i> , 2015	<i>Scophthalmus maximus</i> (rodaballo)	Rodaballo	Ninguno reportado
<i>C. huwi</i>	Ryan <i>et al.</i> , 2015	<i>Poecilia reticulata</i> (Guppy), <i>Paracheirodon innesi</i> (Neon tetra) y <i>Puntius tetrazona</i> (Tigre barb)	Pez	Ninguno reportado
<i>C. erinacei</i>	Kváč <i>et al.</i> , 2014.	<i>Erinaceus europaeus</i> (erizo europeo)	Erizos, caballos	Reportado
<i>C. scrofarum</i>	Kváč <i>et al.</i> , 2013	<i>Sus scrofa</i> (cerdo)	Cerdos	Reportado
<i>C. viatorum</i>	Elwin <i>et al.</i> , 2012	<i>Homo sapiens</i> (humano)	Humanos	Reportado
<i>C. tyzzeri</i>	Tyzzer, 1912, Ren <i>et al.</i> , 2012	<i>Mus musculus</i> (ratón)	Roedores	Reportado
<i>C. cuniculus</i>	Robinson <i>et al.</i> , 2010	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo europeo)	Conejos	Reportado
<i>C. ubiquitum</i>	Fayer <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i> (ganado)	Rumiantes, roedores, primates	Reportado
<i>C. xiaoi</i>	Fayer y <i>et al.</i> , 2010	<i>Ovis aries</i> (oveja)	Ovejas y cabras	Reportado
<i>C. ryanae</i>	Fayer <i>et al.</i> , 2008	<i>Bos taurus</i> (ganado)	Vacas	Ninguno reportado
<i>C. macropodum</i>	Power y Ryan, 2008	<i>Macropus giganteus</i> (canguro)	Marsupiales	Ninguno reportado
<i>C. frágil</i>	Jirků <i>et al.</i> , 2008	<i>Duttaphrynus melanostictus</i> (sapo)	Sapos	Ninguno reportado
<i>C. fayeri</i>	Ryan y <i>et al.</i> , 2008	<i>Macropus rufus</i> (canguro)	Marsupiales	Reportado
<i>C. bovis</i>	Fayer y <i>et al.</i> , 2005	<i>Bos taurus</i> (ganado)	Vacas	Reportado
<i>C. suis</i>	Ryan y <i>et al.</i> , 2004	<i>Sus scrofa</i> (cerdo)	Cerdos	Reportado.

<i>C. galli</i>	Pavlásek, 1999 , Ryan <i>et al.</i> , 2003	<i>Spermestidae, Frangillidae, Gallus, Tetrao urogallus, Pinicola enucleator</i> (Aves)	Aves	Ninguno reportado
<i>C. hominis</i>	Morgan <i>et al.</i> , 2002	<i>Homo sapiens</i> (humano)	Humanos	Comunes en humanos
<i>C. molnari</i>	Álvarez <i>et al.</i> , 2002	<i>Sparus aurata</i> (dorada) y <i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina europea)	Pez	Ninguno reportado
<i>C. canis</i>	Fayer y <i>et al.</i> , 2001	<i>Canis familiaris</i> (Perro)	Perros	Reportado
<i>C. andersoni</i>	Lindsay y <i>et al.</i> , 2000	<i>Bos taurus</i> (ganado)	Vacas	Reportado
<i>C. varanii</i>	Pavlásek <i>et al.</i> , 1995	<i>Varanus prasinus</i> (monitor de esmeralda)	Lagartos	Ninguno reportado
<i>C. baileyi</i>	Current <i>et al.</i> , 1986	<i>Gallus</i> (Pollo)	Aves	Ninguno reportado
<i>C. parvum</i>	Tyzzler, 1912	<i>Bos taurus</i> (ganado)	Rumiantes	comunes en humanos
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	<i>Meleagris gallopavo</i> (Turquía)	Aves y humanos	Común en humanos
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1980	<i>Elaphe guttata, E. subocularis, Sanzinia madagascarensus</i> (serpientes)	Serpientes y lagartos	Ninguno reportado
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	<i>Felis catis</i> (gato)	Gatos	Reportado
<i>C. wrairi</i>	Vetterling y <i>et al.</i> , 1971	<i>Cavia porcellus</i> (conejillo de indias)	Conejillos de indias	Ninguno reportado
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907	<i>Mus musculus</i> (ratón doméstico)	Roedores	Reportado

Existen más de 30 especies de *Cryptosporidium*, que afectan a diferentes animales la mayoría afectan el tracto gastrointestinal excepto *Cryptosporidium Baileyi* que puede llegar a afectar el sistema respiratorio de las aves (Li *et al.*, 2020).

Los principales reservorios de ooquistes de *Cryptosporidium* son, el humano y los bovinos especialmente los terneros, pero también se ha encontrado en animales de compañía, ovinos y vida silvestre, de manera que pueden ser potenciales fuentes de

contaminación para los alimentos, aguas superficiales, aguas subterráneas, actividades recreativas (parques acuáticos, albercas) y plantas recicladoras de agua (Hlavsa *et al.*, 2017; Pumipuntu *et al.*, 2018; Mammeri *et al.*, 2019; Wells *et al.*, 2019; Caffarena *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020).

Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* son extremadamente resistentes a los desinfectantes más utilizados. La viabilidad no se ve afectada por la exposición al 1,05 y al 3% de cloro (como hipoclorito de sodio) durante un período de hasta 18 horas. Treinta minutos de exposición a temperaturas superiores a 65 °C o por debajo del punto de congelación también detienen la infectividad de los ooquistes. Sin embargo, estudios han demostrado la eficacia del ozono como una alternativa para reducir la viabilidad de los ooquistes de *C. parvum* en el agua potable (Lorenzo *et al.*, 1993).

Mediante análisis multivariable, se reconoció la edad, la fuente de alimento, la fuente de agua (incluyen el contacto con aguas superficiales como lagos y ríos, la exposición a agua potable municipal contaminada), la higiene, la propagación de persona a persona en instituciones y el contacto cercano con otros animales domésticos como factores de riesgo potenciales para la aparición de la infección por *Cryptosporidium* (Ayele *et al.*, 2018; Brankston *et al.*, 2018)

III. Biología de la *Cryptosporidium spp.*

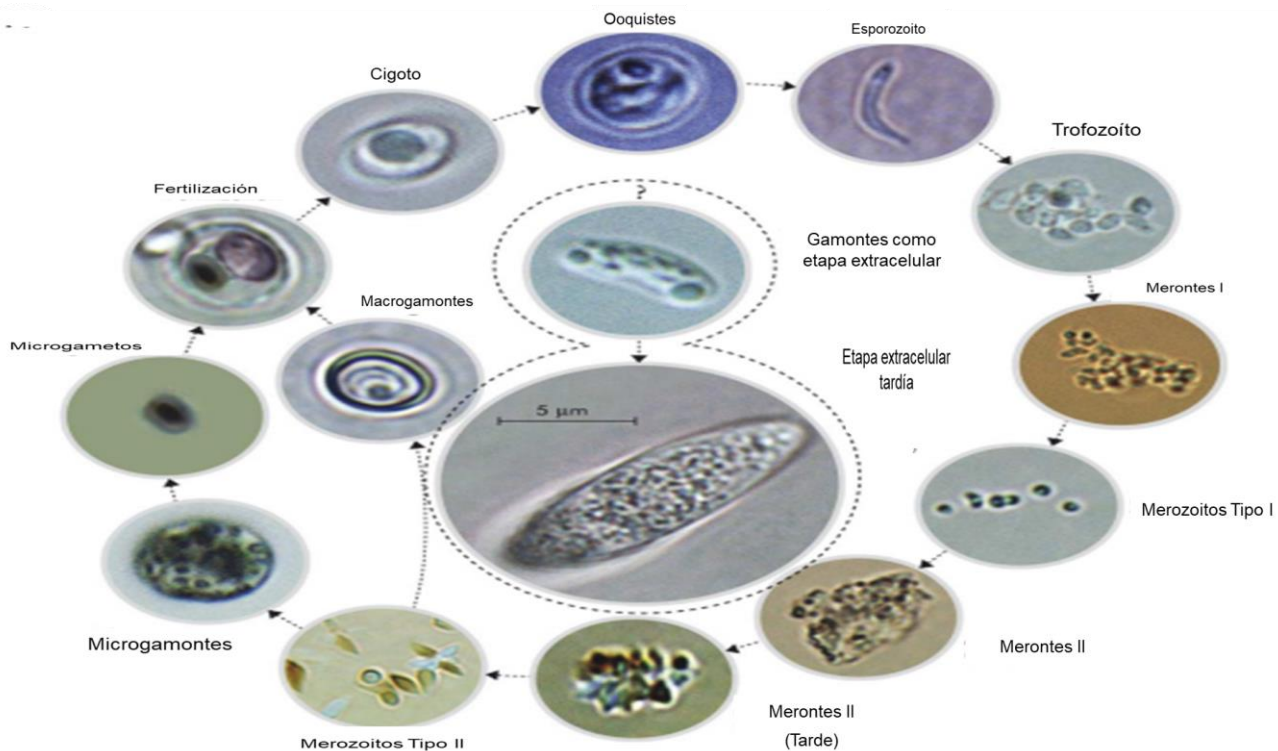
Cryptosporidium tiene un ciclo de vida complejo que consta de una fase asexual (merogonía) y una fase sexual (gametogonía) que culmina en la formación de ooquistes. Las especies de *Cryptosporidium* completan todo su ciclo de vida dentro de un solo huésped (Wilke *et al.*, 2018).

Los ooquistes son resistentes a las variaciones ambientales, así como a la mayoría de los procesos físicos, químicos y microbiológicos utilizados en las plantas de tratamiento de aguas y aguas residuales (Miglioli *et al.*, 2017; Adeyemo *et al.* 2019) puede permanecer infeccioso durante semanas o meses en condiciones frías y húmedas, con la etapa infecciosa (Drummond *et al.*, 2018; Sánchez *et al.* 2018; Bones *et al.*, 2018). El período de incubación típico es de 2 a 10 días (Hlavsa *et al.*, 2017). Una pequeña cantidad de 10 ooquistes ya es suficiente para causar una enfermedad

en personas o animales sanos (Olias *et al.*, 2018). Se encontró que *Cryptosporidium* es resistente a la cloración incluso en dosis altas, pero respondió bien a dosis altas de UV (Pumipuntu y Piratae 2018; Drummond *et al.*, 2018; Abeledo *et al.*, 2018; Adeyemo *et al.*, 2019).

Se estima que la excreción de ooquistes de personas y animales infectados es de 1.6×10^{15} emisiones anuales de ooquistes en heces humanas y animales, respectivamente, los seres humanos son los mayores contribuyentes de ooquistes al medio ambiente (Qian *et al.*, 2020).

Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum* en medio sin células huésped. Modificado de Hijjawi *et al.* 2004.



Debido a la gran variedad de especies de *Cryptosporidium* el tamaño típico promedio de los ooquistes es pequeño alrededor de 4-6 µm de forma esférica a ovoide y tienen estructuras internas oscuras.

El ooquiste tiene dos tipos, uno es la pared delgada (una capa de una matriz de proteína-lípido-carbohidrato que reinfectará el tracto gastrointestinal) y otro es la pared

gruesa (que consta de paredes internas y externas de ooquiste que se excretará en el medio ambiente a través de las heces) (Pumipuntu y Piratae, 2018).

Durante todo el ciclo, las diferentes formas se limitan a las superficies apicales de las células huésped. Las formas infecciosas se adhieren a las superficies apicales mediante un proceso poco conocido y se internalizan dentro de un compartimento intracelular, pero extra citoplasmático separado del citoplasma por una capa densa en electrones que parece ser predominantemente de origen del huésped. El parásito se encuentra dentro de un compartimento, encerrado fuera del plasma de la célula huésped, descrito como la vacuola parasitófora, donde está protegido del ambiente intestinal hostil y es suministrado con energía y nutrientes por la célula huésped a través de un orgánulo alimentador, que es único entre los parásitos Apicomplexa. También se ha informado de que *Cryptosporidium parvum* puede tener etapas de vida extracelulares similares a la gregaria, aunque hasta ahora no hay estudios posteriores que lo hayan confirmado (Bouزيد *et al.*, 2013).

Los parásitos *Cryptosporidium* tienen un metabolismo notablemente simplificado y vías biosintéticas reducidas. Las especies de *Cryptosporidium*, específicamente *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis*, carecen de mitocondrias canónicas y en su lugar tienen remanentes, los llamados mitosomas. Estas son estructuras pequeñas (alrededor de 100 nm de ancho), circulares, de doble membrana unidas que parecen ser mitocondrias funcionalmente reducidas que carecen de capacidad de síntesis de ATP y de su propio genoma (mitocondrial). Sin embargo, los componentes de una vía bioquímica se han localizado recientemente en la mitosoma de *Cryptosporidium parvum*, lo que sugiere un papel funcional de este orgánulo. También son visibles los anillos polares, que se localizan en el extremo apical del parásito.

Los esporozoítos, en general, tienen forma de medialuna, con un complejo apical que contiene micro nemas, un solo roptría y gránulos densos. Se cree que cada una de estas estructuras tiene un papel en el apego y la invasión de las células huésped (Clode *et al.*, 2015).

4.1. Ciclo biológico intracelular.

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* se puede dividir en seis fases principales de desarrollo:

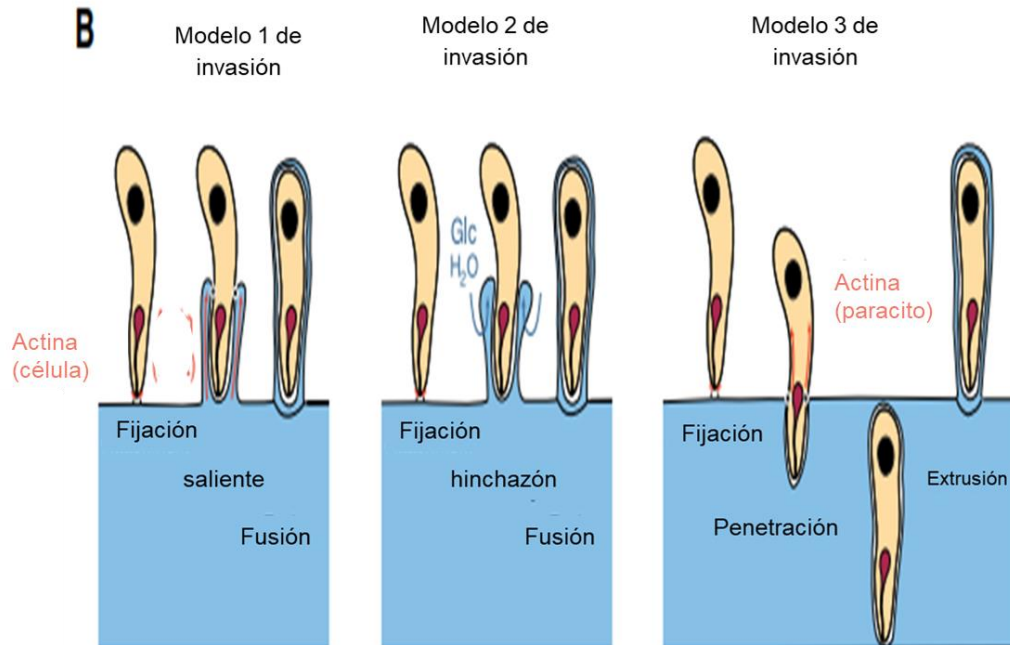
1. Escisión. Es la liberación de esporozoitos infecciosos en el tracto intestinal.
2. Merogonía. multiplicación asexual dentro de las células huésped.
3. Gametogonía: La formación de microgametos (célula masculina) y macrogametos (células femeninas).
4. Fertilización: la unión de micro y macrogametos.
5. Formación de la pared de ooquiste: Para producir la etapa ambientalmente resistente responsable de la transmisión de la infección de un huésped a otro.
6. Esporogonia. la formación de esporozoitos infecciosos. (Bouzid *et al.*, 2013)

Después de que el huésped ingiera el ooquiste, los esporozoítos móviles dentro se liberan en el tracto gastrointestinal a través de una sutura en la pared del ooquiste mediante un proceso llamado escisión. Se cree que este proceso se desencadena tras la ingestión por factores como la temperatura de corporal 37 °C, el pH gástrico, las enzimas pancreáticas y las sales biliares (Pumipuntu y Piratae 2018).

Los esporozoitos liberados se deslizan sobre la superficie de las células intestinales, liberando proteínas para ayudar en la adhesión y posterior invasión de las células huésped.

Los estudios in vivo e in vitro han demostrado la penetración y unión de las etapas de *Cryptosporidium* a las superficies apicales de las células huésped. Sin embargo, los mecanismos por los cuales *Cryptosporidium* invade las células epiteliales intestinales del huésped y establece este compartimento inusual son poco conocidos. Inicialmente, *Cryptosporidium* exhibe deslizamiento dependiente de actina y probablemente usa un proceso impulsado por parásitos para ingresar a la superficie apical de las células epiteliales intestinales del hospedador, donde descansa sobre un lecho de proteínas de unión a actina del hospedador (Thompson *et al.*, 2005).

Figura 2. Modelos diferentes de invasión. modificado de Guérin y Striepen, 2020.



Se han considerado tres modelos diferentes de invasión. El modelo 1 propone que la membrana parasitófora del huésped se extienda alrededor del parásito como resultado de la polimerización de la actina del huésped. El modelo 2 propone glucosa local (Glc) y la subsiguiente absorción de agua y el Modelo 3 invoca la penetración activa del parásito para formar una vacuola parasitófora, antes de que el parásito y la vacuola parasitófora sean extruidos del lado apical de la célula (Guérin y Striepen, 2020).

El contenido de las micro nemas (orgánulo secretor especializado, característicos de las etapas móviles) están involucrado en la adherencia a las células huésped a través de la secreción de proteína. Es probable que los gránulos densos liberen su contenido después de la formación de la membrana de la vacuola parasitófora y presumiblemente modifiquen esta estructura para ayudar a invadir las células huésped.

Con la ayuda de la roptría y micro nemas, el parásito invade la célula huésped, incluida la membrana celular, para encerrar al parásito en las membranas de las vacuolas parasitófora.

El desarrollo endógeno de *Cryptosporidium* implica una secuencia de eventos que comprenden la formación de la vacuola parasitófora, el desarrollo de un orgánulo alimentador único y la multiplicación asexual y sexual del parásito. Estudios recientes en los que se realizó microscopía electrónica en serie durante una incubación de 1 h de *C. parvum* en cultivo celular mostraron que, durante la internalización, se forman numerosas vacuolas cubiertas por la membrana plasmática del parásito y se agrupan para establecer la vacuola parasitófora (Thompson *et al.*, 2005).

La vacuola se distingue porque permanece extra citoplasmática, pero se considera intracelular, ya que mantiene su posición dentro de la membrana derivada del hospedador encima de las células epiteliales. En la vacuola parasitófora, el parásito está protegido del entorno intestinal hostil y la célula huésped le suministra energía y nutrientes a través de una membrana única y altamente invaginada, el orgánulo alimentador, que se forma entre el parásito y el citoplasma del huésped durante la internalización.

Dentro de la membrana de la vacuola parasitófora, cada esporozoíto se convierte en un trofozoíto esférico, que se reproduce asexualmente, la reproducción se produce mediante dos fases de merogonía, que produce la formar un meronte Tipo 1 que contiene ocho merozoitos, los merontes son morfológicamente similares a los esporozoitos. Cuando maduran se produce la rotura de la vacuola parasitófora y se liberan a la luz intestinal (Vergara y Quílez, 2004).

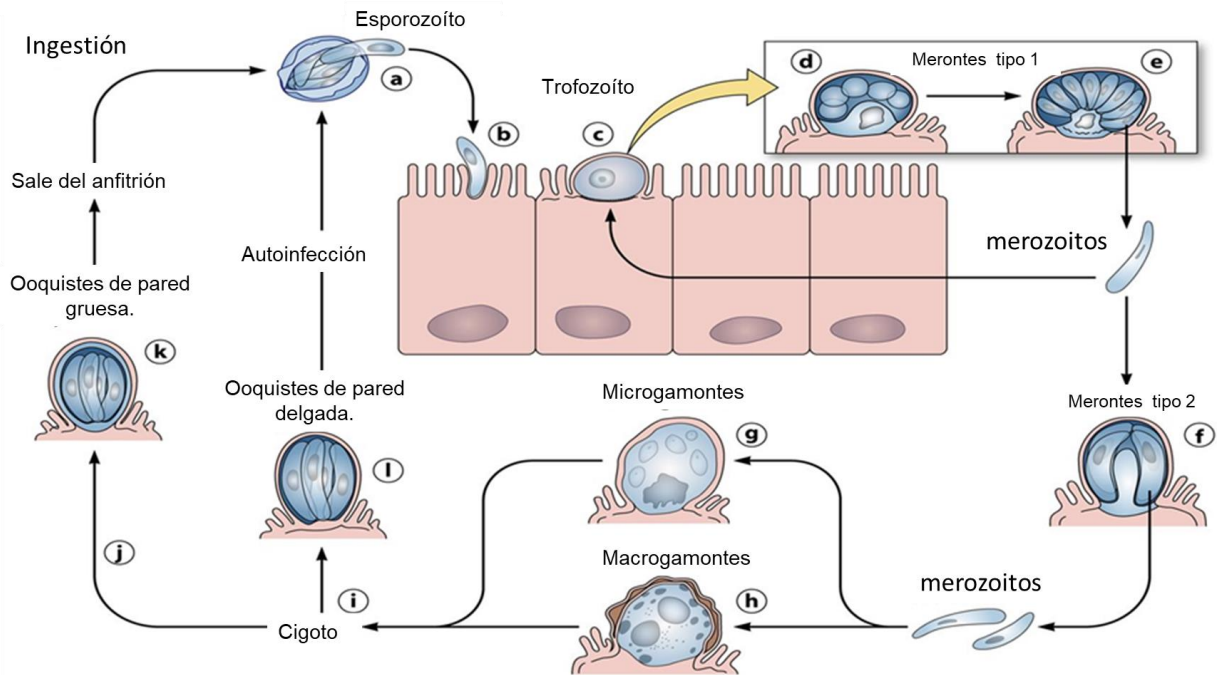
Los merontes de tipo I pueden desarrollar otros merontes de tipo I, aumentando rápidamente la gravedad de la infección, o pueden continuar el desarrollo a merontes de tipo II que contienen cuatro merozoitos.

Estos cuatro merozoitos, cuando se liberan, se adhieren a otras células epiteliales del tracto intestinal. En lugar de formar más merontes, los merozoitos de tipo II inician un proceso llamado gametogonía para completar la etapa sexual de desarrollo.

Cada merozoito produce etapas reproductivas sexuales masculinas o femeninas, conocidas como microgametos o macrogametos, respectivamente. Hasta 16 microgametos están formados por la división nuclear de microgamontes, que, cuando

se liberan de la membrana de la vacuola parasitófora, localizan y fertilizan un macrogameto cito unicelular que se ha desarrollado a partir de un macrogameto, formando un cigoto (Bones *et al.*, 2018).

Figura 3. Ciclo reproductivo de *Cryptosporidium spp* modificado de Bouzid *et al.*, 2013.



El cigoto diploide se somete a un proceso similar a la meiosis (esporogonia) que resulta en cuatro esporozoitos haploides dentro de un ooquiste esporulado. Los ooquistes resultantes son de paredes gruesas o delgadas y contienen cuatro esporozoitos. Los ooquistes de paredes gruesas son ambientalmente estables y se liberan al medio ambiente con las heces del huésped, lo que permite la transmisión de la infección de un huésped a otro, mientras que los ooquistes de paredes delgadas permanecen en el intestino y auto infectan al mismo huésped. La autoinfección ocurre cuando los esporozoitos se liberan del ooquiste de pared delgada y el ciclo comienza de nuevo. La autoinfección y la formación de merontes de Tipo I (replicación asexual) proporcionan una explicación para la infección crónica persistente y hacen que la criptosporidiosis sea una causa frecuente de diarrea aguda prolongada en algunas poblaciones (Hassan *et al.*, 2021).

Los ooquistes son inmediatamente infecciosos, lo que significa que no necesitan madurar (esporular) en el medio ambiente, como es el caso de algunos otros parásitos protozoarios importante.

4.2. Ciclo biológico extracelular.

Estudios han demostrado que *Cryptosporidium spp.* puede completar todo su ciclo de vida sin la necesidad de células huésped, con la presencia de todas las fases de desarrollo, incluidas la merogonía, la gametogonía, la esporogonia, así como las nuevas etapas similares a gametocitos descritas en cultivo celular de una manera similar a las gregarinas, parásitos Apicomplexa de los invertebrados (Hijawi *et al.* 2004., O 'Hará y Chen, 2011).

Se demostró que *Cryptosporidium* tiene la capacidad de formar una vacuola parasitófora de forma independiente, en un entorno de biopelícula libre de células huésped, lo que potencialmente les permite completar un ciclo de vida extracelular. (Koh *et al.* 2014)

En una investigación de estadios extracelulares se purificaron primero a partir del sobrenadante de cultivos de 4-5 días infectados con *Cryptosporidium andersoni*. Se observaron con frecuencia estadios morfológicamente similares moviéndose sobre monocapa de la célula de huésped humano infectadas con *Cryptosporidium parvum*.

Cuatro días después de infección con *Cryptosporidium* apareció morfológicamente diferente de los merozoitos que carecen de extremos puntiagudos que caracterizan a los merozoitos típicos. La etapa dos fue romas y en forma de bastón con un núcleo ubicado en la parte media a anterior y sin el extremo puntiagudo que caracteriza a los merozoitos típicos. Además, esta etapa varió en tamaño y forma (3–10 mm 1,25–3,75 mm de diámetro) debido a la extensión y contracción activas. Durante la purificación de ooquistes de *Cryptosporidium andersoni* de las heces de un novillo infectado naturalmente, también se observó una etapa extracelular. Aunque la etapa extracelular era más grande que los ooquistes, tenía el mismo color y apariencia refráctil bajo microscopía óptica. Esta etapa extracelular tenía forma de bastón y era más grande (10,7-9,8 ± 2,0-2,6 mm de diámetro) en comparación con las de *Cryptosporidium*

parvum y algunas contenían solo un núcleo, mientras que otras eran multinucleadas y algunos se vieron sometidos a sizigia (Hijawi *et al.*, 2002).

Los estudios realizados en 2014 por Koh *et al.*, en biopelículas de *Pseudomonas* para determinar los estadios de *Cryptosporidium* en un ambiente controlado durante un periodo de 6 días observo varias poblaciones distintivas incluyeron poblaciones de ooquistes intactos, lo que indico que no todos los ooquistes se acumularon dentro de la biopelícula.

Mediante la microscopía focal, se observaron ooquistes vacíos con una abertura amplia y membrana rugosa y esporozoítos libres, era evidente que algunos de ellos habían sufrido escisión dentro de la biopelícula inmadura desde el día.

Para el día 3, trofozoítos y varios gametocitos grandes como células similares en tamaño a los merontes de tipo I y II. Estos gametocitos se caracterizaron además como merontes cuando se detectaron varios merozoitos de tipo II no liberados dentro de un solo meronte de tipo II. Por ello era de esperar, que los merozoitos libres de tipo I y II fueran identificados con frecuencia. Los microgamontes dentro de las biopelículas también eran grandes y contenían una gran cantidad de microgametos. Aunque estos microgametos parecían brotar del microgamonte, no se pudo determinar la identidad de las estructuras en forma de salchicha. Además, se detectaron células extragrandes de tipo gamón con una función desconocida. A lo largo del estudio, reveló varias grandes estructuras celulares unidas a la membrana. Tanto la membrana como las estructuras internas se marcaron con fluorescencia (Koh *et al.*, 2014).

La persistencia resulta del equilibrio entre la multiplicación y la inactivación en el caso de patógenos que no pueden multiplicarse fuera de una célula huésped eucariota. Actualmente, no hay datos cuantitativos que describan la proporción de patógenos entéricos que interactúan con las biopelículas de aguas residuales antes de ser liberados al medio ambiente (Skraber *et al.*, 2007).

IV. Criptosporidiosis.

La criptosporidiosis se incluyó en una lista de enfermedades recopiladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya que se considera un problema de salud pública mundial debido a que se presentan brotes en humanos, animales y una alta carga de contaminación ambiental por ello es una de las principales causas de brotes de enfermedades protozoarias transmitidas por el agua (Martins *et al.*, 2019; Robertson *et al.*, 2020).

La criptosporidiosis es causada por la ingestión de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* el cual causa la enfermedad gastrointestinal que se produce tanto en el hombre como en diferentes animales de granja, mascotas y animales silvestres (Pumipuntu y Piratae 2018; Dessì *et al.*, 2020)

Puede causar enteritis con diarrea profusa en mamíferos, gastritis fatal en serpientes y enfermedades respiratorias y entéricas en aves. En los mamíferos, la enteritis por criptosporidiosis afecta principalmente a las crías (Hernández *et al.*, 2018).

En animales y en humanos sanos la enfermedad suele ser asintomática. Pero la deshidratación y otras consecuencias de la diarrea en personas con síntomas pueden poner en peligro la vida, especialmente en huéspedes muy jóvenes (Spickler, 2018).

En el hombre se caracteriza por diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas vómitos y fiebre leve, los síntomas pueden variar de leves a graves y por lo general, duran hasta 2-3 semanas y pueden reaparecer. La enfermedad suele ser autolimitante, pero en pacientes con determinadas inmunodeficiencias relacionadas con las células T, puede ser grave y en ocasiones, potencialmente mortal. Todas las edades pueden verse afectadas, pero se informan más casos entre los niños, especialmente los menores de 5 años y en adultos se ha reportado en mayores de 70 años (Hlavsa *et al.*, 2017; Spickler, 2018)

El periodo de prepatencia (tiempo entre la infección y la eliminación de ooquistes), varía de 2 a 14 días, en la mayoría de los animales domésticos, mientras que el periodo de patencia (duración de la excreción de ooquistes), es variable dentro de las diferentes especies de hospedadores, desde varios días a varios meses (Plutzer *et al.*,

2018). En humanos inmunocompetentes, estimando la fecha de infección accidental, se ha calculado un periodo de prepatencia entre 5 y 28 días, con una media de 7,2 días y un periodo de patencia que puede oscilar entre 8 y 31 días, aunque pudiera prolongarse de forma intermitente. En los pacientes con SIDA la eliminación de ooquistes puede ser indefinida (De la Parte, 2005).

Debido a la amplia variedad de especies de *Cryptosporidium*, la capacidad de algunas para afectar a varios huéspedes y las vías de transmisión, la criptosporidiosis se considera una enfermedad zoonótica de distribución mundial (Pumipuntu y Piratae, 2018).

A nivel mundial, la criptosporidiosis es una de las causas más comunes de mortalidad en niños menores de 24 meses y puede estar asociada con importantes efectos a largo plazo en la salud. (King *et al.*, 2019)

La prevalencia de este microorganismo es variable, en función de las características socioeconómicas de la población, ya que es más frecuente en los lugares con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable, en las piscinas, en la eliminación de aguas residuales o con estrecho contacto con animales. Se encuentra en las heces de 1% a 3% de los habitantes de los países desarrollados (Europa y América del Norte), en el 5% de los países asiáticos, en el 10% de los países africanos y en el 40% de los países de Sudamérica.

La infección se transmite de persona a persona, por contacto con animales infectados, por el agua de bebida, por las piscinas o por los alimentos contaminados (frutas, verduras, zumos de frutas, moluscos, etc.). Se reporta que tiene una morbilidad del 1% al 30% y una mortalidad de 0.7% al 20% en personas inmunodeprimidos (Hernández *et al.*, 2018).

Cada año se notifican en todo el mundo numerosos brotes de criptosporidiosis humana causados por subtipos genéticos de *Cryptosporidium parvum* y el ganado o el agua son fuentes de infección identificadas con frecuencia (Caffarena *et al.*, 2020).

La criptosporidiosis es un importante problema de salud humana a nivel mundial. A pesar de los métodos bien establecidos, el diagnóstico erróneo sigue siendo común

en humanos. Nuestra comprensión del mecanismo bioquímico de la criptosporidiosis sigue siendo limitada, lo que agrava la dificultad del diagnóstico clínico (Karpe *et al.*, 2021)

El diagnóstico de la criptosporidiosis puede realizarse mediante la detección de los estadios endógenos en cortes histológicos de muestras de intestino obtenidas por biopsia o post mortem, que pueden ser teñidas con hematoxilina-eosina y permiten detectar los estadios del parásito en su localización apical característica. No obstante, la forma habitual de diagnosticar la enfermedad consiste en identificar los ooquistes en muestras de heces (Mamedova y Karanis, 2020).

Aunque el pequeño tamaño de los ooquistes y su similitud con diversas levaduras exige el empleo de diversas técnicas coprológicas y tinciones específicas. Las técnicas convencionales de ejecución más fácil y rápida son las tinciones negativas como la de Heine. El principal inconveniente es su escasa sensibilidad, ya que se realizan sobre frotis de heces sin concentrar y por tanto la cantidad de heces que se examina es muy escasa (aprox. 0,001gr./frotis), aunque pueden utilizarse en muestras obtenidas durante el periodo de diarrea cuando habitualmente se eliminan grandes cantidades de ooquistes. Para solucionar este problema se pueden usar métodos de concentración, que permiten examinar una mayor cantidad de heces, como las técnicas de flotación con diferentes soluciones (Vergara y Quílez, 2004).

Después de la una infección por *Cryptosporidium* la autólisis es evidente a partir de las 12 h la autólisis completa y la destrucción del tejido con pérdida de las vellosidades e incluso la estructura de la cripta se aprecia a las 18 h. Se encontró que la longitud de las vellosidades disminuyó significativamente con el tiempo ($p < 0.001$). La infección por *C. parvum* produce cambios destructivos en el intestino acortan la longitud de las vellosidades y que estos cambios pueden controlarse in vitro durante un período corto. Significativamente, en presencia de antibióticos (penicilina / estreptomina) el daño se reduce en términos de la velocidad a la que tiene lugar; lo que sugiere que las bacterias grampositivas y negativas residentes pueden tener un efecto amortiguador temprano durante la infección por *C. parvum* (Drinkall *et al.*, 2017)

Tratamiento

Los medicamentos antiparasitarios pueden ayudar a tratar la criptosporidiosis en individuos sanos, pero su eficacia es incompleta y es posible que no puedan controlar la enfermedad si el sistema inmunológico está comprometido.

El tratamiento de la enteritis por Criptosporidiosis en rumiantes jóvenes suele ser sintomático y de apoyo. Debe mantenerse una ingesta adecuada de energía. En ocasiones, puede ser necesario un apoyo intensivo en especies o individuos particularmente susceptibles. La halofuginona está aprobada para el tratamiento de la criptosporidiosis en terneros en algunos países y puede disminuir la duración de la diarrea. Sin embargo, este medicamento debe iniciarse a más tardar en las primeras 24 horas de la diarrea y administrarse durante 7 días. Existe información limitada sobre su uso en ovejas, cabras y otras especies. Ocasionalmente se han empleado otros fármacos antiprotozoarios (por ejemplo, paromomicina, azitromicina, nitazoxanida, tilosina) y calostro hiperinmune ovino o bovino en varios mamíferos, animales domésticos o aves silvestres cautivas y reptiles (Spickler, 2018).

V. Biopelícula.

5.1. Definición.

Las biopelículas bacterianas son comunidades complejas de bacterias adheridas a la superficie (Yonezawa *et al* 2015; Muhammad *et al.*, 2020), en un comportamiento grupal cooperativo que involucra poblaciones bacterianas que viven incrustadas en una matriz extracelular (Solano *et al.*, 2014). Las bacterias existen en la Naturaleza bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas, de libre flotación y bacterias en biopelículas (Nazar, 2007) Se pueden formar en superficies bióticas y abióticas, debido a su respuesta a condiciones adversas del medio ambiente (Campuzano *et al.*, 2018).

La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura y llega a representar hasta el 97 %. Está formada, además, por exopolisacáridos, que constituyen su componente fundamental, producidos por los microorganismos integrantes. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos y diversos productos procedentes de la lisis bacteriana (Muhammad *et al.*, 2020). El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y

proteínas se conocen con el nombre de sustancias poliméricas extracelulares. En la matriz también pueden hallarse: cristales de sales minerales, partículas de corrosión, de sedimento o ambas, o componentes sanguíneos. Los exopolisacáridos pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes. Pueden tener carga neutra o poli aniónica, según el tipo de exopolisacárido, lo que les permitirá interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias.

Se han descrito en muchos sistemas desde que Van Leeuwenhoek examinó los "animálculos" en la placa de sus propios dientes en el siglo XVII, pero la teoría general del predominio de las biopelículas no se promulgó hasta 1978. Esta teoría establece que la mayoría de las bacterias crecen en biopelículas encerradas en una matriz que se adhieren a las superficies de todos los ecosistemas acuáticos con suficientes nutrientes y que estas células bacterianas sésiles difieren profundamente de sus contrapartes planctónicas (flotantes) (Donlan y Costerton, 2002).

Desde el descubrimiento de las biopelículas se sabe que el 90% de los microorganismos poseen esta característica microbiológica y que su biosíntesis es un proceso complejo, constante y dinámico que ocurre en 6 fases.

- 1.- Fase de unión reversible, en la que las bacterias se adhieren de manera no específica a las superficies
- 2.- Fase de unión irreversible, que implica la interacción entre las células bacterianas y una superficie utilizando adhesinas bacterianas tales como fimbrias y lipopolisacáridos.
- 3.-Producción de sustancias poliméricas extracelulares por las células bacterianas residentes
- 4.-Fase o de crecimiento: la bacteria, una vez adherida, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una micro colonia. A medida que las células se dividen y colonizan la superficie, comienzan a elaborar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y este comienza a desplegarse en una formación tridimensional (Sarduy y González, 2016).

5.-Fase de maduración de la biopelícula, en la que las células bacterianas sintetizan y liberan moléculas de señalización para detectar la presencia de las otras, lo que conduce a la formación de micro colonia y la maduración de biopelículas.

6.- Fase de dispersión o desprendimiento: donde las células bacterianas abandonan las biopelículas y regresan al estilo de vida planctónico independiente (Skraber *et al.*, 2007; Tolker, 2015; Muhammad *et al.*, 2020).

Los eventos de desprendimiento de biopelículas son comunes y ocurren cuando unas biopelículas se desprenden del sustrato para suspenderse como partículas grandes en la columna de agua y puede resultar en la liberación de reservorios de patógenos de las biopelículas a la columna de agua (Wolyniak *et al.*, 2012).

La arquitectura y la organización de las biopelículas dependen de las especies bacterianas formadoras de biopelículas. Múltiples factores están involucrados en la formación de estructuras particulares en las biopelículas. Además, la misma especie bacteriana puede formar diferentes estructuras de biopelícula en diferentes condiciones ambientales y puede cambiar en respuesta a un cambio en las condiciones nutricionales en su ambiente (Tolker, 2015).

La capacidad de formar biopelícula no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, independiente de la especie, puede existir dentro de biopelículas adheridos a superficies en una interfase sólido/ líquida, incluyendo organismos importantes en enfermedades otorrinolaringológicas, tales como *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella* y *S. aureus*. Esta adhesión a una superficie húmeda ya sea inerte o viviente, es de carácter irreversible, esto es, la biopelícula no logra ser removido mediante lavado suave (Nazar, 2007)

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión. Se ha encontrado que los gérmenes se adhieren más rápidamente a superficies hidrofóbicas, no polarizadas, como lo es el teflón y otros plásticos, en comparación con materiales hidrofílicos, como vidrio o metales. Aparentemente se produciría algún tipo de interacción hidrofóbica entre la

superficie celular y la del sustrato que permitirían a la bacteria superar las activas fuerzas de rechazo a cierta distancia de la superficie del sustrato y lograr adherirse irreversiblemente. (Nazar, 2007)

En la adhesión bacteriana pueden también influir variaciones en la velocidad de flujo, temperatura del agua y concentración de nutrientes. Se ha encontrado que un incremento en la concentración de diversos cationes (sodio, calcio, hierro) afecta la adhesión de *Pseudomonas spp.* a superficies de vidrio (Nazar, 2007).

Las bacterias que forman las biopelículas poseen una expresión génica diferente respecto a sus contrapartes en estado planctónico y originan, por tanto, bacterias fenotípicamente distintas. Las biopelículas tienen un ambiente muy dinámico, donde se intercambia material genético, como plásmidos (ácido desoxirribonucleico extra cromosómico), enzimas y otras moléculas. Existe una tasa de transferencia génica mediada por plásmidos, enormemente incrementada entre biopelículas de bacterias; la redistribución de genes entre estas es un proceso continuo, con importantes consecuencias en su adaptación evolutiva. Las cepas bacterianas de importancia clínica, unidas a plásmidos, desarrollan biopelículas más fácilmente; sin embargo, cuando no se encuentran asociadas a estas, se producen micro colonias de escaso desarrollo. Debido a que los plásmidos pueden codificar resistencia a múltiples antimicrobianos, la biopelícula proporciona también un mecanismo para el incremento de la resistencia a los antibióticos (Sarduy y Gonzalez, 2016)

En la parte más interna de las biopelículas, la concentración de oxígeno es baja, por lo que se genera una atmósfera anaerobia y de bajo pH. Esto puede ocasionar una disminución en la actividad de algunos antibióticos, tales como los aminoglucósidos que disminuyen su efectividad en atmósferas anaerobias. Otros fenómenos que ocurren por las alteraciones del microambiente son la disminución del metabolismo bacteriano y la disminución de los tiempos de replicación. Es importante recordar que el objetivo de muchos antibióticos es bloquear rutas metabólicas de los microorganismos, como la síntesis de proteínas o la síntesis de la pared bacteriana. Por ejemplo, al disminuir el tiempo de replicación, los antibióticos betalactámicos no pueden actuar de manera efectiva (Ortega y Hernández, 2018).

5.2. Biopelículas y *Cryptosporidium*.

La capacidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* para adherirse a la biopelícula se sugirió por primera vez después de un brote de criptosporidiosis transmitida por el agua que se produjo en el noroeste de Inglaterra en marzo de 2000. El equipo de control del brote sugirió cambiar el suministro de agua del área afectada por el brote para eliminar cualquier contaminación del agua de ooquiste. Sin embargo, los ooquistes permanecieron microscópicamente detectables en agua hasta 19 días después del cambio. Los autores plantearon la hipótesis de la liberación de ooquiste de la biopelícula desarrollada en la superficie de las tuberías de distribución (Lefebvre *et al.*, 2021).

La evidencia de que los ooquistes de *Cryptosporidium* tenían potencial de distribución en biopelículas fue proporcionada por primera vez por Skraber *et al.*, mostrando la presencia de ooquistes en biopelículas polimicrobianas desarrolladas en cupones de cloruro de polivinilo (PVC) sumergidos durante al menos 2 meses en aguas residuales (Skraber *et al.*, 2007)

Después de ser excretan en las heces en una forma totalmente infecciosa como ooquistes en ambientes acuáticos naturales, esta etapa transmisible puede permanecer viables fuera de sus huéspedes en ambientes acuosos durante semanas o meses, se sabe que las biopelículas actúan como reservorios ambientales para los ooquistes (Koh *et al.*, 2013).

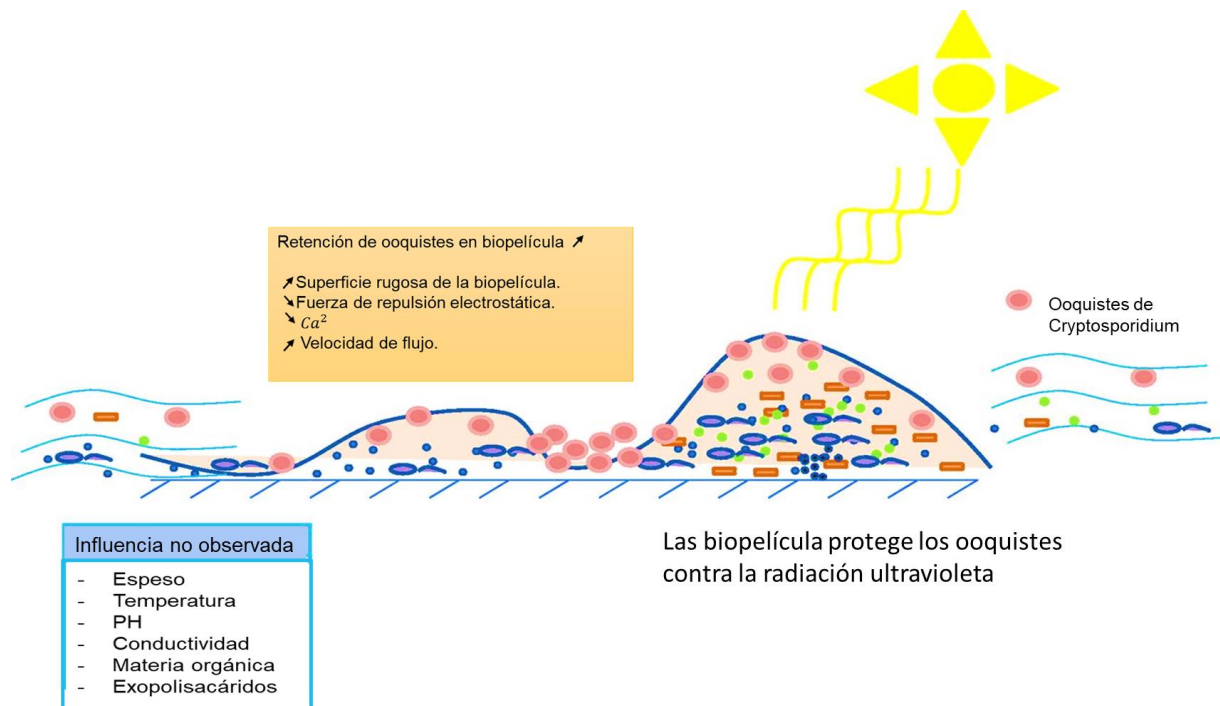
Las biopelículas parecen representar una fuente potencialmente de contaminación significativa a largo plazo de ooquistes de *Cryptosporidium* que pueden ser atrapados y pueden contaminar los suministros de agua a través de su posterior liberación de forma gradual (Wolyniak *et al.* 2012; Chan *et al.*, 2019).

Esto explica la aparición de ooquistes en los sistemas de distribución de agua mucho después de un evento de contaminación. Por lo tanto, se sugirió que las biopelículas eran la razón por la cual se tenía la recuperación continua de ooquistes de un sistema de distribución de agua potable, luego de un brote de criptosporidiosis transmitida por el agua en Inglaterra (Wingender y Flemming 2011).

Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se adhieren rápidamente a las biopelículas microbianas naturales. La dinámica de adhesión y liberación de ooquiste es importante para evaluar y reducir potencialmente el riesgo de exposición e infección humana (Searcy *et al.*, 2006; Wolyniak *et al.*, 2010).

La unión de los ooquistes a las biopelículas está controlada por la arquitectura de las biopelículas y las interacciones químicas de la superficie que dependen de la química del agua. Las características de una biopelícula específica, incluida la composición, el grosor y la morfología, dependen del número y la diversidad de organismos en el agua, la concentración y naturaleza de la materia orgánica biodegradable y las características del material de soporte.

Figura 4. Parámetros que influyen en la retención y diseminación de ooquistes a partir de biopelículas. Modificado de Lefebvre *et al.*, 2021.



La irradiación UV (radiación ultravioleta) sobre la viabilidad de los ooquistes *Cryptosporidium* ya ha sido reportado en la literatura, pero la influencia de las biopelículas es raramente documentada. Se compararon la infectividad de ooquistes adheridos a la parte superior de una biopelícula, la infectividad de ooquistes adheridos a la parte inferior de una biopelícula de 30 μm y la infectividad de ooquistes

suspendidos. Los resultados fueron claro, ooquistes expuestos al sol fueron menos infecciosos que los ooquistes en la oscuridad. La infectividad de los ooquistes adheridos a la parte superior de las biopelículas es significativamente menor que la infectividad de los ooquistes en la parte inferior de la biopelícula, lo que significa que las biopelículas proporcionan una barrera protectora para los ooquistes contra la radiación solar. (Lefebvre *et al.*, 2021).

En un estudio donde se observó los cambios que tenían las biopelículas cuando interactuaban con ooquistes se demostró que las biopelículas eran más gruesas que los controles de solo biopelícula. Aunque tanto los controles de solo biopelículas como las biopelículas expuestas a *Cryptosporidium* formaron biopelículas inmaduras el primer día y biopelículas maduras el día seis, las biopelículas expuestas a *Cryptosporidium* siempre fueron significativamente más gruesas que los controles de biopelículas solamente. Además, para el día tres, las biopelículas expuestas a *Cryptosporidium* habían formado biopelículas maduras y, por lo tanto, habían madurado significativamente más rápido que las biopelículas inmaduras de tres días comparables en el control de solo biopelícula. (Koh *et al.*, 2013). El estudio comprobó el esquema publicado por Wingender y Flemming en 2011, que representaba el sitio donde se alojaban frecuentemente los ooquistes y la teoría de los microorganismos utilizan los ooquistes para su movimiento de la parte superior a la inferior (Wingender y Flemming, 2011).

VI. Contaminación del agua por *Cryptosporidium* spp.

A nivel mundial, el agua subterránea representa aproximadamente el 95% del agua dulce disponible y representa una fuente clave de agua potable doméstica, con aproximadamente el 31.5% (2.200 millones de personas) de la población mundial que depende del agua subterránea para el consumo diario (Chique *et al.*, 2020). El agua superficial, también es una fuente importante de agua potable y en ocasiones consumida sin haber recibido tratamiento (Limaheluw *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2017).

También la reutilización del agua se considera una forma innovadora de abordar la escasez de agua que puede generar importantes beneficios económicos, sociales y ambientales, los principales países que reutilizan el agua son, China, México y EE.

UU. (Principalmente California, Texas, Arizona y Florida) Particularmente los principales países tratadores de aguas residuales per cápita, son Qatar, Israel y Kuwait países que se encuentran en Asia y la mayoría de su territorio es desierto (Abeledo *et al.*, 2018).

Las regiones más vulnerables a contaminación de agua incluyen áreas densamente pobladas como India, China, Pakistán y Bangladesh, Nigeria, Argelia y Sudáfrica, México, Venezuela y algunas áreas costeras de Brasil, varios países de Europa Occidental y Oriental (incl. Reino Unido, Bélgica y Macedonia) y Oriente Medio. Las fuentes puntuales de contaminación (heces humanas) parecen ser una fuente de más dominante que las fuentes difusas (principalmente estiércol animal) en la mayoría de las regiones del mundo (Vermeulen *et al.*, 2019).

El uso de agua no tratada para beber y otros fines domésticos, como la preparación de alimentos, lavar la ropa y bañarse, puede ser perjudicial para las comunidades, (Potgieter *et al.*, 2020) y juega un papel importante en la transmisión de muchos microorganismos patógenos diferentes, como bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos. Ya que estos provocan brotes de enfermedades transmitidas por el agua. Que en los últimos años han mostraron un gran aumento no solo en número sino también en extensión (Hamdy *et al.*, 2019).

Se estima que las enfermedades transmitidas por el agua causan más de 2,2 millones de muertes por año y muchos casos de enfermedades gastrointestinales todos los días, en todo el mundo, tanto en países desarrollados como en los países subdesarrollo (Wei *et al.*, 2018).

La vulnerabilidad del agua superficial con respecto a la contaminación por *Cryptosporidium* está confirmada en la literatura. Los ríos podrían ser un medio de transmisión rápida y a larga distancia de microorganismos patógenos de fuentes terrestres. También resulta que *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* siguen siendo las especies que se encuentran principalmente tanto en aguas superficiales como en aguas tratadas en todo el mundo (Pignata *et al.*, 2019).

Cryptosporidium spp. se clasifica sistemáticamente como la principal causa mundial (> 50%) de los brotes de infección por protozoos transmitidos por el agua (Chique *et al.*, 2020). Los brotes de a menudo están relacionados con fallas en el tratamiento o deficiencias de tratamiento en plantas recicladoras de agua, lo que permite la contaminación de las aguas potable que están destinadas a consumo humano (Diéguez *et al.*, 2018).

Cryptosporidium spp. se puede encontrar en ambientes acuáticos, incluidas aguas superficiales, subterráneas, suministros de agua potable y aguas residuales. La calidad del agua y los parámetros microbianos como la turbidez, la temperatura, el color, los residuos de desinfectantes, la dosis de coagulante, la superficie total, la abundancia de coliformes fecales, así como la geografía, los animales locales, los patrones de topografía y lluvia, juegan un papel importante en la supervivencia de *Cryptosporidium spp.* en agua (Daraei *et al.*, 2020).

El primer inventario mundial publicada en 2013 de emisiones de ooquiste de *Cryptosporidium* al agua superficial, identifico las regiones de puntos calientes y las principales fuentes de contaminación. Los resultados indicaron que las emisiones globales de fuentes puntuales de aguas residuales que contienen excretas humanas son comparables a las emisiones totales de fuentes difusas de la producción ganadera. Sin embargo, las emisiones de las áreas urbanas se concentran en áreas relativamente pequeñas, mientras que las emisiones agrícolas son más difusas. Las áreas de puntos críticos identificadas incluyen grandes áreas urbanas en China, India y América Latina. Las principales emisiones de fuentes difusas se pueden encontrar en áreas agrícolas con producción ganadera intensiva, por ejemplo, en China, India y países industrializados. El análisis muestra que las emisiones humanas pueden ser mucho mayores según el modelo si las heces que no se recogen en los sistemas de alcantarillado terminan directamente en las aguas superficiales. Este es probablemente el caso en muchas áreas urbanas de países en desarrollo donde no existen sistemas de alcantarillado y las aguas residuales se canalizan a través de alcantarillas abiertas hacia las aguas superficiales. (Hofstra *et al.*, 2013).

En la publicación más reciente de la prevalencia de *Cryptosporidium* se determinó que en fuentes de agua tratada la prevalencia fue de 25.7% y en fuentes de agua no tratada fue de 40.1% la prevalencia general de *Cryptosporidium spp.* entre todos los tipos de agua fue de 36% (Daraei *et al.*, 2020).

6.1. Brotes.

Un brote de criptosporidiosis en una comunidad generalmente comienza como un brote focal asociado con un lugar de agua recreativa y evoluciona a un brote asociado con múltiples lugares de agua recreativa u otros entornos (por ejemplo, centros de cuidado infantil o albercas públicas). A medida que avanza el brote, la exposición al agua recreativa podría disminuir en su importancia como factor de riesgo, mientras que la transmisión secundaria (es decir, el contacto con una persona infectada) podría volverse cada vez más importante (Hlavsa *et al.*, 2011).

Desde su descubrimiento en 1907 se notificaron relativamente pocos casos adicionales en humanos hasta 1982, cuando se identificó diarrea grave y prolongada causada por *Cryptosporidium* en hombres principalmente de las ciudades que padecían el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en los Estados Unidos y en sujetos inmunocompetentes, especialmente en los cuidadores de terneros (Meinhardt *et al.*, 1996).

En 1993 *Cryptosporidium spp* es reconocido como problema de salud pública asociado al agua que se utiliza para tomar en EE UU. Ya que se produjo un brote de criptosporidiosis en Milwaukee, este brote no solo fue la primera aparición significativa de *Cryptosporidium spp.* como un patógeno humano importante, sino también fue un enorme brote transmitido por el agua que afectó a miles de personas de una ciudad importante de América del Norte, Con un costo asociado a la enfermedad estimado de US \$ 96,2 M y 100 muertes. Desde entonces, los brotes de criptosporidiosis ocurren regularmente en todo el mundo (Gargala, 2008; Zahedi *et al.*, 2018).

Con base en un estudio realizado durante 2019 que recopiló 221 publicaciones de diferentes regiones, se realizó un estimado de la prevalencia global de la infección por *Cryptosporidium* el cual resulta que la prevalencia es de 7.6% en los estudios tomados

de 69 países. La mayor prevalencia se encontró en México, Nigeria, Bangladesh y la República de Corea entre los residentes generales, los pacientes, los escolares y la población sana, respectivamente. Los países sin prevalencia estimada no significaron que no hubo infección por *Cryptosporidium*, pero estos países no tienen ningún estudio que cumpla con los requisitos para la inclusión. Los países de ingresos altos tuvieron la prevalencia más baja en subgrupos de población, excepto para los residentes generales (Dong *et al.*, 2020).

Se sabe por estudios anteriores que la prevalencia de la criptosporidiosis varía del 1 al 5% en niños de países desarrollados y del 50% en niños de países en desarrollo. La criptosporidiosis se puede encontrar con más frecuencia en niños pequeños y pacientes inmunodeprimidos, especialmente aquellos con inmunosupresión asociada al VIH, donde la prevalencia general de la infección por *Cryptosporidium spp* es de 9.5% a nivel global, pero en países con una alta tasa de VIH puede ser mucho mayor principalmente en países africanos donde se ha encontrado hasta un 34% mediante microscopía y pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Este varía según el sexo, siendo mayor entre los hombres en comparación con las mujeres. La distribución de especies de *Cryptosporidium* en humanos varía según las áreas geográficas y las condiciones socioeconómicas. En los países europeos, aumentó la detección de infecciones por *C. parvum*, *C. hominis* y *C. meleagridis* en humanos. Las infecciones por *C. canis* y *C. felis* se informan en estudios realizados en países en desarrollo (Bednarska *et al.*, 2018; Nakibirango *et al.*, 2019; Sinyangwe *et al.*, 2020).

La criptosporidiosis en Asia parece estar asociada con la urbanización y el rápido aumento de la población. Las fuentes de agua son insuficientes, no están bien mantenidas y están expuestas a la contaminación por animales. Se han notificado casos de criptosporidiosis en Camboya, Indonesia, Laos, Malasia, Myanmar, Filipinas, Singapur, Tailandia y Vietnam. En Bangkok, entre los *Cryptosporidium spp.* que han sido aislados de pacientes con VIH son *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. muris*, y *C. parvum* genotipo bovino. En la India, un estudio encontró que tanto los pacientes con VIH como los que no tenían VIH que acudían a un hospital tenían una prevalencia del 38.60% y 2.52% respectivamente, mostrando una alta prevalencia en pacientes con VIH.

En China la prevalencia de *Cryptosporidium* en niños con diarrea en la región de Guangzhou fue del 6.9% y la prevalencia real del 9% ajustada por la especificidad y la sensibilidad del método de diagnóstico. En otras regiones de China, la prevalencia de *Cryptosporidium* en niños en los informes disponibles osciló entre 0.7 y 5% y entre 1 y 9.9% en la provincia de Jiangsu, 1.3% y 2.14-5.19% en la provincia de Anhui, 4-7% en Changsha y 5% en la provincia de Yunnan (Chen *et al.*, 2017).

Las tasas de prevalencia de la criptosporidiosis en Australia son un problema importante de salud pública y son más altas que en otros países desarrollados. Aunque la criptosporidiosis también se asoció con la lluvia, se ha informado que se producen casos en áreas cálidas y secas. En las zonas rurales, los casos de criptosporidiosis están relacionados con una alta densidad de ganado. Los más importante identificados en humanos: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. fayeri*, *C. andersoni*, y *C. bovi*. En 2009 en Nueva Gales del Sur, se infectaron 1141 personas con *Cryptosporidium spp.* debido a la contaminación de las piscinas públicas (Bamaiyi y Redhuan, 2016).

Estados Unidos, se han notificaron al menos 928 brotes de enfermedades transmitidas por el agua entre 1971 y 2014. Durante cuarenta años, varios agentes etiológicos han causado contaminaciones. Bacterias, virus y agentes no identificados han causado la mayoría de estas epidemias, pero los brotes de parásitos como *Cryptosporidium spp.* y *Giardia intestinalis* también se han presentado sistemáticamente a lo largo de este período (Pignata *et al.*, 2019). Principalmente *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* que afectan a los humanos y bovinos (Wingender y Flemming, 2011) se han reportan con frecuencia como contaminantes ambientales importantes en muchos países a pesar de sus diferentes factores climáticos, socioeconómicos y demográficos (El-Alfy Y Nishikawa, 2020).

Entre el 1 y el 15 de marzo de 2000, se produjo un brote de criptosporidiosis en y alrededor de la ciudad de Clitheroe en el condado de Lancashire en el noroeste de Inglaterra. El Departamento de Salud Ambiental de Ribble Valley notificó nueve casos de criptosporidiosis a la Autoridad de Salud de East Lancashire. Todos los pacientes vivían en o cerca de Clitheroe. La información provisional proporcionada por la empresa de agua indicó que seis de estos nueve pacientes vivían en una sola zona de

agua abastecida por las mismas obras de tratamiento de agua. Sobre la base de esta información, se declaró un brote y se estableció un equipo de control de brotes. Después de realizar estudios a diferentes habitantes se concluyó que 51 pacientes dieron positivos a *Cryptosporidium* y vivían en la misma zona de suministro de agua y bebían agua del grifo principal sin hervir en la zona. La tasa bruta de ataque para los residentes de esta zona fue de 29,6 por 10.000 habitantes (según la población registrada de médicos generales de 17.252 personas vinculadas por el código postal de las residencias en la zona de suministro de agua) (Howe *et al.*, 2002).

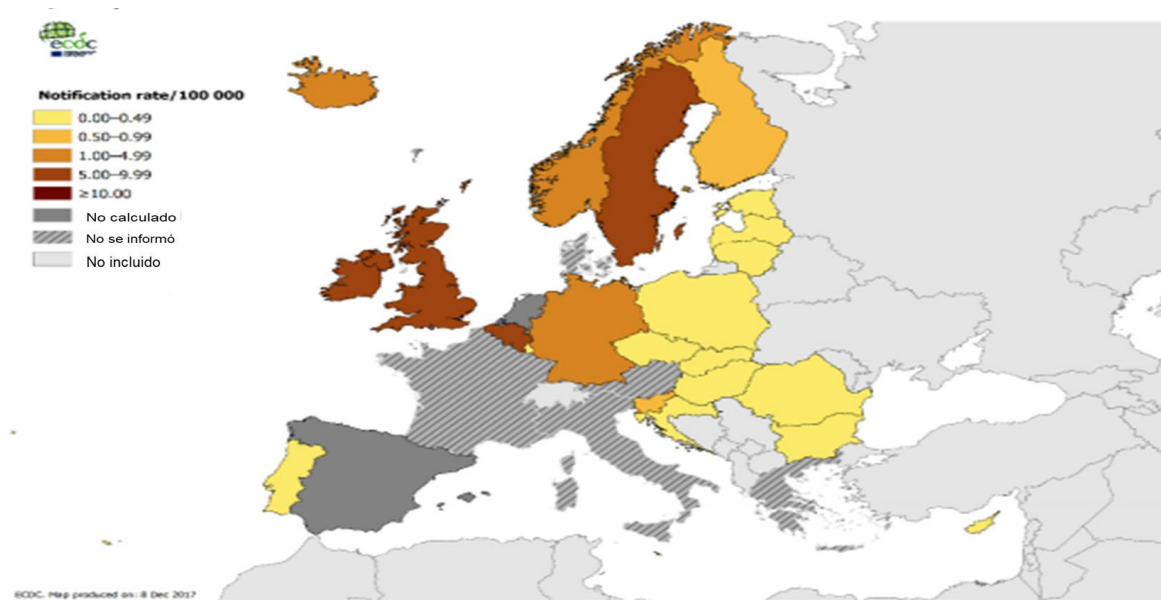
Durante el 2007 y 2008 se reportaron 134 brotes de enfermedades transmitidas por el agua reportadas por el Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), 62 brotes fueron asociados con agua recreativa tratada y causados por parásitos. Un total de 58 (93.5%) brotes fueron causados por *Cryptosporidium*, resultando en 12137 casos de diarreas agudas en humanos. Algunos de los brotes de criptosporidiosis fueron brotes en toda la comunidad (Hlavsa *et al.*, 2011).

En Östersund, Suecia, en noviembre de 2010, alrededor del 45% de los habitantes se vieron afectados por la *criptosporidiosis* causada por *C. hominis* del suministro público de agua contaminada. El brote se caracterizó por la rápida aparición de síntomas y una alta tasa de ataque. Los Factores de riesgo identificados fue, cantidad de agua consumida diariamente (Bamaiyi y Redhuan, 2016).

En agosto de 2013, en la ciudad alemana de Halle, 167 personas, en su mayoría niños, mostraron los síntomas clásicos de la criptosporidiosis. El brote fue causado por el consumo de agua contaminada por aguas residuales tras la inundación del río Saale. El análisis de muestras ambientales mostró un elevado número de ooquistes (hasta 592 ooquistes / 100 L) de *Cryptosporidium hominis* (Pignata *et al.*, 2019).

En junio de 2015, se produjo un brote de criptosporidiosis en Hungría con 35 casos dieron positivo (23 probables y 12 confirmados por laboratorio) entre 191 asistentes a unas vacaciones de rehabilitación residencial para pacientes pediátricos con trasplante de órganos y sus familias en un hotel en el condado de Somogy, Hungría (Plutzer *et al.*, 2018).

Figura 5. Distribución de casos confirmados de *Cryptosporidium* por cada 100000 habitantes por país de la Unión Europea en 2015. Modificado de Ongerth *et al.*, 2018.



Estadísticas epidemiológicas compartidas por el Centro europeo para la prevención y el control de enfermedades en su informe más recientes sobre criptosporidiosis muestran una amplia distribución de casos confirmados de la enfermedad en Europa. Algunas características importantes en el informe del 2015 son: Los datos recopilados proceden de aproximadamente la mitad de los países de Europa. Las excepciones importantes incluyen Francia, España, Portugal, Italia, Grecia, Ucrania, Rusia, Países Bajos y Dinamarca, una revisión reciente centrada en *Cryptosporidium* y *Giardia* en Europa del Este describe la distribución de ambos organismos en las poblaciones animal y humana en toda esta región (Ongerth *et al.*, 2018).

Entre enero de 2011 y diciembre de 2016, se notificaron 381 brotes transmitidos por el agua debidos a parásitos protozoarios como *Cryptosporidium spp* en todo el mundo. El 49% de los eventos ocurrieron en Nueva Zelanda, el 41% en América del Norte y el 9% en Europa (Pignata *et al.*, 2019).

Cuadro 2. Principales brotes.

Año	Ciudad	Afectados	Causas
1982	Estados Unidos		Sujetos inmunocompetentes, especialmente en los cuidadores de terneros
1993	Milwaukee, Estados Unidos	Miles de personas	Brote transmitido por el agua
2000	Clitheroe Inglaterra	51 pacientes	Consumo del subministro de agua potable
2007-2008	Estados Unidos	58 brotes 12137 personas	Fueron asociados con agua recreativa tratada
2009	Nueva Gales del Sur	Se infectaron 1141 personas	Contaminación de las piscinas públicas.
2010	Östersund, Suecia	45% de los habitantes	Cantidad de agua consumida diariamente
2013	Halle Alemania	167 personas	Consumo de agua contaminada por aguas residuales tras la inundación del río Saale
2015	Somogy Hungría	35 personas	Asistentes a unas vacaciones agua de alberca en un hotel

En países latinoamericanos se han establecido cifras de prevalencia de oquistes en el agua: en Brasil se determinó en un 18.7 %; en Argentina del 3.9 %, Costa Rica 4.3 %, Venezuela 10.8 %, Ecuador 11.2 %, Guatemala 13.8 %-16.7% en Haití y en Colombia de 33.2 % (García *et al.*, 2014).

Los países que soportan la carga de morbilidad relativa más alta se encuentran principalmente en el sur y sureste de África subsahariana y se caracterizan por una prevalencia relativamente alta del VIH / SIDA (Limaheluw *et al.*, 2019). La transmisión es principalmente de hombre a hombre, dado el frecuente contacto cercano entre

humanos y animales en África, el aparente predominio de la transmisión de persona a persona es interesante y desconcertante (Robertson *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Prevalencia *Cryptosporidium* en agua.

Prevalencia <i>Cryptosporidium</i> en agua	
Países	%
Argentina	3.9 %,
Brasil	18.7 %
Colombia	33.2 %
Costa Rica	4.3 %,
Ecuador	11.2 %,
Guatemala	13.8 %-16.7%
Haití	33.2 %
México	7.7%,
Sudán	13.3%
Tailandia	6%-11%
Venezuela	10.8 %,
Vietnam	5%
Prevalencia global	19.6%

6.2. Brotes en México.

En México, *Cryptosporidium* se notificó por primera vez en la década de los 80 en niños del estado de San Luis Potosí y en pacientes inmunodeprimidos de la Ciudad de

México y Monterrey, incluidos pacientes hospitalizados y niños infectados por el VIH. En bovinos fue identificada por primera vez en 1983 mediante microscopia en becerras lactantes (Soave *et al.*, 1989; Vitela *et al.*, 2018).

En México, si bien el diagnóstico etiológico de los síndromes diarreicos no se realiza de manera rutinaria en varias regiones, algunos estudios han intentado determinar la prevalencia de paracitos intestinales en pacientes inmunodeprimidos. se han reportado *Cryptosporidium spp* en proporciones variables (6% -82%) de adultos y niños inmunodeprimidos de México (García *et al.*, 2014).

Se estima que la tasa de prevalencia en México de *Cryptosporidium spp* es de 7.7%, superior al porcentaje reportado en Argentina (0.2%) y Vietnam (5%). sin embargo, es menor que la reportada en Sudán (13.3%). De igual forma, en un estudio realizado en San Pedro Itzcán, ubicado en la orilla del lago Chapala, la prevalencia de *Cryptosporidium spp* fue del 7%. Es importante considerar la alta transmisibilidad de *Cryptosporidium spp* ya que los ooquistes que se eliminan en las heces son inmediatamente infecciosos para humanos y animales (Galván *et al.*, 2019).

Hay pocos informes sobre la prevalencia de Criptosporidiosis en humanos, las tendencias epidemiológicas siguen siendo desconocidas a nivel nacional. Estudios realizados en niños menores de un año de la Ciudad de México en 2006, que fueron atendidos en la Unidad de Medicina Familiar Gabriel Mancera del Instituto Mexicano del Seguro Social demostró que de 100 niños que fueron atendidos por enfermedad diarreica aguda, 44 casos fueron positivos para protozoos, en 18 (41%) se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium*. Esto se considera un importante creciente de las infecciones por *Cryptosporidium* en huéspedes humanos (SÁNCHEZ, 2006).

Un Estudio realizado a 1,179 viajeros norteamericanos que visitaron México entre 2005 y 2007. La diarrea del viajero (DT) fue informada por 521 (44%) participantes. Entre los sujetos con DT, se examinaron 218 casos para detectar criptosporidiosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa e inmunoensayos ligados a enzimas. Hubo 14 (6%) casos de criptosporidiosis. ELISA detectó siete (3%) casos de *Cryptosporidium*, mientras que la PCR identificó siete casos adicionales (6%). La especiación por secuenciación de 18Sr ARN mostró que 13 casos fueron causados

por *Cryptosporidium parvum* y solo 1 caso fue causado por *Cryptosporidium hominis*. ELISA mostró una sensibilidad del 50% y una especificidad del 100% en comparación con la PCR (Nair *et al.*, 2008).

En un estudio realizado en la ciudad de Monterrey, México, *Cryptosporidium* fue el protozoo con una mayor frecuencia, como se informa habitualmente en otros lugares. La prevalencia de criptosporidiosis fue del 11% entre todos los pacientes inmunodeprimidos y del 14% entre aquellos con infección por VIH. La criptosporidiosis es endémica tanto en entornos urbanos como en comunidades rurales de México, con tasas de prevalencia que oscilan entre el 3% y el 51%.

En México la prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en bovinos oscilar entre el 22% y el 67%. En lugares importantes como la Región Lagunera donde se encuentra uno de los mayores productores de leche del país, la prevalencia de *Cryptosporidium spp* según los estudios se encuentra en 71.79% lo cual representa un dato alarmante, de ahí que las infecciones gastrointestinales en los bovinos son frecuentes con un mayor nivel de infección para los terneros (López *et al.*, 2020).

En México, las autoridades de salud carecen de información sobre brotes de criptosporidiosis en el territorio nacional, existiendo en la actualidad pocos estudios científicos sobre el tema. En cuatro estudios epidemiológicos transversales para identificar la prevalencia del parásito, realizados en la ciudad de México en grupos de niños y enfermos de cáncer, la prevalencia reportada en enfermos con diarrea fue del orden del 29.6% y de 11.4% en individuos aparentemente sanos (García *et al.*, 2014).

En 2010 en comunidades rurales de San Luis Potosí, Se encontró que casi la mitad de 2055 niños de 3 a 19 años en 14 tenían parásitos intestinales. Además, no se encontraron diferencias en la prevalencia de estas infecciones entre niños y niñas o niños en edad escolar y preescolar en este estudio.

Un estudio realizado en niños de dos escuelas primarias públicas y tres jardines de infancia públicos ubicados en la región de Cananea en el noroeste de México entre 2013 y 2014 se encontró que, más de la mitad de los niños tenían infecciones por

protozoos patógenos y comensales, un tercio tenía poli parasitismo intestinal (Quihui *et al.* 2017).

En 2013, en El Valle de Juárez, Chihuahua se detectó ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en muestras de agua doméstica, en 19 de 38 (50%) muestras tomadas de grifos y en 12 de 13 comunidades de estudio lo que demostró que los ooquistes pueden causar un brote de enfermedades diarreicas y en algunos casos no ser reportadas (Quihui *et al.*, 2017).

En México, el consumo de ensaladas mixtas de Taylor Farms en Guanajuato se ha asociado a la infección por *Cryptosporidium spp* y algunos casos se relacionaron específicamente con cilantro fresco originario de Puebla que son regados con aguas recicladas (Galván *et al.*, 2019).

La criptosporidiosis es una enfermedad común en los niños mexicanos, como lo demuestra un estudio realizado en bebés con diarrea severa, donde se encontró que el 41% estaba infectado con *Cryptosporidium*. En muchos casos, la infección es asintomática, particularmente en niños mayores (Nair *et al.*, 2008).

Aunque la criptosporidiosis es común en nuestra área, *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* infectan principalmente a niños menores de cinco años y la mayoría de nuestros participantes tenían más de diez años (Calderón *et al.*, 2020).

6.3. Contaminación del agua.

Cryptosporidium spp se reconoce en gran medida como una causa común de brotes de enfermedades diarreicas transmitidas por el agua y los alimentos en todo el mundo. La transmisión a través del agua es una ruta importante en la epidemiología del parásito y, por lo tanto, es un grave problema de salud pública (Widmer *et al.*, 2020).

La contaminación hídrica puede definirse como el resultado de la adición de cualquier tipo de sustancia o forma biológica que lleva a alterar su calidad a tal punto que restringe e impide su utilización. El agua es la sustancia más común e importante en

la tierra y su disponibilidad ha sido el factor más crítico para la supervivencia durante el desarrollo de toda forma viva en el planeta (Xiao *et al.*, 2018).

En la historia de la humanidad los centros culturales y los asentamientos humanos siempre se fundaron en zonas con suministro suficiente de agua dulce y a medida que la población aumentaba el suministro natural de agua se iba limitando, por lo que las grandes culturas desarrollaron técnicas y sistemas sofisticados para lograr el acceso a nuevos depósitos de agua como, perforación de pozos y construcción de acueductos

Las aguas superficiales y subterráneas pueden contaminarse en la misma fuente, en la red de distribución o en los receptáculos de almacenamiento. Tanto las aguas superficiales como las subterráneas deben ser protegidas. Sin embargo, las aguas subterráneas, dada su buena calidad y su movimiento relativamente lento suelen ser más fáciles de controlar que las aguas superficiales (Córdoba *et al.*, 2010).

El agua también fue y es utilizada para riego de sus cultivos, la alimentación de los animales y la propia. Ya que solo el .05% de agua dulce se encuentra disponible para su utilización (Mekonnen y Hoekstra, 2015).

Pero muy pronto otras complicaciones de las zonas densamente pobladas, como la creciente cantidad de residuos, aguas residuales y otros tipos de contaminación, se convirtieron también en factores peligrosos sobre el agua potable. Además de los problemas de higiene causados por los residuos insalubres el rápido desarrollo de la industria, especialmente el desarrollo de la industria química, ha dado lugar a una contaminación permanente de todos los tipos de sistemas de agua naturales, que no sólo se observa en los países altamente industrializados sino en todos los lugares del planeta; incluso se ha encontrado que la nieve y el hielo del Ártico y la Antártida, contienen contaminantes biológicos y químicos que se derivan principalmente de los países industrializados del hemisferio norte.

Los principales protozoos patógenos encontrados en aguas contaminadas son: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Toxoplasma gondii*, *Blastocystis spp.*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Cryptosporidium spp.* y algunas otras especies de coccidias como *Cystoisospora belli*

y *Cyclospora cayetanensis*. Debido a la alta resistencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden permanecer varias semanas hasta meses y ser uno de los principales contaminantes (Ríos *et al.*, 2017).

Esta contaminación ha causado brotes que se atribuyen a la contaminación de las fuentes de agua y el suelo que son infectados por los animales muertos arrojados al agua o cerca de ellas, las escorrentías agrícolas, los deshielos, los biosólidos y las fuertes lluvias que arrastran microorganismos a las fuentes principales de agua y a las aguas subterráneas (Hamdy *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2018).

La contaminación de aguas de consumo es contaminada principalmente con material fecal de ganado vacuno, así como con aguas negras o material fecal humana se han asociado con brotes de diarrea causada por este protozooario (Luna *et al.*, 2002).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* se encuentran en todas partes del mundo. Millones de ooquistes pueden liberarse en una evacuación intestinal de un ser humano o animal infectado.

Las *Cryptosporidium* se pueden encontrar en fuentes de agua, como pozos privados, que se han contaminado con heces de humanos o animales infectados. El agua puede contaminarse a través de desbordes de aguas residuales, sistemas de alcantarillado que no funcionan correctamente, escorrentías de aguas pluviales contaminadas y escorrentías agrícolas.

Los pozos pueden ser más vulnerables a dicha contaminación después de una inundación, particularmente si los pozos son poco profundos, han sido excavados o perforados o han estado sumergidos por el agua de la inundación durante largos períodos de tiempo.

El agua es un importante medio de transmisión, entre otros aspectos por su dispersión y la elevada resistencia que poseen los ooquistes a los tratamientos comunes de potabilización, ya que se requieren como mínimo una concentración mayor de 80 mg/ L de cloro libre para su destrucción, esta concentración es 400 veces la máxima permitida en agua para consumo humano (0.2 a 1.5 mg/ L). Por otro lado, el agua recién procesada que sale de la planta potabilizadora puede contaminarse en el

trayecto antes de llegar al usuario por daños en las tuberías. Debido a la aparición de infecciones gastrointestinales atribuibles, entre otros aspectos, a la ingesta de agua potable contaminada por *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* y, asimismo a la imposibilidad de utilizar la prueba de bacterias coliformes como indicadores de una posible contaminación por este tipo de organismos, es que se ha tratado de establecer un método seguro y confiable para la detección del parásito (Díaz *et al.*, 2003).

6.4. Identificación de ooquistes en agua en diferentes regiones del mundo.

Una revisión de los informes publicados de la situación de *Cryptosporidium* en las aguas de Europa elaborada por Ongerth *et al.*, en 2018 reflejo dónde los investigadores individuales encuentran el interés y el apoyo financiero para realizar investigaciones especializadas y exigentes de *Cryptosporidium*. Por este motivo la distribución geográfica de tales investigaciones no está ligada a la distribución real de estos organismos en el medio ambiente. Los países analizados fueron: Austria, Gran Bretaña, Bulgaria, República Checa, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Italia, Luxemburgo, Países Bajos, Noruega, Polonia, Portugal, Rumania, Rusia, Escocia, España, Suecia y Suiza, donde de un total de 5594 muestras de aguas residuales tratadas, superficial y de río el 41% fueron positivas (Ongerth *et al.*, 2018).

En el análisis de literatura elaborado por Chique durante un periodo de 27 años, de 1992 a julio de 2019 proporciono información sobre la prevalencia global de *Cryptosporidium* en las fuentes de agua subterránea para uso doméstico según los hallazgos de la literatura internacional revisados. Una tasa de detección del 19.6% sugiere *Cryptosporidium* está presente con frecuencia en las fuentes de agua subterránea, lo que representa un vector de transmisión latente y un importante problema de salud. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los efectos del sesgo de publicación, es decir, no publicar resultados negativos, pueden influir en las estimaciones calculadas. Si las cifras presentadas se consideran válidas, se puede cuestionar la suposición de que los sistemas domésticos de suministro de agua subterránea están en gran medida a salvo de la contaminación por *Cryptosporidium* (Chique *et al.*, 2020).

La criptosporidiosis se encuentra muy extendida en el sureste asiático tanto en humanos como en animales. Por ejemplo, en Tailandia, un estudio reveló que el 11% y el 6% del agua de ríos y océanos recolectada en varios lugares de Tailandia estaban contaminadas con ooquistes de *Cryptosporidium spp.* (Bamaiyi y Mohd, 2016).

En tan solo 2 años en Estados Unidos se reportaron 134 brotes 84 en 2007 y 50 en 2008. De los 134 brotes 83 (61.9%) comenzaron durante junio, julio o agosto meses donde comienzan las temporadas de lluvia. La vía de entrada implicada para cada brote fue ingestión con agua o alimentos contaminados por el agua en 81 brotes (60.4%), contacto en 25 (18.7%), inhalación en 18 (13.4%), rutas combinadas en 6 (4.5%) y desconocida en 4 brotes (3.0%) (Hlavsa *et al.*, 2011).

En 2013 se realizaron estudios en las localidades de Alberta, Quebec, Ontario y Columbia Británica, utilizando el método USEPA 1623 (Agencia de Protección Ambiental de EE. UU., 2005). Se detectaron 601 muestras que dieron positivo para *Cryptosporidium* de las cuales obtuvimos resultados de especies y genotipos de *Cryptosporidium* en 422. se observaron 29 especies y genotipos de diferentes en agua ambiental que dieron positivo para la detección molecular de *Cryptosporidium*. De estas 422 muestras, 173 muestras tenían múltiples especies o genotipos detectados. La mayoría de estos tenían dos especies detectadas, sin embargo, el 22% tenía tres o más especies o genotipos diferentes detectados en una sola muestra. Hubo 30 muestras donde se identificaron tres especies diferentes y 11 muestras donde se identificaron cuatro especies diferentes. En el caso de muestras de *Cryptosporidium* positivas para moléculas, la frecuencia de detección de cada especie o genotipo osciló entre una única detección y 186 detecciones. *Cryptosporidium andersoni* se detectó con mayor frecuencia en muestras de agua y también se detectaron con frecuencia algunas especies silvestres (genotipos de rata almizclera y rata almizclera). *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum* se detectaron solo en siete y nueve muestras, respectivamente. Las especies y genotipos de *Cryptosporidium* detectados en el medio ambiente a menudo estaban representados por más de una variante de secuencia. La cantidad de heterogeneidad de secuencia observada para cada una de las especies / genotipos osciló entre 1 y 18 variaciones. Los genotipos de *Cryptosporidium andersoni*, rata almizclera I, rata almizclera II y campañaol muestran

una gran cantidad de heterogeneidad de secuencia, mientras que *Cryptosporidium baileyi* no mostró heterogeneidad. (Ruecker *et al.*, 2013).

En el estudio realizado por Pignata *et al.* en el noroeste de Italia en una zona montañosa, a 600 m sobre el nivel del mar, se detectaron una alta variabilidad de las concentraciones de ooquiste, en una planta de tratamiento de agua potable que consta de las siguientes fases para el tratamiento del agua: peroxidación con hipoclorito de sodio, filtración en arena, filtración en Carbón Activado Granular (GAC), cloración final (0.15-0.20 mg/L de cloro residual) y desinfección UV (dosis mínima aplicada 400 J/m²), realizada con Wallace y Tiernan Barrier® M900 Sistema UV equipado con lámparas de media presión, diseñado para el tratamiento de 10–1150 m³ / h de caudal de agua. El muestreo ambiental se realizó por un período de tres años, entre mayo de 2013 y mayo de 2016 y se monitorearon tres puntos diferentes: la fuente de agua potable, el efluente de la planta de tratamiento de agua potable y agua del grifo de un bebedero público ubicado en un distrito del municipio seleccionado como punto de acopio de la red. Los resultados se reflejaron un a tabla donde se concluyó que los picos de contaminación podrían deberse a los factores como el deshielo y precipitaciones que arrastran aguas a las fuentes analizadas. Se encontraron ooquistes en la mayoría de las muestras (83.3%), tanto en el afluente (IN, 100% positivo) como en el efluente (OUT, 77.8% positivo) de la planta de tratamiento, así como en el punto de recogida designado a lo largo de la red (agua del grifo, 77.8% positivo) (Pignata *et al.*, 2019).

6.5. Métodos de detección de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*

Se ha hecho hincapié en el estudio de *Cryptosporidium spp.* en aguas superficiales, fácilmente susceptible a la contaminación patógena (Chique *et al.*, 2020). El monitoreo de la presencia de *Cryptosporidium* en las cuencas hidrográficas que proporcionan agua potable es necesario para determinar dónde deben dirigirse los recursos limitados de manera más efectiva para proteger a los consumidores de la exposición a los ooquistes patógenos transmitidos por el agua. La gestión de riesgos de las fuentes de agua requiere un control rentable, rápido y eficiente (Jellison *et al.*, 2020).

La sensibilidad y especificidad de los métodos de detección actuales están determinadas en gran medida por la eficacia de los métodos de concentración y separación utilizados y están severamente limitados por la turbidez de las muestras de agua (Khan *et al.*, 2019) su recuperación y detección dependen de la filtración o centrifugación de la muestra de agua, seguida de la concentración selectiva de ooquistes (Diéguez *et al.*, 2018).

Método 1623

El método estándar de oro para detectar *Cryptosporidium spp.*, Incluido *C. parvum*, en muestras de agua ambiental, es el Método 1623 de la Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU. (USEPA). Este método se basa en anticuerpos, comenzando con la concentración del ooquiste usando un sistema de ultra filtro de fibra hueca, seguido de aislamiento de ooquistes por separación inmunomagnética (IMS), tinción de ooquistes recuperados usando un anticuerpo monoclonal fluorescente y contratinción de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), luego finalmente evaluación microscópica para visualizar el ooquiste teñido (Hassan *et al.*, 2021). Este método ha demostrado un rendimiento de recuperación del 61% en agua pura enriquecida, del 48.8% en muestras de grifos filtrados enriquecidos y del 19.5% en fuentes crudas, con un límite de detección de aproximadamente 10 ooquistes / L (Diéguez *et al.*, 2018). Este método no identifica las especies o genotipos presentes en el agua y, por lo tanto, no proporciona una evaluación precisa del riesgo para la salud humana que plantean estos parásitos cuando se detectan en una muestra de agua. Aunque podría detectarse una gran cantidad de ooquistes de *Cryptosporidium* en una muestra de agua, el riesgo para la salud humana puede ser bajo porque las especies y los genotipos presentes pueden no ser capaces de infectar a los humanos (Ruecker *et al.*, 2007).

Se utilizan otras tinciones negativas como el verde de malaquita (técnica de tinción de Heine modificada) para teñir el material de fondo de los portaobjetos y dejar los ooquistes de *Cryptosporidium* sin teñir. Existen muchas limitaciones en el uso de métodos de tinción para la detección e identificación de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, incluida, la variabilidad en la captación de tinción por los ooquistes, que depende

de la tinción en sí y de la edad de los ooquistes en el caso de ácido resistencia los métodos carecen de la sensibilidad y especificidad requeridas, particularmente para muestras que contienen pequeñas cantidades de ooquistes y debido al hecho de que la mayoría de los ooquistes de *Cryptosporidium*, incluyendo *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis*, son morfológicamente indistinguibles, la necesidad para un microscopista bien entrenado para la interpretación de los resultados y el método es muy lento, tedioso y subjetivo en comparación con otros métodos (Hassan *et al.*, 2021).

La técnica de Inmunofluorescencia directa se realiza, empleando el anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína A400FL Crypto-a-Glo™ específico para la detección de *Cryptosporidium parvum*.

Para ello, se coloca 30 µL del concentrado sobre un portaobjeto y se preparó el extendido en el centro de este. Se deja secar completamente a temperatura ambiente, se agregó metanol sobre el extendido y se deja secar, luego se cubre completamente con el anticuerpo monoclonal marcado e inmediatamente se incubó por 30 minutos en cámara húmeda. Al finalizar este tiempo, se lavó la lámina portaobjeto un minuto en PBS para remover el exceso de anticuerpo y por último se le agregó 1 gota de líquido de montaje (Waterborne, INC. New Orleans, USA). La muestra se debe observar utilizando un microscopio de epifluorescencia a través de un filtro de luz azul de 480 nm, empleando una magnificación de 400 X. Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se observaron como estructuras con fluorescencia verde manzana brillante de forma redondeadas de 4 a 6 µm de diámetro (Arnedo *et al.*, 2008).

Tinción ziehl neelse, se realiza el frotis con las muestras de agua, una vez seco, se cubre con fucsina básica, se calienta hasta la emisión de vapor y se tiñe durante 20 min. Posteriormente se lavó el portaobjetos con agua del grifo para eliminar el exceso teñir. A continuación, se añade alcohol ácido durante 30 segundos y se enjuaga con agua del grifo. Luego, el portaobjetos se cubre con azul de metileno durante 2 a 5 minutos y se enjuaga con agua del grifo. Finalmente, el frotis se deja secar al aire y se observa en un microscopio óptico usando la lente de objetivo de 100x (Hassan *et al.*, 2021).

Tinción Auramine, Se cubre el frotis seco con tinción de fenol de auramina al 0,3% durante 10 min. Posteriormente, el portaobjetos se lava con agua del grifo, se cubre con alcohol ácido durante 30 segundos se enjuaga con agua del grifo. Finalmente, el portaobjetos se cubre con permanganato de potasio al 0.1% durante 30 segundos se lava con agua del grifo. Una vez seco, se añade una gota de glicerina básica, se cubre el portaobjetos con un cubreobjetos y se observa en microscopio de fluorescencia utilizando la lente de objetivo de 40x.

En el caso del agua, un estudio analizó muestras de plantas de tratamiento de aguas residuales para la detección de *Cryptosporidium spp.* por ZN e inmunofluorescencia directa. El agente se detectó en el 100% de las muestras analizadas por ambas técnicas, con un 100% de correspondencia. (Díaz *et al.*, 2015).

La evaluación de la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium* es crucial para evaluar la importancia para la salud pública de este importante protozoo zoonótico. La viabilidad se evalúa comúnmente en preparaciones húmedas después del pretratamiento con ácido y la tinción con tintes vitales fluorogénicos (Hamdy *et al.* 2019).

La baja dosis infecciosa de estos parásitos protozoarios significa que aumenta el riesgo asociado para la salud pública. El ID 50 (número de ooquistes necesarios para infectar al 50% de las personas expuestas) se estimó entre 10 y 83 ooquistes en adultos sanos para *Cryptosporidium*. La viabilidad y la infectividad de los ooquistes no se modifican visiblemente después de varias semanas de almacenamiento, La viabilidad de los esporozoitos se evaluó en función de su forma, estructura y motilidad (Jaskiewicz *et al.*, 2018) Cualquier modificación visible en la morfología, la integridad de la pared y el contenido interno de los ooquistes puede indicar una pérdida de viabilidad a nivel del parásito único (Hamdy *et al.* 2019).

Históricamente se han utilizado varios métodos diferentes para evaluar la viabilidad de *Cryptosporidium*. La escisión fue uno de los primeros métodos desarrollados para determinar si los ooquistes eran viables o no. Los esporozoitos de *Cryptosporidium* pueden inducirse a escisión incubando los ooquistes a 37 ° C y pH neutro con sales

bilíares o tensioactivos tales como dodecilsulfato de sodio. Posteriormente, se confirma la escisión de los esporozoítos mediante microscopía de campo claro.

Escisión se ha utilizado de forma rutinaria para evaluar la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium* de diversos tipos de muestras, no solo la escisión se correlacionó pobremente con la temperatura, sino que, además, indicó grandes poblaciones de ooquistes aparentemente viables después de calentar a 70 ° C o más. Es importante enfatizar que es poco probable que el tratamiento térmico haya causado falsos positivos, ya que el calor no aumentó el porcentaje de ooquistes vacíos en ausencia de escisión. Además, la escisión parcial no puede dar cuenta de estos falsos positivos, ya que nuestro estudio incluyó ooquistes parcialmente excitados con los ooquistes DAPI + no viables. Estos resultados concuerdan con otros estudios, que observaron que la escisión sobrestimó la viabilidad de los ooquistes inactivados por sustancias químicas.

De manera similar, la infectividad de los ooquistes se reduce a 60 ° C y se elimina a temperaturas superiores a 70 ° c . Además, en comparación con otros métodos, RNA FISH mostró menos falsos positivos a temperaturas superiores a 80 ° C. Aunque RNA FISH discrimina particularmente bien los ooquistes viables y no viables, es técnicamente desafiante porque la señal fluorescente producida por el RNA marcado es a menudo débil y fácilmente sofocada por las ribonucleasas presentes en la muestra (Vande *et al.*, 2018)

La evaluación de la viabilidad significa determinar si los ooquistes están vivos. Sin embargo, los ooquistes vivos, intactos y metabólicamente funcionales no son necesariamente infecciosos, porque sus esporozoítos pueden no causar la infección de sus huéspedes. Por lo tanto, para obtener una evaluación confiable de la exposición de los seres humanos a parásitos infecciosos, los métodos para medir la viabilidad son de mayor utilidad si se correlacionan con los resultados de los ensayos de infectividad. Si no se establece tal correlación, la detección de ooquistes viables no significa que haya parásitos infecciosos y, por lo tanto, se puede sobrestimar cualquier riesgo (Rousseau *et al.*, 2018).

Los ooquistes con deformación de la forma, aberturas en sus paredes y / o rellenos con un contenido granular sin evidencia de esporozoitos intactos (*C. parvum*), probablemente representan parásitos no viables que se puede observar microscópicamente. Se han descrito métodos no invasivos para determinar la viabilidad de los ooquistes y quistes en función de su tamaño, morfología y cargas eléctricas superficiales. Por ejemplo, la electrorrotación es una técnica cualitativa que se puede utilizar para detectar cambios en la morfología y las propiedades fisicoquímicas de microorganismos sometidos a un campo eléctrico giratorio. Este enfoque se ha utilizado con éxito para investigar la viabilidad de *C. parvum*. Más recientemente, se han diseñado dispositivos de micro fluidos para medir el tamaño y la deformabilidad de los ooquistes de *C. parvum* y *C. muris* mediante espectroscopía de fuerza. Se ha informado que este método discrimina de manera confiable *C. parvum* de los ooquistes de *C. muris* y viable de los ooquistes de *C. parvum* muertos por calor en función de las propiedades de deformabilidad de los ooquistes. Estos métodos podrían ser útiles para evaluar la viabilidad de *C. parvum* ooquistes en muestras ambientales con antecedentes bajos, como agua potable. Sin embargo, el uso de estos métodos aún no se ha adoptado ampliamente, si es que se ha adoptado, y no se ha investigado su uso en el marco de la evaluación de la exposición en los alimentos. Dado que la estructura y las propiedades fisicoquímicas de los ooquistes pueden modificarse en el medio ambiente, incluidas las matrices alimentarias, y después de tratamientos estresantes, sin afectar la viabilidad, parece poco probable que la electrorrotación y otros métodos biofísicos se desarrollen más allá de lo posible. herramientas de investigación (Rousseau *et al.*, 2018)

En términos de seguridad alimentaria, generalmente se considera preferible utilizar un ensayo que pueda sobrestimar el riesgo (y subestimar la eficacia del proceso), que, al revés, ya que este enfoque conservador (enfoque del “peor escenario”) asegura que el público se minimiza el riesgo para la salud.

Ninguna de las técnicas actualmente disponibles parece ser completamente adecuada para una evaluación confiable de la exposición de los seres humanos a los protozoos infecciosos en los alimentos o para las verificaciones de rutina de las medidas de control (Woolsey 2019).

Cuadro 4. Ventajas y limitaciones de las técnicas utilizadas para evaluar la infectividad y la viabilidad. Modificado de Rousseau *et al.*, 2018.

Métodos	Parásitos	Ventajas	Limitaciones
Bioensayos	<i>C. p</i> y <i>C. h</i> <i>/G/T</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere un solo ooquiste - Aplicación en matrices complejas de alimentos - Evaluación confiable de la exposición de humanos a protozoos infecciosos. - Evaluación confiable de la eficacia de la inactivación 	<ul style="list-style-type: none"> - Preocupaciones éticas - Método costoso y trabajo intensivo - Falta de confiabilidad con un número bajo de ooquistes - Discriminación de diferencias grandes, pero no finas entre tratamientos - Larga duración de los resultados (una semana como mínimo)
Cultivo celular	<i>C. p</i> y <i>C. h</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación con bioensayos - Requiere un solo ooquiste - Evaluación de exposición confiable de humanos a protozoos infecciosos - Evaluación confiable de eficacia de inactivación 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de ensayos estandarizados - Tiempo medio (48/72 h) a largo (10 días) para obtener resultados - No se aplica a <i>Giardia</i> - No se aplica en matrices alimentarias complejas
Métodos basados en morfología y propiedades físicas	<i>C/G</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación entre electrrotación y método de exclusión de PI (yoduro de propidio) - Rápido - Requiere un solo ooquiste 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere ooquistes purificados. - No hay datos sobre la viabilidad relativa a la medida de infectividad - No se aplica en la evaluación de la exposición en los alimentos
Escisión	<i>C/G/T</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación con el método de exclusión de 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere una gran cantidad de ooquistes

		<p>PI</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rápido - No costoso 	<p>purificados</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tasa de escisión variable - Sobre / subestimación de la exposición de humanos a protozoos infecciosos - Sobre / subestimación de la eficacia de inactivación - Sin aplicación en matrices complejas de alimentos
Exclusión de tintes vitales	<i>C / G / T</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación con escisión para colorante PI (C) - Rápido y relativamente simple - No costoso - Requiere un solo ooquiste - Aplicación en matrices complejas de alimentos 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere ooquistes purificados - Sobreestimación de la exposición de humanos a protozoos infecciosos - Subestimación de la eficacia de inactivación
RT-PCR	<i>C / G / T</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rápida - Identificación de ooquistes de importancia para la salud humana - Fácil de estandarizar - Requiere un número reducido de ooquistes - Aplicación en matrices alimentarias complejas 	<ul style="list-style-type: none"> - Límite de la variable de detección en función de las matrices - Sobreestimación de la exposición de los seres humanos a protozoos infecciosos - Subestimación de la eficacia de inactivación
PESCADO	<i>C</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido - No costoso - Requiere un solo ooquistes 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere ooquistes purificados. - Sobreestimación de la exposición de los seres humanos a protozoos infecciosos - Subestimación de la eficacia de inactivación - Sin aplicación en

			matrices alimentarias complejas
NASBA	C	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación con el método de exclusión de PI - Rápido - No costoso - Requiere un número bajo de ooquistes 	<ul style="list-style-type: none"> - Sobreestimación de la población viable - No cuantitativo - No hay datos sobre la viabilidad relativa a la medida de la infectividad - No se aplica en la evaluación de la exposición en los alimentos
PMA-PCR	C	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido - Requiere un número bajo de ooquistes. - Se puede acoplar al genotipo - Fácil de estandarizar 	<ul style="list-style-type: none"> - Sobreestimación de la población viable - No hay datos sobre la viabilidad relativa a la medida de infectividad - No se aplica en la evaluación de la exposición en los alimentos

Las biopelículas podrían ser una herramienta muy útil para monitorear cuencas hidrográficas ya que se encuentran adheridas a diferentes superficies y estimar la prevalencia y viabilidad de los ooquistes encontrados. El muestreo debería ser usado como un método más para identificar regiones de alto riesgo dentro de una cuenca hidrográfica grande y compleja y a las plantas de tratamiento de agua asociadas en riesgo potencial de aumento de la carga de ooquistes en el suministro de agua ya que las biopelículas tienen la capacidad de actuar como una malla que atrapa a los ooquistes y los puede mantener durante algunas semanas y es ahí donde se puede identificar la presencia de ooquistes (Jellison et al., 2020). Dado que los procedimientos para la detección generalmente incluyen la recolección de un gran volumen de muestra de agua (10 - 1000 L), seguida de concentración utilizando varias técnicas que incluyen filtración y centrifugación para obtener una muestra concentrada (Diéguez et al., 2018).

VII. Conclusión.

Podemos concluir que *Cryptosporidium* permanece viable en cualquier ecosistema acuático debido a la resistencia a los desinfectantes y la interacción que tienen con las biopelículas, ya que estas almacenan y protegen lo ooquistes de la luz ultravioleta.

El agua se encontró como la principal vía de transmisión de ooquistes de *Cryptosporidium spp* de rápida distribución y a larga distancia, y a las biopelículas como un fuente de reservorio, debido a estos dos factores la cryptosporidiosis es una de las principales enfermedades que afecta a diferentes animales mediante el consumo de agua contaminada o alimentos regadas con esta. Tiene una mayor importancia en niños, personas inmunodeprimidas y animales jóvenes principalmente terneros.

Los principales reportes de brotes fueron en países desarrollados donde el consumo de agua directa del grifo es habitual y se otorgan financiamientos para realizar los estudios. En países donde no se cuenta con el apoyo suficiente la incidencia de brotes de criptosporidiosis es menor. Los estudios demostraron que su distribución es mundial y se puede encontrar en las mayorías de suministros de agua.

Una de las principales maneras de prevenir los brotes es tener un buen control y una desinfección adecuado. En caso de sufrir algún brote identificar, la fuente lo más rápido posible y mantenerlo en vigilancia durante semanas.

La prevalencia y la viabilidad están relacionadas ya que donde se encuentran muestras positivas habrá ooquistes viables que puedan ocasionar una infección. Con respecto a la reproducción de *Cryptosporidium* en biopelículas hay muy pocos investigadores que estudian este proceso, es necesario más investigaciones para identificar los estadios y la manera en que interactúan las biopelículas y los ooquistes.

VIII. Literatura citada.

1. Abeledo-Lameiro, M. J., Ares-Mazas, E. y Gómez-Couso, H. (2018). Use of ultrasound irradiation to inactivate *Cryptosporidium parvum* oocysts in effluents from municipal wastewater treatment plants. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 118–126. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.05.013.
2. Adeyemo, F. E., Singh, G., Reddy, P., Bux, F. y Stenström, T. A. (2019). Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater. *PLOS ONE*, 14(5) . doi:10.1371/journal.pone.0216040.
3. Arnedo-Bracho, M., Díaz-Suárez, O. y Botero, L. (2008). Técnicas para la detección de *Cryptosporidium spp.* en Sistemas de Tratamiento de Agua Residual. *Kamera* 36(2): 120 – 128.
4. Arrowood, M. J. (2002). In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 390–400. doi:10.1128/cmr.15.3.390-400.2002.
5. Ayele, A., Seyoum, Z. y Leta, S. (2018). *Cryptosporidium* infection in bovine calves: prevalence and potential risk factors in northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*, 11(1). doi:10.1186/s13104-018-3219-7.
6. Bamaiyi, P., H. y Redhuan, E., M. (2016). Prevalence and risk factors for cryptosporidiosis: a global, emerging, neglected zoonosis" *Asian Biomedicine*, vol. 10, no. 4, 2016, pp. 309-325. DOI: 10.5372/1905-7415.1004.493.
7. Bastidas, G., Bastidas, D. y Rosales, M. (2017). Criptosporidiosis en humanos a ciento diez años de su descubrimiento. *Rev. cienc. salud med.* 3(3): 79 - 91.
8. Bones, A. J., Jossé, L., More, C., Miller, C. N., Michaelis, M. y Tsaousis, A. D. (2018). Past and future trends of *Cryptosporidium* in vitro research. *Experimental Parasitology*. 196: 28-37. Doi: 10.1016/j.exppara.2018.12.001.
9. Bouzid, M., Hunter, P. R, Chalmers, R. M. y Tyler, K. M. (2013). Patogenicidad y virulencia de *Cryptosporidium*. *Revisiones de microbiología clínica*, 26 (1), 115-134. doi: 10.1128 / cmr.00076-12.
10. Brankston, G., Boughen, C., Ng, V., Fisman, D. N., Sargeant, J. M. y Greer, A. L. (2018). Assessing the impact of environmental exposures and *Cryptosporidium* infection in cattle on human incidence of cryptosporidiosis in

Southwestern Ontario, Canada. PLOS ONE, 13(4).
doi:10.1371/journal.pone.0196573

11. Caffarena, R. D., Meireles, M. V., Carrasco-Letelier, L., Picasso-Risso, C., Santana, B. N., Riet-Correa, F. y Giannitti, F. (2020). Dairy Calves in Uruguay Are Reservoirs of Zoonotic Subtypes of *Cryptosporidium parvum* and pose a Potential Risk of Surface Water Contamination. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. doi: 10.3389/fvets.2020.00562.
12. Calderón de la Barca, A. M., Castillo-Fimbres, R. S., Mejía-León, M. E., Quihui-Cota, L., Ochoa-Leyva, A. y Aguayo-Patrón, S. V. (2020). Enteric parasitic infection disturbs bacterial structure in Mexican children with autoantibodies for type 1 diabetes and/or celiac disease. *Gut Pathogens*, 12(1). doi:10.1186/s13099-020-00376-3.
13. Campuzano S., Jiménez L. y Hernández D. (2018). La formación de biopelículas y la calidad del agua en la consulta odontológica NOVA.; 16 (29): 39-49.
14. Cardoso, F. D., Alves, W., Dos Santos, T., García J., L., Navarro T. y Lemos R. (2019). Surveillance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage from an urban area in Brazil. *Revist Brasileira de Parasitologia Veterinária*. doi: 10.1590/s1984-29612019037.
15. Carreno, R. A., Matrin, D. S. y Barta, J. R. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85(11), 899–904. doi: 10.1007/s004360050655.
16. Chan, S., Pullerits, K., Keucken, A., Persson, K. M., Paul, C. J. y Rådström, P. (2019). Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1). Doi: 10.1038/s41522-019-0082-9.
17. Chen, S., Atwill, E., Zhong, F., Wei, Y, Hou, S., Li, J., Xu, C., Xiao, C., Yang, Z., y Li, X. (2017). Prevalence and Risk Factors of *Cryptosporidium* Infection in Children Hospitalized for Diarrhea in Guangzhou, China. *Bacteriol Parasitol*, 8:2 DOI: 10.4172/2155-9597.1000308.

18. Chique, C., Hynds, P., Andrade, L., Burke, L., Morris, D., Ryan, M. P. y O'Dwyer, J. (2020). *Cryptosporidium spp.* in groundwater supplies intended for human consumption – A descriptive review of global prevalence, risk factors and knowledge gaps. *Water Research*, (176) 115726. Doi: 10.1016/j.watres.2020.115726.
19. Clode, P. L., Koh, W. H. y Thompson, C. A. (2015). Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? *Trends in Parasitology*. 31(12), 614–624. doi:10.1016/j.pt.2015.08.005.
20. Córdoba M., Del Coco V. y Basualdo J. (2010). Agua y salud humana. *Química Viva*, vol. 9, núm. 3, pp. 105-119.
21. Daraei, H., Oliveri, G., Sahlabadi, F., Nam, V., Gholipour, S., Turki, H., Fakhri, Y., Ferrante, M., Moradi, A. y Mousavi, A. (2020). Prevalence of *Cryptosporidium spp.* in water: a global systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research* volume 28, p. 9498–9507, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11261-6>.
22. Das, K., Nair, L. V., Ghosal, A., Sardar, S. K., Dutta, S. y Ganguly, S. (2019). Genetic characterization reveals evidence for an association between water contamination and zoonotic transmission of a *Cryptosporidium sp.* from dairy cattle in West Bengal, India. *Food and Waterborne Parasitology*, vol. 7 e 00064. doi:10.1016/j.fawpar.2019.e00064.
23. De la Parte-Pérez, M. A., Bruzual, E., Brito, A. y Hurtado, M. (2005). *Cryptosporidium spp.* y Criptosporidiosis. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 06-14. Recuperado en 09 de agosto de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100003&lng=es&tlng=es.
24. Dessì, G., Tamponi, C., Varcasia, A., Sanna, G., Pipia, A. P., Carta, S., Salis F., Díaz P. y Scala, A. (2020). *Cryptosporidium* infections in sheep farms from Italy. *Parasitology Research*. doi: 10.1007/s00436-020-06947-2.
25. Díaz-Cinco M., Leyva-Michel E., Mata-Haro V. Y González-Ríos H. (2003). Incidencia y viabilidad de *Cryptosporidium parvum* En el agua potable de ciudad Obregón, Sonora, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 19 (2) 67-72.

26. Díaz-Lee A., Molina R., Dougnaca C., Mercado R., Retamala P. y Fredesa F. (2015). Sensibilidad analítica de técnicas de tinción tradicionales y una técnica molecular para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* aislados de bovinos en muestras de agua: estudio preliminar. Arch Med Vet 47, 91-96
27. Diéguez, L., Winter, M., Molan, S., Monis, P., King, B. y Thierry, B. (2018). Disposable microfluidic micromixers for effective capture of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples. Journal of Biological Engineering, 12(1). doi:10.1186/s13036-018-0095-6.
28. Dong, S., Yang, Y., Wang, Y., Yang, D., Yang, Y., Shi, Y., Li, C., Li, L., Chen Y., Jiang Q y Zhou, Y. (2020). Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. Acta Parasitologica. doi: 10.2478/s11686-020-00230-1.
29. Donlan, R. M. y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 15(2), 167–193. doi:10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.
30. Drinkall, E., Wass, M. J., Coffey, T. J. y Flynn, R. J. (2017). A rapid IL-17 response to *Cryptosporidium parvum* in the bovine intestine. Veterinary Immunology and Immunopathology, 191, 1–4. doi:10.1016/j.vetimm.2017.07.009.
31. Drummond, J. D., Boano, F., Atwill, E. R., Li, X., Harter, T. y Packman, A. I. (2018). *Cryptosporidium* oocyst persistence in agricultural streams –a mobile-immobile model framework assessment. Scientific Reports, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-22784-x.
32. El-Alfy, E.-S. Y Nishikawa, Y. (2020). *Cryptosporidium* species and cryptosporidiosis in Japan: a literature review and insights into the role played by animals in its transmission. Journal of Veterinary Medical Science. 82 (8): 1051-1067 doi:10.1292/jvms.20-0151.
33. Firoozi, Z., Sazmand, A., Zahedi, A., Astani, A., Fattahi-Bafghi, A., Kiani-Salmi, N. y Akrami-Mohajeri, F. (2019). Prevalence and genotyping identification of *Cryptosporidium* in adult ruminants in central Iran. Parasites y Vectors, 12(1). doi:10.1186/s13071-019-3759-2.

34. Galván-Ramírez, M., Madriz-Elizondo, A., Temores Ramírez, C., Romero Rameo, J., De la O Carrasco, D. y Cardona López, M. (2019). Enteroparasitism and Risk Factors Associated with Clinical Manifestations in Children and Adults of Jalisco State in Western Mexico. *Osong Public Health Res Perspect.* 10(1):39–48 DOI: <https://doi.org/10.24171/j.phrp.201910108>.
35. García-Sánchez, E. Valladares-Carranza, B., Talavera-Rojas, M. y Velázquez-Ordóñez, V. (2014). Cryptosporidiosis. Importancia en salud pública. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 15, núm. 5.
36. Gargala, G. (2008). Tratamiento farmacológico y nuevo objetivo farmacológico contra *Cryptosporidium*. *Parásito*, 15 (3), 275-281. doi: 10.1051 / parásito / 2008153275.
37. Ghazy, A. A., Shafy, S. A. y Shaapan R. M. (2015). Cryptosporidiosis in Animals and Man: 1. Taxonomic Classification, Life Cycle, Epidemiology and Zoonotic Importance. *Asian Journal of Epidemiology*, 8: 48-63.
38. Guérin, A. y Striepen, B. (2020). The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite *Cryptosporidium*. *Cell Host y Microbe*, 28(4), 509–515. doi:10.1016/j.chom.2020.09.007.
39. Hamdy, D., El-Badry, A. y Abd El Wahab, W. (2019). Assessment of Giardia and *Cryptosporidium* Assemblages/Species and Their Viability in Potable Tap Water in Beni-Suef, Egypt Using Nested PCR/RFLP and Staining. *Iranian Journal of Parasitology*, 14(3), 368–378.
40. Hassan E., Örmeci B., De Rosa M., Dixon B., Sattar S., Iqbal A. (2021). A review of *Cryptosporidium spp.* and their detection in water. *Water Sci Technol* 83 (1): 1–25. DOI: 10.2166 / wst.2020.515.
41. Hernández-Gallo, N., Hernández-Flórez, L. J. y Cortés-Vecino, J. A. (2018). Criptosporidiosis y una Salud. *Revista de Salud Pública*, 20(1), 138–143. doi: 10.15446/rsap.v20n1.69959.
42. Hijjawi, N., Meloni, B., Ng'anzo, M., Ryan, U., Olson, M., Cox, P., Monis, P. y Thompson, R. C. (2004). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, 34(7), 769–777. doi:10.1016/j.ijpara.2004.04.001.

43. Hijjawi, N., Meloni, B., Ryan, U., Olson, M. y Thompson, RC. (2002). Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32(14), 1719–1726. doi:10.1016/s0020-7519(02)00199-64.
44. Hlavsa, M. C., Roellig, D. M., Seabolt M. H., Kahler A. M., Murphy J. L., Kitt, T. K., Geeter, E. F., Dawsey R., Davidson S. L., Kim T. N., Tucker T. H., Iverson, S. A., Garrett B., Fowle N., Collins J., Epperson G., Zusy S., Weiss J. R., Komatsu K., Rodríguez E., Patterson J. G., Sunenshine R., Taylor B. Cibulskas K., Denny L., Omura K., Tsorin B., Fullerton K. E. y Xiao L. (2017). Using Molecular Characterization to Support Investigations of Aquatic Facility–Associated Outbreaks of Cryptosporidiosis Alabama, Arizona, and Ohio, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 66:493–497. DOI: 10.15585/mmwr.mm6619a2.
45. Hlavsa, M., Roberts, V., Anderson, A., Hill, V., Kahler, A., Orr, M., Garrison, L., Hicks, L., Newton, A., Hilborn, E., Wade, T., Beach, M. M. y Yoder J. (2011). Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks and Other Health Events Associated with Recreational Water, United States, 2007–2008. *Surveillance Summaries*. Vol. 60. No. 12.
46. Hofstra, N., Bouwman, A. F., Beusen, A. y Medema, G. J. (2013). Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. *Science of The Total Environment*. 442, 10-19. doi: 10.1016 / j.scitotenv.2012.10.013.
47. Howe, A. D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K. S., Wright, P. y Hunter, P. R. (2002). *Cryptosporidium* Oocysts in a Water Supply Associated with a Cryptosporidiosis Outbreak. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6), 619–624. doi: 10.3201/eid0806.010271.
48. Huang, Q., Yang, L., Li, B., Du, H., Zhao, F., Han, L., Wang, Q., Deng, Y., Xiao, G. y Wang, D. (2020). *Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* emissions from humans and animals in the Three Gorges Reservoir in Chongqing, China. 8: 9985. doi: 10.7717 / peerj.9985.
49. Jaskiewicz, J. J., Sandlin, R. D., Swei, A. A., Widmer, G., Toner, M., y Tzipori, S. (2018). Cryopreservation of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-05240-2.

50. Jellison, K., Cannistraci, D., Fortunato, F. y Leod, C. (2020) Biofilm Sampling for Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in a Southeastern Pennsylvania Watershed. *Appl Environ.* 86(23). doi: 10.1128/AEM.01399-20.
51. Karpe, A. V., Hutton, M. L., Mileto, S. J., James M. L., Evans C., Shah R. M., Ghodke A. B., Hillyer K. E., Metcalfe S. S., Liu J. W., Walsh T., Lyras D., Palombo E. y Beale D., J. (2021). Cryptosporidiosis Modulates the Gut Microbiome and Metabolism in a Murine Infection Model. 11;11(6):380. doi: 10.3390/metabo11060380.
52. Khan, A., Shams, S., Khan, S., Khan, M. I., Khan, S. y Ali, A. (2019). Evaluation of prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* infection in rural population of district Buner, Pakistan. *PLOS ONE*, 14(1). doi:10.1371/journal.pone.0209188.
53. King, P., Tyler, K. M. y Hunter, P. R. (2019). Anthroponotic transmission of *Cryptosporidium parvum* predominates in countries with poorer sanitation: a systematic review and meta-analysis. *Parasites y Vectors*, 12(1). doi:10.1186/s13071-018-3263-0.
54. Koh, W., Clode, P. L., Monis, P. y Thompson, R. (2013). Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasites y Vectors*, 6(1), 270. doi:10.1186/1756-3305-6-270
55. Koh, W., Thompson, A., Edwards, H., Monis, P. y Clode, P. L. (2014). Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BMC Microbiology*, 14(1). doi: 10.1186/s12866-014-0281-8.
56. Kong, Y., Lu, P., Yuan, T., Niu, J., Li, Z. y Yang, B. (2017). *Cryptosporidium* Contamination and Attributed Risks in Yunlong Lake in Xuzhou, China. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2017, 1–6. doi: 10.1155/2017/4819594.
57. Kováčiková, M., Simdyanov, T. G., Diakin, A. y Valigurová, A. (2017). Structures related to attachment and motility in the marine eugregarine Cepheloidophora cf. communis (Apicomplexa). *European Journal of Protistology*, 59, 1–13. doi:10.1016/j.ejop.2017.02.006.

58. Lefebvre, M., Razakandrainibe, R., Villena, I., Favennec, L. y Costa, D. (2021). Interacciones entre criptosporidio y biofilm: una revisión. *Microbiología aplicada y ambiental*, 87 (3). doi. org/10.1128/AEM.02483-20.
59. Li, X., Nguyen, T., Xiao, C., Levy, A., Akagi, Y., Silkie, S. y Atwill, E. R. (2020). Prevalence and Genotypes of *Cryptosporidium* in Wildlife Populations Co-located in a Protected Watershed in the Pacific Northwest, 2013 to 2016. *Microorganisms*, 8(6), 914. doi: 10.3390/microorganisms8060914.
60. Limaheluw, J., Medema, G. y Hofstra, N. (2019). An exploration of the disease burden due to *Cryptosporidium* in consumed surface water for sub-Saharan Africa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. doi:10.1016/j.ijheh.2019.04.004
61. López Torres, L. L., López Cuevas, O., Vázquez, Vázquez, C., Alvarado Gómez, O. G., Vázquez Alvarado, R. E., Rodríguez Fuentes, H., Chaidez Quiroz, C. y Vidales Contreras, J. A. (2020). Prevalence of *Cryptosporidium spp.* in dairy livestock from the Laguna region, México. *Revista bio ciencias*, 7, 881. doi. org/10.15741/revbio.07.e881.
62. Lorenzo-Lorenzo, M. J., Ares-Mazas, M. E., de Maturana, I. V.M. y Duran-Oreiro, D. (1993). Effect of Ultraviolet Disinfection of Drinking Water on the Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *The Journal of Parasitology*, 79(1), 67. doi: 10.2307/3283279.
63. Luna, S., Reyes L., Chinchilla, M. y Catarinella, G. (2002). Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en aguas superficiales en Costa Rica. *Parasitología latinoamericana*, 57(1-2), 63-65. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122002000100015>.
64. Mamedova, S. y Karanis, P. (2020). *Cryptosporidium spp.* Infections in Livestock and Wild Animals in Azerbaijan Territory. *Environ. Sci. Proc.* 2, 44; doi: 10.3390/environsciproc2020002044.
65. Mammeri, M., Chevillot, A., Chenafi, I., Julien, C., Vallée, I., Polack, B., Follet, J. y Adjou, K. T. (2019). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from diarrheal dairy calves in France. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 100323. doi:10.1016/j.vprsr.2019.100323.

66. Meinhardt, P. L., Casemore, D. P. y Miller, K. B. (1996). Epidemiologic Aspects of Human Cryptosporidiosis and the Role of Waterborne Transmission. *Epidemiologic Reviews*, 18 (2), 118-136. doi: 10.1093 / oxfordjournals.epirev.a017920.
67. Mekonnen, M. M. y Hoekstra, A. Y. (2015). Global Gray Water Footprint and Water Pollution Levels Related to Anthropogenic Nitrogen Loads to Fresh Water. *Environmental Science y Technology*, 49(21), 12860–12868. Doi: 10.1021/acs.est.5b03191.
68. Miglioli, M. G., Zuanazzi, J. G., Silva, J. D. da, Franco, R. M. B. y Greinert-Goulart, J. A. (2017). Remoção de cistos de *Giardia spp.* e ooquiste de *Cryptosporidium spp.* na Estação de Tratamento de Esgoto Garcia, no município de Blumenau, SC, Brasil. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 12(6), 1001. doi: 10.4136/ambi-agua.2028.
69. Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu J., Guan X. y Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00928
70. Nair, P., Mohamed, J. A., DuPont, H. L., Figueroa, J. F., Carlin, L. G., Jiang, Z. D., Belkind-Gerson, J., Martinez-Sandoval, F. G. y Okhuysen, P. C. (2008). Epidemiology of cryptosporidiosis in North American travelers to Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(2), 210–214.
71. Nakibirango, J., Mugenyi, V., Nsaba, D., Nsimemukama, A., Rugera, S. P., y Okongo, B. (2019). Prevalence of cryptosporidiosis and hygiene practices among HIV/AIDS patients in southwest Uganda. *HIV/AIDS Research and Palliative Care*, Volume 11, 141–145. doi: 10.2147/hiv.s206195.
72. Navarro-Martinez, L., del Águila, C. y Bornay-Llinares, F. J. (2011). *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(2), 135–143. doi:10.1016/j.eimc.2010.12.002.
73. Nazar, C. (2007) Bacterial biofilms. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 67: 61-72.
74. Nociolini, C., Cucini, C., Leo, C., Francardi, V., Dreassi, E. y Carapelli, A. (2018). Assessing the Efficiency of Molecular Markers for the Species

- Identification of Gregarines Isolated from the Mealworm and Super Worm Midgut. *Microorganisms*, 6(4), 119. doi: 10.3390/microorganisms6040119.
75. O'Hara, S. P., y Chen, X.-M. (2011). The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection*, 13(8-9), 721–730. doi:10.1016/j.micinf.2011.03.008.
76. Ogendo, A., Obonyo, M., Wasswa, P., Bitek, A., Mbugua, A. y Thumbi, S. M. (2017). *Cryptosporidium* infection in calves and the environment in Asembo, Western Kenya: 2015. *Pan African Medical Journal*, 28. doi: 10.11604/pamj.suppl.2017.28.1.9313.
77. Olias, P., Dettwiler, I., Hemphill, A., Deplazes, P., Steiner, A. y Meylan M. (2018). The significance of cryptosporidiosis for the health of calves in Switzerland. *Übersichtsarbeiten*. Band 160, Heft 6, 363–374. <https://doi.org/10.17236/sat00163>.
78. Ongerth, J., Plutzer, J. y Karanis, P. (2018). *Cryptosporidium* y *Giardia*: niveles y distribución en aguas superficiales en toda Europa. *Proceedings*, 2 (11), 690. doi: 10.3390/Proceedings2110690.
79. Ortega-Peña S. y Hernández-Zamora E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Bol Med Hosp Infant Mex*. (75) 79-88 DOI: 10.24875/BMHIM.M18000012.
80. Petersen, H. H., y Enemark, H. L. (2018). Viability Assessment of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Vital Dyes: Dry Mounts Overestimate the Number of “Ghost” Oocysts. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(3), 141–144. doi: 10.1089/fpd.2017.2348
81. Petrincová, A., Valenčáková, A., Luptáková, L., Ondriska, F., Kalinová, J., Halánová, M., Danisova´ O. y Jarčuška, P. (2015). Molecular characterization and first report of *Cryptosporidium* genotypes in human population in the Slovak Republic. *Electrophoresis*, 36(23), 2925–2930. doi: 10.1002/elps.201500230.
82. Pignata, C., Bonetta, S., Cacciò, S., Sannella, A., Gilli G. y Carraro, E. (2019). *Cryptosporidium* Oocyst Contamination in Drinking Water: A Case Study in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 2055. doi: 10.3390/ijerph16112055.
83. Plutzer, J., Kelen, K., Varga, E., Kucsera, I., Reusz, G., Szabó, A. J., Fehér A., Chalmers, R. M. (2018). First *Cryptosporidium* outbreak in Hungary, linked to a

- treated recreational water venue in 2015. *Epidemiology and Infection*, 1–6. doi: 10.1017/s0950268818003138.
84. Potgieter, N., Karambwe, S., Mudau, L. S., Barnard, T. y Traore, A. (2020). Human Enteric Pathogens in Eight Rivers Used as Rural Household Drinking Water Sources in the Northern Region of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 2079. doi: 10.3390/ijerph17062079.
85. Pumipuntu, N. y Piratae, S. (2018). Criptosporidiosis: una enfermedad zoonótica preocupante. *Veterinary World*, 11 (5), 681–686. doi: 10.14202 / vetworld.2018.681-686.
86. Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G. G., Javalera-Duarte, A., Ponce-Martínez, J. A., Valbuena-Gregorio, E. y López-Mata, M. A. (2017). Prevalence and associated risk factors for *Giardia* and *Cryptosporidium* infections among children of northwest Mexico: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 17(1). doi:10.1186/s12889-017-4822-6
87. Ríos-Tobón, S, Agudelo-Cadavid, R. M, y Gutiérrez-Builes L. A. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. 35(2): 236-247. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.
88. Robertson, L. J., Johansen, Ø. H., Kifleyohannes, T., Efunshile, A. M. y Terefe, G. (2020). *Cryptosporidium* Infections in Africa—How Important Is Zoonotic Transmission? A Review of the Evidence. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. doi: 10.3389/fvets.2020.575881.
89. Rousseau, A., La Carbona, S., Dumètre, A., Robertson, L. J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., y Aubert, D. (2018). Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. *Parasite*, 25, 14. doi: 10.1051/parasite/201800.
90. Ruecker, N. J., Braithwaite, S. L., Topp, E., Edge, T., Lapen, D. R., Wilkes, G., Robertson, W., Medeiros, D., Sensen, C. y Neumann, N. F. (2007). Tracking Host Sources of *Cryptosporidium* spp. in Raw Water for Improved Health Risk Assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3945–3957. doi:10.1128/aem.02788-06.

91. Ruecker, N. J., Matsune, J. C., Lapen, D. R., Topp, E., Edge, T. A. y Neumann, N. F. (2013). The detection of *Cryptosporidium* and the resolution of mixtures of species and genotypes from water. *Infection, Genetics and Evolution*, 15, 3–9. doi:10.1016/j.meegid.2012.09.009.
92. Sánchez, C., López, M. C., Galeano, L. A., Qvarnstrom, Y., Houghton, K. y Ramírez, J. D. (2018). Molecular detection and genotyping of pathogenic protozoan parasites in raw and treated water samples from southwest Colombia. *Parasites y Vectors*, 11(1). doi:10.1186/s13071-018-3147-3.
93. Sánchez, J. T., Tay, J., Aguilar, A., Ruiz, D., Malagón, F., Rodríguez, J. A., Ordóñez, J. Y Calderón, L. (2006). Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico City. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(6), pp. 1095–1098. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.1095>.
94. Sarduy, L. y González, M. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicent Electrón.* 20(3) 167-165.
95. Sarkar, S., Kundu, B. y Bandyopadhyay, P. K. (2020). Morphotaxonomical description of six new species of acephaline gregarines infecting oligochaete host. *Journal of Parasitic Diseases.* doi: 10.1007/s12639-020-01261-1.
96. Searcy, K. E., Packman, A. I., Atwill, E. R. y Harter, T. (2006). Capture and Retention of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6242–6247. doi:10.1128/aem.00344-06
97. Sinyangwe, N. N., Siwila, J., Muma, J. B., Chola, M., y Michelo, C. (2020). Factors Associated with *Cryptosporidium* Infection Among Adult HIV Positive Population in Contact with Livestock in Namwala District, Zambia. *Frontiers in Public Health*, 8. doi: 10.3389/fpubh.2020.00074.
98. Skraber, S., Helmi, K., Willame, R., Ferréol, M., Gantzer, C., Hoffmann, L. y Cauchie, H.-M. (2007). Occurrence and persistence of bacterial and viral faecal indicators in wastewater biofilms. *Water Science and Technology*, 55(8-9), 377–385. doi: 10.2166/wst.2007.280.
99. Smith, T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa.

- European Journal of Protistology, 50(5), 472–495. doi: 10.1016/j.ejop.2014.07.002.
100. Soave, R., Ruiz, J., Garcia-Saucedo, V., Garrocho, C. y Kean, B. H. (1989). Cryptosporidiosis in a Rural Community in Central Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, 159(6), 1160–1162. doi: 10.1093/infdis/159.6.1160.
101. Solano, C., Echeverz, M. y Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96–104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008.
102. Spickler AR. 2018. Cryptosporidiosis. Retrieved from <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>.
103. Thompson, R. C. A., Koh, W. H. y Clode, P. L. (2016). *Cryptosporidium*—What is it? *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 54–61. doi:10.1016/j.fawpar.2016.08.004.
104. Thompson, R. C. A., Olson, M. E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M. S. y Hijjawi, N. S. (2005). *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 77–158. doi:10.1016/s0065-308x(05)59002-x.
105. Tolker, T. (2015). Biofilm Development. *Microbiology Spectrum*, 3(2). doi:10.1128/microbiolspec.mb-0001-2014
106. Vande Burgt, N. H., Auer, A., y Zintl, A. (2018). Comparison of in vitro viability methods for *Cryptosporidium* oocysts. *Experimental Parasitology*, 187, 30–36. doi:10.1016/j.exppara.2018.03.002.
107. Vergara C. y Quílez J. (2004) Criptosporidiosis: una zoonosis parasitaria. *Revista MVZ Córdoba*, vol. 9, núm. 1, pp. 363- 372
108. Wei, X., Li, J., Hou, S., Xu, C., Zhang, H., Atwill E., Li, X., Yang, Z y Chen, S. (2018). Assessment of Microbiological Safety of Water in Public Swimming Pools in Guangzhou, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), 1416. doi: 10.3390/ijerph15071416.
109. Wells, B., Paton, C., Bacchetti, R., Shaw, H., Stewart, W., Plowman, J., Katzer, F. y Innes, E., A. (2019). *Cryptosporidium* Prevalence in Calves and Geese Co-Grazing on Four Livestock Farms Surrounding Two Reservoirs Supplying Public Water to Mainland Orkney, Scotland. *Microorganisms*, 7(11), 513. doi: 10.3390/microorganisms7110513.

110. Widmer, G., Carmena, D., Kváč, M., Chalmers, R. M., Kissinger, J. C., Xiao, L., Sateriale, A., Striepen, B., Laurent, F., Lacroix, S., Gargala G. y Favennec, L. (2020). Update on *Cryptosporidium* spp.: highlights from the Seventh International Giardia and *Cryptosporidium* Conference. *Parasite*, 27, 14. doi:10.1051/parasite/2020011.
111. Wilke, G., Ravindran, S., Funkhouser-Jones, L., Barks, J., Wang, Q., VanDussen, K. L., Stappenbeck T. S., Kuhlenschmidt T. B., Kuhlenschmidt M. S. y Sibley, L. D. (2018). Monoclonal Antibodies to Intracellular Stages of *Cryptosporidium parvum* Define Life Cycle Progression In Vitro. *Sphere*, 3(3). doi:10.1128/msphere.00124-18
112. Wingender, J. y Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 417–423. doi:10.1016/j.ijheh.2011.05.009
113. Wolyniak, Di. Cesare, E. A., Hargreaves, B. R. y Jellison, K. L. (2012). Biofilm Roughness Determines *Cryptosporidium parvum* Retention in Environmental Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4187–4193. doi:10.1128/aem.08026-11.
114. Wolyniak, E. A., Hargreaves, B. R. y Jellison, K. L. (2010). Seasonal Retention and Release of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Environmental Biofilms in the Laboratory. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1021–1027. doi:10.1128/aem.01804-09
115. Woolsey, I. D., Blomstrand, B., Øines, Ø., & Enemark, H. L. (2019). Assessment of differences between DNA content of cell-cultured and freely suspended oocysts of *Cryptosporidium parvum* and their suitability as DNA standards in qPCR. *Parasites & Vectors*, 12(1). doi:10.1186/s13071-019-3851-7.
116. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. y Upton, S. J. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72–97. doi:10.1128/cmr.17.1.72-97.2004.
117. Xiao, S., Zhang, Y., Zhao, X., Sun, L. y Hu, S. (2018). Presence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and Giardia in recreational lake water in Tianjin, China: a preliminary study. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-20902-3.

118. Yonezawa, H., Osaki, T. y Kamiya, S. (2015). Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and Its Involvement for Antibiotic Resistance. *Bio Med Research International*, 2015, 1–9. doi: 10.1155/2015/914791.
119. Zahedi, A., Monis, P., Gofton, A. W., Oskam, C. L., Ball, A., Bath, A., Charlotte L. y Ryan, U. (2018). *Cryptosporidium* species and subtypes in animals inhabiting drinking water catchments in three states across Australia. *Water Research*, 134, 327–340. doi:10.1016/j.watres.2018.02.005.
120. Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I., y Ryan, U. (2016). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: Critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 88–109. doi:10.1016/j.ijppaw.2015.12.001.
121. Zhang, Q., Shao, Q., Guo, Y., Li, N., Li, Y., Su, J., Xu, R., Zhang, Z., Xiao, L. y Feng, Y. (2020). Characterization of Three Calcium-Dependent Protein Kinases of *Cryptosporidium parvum*. *Front. Microbiol.* 11: 622203. doi: 10.3389/fmicb.2020.622203.