



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Detección de *Cryptosporidium* spp. en *Crassostrea* y *Ostrea*  
provenientes de los estados de Nayarit, Tabasco y  
Veracruz

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA KARINA CRUZ GALINDO



DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. Martha Ponce Macotella  
2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

### **1. Datos de la alumna**

Ana Karina Cruz Galindo

Teléfono: (55) 1173-3798

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305026806

### **2. Datos del tutor**

Dra. Martha Ponce Macotela

### **3. Datos del Sinodal 1**

Dra. Paz María Salazar Schettino

### **4. Datos del Sinodal 2**

M. en C. David Osorio Sarabia

### **5. Datos del sinodal 3**

M. en C. María del Pilar Torres García

### **6. Datos del sinodal 4**

M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán

### **7. Datos del trabajo escrito**

Detección de *Cryptosporidium* spp. en  
*Crassostrea* y *Ostrea* provenientes de  
los estados de Nayarit, Tabasco y Veracruz.

57p.

2014

*“El científico no estudia la naturaleza por la utilidad que le pueda reportar; la estudia por el gozo que le proporciona, y éste gozo se debe a la belleza que hay en ella.... La belleza intelectual se basta a sí misma, y es por ella, más que quizá por el buen futuro de la humanidad, por lo que el científico consagra su vida a un trabajo largo y difícil”*

*Henri Poincaré*

## Dedicatoria

*A mis padres:*

*María Gabriela Galindo Alcántara*

*Ángel Tereso Cruz Cruz*

*Dedico este trabajo a quienes jamás encontraré la forma de agradecer el que me hayan brindado su amor, cariño y comprensión. Doy muchas gracias a la vida el que me haya puesto como padres a ustedes, porque día a día hicieron de mí la persona que hasta el momento soy, quienes sin medir sus esfuerzos me han dado todo lo que se puede necesitar, porque gracias a todo su apoyo he llegado a realizar una de mis grandes metas, los adoro como no imaginan.*

*A mis hermanas:*

*Cruz Galindo Tere, Gaby, Adriana y Olga por su apoyo, su amistad, por las grandes experiencias que tenemos y la confianza que han depositado en mí, porque son unos pilares fundamentales en mi vida y por la hermosa familia que aún seguimos formando a pesar de las adversidades, ¡Ah!, y a mis cuñados, Gerardo, Sergio y Juan por formar parte de ella y por permitirme ver crecer a la familia, conociendo a nuevas y bellas personitas.*

*A mis sobrinos, mis chaparros:*

*Abraham, Alondra, Lesly, Vania y a mini Sergio, por permitirme compartir con ustedes grandes momentos, por enseñarme nuevas cosas día con día, y por hacerme una tía tan joven. Los amo y por ello siempre confíen en sus grandes capacidades y recuerden que todo lo que deseen lo pueden lograr, sólo con un poco más de esfuerzo.*

*A toda mi familia y amigos.*

## Agradecimientos

Gracias por el apoyo brindado, disposición, asesoramiento y tiempo en la realización de éste trabajo, a mi tutora de tesis, a la Dra. Martha Ponce Macotela.

A mis sinodales a la Dra. Paz María Salazar Schettino, Al M. en C. David Osorio Sarabia, A la M. en C. María del Pilar Torres y a la M. en C. Cristina Cañeda Guzmán por sus observaciones y comentarios que enriquecieron éste trabajo.

A los profesores del taller y equipo de trabajo del Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría dirigido por la Dra. Martha Ponce Macotela. Al M. en C. Aarón Rodríguez, Al técnico laboratorista Gustavo Peralta, al Biól. Mario Martínez, A la M. en C. Silvia Rodríguez y a la M. en C. Yadira Rufino.

A mis compañeros del taller: “Estudio biológico y molecular de Parásitos de Importancia médica” A Ana Valeria Núñez Ramírez, Candy Jiménez, Christian García, Karina Clavijo, Laura Soto, Rocío Ruíz y Berenice González.

Nuevamente un agradecimiento profundo y con cariño al laboratorista Gustavo E. Peralta Abarca por su ayuda constante, asesoramiento en el laboratorio, por todo su conocimiento brindado y su amistad ¡muchas gracias!

Nuevamente al M. en C. Aarón Rodríguez Caballero por su amistad, asesoramiento y los buenos momentos en el laboratorio.

Al Biól. Jorge Luis Garcés Salazar por su ayuda y colaboración en la identificación taxonómica de los ostiones.

A una gran persona y amiga, a la Dra. América Castañeda Sortibrán por su asesoramiento, por su conocimiento brindado día a día, por permitirme trabajar con ella, por confiar en mí, por el apoyo y cariño brindado en todo momento ¡infinitas gracias!

A todos los buenos amigos que pude haber conocido durante mi estancia en la facultad, algunos antes y otros después, sin duda gracias, a “Vic” Victor Gonzáles G. por éstos casi nueve años de tolerarme, de brindarme tu amistad y muy buenos momentos.

A mí querida “prima” Lidia García R. gracias por tus consejos oportunos, el tiempo compartido, las experiencias inolvidables que me has brindado, que me han ayudado a ser mejor estudiante y persona.

A Oscar Jiménez Díaz por los buenos y no tan buenos momentos, por las risas, por ser mi cómplice, por hacerme enojar continuamente y enseñarme lo que es la defensa personal :p , por tu apoyo y cariño incondicional seguirás siendo mi amiwito, durante mucho tiempo, se te quiere montones Tobias.

A Vale Núñez y a Yosahandy Vázquez, por ser grandes personas y amigas, por enseñarme a tolerar más a las personas, a no desviarme de lo que realmente es importante, por su cariño, por los buenos consejos, por los ánimos brindados, por la buena música, por todos los momentos que siempre conservaré con mucho cariño y por lo bello que han agregado a mi vida las quiero.

A Angélica Aguilar, Oscar Rivera, “maravilla” César, Candy Jiménez, Jovana Jasso, a Karen Díaz, Tania Salazar e Iván Flores por todas las risas, buenas clases, buenos momentos, por el camino que hemos recorrido juntos, los quiero.

A la M. en C. Leticia Riverón por el asesoramiento de este trabajo y por las muestras obtenidas del estado de Tabasco.

Y a todas aquellas personas que me encontré durante este recorrido en mi formación de Bióloga, los cuáles me enseñaron a continuar siempre adelante.

Finalmente la UNAM, a la Facultad de Ciencias, a todos mis profesores de la carrera, que contribuyeron en mi formación académica.

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>Introducción</b> .....                                   | <b>9</b>  |
| Taxonomía.....  | 9         |
| Historia.....   | 11        |
| Morfología .....  | 11        |
| Mecanismo de infección.....                                 | 13        |
| Ciclo de vida .....   | 13        |
| Mecanismos patogénicos .....                                | 15        |
| Manifestaciones clínicas .....                              | 15        |
| Diagnóstico .....   | 16        |
| Tratamiento .....   | 16        |
| Epidemiología .....   | 17        |
| Biología de los ostiones .....                              | 19        |
| Clasificación morfológica de los moluscos bivalvos .....    | 20        |
| Características de los moluscos bivalvos .....              | 20        |
| Producción de ostión .....                                  | 23        |
| Producción de ostión en México .....                        | 24        |
| <b>Justificación</b> .....                                  | <b>26</b> |
| <b>Objetivo</b> .....                                       | <b>26</b> |
| <b>Hipótesis</b> .....                                      | <b>26</b> |
| <b>Materiales y Métodos</b> .....                           | <b>27</b> |
| Obtención de material biológico .....                       | 28        |
| Identificación taxonómica de los ostiones .....             | 28        |
| Separación de valvas.....                                   | 29        |
| Extracción de órganos internos .....                        | 29        |
| Trituración de tejido (branquias/tracto digestivo) .....    | 30        |
| Tinción de Ziehl- Neelsen modificada.....                   | 30        |
| Diagnóstico morfológico .....                               | 31        |
| <b>Resultados</b> .....                                     | <b>32</b> |
| Obtención de material biológico .....                       | 32        |
| Identificación taxonómica.....                              | 35        |
| Prevalencia de <i>Cryptosporidium spp.</i> en ostiones..... | 39        |
| Prevalencia global en los tres estados .....                | 42        |
| <b>Discusión</b> .....                                      | <b>43</b> |
| <b>Conclusiones</b> .....                                   | <b>46</b> |
| <b>Perspectivas</b> .....                                   | <b>46</b> |
| <b>Referencias</b> .....                                    | <b>47</b> |
| <b>Anexo</b> .....  | <b>57</b> |

## Resumen

*Cryptosporidium* spp. es un protozooario intracelular, emergente, con distribución cosmopolita, que causa cuadros diarreicos. Se le encuentra en vertebrados e invertebrados. Se ha demostrado que los moluscos bivalvos (ostiones, almejas y mejillones) son portadores de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y que puede ser una fuente de infección para el humano cuando los consume crudos o insuficientemente cocidos. México es un gran productor de ostiones; sin embargo, no se cuenta con reportes de prevalencia de criptosporidiosis en bivalvos. En este trabajo nos propusimos determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ostiones de los principales estados productores de ostión. Se obtuvieron 131 bivalvos de los estados de Nayarit, Tabasco y Veracruz, y se identificaron taxonómicamente. Se extrajeron las branquias y tracto digestivo por separado, se maceraron y se realizaron los frotis para la tinción de Ziehl-Neelsen. Las laminillas se analizaron por microscopía de campo claro con el objetivo 100X. La prevalencia de criptosporidiosis fue del 19.84%. Los bivalvos de Nayarit fueron de la especie *Ostrea conchaphila* y la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. fue del 53%. En Tabasco fue la especie *Crassostrea rizophorae* y la prevalencia fue del 13.3%. En Veracruz fueron dos especies de bivalvos *Crassostrea rizophorae* y *C. virginica*, con una prevalencia del 16.27% en ambos. Hubo mayor detección de ooquistes en el tracto gastrointestinal. Es la primera vez que se detecta la especie *Ostrea conchaphila* con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Se comprobó que los ostiones procedentes de los tres estados son portadores de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

## Introducción

Las parasitosis emergentes y oportunistas han incrementado su frecuencia en los últimos años. Diversas causas, tales como: socioeconómicas, sanitarias, ecológicas, higiénicas y culturales, favorecen las parasitosis que generan un grave problema de salud pública, sobre todo en países en vías de desarrollo. Tal es el caso de *Cryptosporidium* spp., parásito protozooario intestinal, con distribución cosmopolita y que infecta a un gran número de animales vertebrados, incluyendo al hombre (MacKenzie *et al.*, 1994; Rossignol, 2010, Heitman *et al.*, 2002; Erickson & Ortega, 2006).

## Taxonomía

*Cryptosporidium* spp. es un protozooario intracelular, tiene un complejo apical constituido por roptrias y micronemas, con reproducción sexual y asexual (Tzipori & Ward, 2002) . A continuación se resume la clasificación taxonómica para *Cryptosporidium* (Cavalier & Smith, 1998).

Reino: Protista  
Infrareino: Alveolata  
Phylum: Apicomplexa  
Clase: Sporozoa  
Subclase: Coccidia  
Orden: Euccoccida  
Suborden: Eimeriina  
Familia: *Cryptosporididae*  
Género: *Cryptosporidium* (Cavalier & Smith, 1998)

De acuerdo con El Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN por sus siglas en inglés) se han aceptado veinte especies para el género de *Cryptosporium*, que varían de acuerdo a su sitio de infección y al diámetro de sus ooquistes (Tabla 1) (Plutzer & Karanis, 2009).

**Tabla 1.** Especies de *Cryptosporidium* spp. registradas a nivel mundial.

| Especies              | Huésped<br>(Nombre científico)                               | Sitio de infección                   | Tamaño de ooquistes<br>( $\mu\text{m}$ ) | Autor  |
|-----------------------|--|--------------------------------------|--|--|
| <i>C. muris</i>       | Ratón ( <i>Mus musculus</i> )                                | Estómago                             | 6.1 (5.6-6.4) x 8.4 (8.0-9.0)            | Tyzzer (1907)                                |
| <i>C. parvum</i>      | Ratón ( <i>Mus musculus</i> )                                | Intestino delgado                    | 4.9 (4.5-5.4) x 4.4 (4.2-5.2)            | Tyzzer (1912)                                |
| <i>C. wrairi</i>      | Cerdo ( <i>Cavia porcellus</i> )                             | Intestino delgado                    | 4.6 (4.0-5.0) x 5.4 (4.8-5.6)            | Vetterling <i>et al.</i> , (1971)            |
| <i>C. felis</i>       | Gato doméstico ( <i>Felis catis</i> )                        | Intestino delgado                    | 4.5 (5.0-4.5) x 5.0 (6.0-5.0)            | Iseki (1989)                                 |
| <i>C. serpentis</i>   | Serpiente ( <i>Elaphe guttata</i> )                          | Estómago                             | 6.2 (5.6-6.6) x 5.3 (4.8-5.6)            | Levine (1980)                                |
| <i>C. baileyi</i>     | Gallina ( <i>Gallus gallus</i> )                             | Cloaca, bursa, tráquea               | 4.8 (4.8-5.7) x 6.4 (5.6-7.5)            | Current <i>et al.</i> , (1986)               |
| <i>C. meleagridis</i> | Ave ( <i>Meleagris gallipavo</i> )                           | Intestino delgado                    | 5.0 (4.5-6.0) x 4.4 (4.2-5.3)            | Slavin (1995)                                |
| <i>C. varanii</i>     | Lagartija ( <i>Eumeces schneideri</i> )                      | Intestino delgado y estómago         | 4.7 (4.2-5.2) x 5 (4.4-5.6)              | Koudela & Modry (1998)                       |
| <i>C. gali</i>        | Ave ( <i>Galus gallus</i> )                                  | Proventrículo                        | 8.25 (8.0-8.5) x 6.3 (6.2-6.4)           | Pavlásek (1999)                              |
| <i>C. andersoni</i>   | Ganado ( <i>Bos taurus</i> )                                 | Abomaso                              | 7.4 (6.0-8.1) x 5.5 (5.0-6.5)            | Lindsay <i>et al.</i> , (2000)               |
| <i>C. canis</i>       | Perro doméstico ( <i>Canis familiaris</i> )                  | Intestino delgado                    | 4.95 x 4.75                              | Fayer <i>et al.</i> , (2001)                 |
| <i>C. molnari</i>     | Peces ( <i>Sparus aurata</i> y <i>Dicentrarchus labrax</i> ) | Estómago e intestino                 | 4.7 (3.2-5.4) x 4.4 (3.0-5.0)            | Álvarez - Pellitero & Sitjá-Bobadilla (2002) |
| <i>C. hominis</i>     | Humano ( <i>Homo sapiens</i> )                               | Intestino delgado                    | 4.8 (6.4-5.4) x 5.2 (4.4-5.9)            | Morgan- Ryan <i>et al.</i> , (2002)          |
| <i>C. scophthalmi</i> | Pez ( <i>Psetta maxima</i> )                                 | Intestino y estómago                 | 4.4 (3.7-5.0) x 3.9 (3.0-4.6)            | Alvarez- Pellitero <i>et al.</i> , (2004)    |
| <i>C. suis</i>        | Cerdo ( <i>Sus scrofa</i> )                                  | Intestino delgado e intestino grueso | 4.6 (4.9-4.4) x 4.2 (4.0-4.3)            | Ryan <i>et al.</i> , (2004)                  |
| <i>C. bovis</i>       | Ganado ( <i>Bos taurus</i> )                                 | Intestino delgado                    | 4.8 (4.7-5.3) x 4.6 (4.1-4.7)            | Fayer <i>et al.</i> , (2005)                 |
| <i>C. ryanae</i>      | Ganado ( <i>Bos taurus</i> )                                 | Intestino delgado                    | 3.1 (2.9-4.4) x 3.7 (2.9-3.6)            | Fayer <i>et al.</i> , (2008)                 |
| <i>C. fragile</i>     | Anfibio ( <i>Duttaphrynus melanostictus</i> )                | Estómago                             | 6.2 (5.5-7.0) x 5.5 (5.0-6.5)            | Jirku <i>et al.</i> , (2008)                 |
| <i>C. macropodum</i>  | Canguro ( <i>Macropus giganteus</i> )                        | Intestino delgado                    | 4.9 (4.5-6.0) x 5.4 (5.0-6.0)            | Power & Ryan (2008)                          |
| <i>C. fayeri</i>      | Canguro ( <i>Macropus rufus</i> )                            | Intestino delgado                    | 4.9 (4.5x5.1) x 4.3 (3.8-5.0)            | Ryan <i>et al.</i> , (2008)                  |

## Historia

Ernest Tyzzer (1907) describió el género *Cryptosporidium*. Los parásitos fueron extraídos de las glándulas gástricas y del intestino delgado en un ratón de laboratorio y los denominó *C. muris* y *C. parvum* respectivamente (Xiao *et al.*, 2004).

Los dos primeros casos en pacientes humanos se reportaron en 1976. En un paciente de 3 años de edad con enterocolitis aguda (Nime *et al.*, 1976), y en un paciente de 39 años con inmunosupresión (Meisel *et al.*, 1976).

Hasta 1982 el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) reportó 21 casos, que correspondieron a pacientes masculinos con SIDA. Siendo la causa de diarrea con mayor importancia en pacientes inmunosuprimidos, especialmente con SIDA (CDC, 1982).

En 1990 se reportaron 15 especies de *Cryptosporidium* así como técnicas moleculares para el diagnóstico, clasificación y especificidad de hospederos (Fayer, 2004).

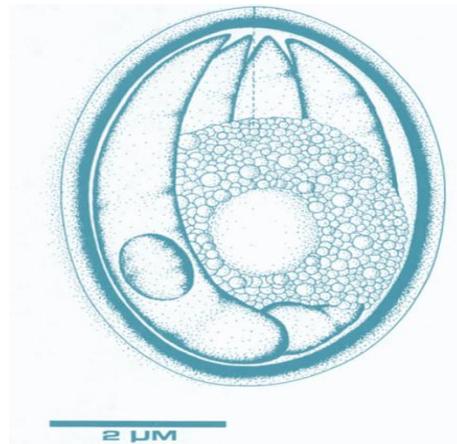
A partir de 1994 se reconoció a *Cryptosporidium* como problema de salud pública, y al agua como su principal fuente de diseminación (MacKenzie *et al.*, 1994).

En las últimas décadas a nivel internacional se han reportado más de 45 brotes de criptosporidiosis transmitidos por el agua siendo Estados Unidos y Reino Unido los más afectados (Caccio & Pozio, 2006). Diversos factores contribuyen al desencadenamiento de estos brotes como: una alta contaminación de aguas superficiales y subterráneas con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y a la elevada resistencia de los ooquistes a los diferentes tratamientos para eliminarlos (Álcantara-Warren & Guerrant, 2008).

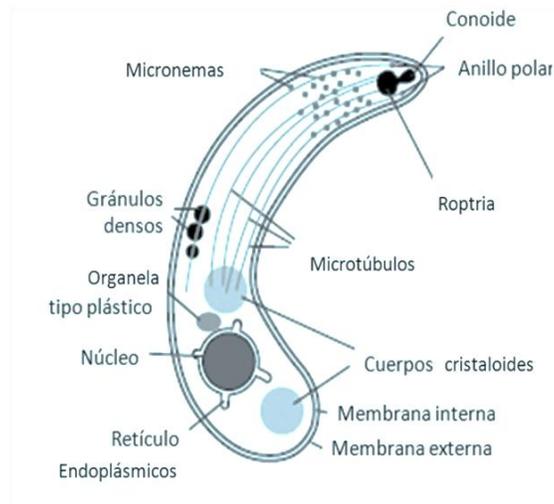
## Morfología

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. incluye distintos estadios: El ooquiste es esférico u ovoide y traslúcido; mide de 4  $\mu\text{m}$  – 6  $\mu\text{m}$  y contiene cuatro esporozoítos (Fig. 1) . Los esporozoítos son alargados, simulando una coma, poseen un complejo apical, formado por roptrias, anillo polar, micronemas y gránulos densos el cual les permite adherirse a su hospedero (Fig. 2). Los trofozoítos son semiesféricos y contienen un gran núcleo. El

meronte (esquizonte) es semiesférico y contienen merozoítos. Los merozoítos tienen el complejo apical. Los microgametos tienen un núcleo compacto y un anillo polar de microtúbulos. Los macrogametos poseen una membrana vesicular, gránulos densos de amilopectina y gránulos de polisacáridos (Del Coco *et al.*, 2009; Carey, *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005).



**Fig. 1.** Esquema que muestra la morfología del ooquiste de *Cryptosporidium baileyi* (Modificado de Current *et al.*, 1986).



**Fig. 2.** Esquema que muestra las estructuras visibles con microscopio electrónico *Cryptosporidium* spp. (Modificado de Smith *et al.*, 2005).

## Mecanismo de infección

La infección se puede dar con 1-10 ooquistes. El mecanismo de infección es por fecalismo de humanos y otros mamíferos. Las vías de transmisión pueden ser: Directo ano-mano-boca. Indirecto en donde las heces pueden contaminar el agua de beber o los alimentos. Por fomites, forosis y por los cuerpos de agua que se usan para riego (Fayer *et al.*, 2000; De la Parte-Pérez *et al.*, 2005).

## Ciclo de vida

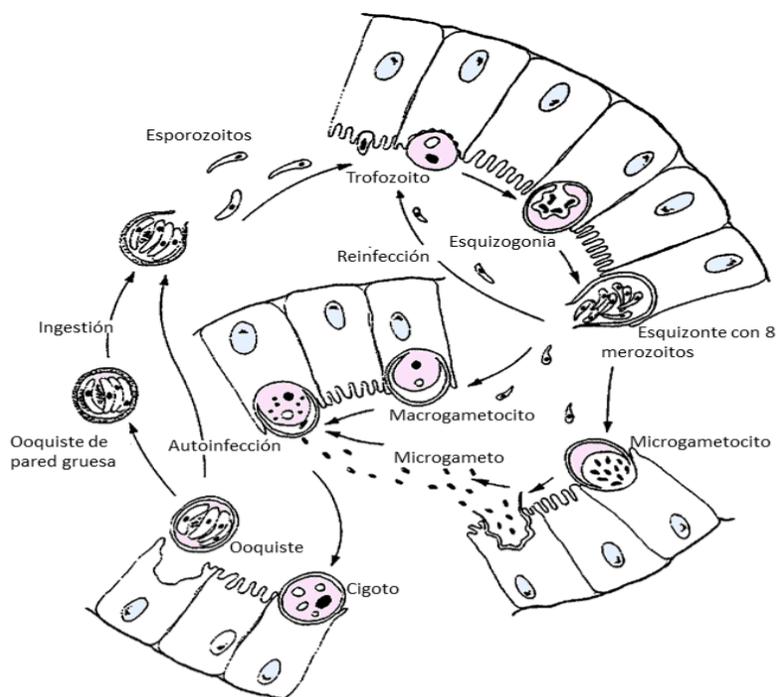
El ciclo de vida de *Cryptosporidium* en mamíferos, especialmente en humanos es monoxeno (sólo requiere de un hospedero). Se inicia cuando el hospedero ingiere los ooquistes, éstos se rompen en el intestino delgado por los cambios microambientales: cambio del pH, agentes reductores y sales biliares entre otros. Del ooquiste salen cuatro esporozoítos móviles, que rápidamente invaden a las células epiteliales del intestino delgado. Forman una vacuola parasitófora que mantiene al parásito dentro de la célula, pero extracitoplasmática. Dentro de la vacuola el esporozoíto se diferencia en trofozoíto, posteriormente en esquizonte, y por división nuclear en merogonia (fase asexual) que da lugar a la formación del meronte I y II.

Los merontes de tipo I contienen de 6 a 8 núcleos que maduran en 6 -8 merozoítos, son liberados cuando maduran y pueden infectar a otros enterocitos (multiplicación asexual)

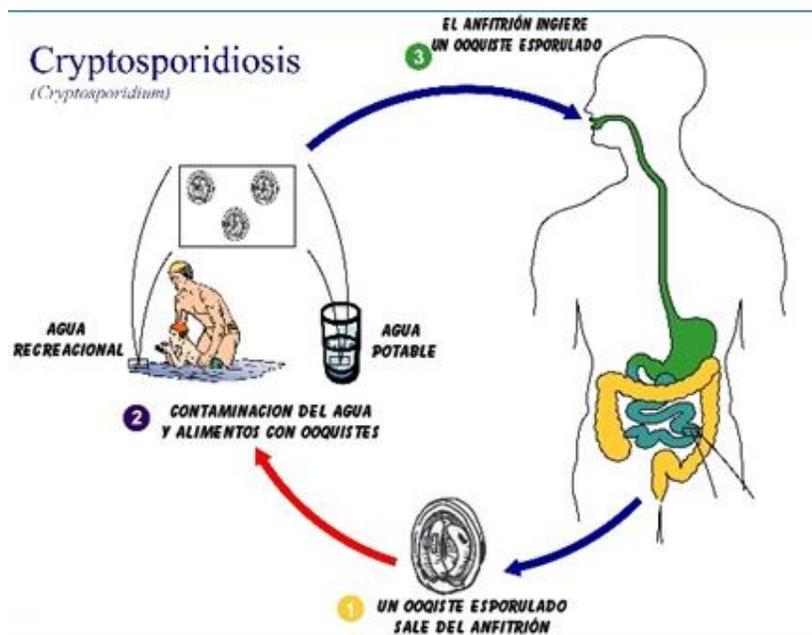
Los merozoítos tipo I pueden convertirse en merontes de tipo II. En éstos se forman cuatro merozoítos que se diferencian en macrogametocito y microgametocito (gametogonia, fase sexual). Los macrogametocitos son uninucleados, se agrandan, sintetizan gránulos de amilopectina y cuerpos formadores de pared, y se transforman en macrogametos. Los microgametocitos contienen hasta 16 núcleos y se transforman en microgametos. Los macrogametos son fecundados por microgametos y se forma un cigoto. En el cigoto se desarrollan cuatro esporozoítos (por esporogonia) y se forman los ooquistes (Fig. 3).

Los ooquistes de pared delgada (20%) pueden producir la autoinfección interna, persistente en personas inmunodeficientes. Los ooquistes de pared gruesa (80%) son

excretados en las heces al ambiente (Fig. 4) (Becerril, 2008; Smith *et al.*, 2005; Thomson *et al.*, 2005; Fayer & Ungar, 1986; Hijjawi *et al.*, 2004).



**Fig. 3** Esquema de ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. en el huésped. (Modificado de Chen *et al.* 2002).



**Fig. 4** Esquema de ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. en el ambiente (Modificado de CDC, 1982).

## Mecanismos patogénicos

Los esporozoítos invaden a las células epiteliales y se multiplican. Producen enzimas que degradan el moco intestinal y establecen contacto con las células intestinales a través de interacciones ligando-receptor. La adhesión e invasión son facilitadas por la interacción que se presenta con el enterocito, por las proteínas de superficie del esporozoíto y las proteínas secretadas por el complejo apical (Borowski, 2008; Del Coco *et al.*, 2009).

Los parásitos intracelulares producen aplanamiento de las microvellosidades, con la consecuente disminución de las enzimas digestivas y mala absorción de fluidos, electrolitos y nutrientes (Gookin *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

## Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas dependerán del estado inmune y la edad del hospedero; además del origen, especie o genotipo del parásito (Okhuysen *et al.*, 1999; Carey *et al.*, 2004; Tzipori & Ward, 2002).

En personas inmunocompetentes (sistema inmune normal) el período de incubación es de 5 a 28 días. Los pacientes pueden ser asintomáticos. Cuando es sintomática, se presenta: anorexia, náuseas, vómito, fiebre, diarrea acuosa y pérdida de peso. La eliminación de ooquistes es intermitente por 1 a 4 semanas en donde la infección se puede autolimitar (Chen *et al.*, 2002; Tzipori & Ward, 2002).

En pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) la diarrea acuosa puede ser persistente, eliminando 10 litros de heces líquidas por día, lo que da lugar a deshidratación, choque hipovolémico y muerte fundamentalmente en pacientes con CD4+ menor a 50 células/mm<sup>3</sup> (Becerril *et al.*, 2008; Flaningan *et al.*, 1992). En estos pacientes la ubicación extra intestinal del parásito es frecuente y puede invadir: hígado, esófago, páncreas, pulmón y conductos biliares (De la Parte- Pérez *et al.*, 2005; Caccio & Pozio, 2006; Fayer, 2004; Xiao & Ryan, 2004). Aunque la prevalencia en personas con SIDA no es alta en países desarrollados (5-15%), la falta de tratamientos eficaces hace que esta infección sea una de las más problemáticas, entre las infecciones oportunistas asociadas con SIDA (Tzipori & Ward, 2002).

## Diagnóstico

El diagnóstico se lleva a cabo mediante la búsqueda e identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* en la materia fecal (Smith, 2007; Becerril, 2008). Las técnicas más precisas para el diagnóstico son las siguientes:

Tinciones. Las tinciones utilizadas son las de Ziehl-Neelsen modificada, Kinyoun y DMSO-carbolfucsina. Se observan los ooquistes de color rojo en un fondo de contraste de color verde brillante o azul que llegan a medir de 3- 6  $\mu\text{m}$  (Feldman & Guardis, 1990).

Otras técnicas utilizadas son las pruebas inmunológicas: el ensayo inmuno enzimático ligado a enzimas (ELISA) ésta prueba son más sensibles, La hemaglutinación pasiva inversa (RPH por sus siglas en inglés) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). La Inmunofluorescencia indirecta cuenta con una alta sensibilidad (98-100%) y especificidad (96-100%). (De la Parte - Pérez, *et al.*, 2005; Cacciò & Pozio, 2006; Jex *et al.*, 2008).

Y finalmente las técnicas Moleculares: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), necesaria para la identificación de la especie y genotipos (Carey *et al.*, 2004).

## Tratamiento

En la actualidad no existe un fármaco efectivo contra la criptosporidiosis tanto en humanos como en otros mamíferos, por lo cual se emplea una gran cantidad de antiparasitarios (Current & García, 1991; Rossignol, 2010; De la Parte –Pérez *et al.*, 2005).

La paramomicina es un antibiótico que actúa sobre los ribosomas del parásito y detiene la síntesis proteica microbiana a nivel ribosomal. Este fármaco reduce los síntomas y la excreción de ooquistes. La dosis es de 500 mg/ 6 horas /28 días (Theodos *et al.*, 1998; White *et al.*, 1994).

La azitromicina es otro antibiótico que interrumpe la síntesis de proteínas microbianas uniéndose a la subunidad 50s. Es el macrólido con mayor eficacia contra la criptosporidiosis, la dosis es de 500 mg/día/3 días (Gargala, 2008).

La roxitromicina es un macrólido con poco efecto. La dosis es de 150 mg/12 hras /4 semanas.

La nitazoxanida es un antiparasitario de amplio espectro. Es un benzotiazol que actúa a nivel de la piruvato-ferrodoxin óxido reductasa (esencial en organismos anaérobicos). La dosis es de 500 mg/12 hras /3 días en inmunocompetentes y por 14 días en inmunodeficientes (Aslam & Musher, 2007).

Los resultados de la administración a humanos de anticuerpos anti-IgA del calostro bovino (obtenidos de la inmunización de vacas con ooquistes de *Cryptosporidium parvum*), y de anticuerpos provenientes de yema de huevo (inducidos por vacunación de gallinas con antígenos de *Cryptosporidium*) son contradictorios y poco efectivos (Riggs *et al.*, 2002).

## Epidemiología

La criptosporidiosis es un importante problema de salud pública a nivel mundial. En Estados Unidos se reportan 300 000 mil casos anualmente. La prevalencia en países desarrollados es del 1 al 3%. En países europeos se calcula que 3.3 / 100 habitantes tienen esta parasitosis. En países en vías de desarrollo afecta fundamentalmente a la población infantil (12%) y a personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Becerril *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2002 Mele *et al.*, 2003).

En las últimas décadas, *Cryptosporidium* spp. ha emergido como consecuencia de la aparición del VIH (Del Coco, 2009). Brandonisio *et al.* (1993), en Italia, encontraron una prevalencia del 33.3% en pacientes que presentaban diarrea y eran portadores de VIH. Lim Ya *et al.* (2005) reportan el 3.0% en pacientes con VIH en Selago, Malasia. En Nepal la prevalencia fue del 22.4% en 745 pacientes con VIH (Tiwari *et al.*, 2013).

En México los reportes de criptosporidiosis son escasos. En un estudio que se realizó con 403 niños, menores de cinco años de edad, en el estado de Puebla, se encontró una prevalencia del 9.4% (Miller *et al.*, 1994). Otro estudio reportó el 41% en una muestra de 200 niños en la Cd. de México (Sánchez- Vega *et al.*, 2006). Otros estudios muestran una

prevalencia del 2.8% al 7.5% (Larrosa- Haro *et al.*, 2002; Javier- Enriquez *et al.*, 1997; Solorzáno-Santos *et al.*, 2000). Algunas de las causas de esta parasitosis se debe principalmente a los alimentos contaminados con ooquistes de *Cryptosporidium* spp. En los últimos años, reportes de otros países, muestran que los moluscos bivalvos (almejas, mejillones, escalopas y ostiones) son portadores de ooquistes (Tablas 2 y 3). Debido a que el ser humano tiene el hábito de consumir ostiones crudos, éstos pueden ser una fuente de adquisición de esta parasitosis.

**Tabla 2.** Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos de distintos países.

| Bivalvo examinado   | País                       | <i>Cryptosporidium</i>                                 | Prevalencia % (Positivos/N)                    | Producto biológico           | Método  | Referencia                          |
|---|----------------------------|--|--|------------------------------|---------|-------------------------------------|
| Mejillón ( <i>Mytilus edulis</i> )  | Irlanda                    | <i>Cryptosporidium</i>                                 | 1/13 sitios                                    | Tejido completo              | IFA     | Chalmers <i>et al.</i> , 1997       |
| Mejillón ( <i>Ischadium recurvum</i> )  | EU                         | <i>Cryptosporidium</i>                                 | 87.5 (14/16) Hemolinfa<br>100 (16/16) Tejido   | Hemolinfa y tejido           | IFA     | Grazyck <i>et al.</i> , 1999        |
| Mejillón ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )   | España                     | <i>C. parvum</i>                                       | 31 mejillones positivos                        | Tejido completo              | IFA     | Gómez-Bautista <i>et al.</i> , 2000 |
| Mejillón ( <i>Dreissena polymorpha</i> )  | Canadá                     | <i>C. parvum</i>                                       | 100 (24/24)                                    | Tejido blando                | IFA/PCR | Grazyck <i>et al.</i> , 2001        |
| Mejillón ( <i>mytilus galloprovincialis</i> )<br>Almeja ( <i>Ruditapes decussatus</i> ) | Irlanda, España y Portugal | <i>Cryptosporidium</i>                                 | Mejillón: 32.7 (35/197)<br>Almeja: 54.8(23/42) | Branquias y tracto digestivo | IFA     | Gómez-Couso <i>et al.</i> , 2003    |
| Almeja (especies no especificada)   | Canadá                     | <i>Cryptosporidium</i>                                 | IFA:0.8<br>PCR:16                              | Branquias                    | IFA/PCR | Fayer <i>et al.</i> , 2003          |
| Almeja ( <i>Chamelea gallina</i> )  | Italia                     | <i>C.hominis</i>                                       | 50 (2/4 piscinas)                              | hemolinfa                    | PCR     | Traversa <i>et al.</i> , 2004       |
| Mejillón ( <i>Mytilus californianus</i> )   | EU                         | <i>C.parvum</i> ,<br><i>C.hominis</i> , <i>C.felis</i> | 12.2 (16/156) lotes                            | Hemolinfa                    | PCR     | Miller <i>et al.</i> , 2005         |
| Almeja ( <i>Chamelea gallina</i> )  | Italia                     | <i>C.parvum</i>  | 71.9 (23/32)                                   | Tejido blando                | IFA     | Giangaspero <i>et al.</i> , 2005    |
| Mejillón ( <i>Mytilus edulis</i> )  | Noruega                    | <i>Cryptosporidium</i>                                 | 6/14 sitios 43 grupos                          | tejido                       | IFA     | Robertson & Gjerde, 2008            |
| Mejillón ( <i>Mytilus edulis</i> )  | Canadá                     | <i>Cryptosporidium</i>                                 | 73 (8/11)                                      | Tejido blando                | IFA/PCR | Levesque <i>et al.</i> , 2010       |

N: Tamaño de muestra

IFA: técnica de inmunofluorescencia

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

**Tabla 3.** Prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en ostiones de distintos países.

| Especie                        | País         | <i>Cryptosporidium</i>        | Prevalencia % (Positivos/N)              | Producto biológico          | Método  | Referencia                         |
|--------------------------------|--------------|-------------------------------|--|-----------------------------|---------|------------------------------------|
| <i>Crassostrea virginica</i>   | EUA          | <i>Cryptosporidium</i>        | 38.8 (140/360)                           | Hemolinfa                   | IFA     | Fayer <i>et al.</i> , 1998         |
| <i>Ostrea edulis</i>           | España       | <i>Cryptosporidium</i>        | 83.3 (5/6 lugares 60/72muestras)         | Tracto gastrointestinal     | IFA     | Freire-Santos <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Crassostrea virginica</i>   | EUA          | <i>C. parvum/C. hominis</i>   | 19.6 (311/1590)                          | Branquias                   | IFA     | Fayer <i>et al.</i> , 2002         |
| <i>Ostrea edulis</i>           | España       | <i>C. parvum y C. hominis</i> | 66.7 (6/9) por IFA<br>55.6 (5/9) por PCR | Branquia y tracto digestivo | IFA     | Gómez-Couso <i>et al.</i> , 2004   |
| <i>Crassostrea virginica</i>   | EUA          | <i>C. parvum</i>              | 88.7 de las muestras                     | Hemolinfa                   | IFA     | Graczyk <i>et al.</i> , 2007       |
| <i>Crassostrea gigas</i>       | Países bajos | <i>C. parvum y C. hominis</i> | 6.7 (9/133 de las muestras)              | Tracto digestivo            | IFA     | Schets <i>et al.</i> , 2007        |
| <i>Crassostrea rhizophorae</i> | Brasil       | <i>Cryptosporidium</i>        | 8.3 (1/12 grupos de 10 ostras positivas) | Tracto gastrointestinal     | IFA     | Guiguet-Leal <i>et al.</i> , 2008  |
| <i>Crassostrea gigas</i>       | Italia       | <i>Cryptosporidium</i>        | 0 (0/8 grupos de muestras 17-23).        | Hemolinfa                   | IFA/PCR | Francavilla <i>et al.</i> , 2012   |

N: Tamaño de muestra

IFA: técnica de inmunofluorescencia

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Tomado y adaptado de (Willis *et al.*, 2013).

## Biología de los ostiones

El Phylum Mollusca es uno de los grupos más diversos y antiguos del Reino Animal, cuenta con aproximadamente 93,000 especies vivas (el segundo después de los artrópodos). La clase Bivalvia, Lamellibranchia o Pelecypoda es una de las siete clases que forma parte del Phylum, incluye cerca de 20 000 especies descritas y se encuentra integrada por almejas, ostiones, mejillones y escalopos. Los moluscos de esta clase se utilizan como alimento y por ello tiene una importancia comercial fundamental.

Los bivalvos tienen una amplia distribución en los ecosistemas marinos, algunas especies se han adaptado a vivir en ambientes salobres y agua dulce. La mayoría vive en los sustratos blandos excavando con su pie, otros en sustratos duros (Brusca & Brusca, 2003; Fernández-Álamo & Rivas, 2007).

## **Clasificación morfológica de los moluscos bivalvos**

La Malacología es la ciencia que estudia a los Moluscos y la Conquiliología es una de las ramas que se ocupa del análisis de las conchas. Para entender la taxonomía y diversidad de este grupo se consideran las siguientes características: Tamaño de las valvas (inequivalvas y equivalvas), forma (convexas, redondeadas, ovoides, elípticas, etc.), color, presencia de estrías (sí son finas o no), el ligamento que une a los dos valvas, línea paleal, número y tamaño de músculos aductores, tipo de dentición, y tipo de escultura (presencia y posición de las costillas) (García-Cubas & Reguero, 2007).

### **Características de los moluscos bivalvos**

Los bivalvos son organismos muy especializados, variados en forma, color y tamaño. Están comprimidos lateralmente, con simetría bilateral, tienen una cabeza muy reducida y carecen de esqueleto interno. Su cuerpo está protegido por una concha de dos piezas (formada por dos valvas), generalmente simétricas, unidas mediante un ligamento que funciona como un resorte y permite la apertura de la concha, y una charnela (un sistema de dientes, huecos o fosetas que se unen entre sí).

### **Concha**

La concha está formada principalmente de carbonato de calcio, está integrada a partir del depósito de cristales de esta sal sobre una matriz orgánica constituida por la proteína conquiolina. Las valvas están articuladas en posición dorsal y cierran por la contracción de los músculos llamados aductores, funcionan como esqueleto para la unión de los músculos, protección ante depredadores y evitan que se introduzca arena o fango en el interior de la concha (Brusca & Brusca, 2003; Padilla & Cuesta, 2003).

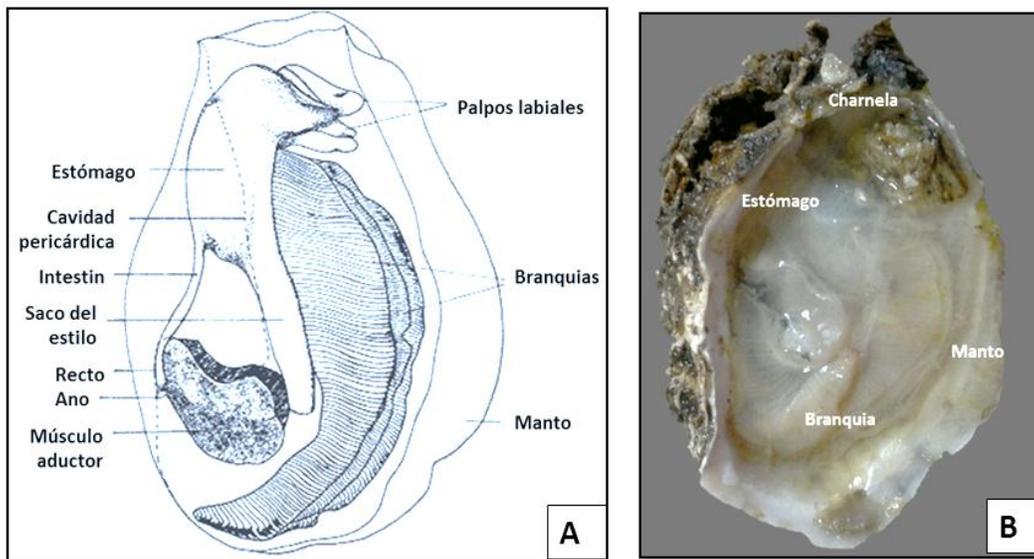
### **Manto**

El manto de los bivalvos está integrado de tejido conjuntivo, formando dos lóbulos que cubren a los órganos internos, dejando una cavidad nombrada cavidad paleal. El manto presenta tres pliegues: uno interno, el cual contiene a los músculos y fija el manto a la concha, el intermedio está relacionado con la función sensorial y, el externo es el encargado de secretar la concha. En algunos bivalvos el manto forma tres aperturas, uno

corresponde al sifón inhalante (regulan la entrada de agua), otro al exhalante (expulsión de agua, previa captación del oxígeno disuelto y de las partículas de alimento) y uno al pie.

## Pie

Los bivalvos tienen un pie con forma de hacha que usan para anclarse al sustrato y para la locomoción. En los costados de la masa visceral se encuentran las branquias dentro de la cavidad del manto (Fig. 5).



**Fig. 5 A.** Esquema de la estructura interna de un bivalvo (ostión) modificado de (Castillo- Rodríguez & García-Cubas, 1984) **B.** Fotografía que muestra la anatomía interna de un ostión de la especie *Crassostrea virginica* obtenido del estado de Veracruz.

## Branquias

Las funciones de las branquias son: captura de partículas nutritivas (por medio de la filtración) y captación de oxígeno. Las branquias están formadas por largos filamentos denominados ctenidios unidos unos con otros, están cubiertos por cilios formando unas láminas o placas con una gran cantidad de orificios para que pase el agua a través del sifón inhalante, el agua se introduce en la cavidad paleal, pasa por las branquias y es expulsada por el sifón exhalante. Cuando en la cavidad paleal entra agua con muchos sedimentos las branquias se contraen, al contrario cuando el agua está relativamente limpia se despliegan. El flujo de agua está regulado por los cambios en el diámetro de las aperturas

que dan acceso a la cavidad del manto por la contracción y expansión de las branquias (Padilla & Cuesta, 2003; Fernández-Álamo & Rivas, 2007).

### **Sistema circulatorio**

En la mayoría de los bivalvos el sistema circulatorio es abierto, está formado por una serie de espacios o senos llamados hemocele y una red de vasos a nivel de los órganos respiratorios, a través de los cuales circula la hemolinfa, la cual contiene amebocitos y proteínas que participan en la respiración como la hemocianina, hemoglobina y mioglobina. El corazón se encuentra dentro del saco celómico (cámara pericárdica), en la región dorsal del tubo digestivo, está formado por un par de aurículas y un ventrículo, de éste sale la aorta que lleva la hemolinfa por un sistema de vasos, humedeciendo todos los tejidos y los órganos con la hemolinfa oxigenada, almacenando los productos de desecho y transportándolos hacia los vasos eferentes de las branquias en donde se vuelve a oxigenar para regresar a las aurículas y cerrar el circuito (Fernández Álamo & Rivas, 2007).

### **Sistema reproductivo**

El sistema reproductivo está integrado por dos gónadas formadas a partir de los túbulos ramificados, las cuales se unen entre sí para originar conductos que se abren en un gonoducto. Los gametos se forman a partir del epitelio de los túbulos y a través del gonoducto llegan a la cámara paleal donde son expulsados al exterior a través de la abertura exhalante. En la mayoría, la fertilización es externa. Pueden ser dioicos o hermafroditas (Gómez-Couso *et al.*, 2003).

### **Sistema digestivo y alimentación**

En el sistema digestivo los palpos labiales (como tentáculos) se localizan a un costado de la boca, seleccionan por tamaño, textura y composición química a las partículas que penetran.

Los moluscos se alimentan de materia orgánica, fitoplancton, partículas inertes, detritos y microzooplancton que se encuentran en suspensión en el agua y son ingeridos por microfagia. Este alimento pasa desde la boca al esófago, estómago, al estilo en donde se

tritura y se mezcla con enzimas digestivas. El alimento digerido es absorbido por algunas partes del estómago que tienen grandes rugosidades, mejor conocida como digestión extracelular (Padilla & Cuesta, 2003).

El proceso de filtración tiene lugar mediante el movimiento de los cilios laterales de las branquias, que origina una corriente de agua que entra en la cámara inhalante, atraviesa las branquias hacia la cámara exhalante y finalmente es expulsada a través del orificio exhalante. Las partículas transportadas por el agua son retenidas por los cilios latero-frontales, éstos las envían a los cilios frontales del filamento branquial, allí son mezcladas con el mucus secretado por las células glandulares, llegando por último a los palpos labiales. El tamaño de las partículas retenidas oscila entre un mínimo de 1-5  $\mu\text{m}$  y un máximo de 400-500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los cilios impiden el ingreso de las partículas de mayor tamaño a la cavidad paleal (Brusca & Brusca, 2003).

### **Producción de ostión**

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO -Food and Agriculture Organization) considera que en América Latina los moluscos bivalvos representan el tercer grupo más importante de organismos marinos en la acuicultura, con una producción cercana a 13 000 toneladas anuales. México ocupa el cuarto lugar con una producción cercana a 1500 toneladas anualmente, después de Chile, Brasil y Perú (Fig. 6) (FAO, 2005).



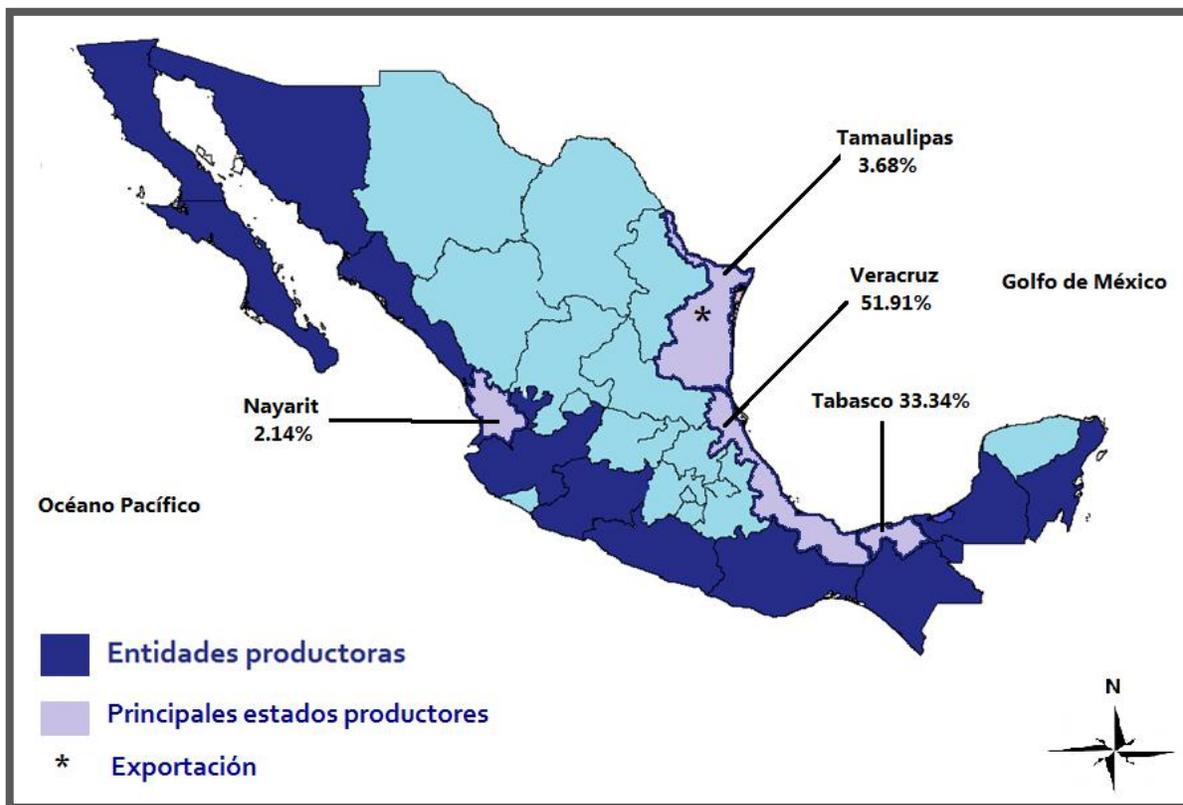
**Fig. 6.** Mapa que muestra los principales países productores de ostión en Latinoamérica.

### **Producción de ostión en México**

El ostión por su volumen se encuentra en el 6° lugar de la producción de especies marinas. Por su valor económico se encuentra en el lugar 16. En las exportaciones se encuentra en el lugar número 18 y su principal destino es Estados Unidos.

Los principales estados productores de ostión son: Veracruz (51.91%), Tabasco (33.34%), Tamaulipas (3.68%) y Nayarit (2.14%); la producción de Tamaulipas se destina a la exportación (Fig.7) (Anuario Nacional de Pesca, 2010).

Nuestro país es gran productor de ostiones, pero no hay estudios que demuestren si éstos son portadores de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.



**Fig. 7.** Mapa de México que muestra los principales estados productores de ostión (Modificado del Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca, 2010).

## Justificación

*Cryptosporidium* spp. es el agente causal que provoca enteritis, diarrea y malabsorción intestinal en humanos y otros mamíferos. La fase infectante es el ooquiste y el mecanismo de infección es por fecalismo; las heces de los diferentes hospederos pueden contaminar el agua de beber, cuerpos de agua y alimentos. Los moluscos bivalvos se alimentan por filtración y se pueden contaminar con productos bióticos y abióticos. Se ha documentado que la criptosporidiosis se puede adquirir por la ingestión de moluscos bivalvos (ostiones, almejas y mejillones) crudos o insuficientemente cocidos. En nuestro país, no hay reportes de infección en bivalvos (ostiones). Es necesario realizar estudios que demuestren que los ostiones son portadores de esta parasitosis.

## Objetivo

Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* en ostiones del género *Crassostrea* y *Ostrea* de los principales estados productores de ostión.

## Hipótesis

Debido a que los bivalvos son organismos filtradores, entonces pueden almacenar ooquistes de *Cryptosporidium* que se encuentren en los cuerpos de agua.

## Materiales y Métodos

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría. Para cumplir con el objetivo se diseñó la siguiente estrategia (Fig. 8).

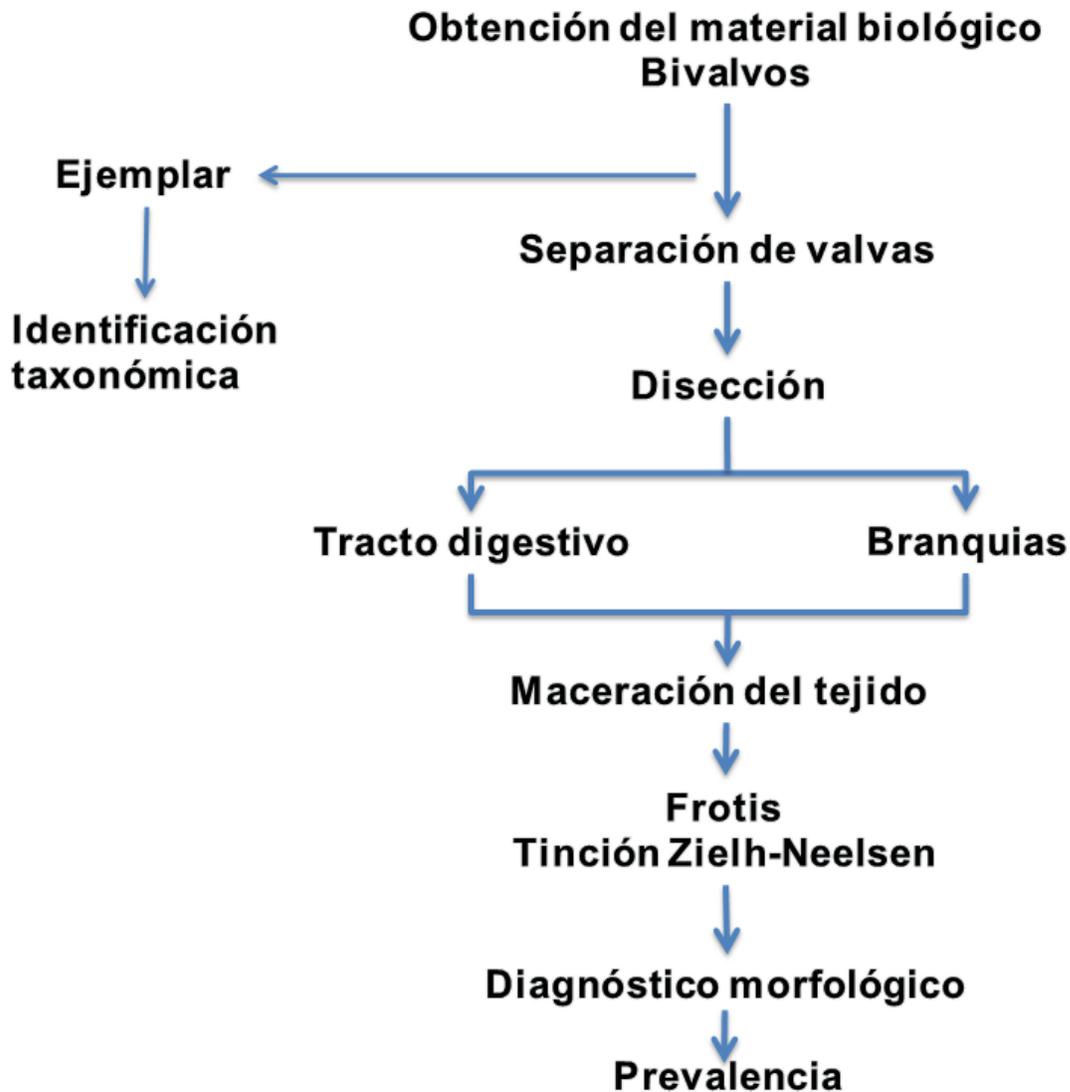


Fig. 8. Metodología para determinar la prevalencia de *Cryptosporidium*.

## Obtención de material biológico

El muestreo se llevó a cabo en el período comprendido entre abril de 2011 a enero de 2013.

El material biológico se obtuvo a partir de la captura realizada por pescadores locales de los principales estados productores: Nayarit, Tabasco y Veracruz (Fig. 9) (Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca ,2010).

Las muestras fueron transportadas en hieleras, con refrigerante a 4°C, al Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.



Fig. 9. Mapa que muestra la ubicación geográfica de los estados analizados.

## Identificación taxonómica de los ostiones

En cada uno de los muestreos, los ejemplares se rotularon y almacenaron a 4°C. Los ejemplares se enviaron para su análisis taxonómico al Biólogo Jorge Luis Garcés Salazar, del laboratorio de prácticas de Animales I, de la Facultad de Ciencias, UNAM. La determinación taxonómica se determinó basándose en el método de Conquiliología (estudio científico de las características de las conchas de los Moluscos).

## Separación de valvas

Los ostiones se sumergieron en agua a 38°C, durante 20 minutos, con la finalidad de separar las valvas y obtener los órganos internos íntegros (Fig. 10).



**Fig. 10.** Fotografías que muestran el procedimiento para la apertura de la concha (izquierda) y bivalvos abiertos (derecha).

## Extracción de órganos internos

Se disectó cada cuerpo del ostión partiendo del manto (Fig. 11). Se colocaron en frascos limpios, se adicionó 5 ml. de solución salina de fosfatos PBS-pH 7 (Anexo No. 1). A continuación se rotularon y guardaron en refrigeración a 4°C hasta su diagnóstico.



**Fig. 11.** Disección de branquias y tracto digestivo en cada ostión.

### **Trituración de tejido (branquias/tracto digestivo)**

En un copropack se colocaron aproximadamente 2.0 g del tejido, se añadieron 2.0 ml de solución salina fosfatos (PBS) paulatinamente y se fue triturando la muestra. La muestra que se obtuvo se almacenó en tubos eppendorf de 1.5ml, a 4°C hasta su uso.

### **Tinción de Ziehl- Neelsen modificada**

- En el centro de un portaobjetos, previamente desengrasado con etanol al 70%, se adicionó una gota del tejido triturado (branquia o tracto digestivo) distribuyéndose de manera uniforme y por duplicado.
- La muestra se incubó a 35°C durante un minuto y posteriormente se fijó con metanol absoluto (este procedimiento se repitió 3 veces).
- Sobre la muestra se colocó papel filtro y Fucsina Básica, se aplicó calor hasta la emisión de vapores, evitando que la muestra se seque, durante 20 minutos.
- La muestra se decoloró con alcohol ácido al 2% (Anexo No. 2), adicionándolo gota a gota, posteriormente se enjuagó con agua corriente.
- A la laminilla se le añadieron tres gotas del colorante de contraste (verde brillante) y se incubó a temperatura ambiente durante dos minutos. (Anexo No. 3)

Finalmente la laminilla se enjuagó con agua de la llave, se dejó secar y se almacenó para su análisis (Fig. 12) (Henriksen & Pohlenz, 1981).



**Fig. 12.** Realización de la tinción Ziehl Neelsen.

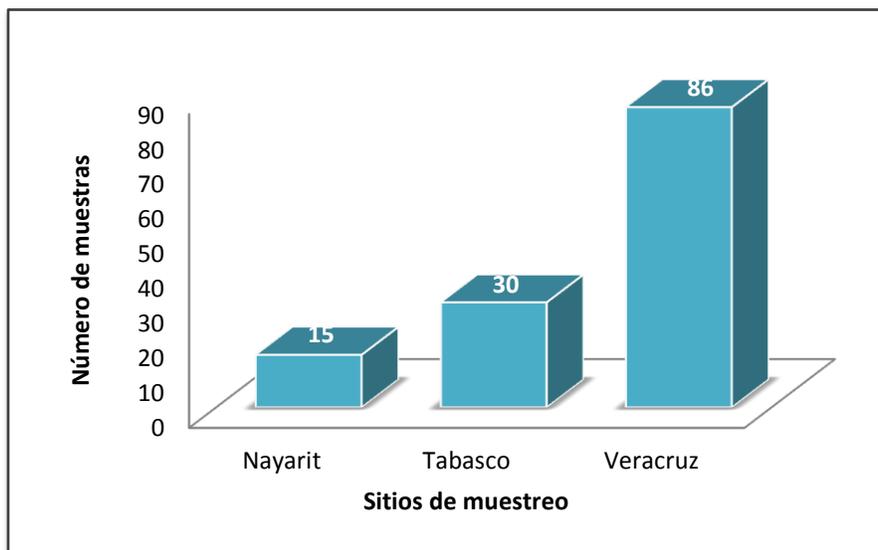
### **Diagnóstico morfológico**

Las muestras se leyeron en un microscopio Olympus BX41<sup>®</sup>, en campo claro con el objetivo 100X. Las muestras positivas contenían estructuras de color rojo, con un diámetro de 3- 6  $\mu\text{m}$ , en un fondo verde.

## Resultados

### Obtención de material biológico

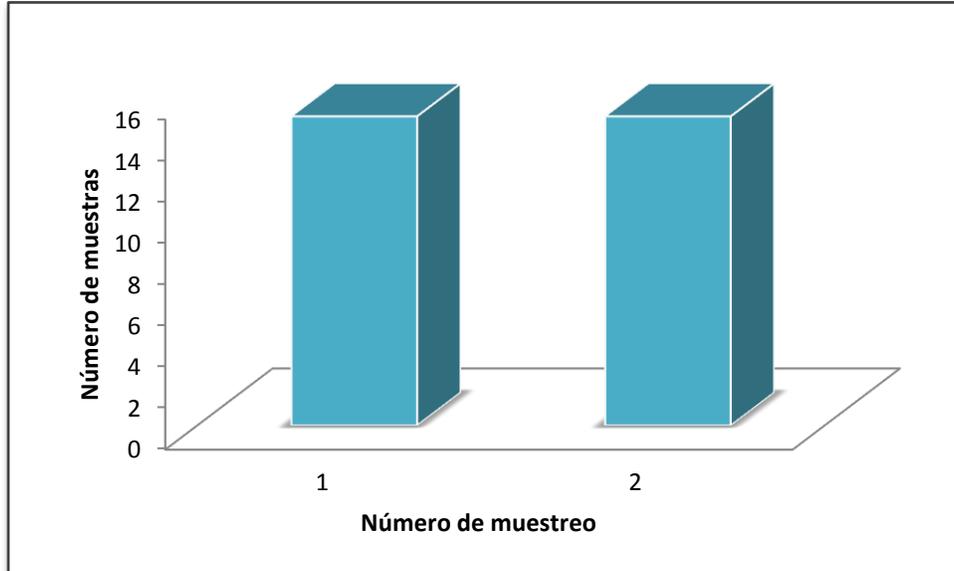
Se analizaron 131 muestras de ostiones provenientes de los tres estados (Fig. 13). En el estado de Nayarit se realizó un solo muestreo en la localidad Puerto La Cruz, donde se obtuvieron 15 ejemplares (Fig. 14). En el estado de Tabasco se llevaron a cabo dos muestreos (Fig. 15) y en el estado Veracruz se realizaron seis muestreos (Fig. 16), uno de éstos se realizó en el Lago de Catemaco, Veracruz (Fig. 17).



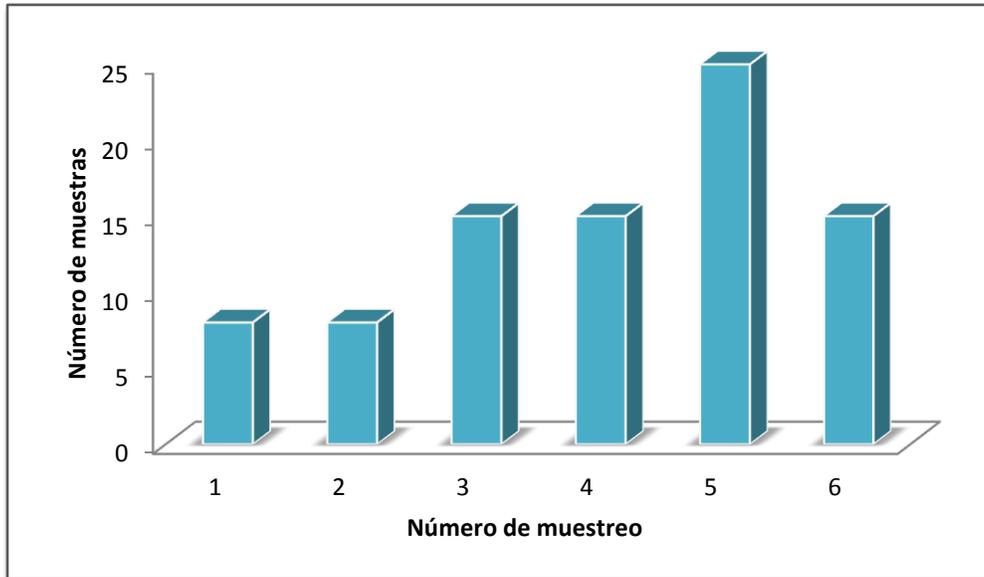
**Fig. 13.** Gráfica que muestra el número de material biológico obtenido por estado.



**Fig. 14.** Fotografía que muestra la localidad de Puerto la Cruz en el estado de Nayarit.



**Fig. 15.** Representación gráfica del tamaño de muestra del estado de Tabasco.



**Fig. 16.** Representación gráfica del tamaño de muestra del estado de Veracruz.



**Fig. 17.** Fotografía que muestra la localidad de Catemaco en el estado de Veracruz.

## Identificación taxonómica

Los ejemplares analizados pertenecen a la Familia Ostreidae y a los géneros *Ostrea* y *Crassostrea* (Rafinesque, 1815).

**Familia Ostreidae** (Rafinesque, 1815). Se caracteriza por poseer una valva izquierda (inferior) grande y profunda; la derecha o superior casi plana. La línea de la charnela sin costillas o dientecillos. El margen de la charnela con o sin denticulaciones finas, costillas radiales irregulares que tienden a dividirse con el crecimiento (García-Cubas & Reguero, 2007).

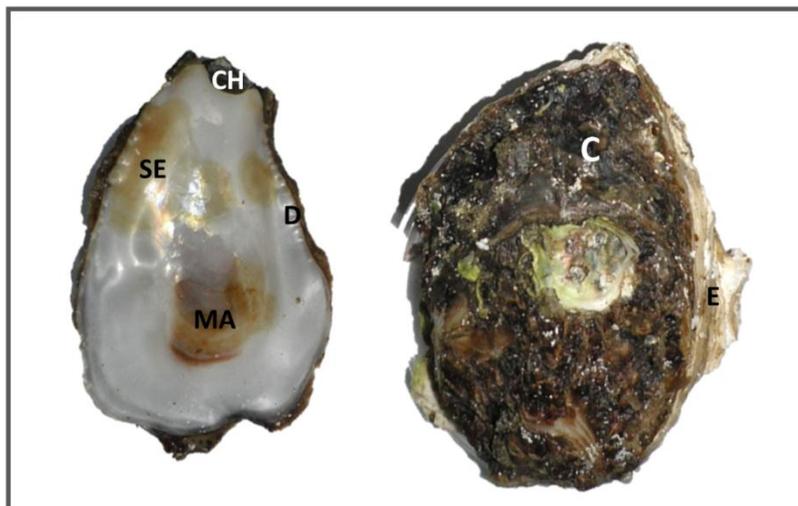
## Estado de Nayarit

Familia: Ostreidae (Rafinesque, 1815)

Género: *Ostrea* (Linnaeus, 1758)

Especie: *Ostrea conchaphila* (Carpenter, 1857)

Los ejemplares del género *Ostrea* tienen concha subcircular, con la valva izquierda profunda, la derecha o superior aplanada y opercular. Impresión muscular subcentral, sin cámara promial, ostias branquiales relativamente grandes. La fertilización y desarrollo de los huevos se efectúa dentro de la cavidad del manto y branquias. Son larvíparos (Fig. 18) (García-Cubas & Reguero, 2007).



**Fig. 18.** Fotografía de la morfología externa de *Ostrea conchaphila* del estado de Nayarit. En dónde se observa CH: marca de la charnela, SE: marca del sifón exhalante, MA: impresión del músculo aductor, E: estrías y C: costillas.

## Estado de Tabasco

Familia: Ostreidae (Rafinesque, 1815)

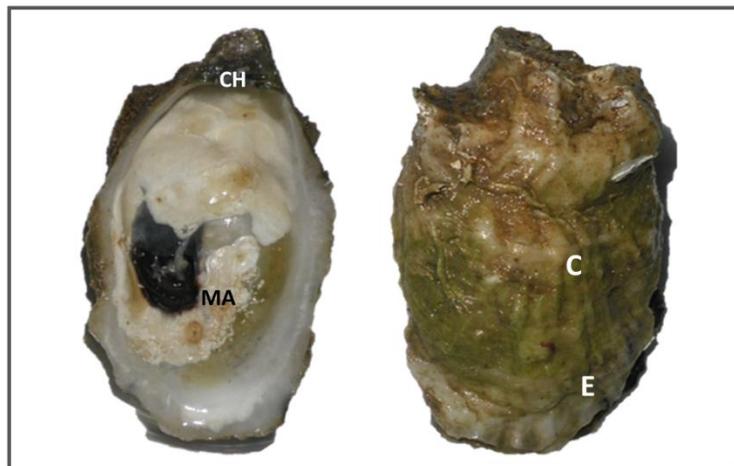
Género: *Crassostrea* (Sacco, 1797)

Especie: *Crassostrea rizophorae* (Guilding, 1828)

El género *Crassostrea* (Sacco, 1797) se caracteriza por tener conchas muy variables generalmente elongadas, la valva izquierda profunda y retraída debajo de la charnela, la valva derecha o superior plana y opercular. Impresión muscular desplazada dorsalmente y pigmentada de rojo- violeta. Cámara promial grande en el lado derecho del cuerpo, ostias de las branquias y huevos pequeños.

Especie *C. rizophorae* (Guilding, 1828)

Cuentan con concha de hasta 150 mm de largo, de color gris, de forma variable, generalmente la valva izquierda en forma de copa y la derecha plana. Conchas ligeras y delgadas de aspecto foliáceo. Interior blanco, con la impresión muscular púrpura y próxima al margen dorsal; márgenes internos rectos y lisos, el de la valva izquierda con machones azul púrpura. Habita sobre raíces y tallos de mangle en la zona intermareal, en aguas de mayor salinidad y menor turbiedad que *C. virginica*, es epifaunal, suspensivora. Se le encuentra a lo largo de las costas con vegetación de manglar desde Tamaulipas hasta Campeche y parte de Yucatán (Fig. 19) (García-Cubas & Reguero, 2007).



**Fig. 19.** Fotografía que muestra la morfología externa de *C. rizophorae* procedente del estado de Tabasco. En dónde se observa CH: marca de la charnela, MA: impresión del músculo aductor, E: estrías y C: costillas.

## Estado de Veracruz

Se detectaron dos especies: *Crassostrea rizophorae* (Fig. 20) y *Crassostrea virginica* (Fig. 21).

Familia: Ostreidae (Rafinesque, 1815)

Género: *Crassostrea* (Sacco, 1797)

Especie: *C. rizophorae* (Guilding, 1828)

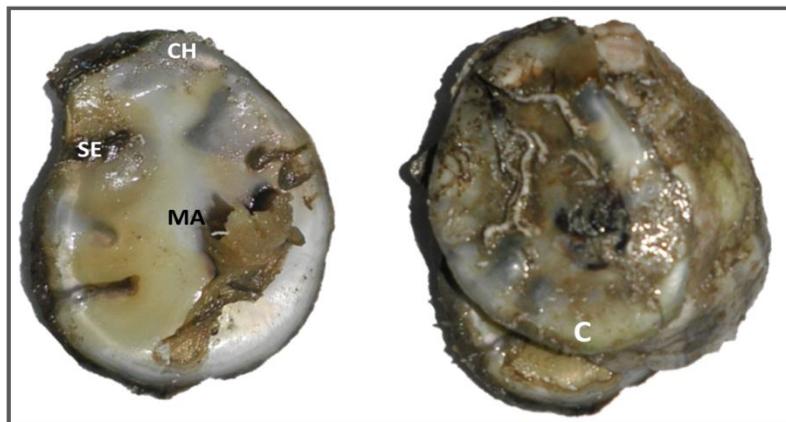
Familia: Ostreidae (Rafinesque, 1815)

Género: *Crassostrea* (Sacco, 1797)

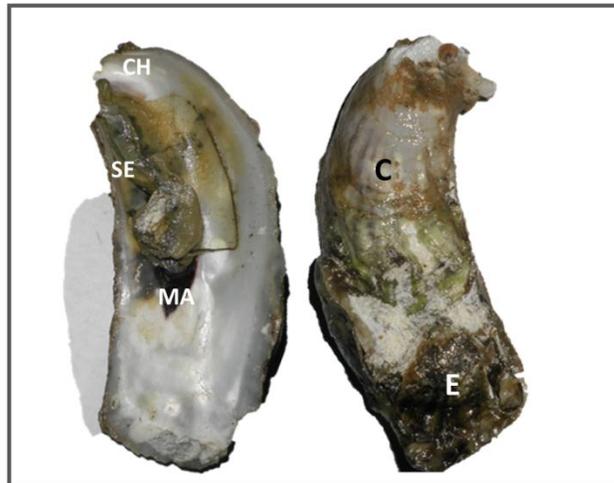
Especie: *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)

La especie *C. virginica* se caracteriza por tener una concha de tamaño grande, hasta 150 mm de largo, de forma irregular, muy variable, desde orbicular hasta alargada, moderadamente gruesa. La superficie rugosa con escamas y los márgenes de las valvas rectas u onduladas. Umbo largo y curvado, la valva derecha más pequeñas y aplanada que la inferior (izquierda). Concha cementada al sustrato por un biso calcificado. Valva izquierda un poco mayor que la derecha. Los umbones con un canal central donde se adhiere el ligamento. En el interior de la concha con la impresión muscular subcentral, púrpura oscuro. Interior liso y carente de sifones.

Habita típicamente en aguas salobres, se le encuentra en lagunas y esteros a lo largo de la costa, desde Tamaulipas hasta Campeche y parte de Yucatán (Fig. 20) (García-Cubas & Reguero, 2007).



**Fig. 20.** Fotografía que muestra la morfología de *C. rizophorae* del estado de Veracruz. En dónde se observa CH: marca de la charnela, MA: impresión del músculo aductor, SE: sifón exhalante y C: costillas.



**Fig.21.** Fotografía que muestra la morfología de *C. virginica* del estado de Veracruz. En dónde se observa CH: marca de la charnela, MA: impresión del músculo aductor, SE: sifón exhalante, E: estrías y C: costillas.

## Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ostiones

### Estado de Nayarit

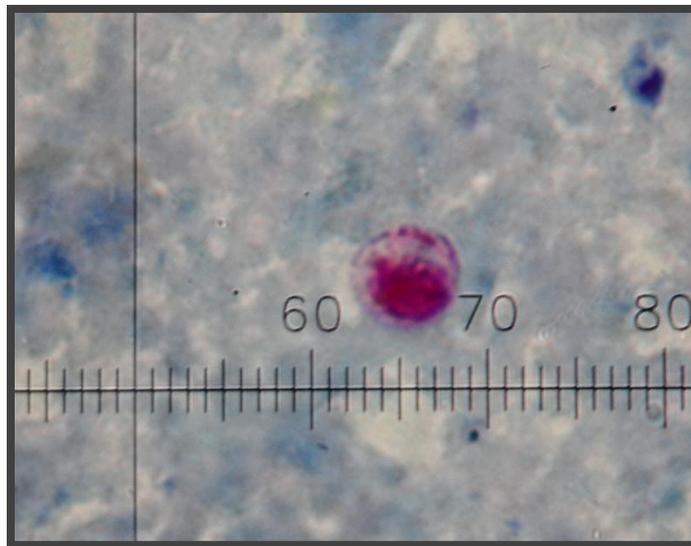
De los quince ejemplares analizados, se encontró una prevalencia de *Cryptosporidium* spp. del 53.3%. El mínimo de ooquistes encontrados por laminilla fue de 3 y el máximo de 91. En las ocho muestras positivas se detectó la presencia de ooquistes en el tracto digestivo (Tabla 4). Los ooquistes se tiñeron de color rojo cereza en un fondo verde (Fig. 22).

**Tabla 4.** Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ostiones del estado de Nayarit.

| Fecha de muestreo | Tamaño de muestra | ZN+      | Sitio de infección | Prevalencia (%) | Número de muestra | Número de ooquistes/laminilla | Tamaño en $\mu\text{m}$ |
|-------------------|-------------------|----------|--------------------|-----------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <b>Marzo 2012</b> | 15                | 8        | TD                 | <b>53.3</b>     | 1                 | 3                             | 3.0-5.0                 |
|                   |                   |          | TD                 |                 | 2                 | 34                            | 3.5-6.0                 |
|                   |                   |          | TD                 |                 | 3                 | 31                            | 3.0-6.0                 |
|                   |                   |          | TD                 |                 | 4                 | 83                            | 3.0-6.0                 |
|                   |                   |          | TD                 |                 | 5                 | 5                             | 3.0                     |
|                   |                   |          | TD                 |                 | 6                 | 91                            | 3.0-6.0                 |
|                   |                   |          | TD                 |                 | 7                 | 28                            | 3.0-6.0                 |
|                   |                   |          | TD                 |                 | 8                 | 5                             | 4.0-5.0                 |
| <b>Total</b>      | <b>15</b>         | <b>8</b> |                    | <b>53.3</b>     |                   |                               |                         |

ZN+ =muestras positivas a la tinción Zielh-Neelsen.

TD= tracto digestivo



**Fig. 22.** Microfotografía que muestra un ooquiste de *Cryptosporidium* obtenido de un ostión del estado de Nayarit. Tinción de Zielh- Neelsen modificada. 100X, Cada línea de la regleta corresponde a 1.0  $\mu\text{m}$ .

## Estado de Tabasco

De los treinta ejemplares analizados, se encontró una prevalencia de *Cryptosporidium spp.* del 26.6%. El mínimo de ooquistes encontrados por laminilla fue de 1 y el máximo de 5. En tres muestras de las cuatro positivas la presencia de ooquistes se halló en el tracto digestivo, en tanto, en solo una muestra se halló en las branquias (Tabla 5). Los ooquistes se tiñeron de color rojo cereza en un fondo verde (Fig. 23).

**Tabla 5.** Prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en ostras del estado de Tabasco.

| Fecha muestreo     | Tamaño de muestra | ZN +     | Sitio de infección | Prevalencia % | Número de muestra | Número de ooquistes/laminilla | Tamaño en $\mu\text{m}$ |
|--------------------|-------------------|----------|--------------------|---------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <b>Agosto 2011</b> | 15                | 4        | B                  | 26.6          | 1                 | 1                             | 4.0                     |
|                    |                   |          | TD                 |               | 2                 | 2                             | 3.0                     |
|                    |                   |          | TD                 |               | 3                 | 2                             | 3.0-3.5                 |
|                    |                   |          | TD                 |               | 4                 | 5                             | 3.5-4.0                 |
| <b>Enero 2013</b>  | 15                | 0        |                    | 0             |                   |                               |                         |
| <b>total</b>       | <b>30</b>         | <b>4</b> |                    | <b>13.3</b>   |                   |                               |                         |

ZN+ =muestras positivas a la tinción Zielh-Neelsen.

B= branquias

TD= tracto digestivo



**Fig. 23.** Microfotografía que muestra un ooquiste de *Cryptosporidium* obtenido de un ostión del estado de Tabasco. Tinción de Zielh- Neelsen modificada. 100X, Cada línea de la regleta corresponde a 1.0  $\mu\text{m}$ .

## Estado de Veracruz

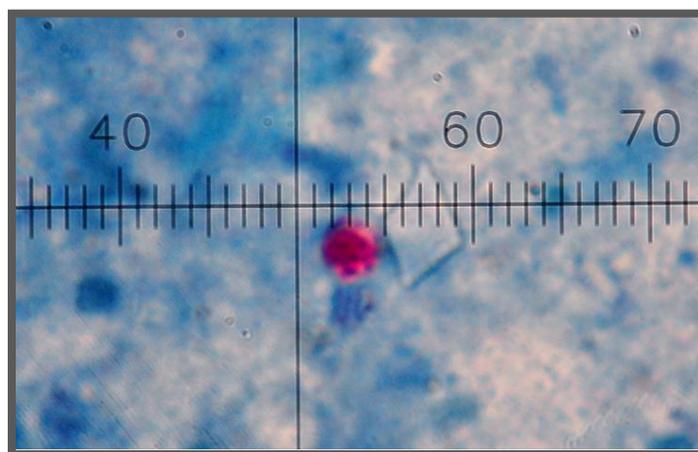
De los ochenta y seis ejemplares analizados, se encontró una prevalencia de *Cryptosporidium spp.* del 16.7%. El mínimo de ooquistes encontrados por laminilla fue de

2 y el máximo de 28. En once muestras de las catorce positivas los ooquistes se encontraron en tracto digestivo, y en solo tres muestras se halló la presencia de ooquistes en branquias y tracto digestivo (Tabla 6). Los ooquistes se tiñeron de color rojo cereza en un fondo verde (Fig. 24).

**Tabla 6.** Prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en ostiones del estado de Veracruz.

| Fecha muestreo | Tamaño de muestra | ZN+       | Prevalencia (%) | Sitio de infección | Numero de muestra | Número de ooquistes/laminilla | Tamaño $\mu\text{m}$ |
|----------------|-------------------|-----------|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|
| Abril 2011     | 8                 | 0         | 0.0             |                    |                   |                               |                      |
| Julio 2011     | 8                 | 2         | 25.0            | TD                 | 1                 | 2                             | 4.0                  |
|                |                   |           |                 | TD                 | 2                 | 2                             | 3.0-3.5              |
| Noviembre 2011 | 15                | 10        | 66.6            | TD/B               | 1                 | 28                            | 3.0-4.0              |
|                |                   |           |                 | TD/B               | 2                 | 16                            | 3.0-3.5              |
|                |                   |           |                 | TD/B               | 3                 | 15                            | 3.0-4.0              |
|                |                   |           |                 | TD                 | 4                 | 3                             | 3.0                  |
|                |                   |           |                 | TD                 | 5                 | 16                            | 3.0                  |
|                |                   |           |                 | TD                 | 6                 | 23                            | 3.0-4.0              |
|                |                   |           |                 | TD                 | 7                 | 16                            | 3.0-4.0              |
|                |                   |           |                 | TD                 | 8                 | 16                            | 3.0                  |
|                |                   |           |                 | TD                 | 9                 | 19                            | 3.0-4.0              |
|                |                   |           |                 | TD                 | 10                | 12                            | 3.0-3.5              |
| Febrero 2012   | 15                | 0         | 0.0             |                    |                   |                               |                      |
| Mayo 2012      | 25                | 2         | 8.0             | Tracto             | 1                 | 11                            | 3.0-3.5              |
|                |                   |           |                 | Tracto             | 2                 | 21                            | 3.0-4.0              |
| Agot.2012      | 15                | 0         | 0.0             |                    |                   |                               |                      |
| <b>Total</b>   | <b>86</b>         | <b>14</b> | <b>16.27</b>    |                    |                   |                               |                      |

B= branquia. TD= Tracto digestivo. ZN+ =muestras positivas a la tinción Zielh-Neelsen.



**Fig. 24.** Microfotografía que muestra un ooquiste de *Cryptosporidium* obtenido de un ostión del estado de Veracruz. Tinción de Zielh-Neelsen modificada. 100X, Cada línea de la regleta corresponde a 1.0  $\mu\text{m}$ .

## Prevalencia global en los tres estados

En la Tabla 7. se muestra la prevalencia por estado, en donde el 19.84% de los bivalvos revisados se encontró que estaban infectados con *Cryptosporidium* spp. Sin embargo, esta prevalencia varía en los distintos estados. La prevalencia mayor se obtuvo en el estado de Nayarit seguida de Veracruz y finalmente Tabasco.

**Tabla 7.** Prevalencia global de *Cryptosporidium* spp.

| Estado   | Tamaño de muestra | ZN+ | Prevalencia (%) | Intervalo de tamaño ( $\mu\text{m}$ ) |
|----------|-------------------|-----|-----------------|---------------------------------------|
| Nayarit  | 15                | 8   | 53.3            | 3.0-6.0                               |
| Tabasco  | 30                | 4   | 13.3            | 3.0-5.0                               |
| Veracruz | 86                | 14  | 16.27           | 3.0-5.0                               |
| Total    | 131               | 26  | 19.84           |                                       |

## Discusión

En México este trabajo es pionero en la detección de *Cryptosporidium* spp. en moluscos bivalvos. En casi todo el litoral de la República Mexicana se produce ostión que está destinado para el consumo humano. El resultado de este trabajo mostró que los cuerpos de agua de Nayarit, Tabasco y Veracruz están contaminados con materia fecal de humanos y/o probablemente de otros animales infectados con *Cryptosporidium*.

Aunque el tamaño de la muestra fue pequeño (131 ejemplares), la prevalencia detectada por estado fue importante: Nayarit 53.3%, Tabasco 13.3% y Veracruz 16.27%. Con una prevalencia total del 19.84%. A nivel internacional la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en ostiones de diversos géneros y especies es variable, por ejemplo: En Brasil se reportó una prevalencia del 8.3% (Guiguet -Leal *et al.*, 2008) y en EUA va del 19.6 al 88.7% (Fayer *et al.*, 2002; Graczyk *et al.*, 2007). En los Países Bajos es del 6.7% y en Italia 0% (Schets *et al.* 2007; Francavilla *et al.*, 2012). En España la prevalencia fue del 66.7% (Gómez-Couso *et al.*, 2004). En este trabajo se obtuvieron las branquias y el tracto digestivo. Se encontró mayor prevalencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en el tracto gastrointestinal. En las branquias (0.76%), tracto digestivo (16.79%) y mixto (2.29%). Otros reportes refieren que buscan a *Cryptosporidium* en branquias y tracto digestivo, pero no hacen la diferencia en cuál de ellos se encuentra el parásito (Gómez-Couso *et al.*, 2004).

Las técnicas descritas para la detección del parásito en los moluscos son: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) para la diferenciación de especies y genotipos (Sulaiman *et al.*, 1999). (Freire-Santos *et al.*, 2000; Gómez-Couso *et al.*, 2004; Schets *et al.*, 2007; Francavilla *et al.*, 2012).

En ésta investigación el diagnóstico se realizó con la tinción de Ziehl-Neelsen y se consideró: la morfología, el diámetro de las estructuras y la asimilación del colorante. En los bivalvos de Nayarit los ooquistes tuvieron un diámetro de 3-6  $\mu\text{m}$ . En los bivalvos de Tabasco y Veracruz fueron de 3-5  $\mu\text{m}$ . Todos fueron de color rojo cereza y en algunos se observaron estructuras (esporozoítos) internas. En todos los casos el diagnóstico lo corroboró un experto en morfología de parásitos.

Los registros de las especies de bivalvos portadores de ooquistes de *Cryptosporidium* son *Crassostrea virginica* (Fayer et al., 2002; Graczyk et al., 2007), *C. gigas* (Schets et al., 2007; Francavilla et al., 2012), *C. rhizophorae* (Leal et al., 2008) y *Ostrea edulis* (Freire-Santos et al., 2000; Gómez-Couso et al., 2004).

Mediante el análisis morfológico de los bivalvos se pudo determinar el género y especie. En Nayarit los ejemplares pertenecen a la especie *Ostrea conchaphila*; es importante destacar que es la primera vez que se detecta la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en esta especie de bivalvo. En Tabasco la especie capturada fue *Crassostrea rizophorae* y en Veracruz se identificaron dos especies *Crassostrea rizophorae* y *Crassostrea virginica*. Las especies de ostiones con ooquistes de *Cryptosporidium* de Brasil coinciden con las registradas en éste estudio, *Crassostrea rizophorae* (Guiguet- Leal et al., 2008) así como las encontradas en EUA, *Crassostrea virginica* (Fayer et al., 1998; Fayer et al., 2002; Graczyk et al., 2007).

En este trabajo los muestreos se realizaron en diferentes meses: en Nayarit fue en marzo y los ostiones tenían ooquistes de *Cryptosporidium* spp. En Tabasco se realizaron dos muestreos, en enero y agosto, y fue en este último mes en el que se observaron ostiones con ooquistes. En Veracruz fueron cuatro muestreos: en febrero, abril, julio y noviembre; se encontraron ostiones con ooquistes en los dos últimos. Estos resultados demuestran la necesidad de realizar muestreos mensuales para observar las fluctuaciones en la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en las diferentes estaciones del año e incluir otros estados productores de ostión.

En los humanos las enfermedades intestinales ocasionadas por protozoarios que se adquieren por vía hídrica, también se pueden adquirir por consumo de bivalvos crudos (Slifko & Col, 2000; Graczyk, 2004). La detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en las muestras obtenidas en ostras de los tres estados indica que existe contaminación con heces de origen humano y probablemente de otros mamíferos, en las zonas de reproducción de estos moluscos. Es necesario ampliar el estudio y detectar el origen de la

contaminación de los cuerpos de agua en donde se producen los bivalvos que se destinan para consumo por los humanos.

## Conclusiones

- En este estudio se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en ostiones del género *Crassostrea* y *Ostrea*.
- Es la primera vez que se registran ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en la especie *Ostrea Conchaphila*.
- Se comprobó que los ostiones procedentes de los estados de Nayarit, Veracruz y Tabasco son portadores de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.
- Se contribuyó con la epidemiología de la criptosporidiosis en México.

## Perspectivas

- Determinar la especie de *Cryptosporidium* spp. que se encuentra en los bivalvos mediante técnicas moleculares.
- Demostrar que los ooquistes de *Cryptosporidium* que se encuentra en los bivalvos son infectantes.

## Referencias

- Álcantara- Warren C. and R.L. Guerrant (2008). Clinical disease and pathology. En: Fayer R, Xiao L, editors. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. New York, CRC Press, p. 235-53.
- Álvarez-Pellitero, P. and A. Sitjà-Bobadilla (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. International Journal for Parasitology 32 (8), 1007-1021.
- Álvarez-Pellitero, P., M. I. Quiroga, A. Sitjà-Bobadilla, M. J. Redondo, O. Palenzuela, F. Padrós, S. Vázquez, and J. M. Nieto (2004). *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. Diseases of Aquatic Organisms 62 (1-2), 133-145.
- Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca (2010). Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA).
- Aslam, S. and D. M. Musher (2007). Nitazoxanide: clinical studies of a broad-spectrum anti-infective agent. Future Microbiology 2 (6), 583-590.
- Becerrill F,M. (2008) Parasitología Médica.2a. Edición. Ma.Graw-Hill. (12)103-110.
- Borowski, H., P. L. Clode, and A. C. Thompson. (2008). Active invasion and/or encapsulation? a reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. Trends in Parasitology 24 (11), 509-516.
- Brandonisio, O., P. Maggi, M. A. Panaro, L. A. Bramante, A. Di Coste, and G. Angarano (1993). Prevalence of cryptosporidiosis in HIV-infected patients with diarrhoeal illness. European Journal of Epidemiology 9 (2), 190-194.
- Brusca, C., and J.Brusca. (2003). Invertebrates. 2a edición, Sinauer Associates, Incorporated,Londres, Inglaterra . Science . 936 pp.
- Cacciò, S. M. and E. Pozio (2006). Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. Expert Review of Anti-infective therapy 4 (3), 429-443.
- Carey, C. M., H. Lee, and J. T. Trevors (2004 ). Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water research 38 (4), 818-862.

- Castillo- Rodríguez, Y. García-Cubas. (1984) Taxonomía y anatomía comparada de las ostras en las costas de México. Manuales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 1(16).
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73 (3), 203-266.
- Centers for Disease Control (CDC) (1982). Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 31 (44), 589-592.
- Chalmers, R. M., A. P. Sturdee, P. Mellors, V. Nicholson, F. Lawlor, F. Kenny, and P. Timpson (1997). *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. *Letters in Applied Microbiology* 25 (5), 380-384.
- Chen, X.M., J.S. Keithly, C.V. Paya and N.F. La Russo (2002). Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*; 346: 1723-31.
- Current, W. L., S. J. Upton, and T. B. Haynes (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology* 33 (2), 289-296
- Current, W. L. and L. S. Garcia (1991). Cryptosporidiosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 11 (4), 873-897.
- De la Parte-Pérez, M.A., E. Bruzual, A. Brito y M.P. Hurtado (2005). *Cryptosporidium* spp. y Criptosporidiosis. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 25(1), 87-102.
- Del Coco, V. F., M.A. Córdoba and A.J. Basualdo (2009). Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev. Argent. Microbiol.*; 41 (3): 185-196.
- Erickson, M. C., & Y.R. Ortega (2006). Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 69, 2786–2808.
- FAO -Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2005). Total production 1950-2003. <http://www.fao.org/fishery/topic/3380/es> Ecedido: 1 Septiembre 2013.
- Fayer, R. and B. L. Ungar (1986). *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews* 50 (4), 458-483.

- Fayer, R., T. K. Graczyk, E. J. Lewis, J. M. Trout, and C. A. Farley (1998). Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (3), 1070-1074.
- Fayer, R., U. Morgan, and S. J. Upton (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology* 30 (12-13), 1305-1322.
- Fayer, R., J. M. Trout, L. Xiao, U. M. Morgan, A. A. Lai, and J. P. Dubey (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from *Domestic dogs*. *The Journal of Parasitology* 87 (6), 1415-1422.
- Fayer, R., J. M. Trout, E. J. Lewis, L. Xiao, A. Lal, M. C. Jenkins, and T. K. Graczyk (2002). Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitology Research* 88 (11), 998-1003.
- Fayer, R., J. M. Trout, E. J. Lewis, M. Santin, L. Zhou, A. A. Lal, and L. Xiao (2003). Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitology Research* 89 (2), 141-145.
- Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126 (1-2), 37-56.
- Fayer, R., M. Santín, and L. Xiao (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Parasitology* 91 (3), 624-629.
- Fayer, R., M. Santín, and J. M. Trout (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology* 156 (3-4), 191-198.
- Feldman R. and M. Guardis (1990). Diagnóstico coproparasitario. La Plata: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires.
- Fernández-Álamo, M.A. y G. Rivas (2007). Niveles de organización en animales. Las prensas de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. 420 pp.
- Flanigan, T., Whalen, C, Turner, J., Soave, R., Toerner, J., Havlir, D. (1992). *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Annals of Internal Medicine* 116(10) 840-842.

- FrancaVilla, M., P. Trotta, M. Marangi, P. Breber and A. Giangaspero (2012). Environmental conditions in a lagoon and their possible effects on shellfish contamination by *Giardia* and *Cryptosporidium*. Springer Science 10 (20) 707-724.
- Freire-Santos, F., A. M. Oteiza-López, C. A. Vergara-Castiblanco, E. Ares-Mazás, E. Alvarez-Suárez, and O. García-Martín (2000). Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. The Journal of Parasitology 86 (4), 853-854.
- García-Cubas, A. & M. Reguero (2007). Catálogo ilustrado de moluscos del Golfo de México y Mar Caribe. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. 168 pp.
- Gargala, G. (2008). Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. Parasite (Paris, France) 15 (3), 275-281.
- Giangaspero, A., U. Molini, R. Iorio, D. Traversa, B. Paoletti, and C. Giansante (2005). *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chameleagallina*) in Italy. Preventive Veterinary Medicine 69 (3-4), 203-212.
- Gómez-Bautista, M., L. M. Ortega-Mora, E. Tabares, V. Lopez-Rodas, and E. Costas (2000). Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). Applied and Environmental Microbiology 66 (5), 1866-1870.
- Gómez-Couso, H., F. Freire-Santos, J. Martínez-Urtaza, O. García-Martín, and M. E. Ares-Mazás (2003). Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. International Journal of Food Microbiology 87 (1-2), 97-105.
- Gómez-Couso, H., F. Freire-Santos, C. F. Amar, K. A. Grant, K. Williamson, M. E. Ares-Mazás, and J. McLauchlin (2004). Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. International Journal of Food Microbiology 91 (3), 279-288.
- Gookin, J. L., S. Chiang, J. Allen, M. U. Armstrong, S. H. Stauffer, C. Finnegan, and M. P. Murtaugh (2006). NF-kappaB-mediated expression of iNOS promotes epithelial defense against infection by *Cryptosporidium parvum* in neonatal piglets. American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology 290 (1) .

- Graczyk, T. K., R. Fayer, E. J. Lewis, J. M. Trout, and C. A. Farley (1999). *Cryptosporidium* oocysts in bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake bay. *Parasitology Research* 85 (7), 518-521.
- Graczyk, T. K., D. J. Marcogliese, Y. de Lafontaine, A. J. Da Silva, B. Mhangami-Ruwende, and N. J. Pieniazek (2001). *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence river. *Parasitology Research* 87 (3), 231-234.
- Graczyk, T. K., D. Bruce, F. Lucy, D. Minchin, L. Tamang, L. N. Moura, and A. J. DaSilva (2004). Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the shannon river drainage area, Ireland. *Parasitology Research* 93 (5), 385-391.
- Graczyk, T. K., E. J. Lewis, G. Glass, A. J. Dasilva, L. Tamang, A. S. Girouard, and F. C. Curriero (2007). Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the chesapeake bay. *Parasitology Research* 100 (2), 247-253.
- Guigue- Leal, D. A. A., M. A. A. Pereira, R. M. M. Bueno Franco, N. Branco, and R. C. C. Neto (2008). First report of *Cryptosporidium spp.* oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. *Journal of Water and Health* 6 (4), 527-532.
- Heitman, T. L., Frederick, L. M., Viste, J. R., Guselle, N. J., Morgan, U. M., Thompson, R. C., et al. (2002). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium spp.* isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology* (48), 530-541.
- Henriksen, S. A. and J. F. Pohlenz (1981). Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta veterinaria Scandinavica* 22 (3-4), 594-596.
- Hijawi, N. S., B. P. Meloni, M. Ng'anzo, U. M. Ryan, M. E. Olson, P. T. Cox, P. T. Monis, and R. C. Thompson (2004). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology* 34 (7), 769-777.
- Iseki, M., T. Maekawa, K. Moriya, S. Uni, and S. Takada (1989). Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research* 75 (3), 218-222.

- Javier- Enríquez, F., C. R. Ávila, J. Ignacio-Santos, J. Tanaka-Kido, O. Vallejo, and C. R. Sterling (1997). *Cryptosporidium* infections in mexican children: clinical, nutritional, enteropathogenic, and diagnostic evaluations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56 (3), 254-257.
- Jex, A. R., H. V. Smith, P. T. Monis, B. E. Campbell, and R. B. Gasser (2008). *Cryptosporidium*-biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances* 26 (4), 304-317.
- Jirků, M., A. Valigurová, B. Koudela, J. Krížek, D. Modrý, and J. Slapeta (2008). New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitologica* 55 (2), 81-94.
- Koudela, B., and D. Modry (1998). New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitol.* (76), 181–188.
- Larrosa-Haro, A., M. Ruiz-Pérez, and S. Aguilar-Benavides (2002). Utility of studying feces for the diagnosis and management of infants and preschool children with acute diarrhea. *Salud Pública de México* 44 (4), 328-334.
- Lévesque, B., C. Barthe, B. R. Dixon, L. J. Parrington, D. Martin, B. Doidge, J.-F. F. Proulx, and D. Murphy (2010). Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in nunavik, Quebec: a pilot study. *Canadian Journal of Microbiology* 56 (11), 968-977.
- Levine, N. D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of Parasitology* 66 (5), 830-834.
- Lim, Y. A., M. Rohela, B. L. Sim, I. Jamaiah, and M. Nurbayah (2005). Prevalence of cryptosporidiosis in HIV-infected patients in Kajang hospital, Selangor. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36 Suppl 4, 30-33.
- Lindsay, D. S., S. J. Upton, D. S. Owens, U. M. Morgan, J. R. Mead, and B. L. Blagburn (2000). *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporiidae*) from cattle, *Bos taurus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 47 (1), 91-95.
- MacKenzie, W. R., N. J. Hoxie, M. E. Proctor, M. S. Gradus, K. A. Blair, D. E. Peterson, J. J. Kazmierczak, D. G. Addiss, K. R. Fox, and J. B. Rose (1994). A massive outbreak in milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine* 331 (3), 161-167.
- Magi, B., V. Canocchi, G. Tordini, C. Cellesi, and A. Barberi (2006). *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitology Research* 98 (2), 150-152.

- Meisel, J. L., D. R. Perera, C. Meligro, and C. E. Rubin (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70 (6), 1156-1160.
- Mele, R., M. A. Gomez Morales, F. Tosini, and E. Pozio (2003). Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both in vitro and in vivo models. *International Journal for Parasitology* 33 (7), 757-764.
- Miller, K., C. Duran-Pinales, A. Cruz-Lopez, L. Morales-Lechuga, D. Taren, and F. J. Enriquez (1994). *Cryptosporidium parvum* in children with diarrhea in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51 (3), 322-325.
- Miller, W. A., M. A. Miller, I. A. Gardner, E. R. Atwill, M. Harris, J. Ames, D. Jessup, A. Melli, D. Paradies, K. Worcester, P. Olin, N. Barnes, and P. A. Conrad (2005). New genotypes and factors associated with *Cryptosporidium* detection in mussels (*Mytilus spp.*) along the California coast. *International Journal for Parasitology* 35 (10), 1103-1113.
- Morgan-Ryan, U. M., A. Fall, L. A. Ward, N. Hijjawi, I. Sulaiman, R. Fayer, A. C. Thompson, M. Olson, A. Lal, and L. Xiao (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49 (6), 433-440.
- Nime, F. A., J. D. Burek, D. L. Page, M. A. Holscher, and J. H. Yardley (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70 (4), 592-598.
- Okhuysen, P. C., C. L. Chappell, J. H. Crabb, C. R. Sterling, and H. L. DuPont (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases* 180 (4), 1275-1281.
- Padilla Álvarez, F, y A. E. Cuesta López (2003). *Zoología aplicada*. 2ª edición. Díaz Santos. Madrid, España. 462 pp.
- Pavlásek, I. (1999). Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Klinicka Mikrobiologie a Infekcni Lekarstvi* (3), 290–301.
- Plutzer, J. and P. Karanis (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology* 165 (3-4), 187-199.

- Power, M. L. and U. M. Ryan (2008). A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). The Journal of Parasitology 94 (5), 1114-1117.
- Robertson, L. J. and B. Gjerde (2008). Development and use of a pepsin digestion method for analysis of shellfish for *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Journal of Food Protection 71 (5), 959-966.
- Rossignol, J.-F. F. (2010). *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. Experimental Parasitology 124 (1), 45-53.
- Ryan, U. M., P. Monis, H. L. Enemark, I. Sulaiman, B. Samarasinghe, C. Read, R. Buddle, I. Robertson, L. Zhou, R. C. Thompson, and L. Xiao (2004). *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). The Journal of Parasitology 90 (4), 769-773.
- Ryan, U. M., M. Power, and L. Xiao (2008). *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). The Journal of Eukaryotic Microbiology 55 (1), 22-26.
- Riggs, M. W., D. A. Schaefer, S. J. Kapil, L. Barley-Maloney, and L. E. Perryman (2002). Efficacy of monoclonal antibodies against defined antigens for passive immunotherapy of chronic gastrointestinal cryptosporidiosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46 (2), 275-282.
- Sánchez-Vega, J. T., J. Tay-Zavala, A. Aguilar-Chiu, D. Ruiz-Sánchez, F. Malagón, J. A. Rodríguez-Covarrubias, J. Ordóñez-Martínez, and L. Calderón-Romero (2006). Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico City. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 75 (6), 1095-1098.
- Schets, F. M., H. H. van den Berg, G. B. Engels, W. J. Lodder, and A. M. M. de Roda Husman (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the oosterschelde, the Netherlands. International Journal of Food Microbiology 113 (2), 189-194.
- Slavin, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). Journal of Comparative Pathology 65 (3), 262-266.
- Slifko, T. R., H. V. Smith, and J. B. Rose (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. International Journal for Parasitology 30 (12-13), 1379-1393.

- Smith, H. V., R. A. Nichols, and A. M. Grimason (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology* 21 (3), 133-142.
- Smith, H. V., S. M. Cacciò, N. Cook, R. A. Nichols, and A. Tait (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology* 149 (1-2), 29-40.
- Solórzano-Santos, F., M. Penagos-Paniagua, R. Meneses-Esquivel, M. G. Miranda Novales, B. Leños-Miranda, D. Angulo-González, and A. Fajardo-Gutiérrez (2000). *Cryptosporidium parvum* infection in malnourished and non malnourished children without diarrhea in a mexican rural population. *Revista de Investigación Clínica; Órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición* 52 (6), 625-631.
- Sulaiman, I. M., L. Xiao, and A. A. Lal (1999). Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10), 4431-4435.
- Theodos, C. M., J. K. Griffiths, J. D'Onfro, A. Fairfield, and S. Tzipori (1998). Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (8), 1959-1965.
- Tiwari, B. R. R., P. Ghimire, S. Malla, B. Sharma, and S. Karki (2013). Intestinal parasitic infection among the HIV-infected patients in Nepal. *Journal of Infection in Developing Countries* 7 (7), 550-555.
- Traversa, D., A. Giangaspero, U. Molini, R. Iorio, B. Paoletti, D. Otranto, and C. Giansante (2004, July). Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from *Chamelea gallina* clams in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7), 4367-4370.
- Tyzzar, E., (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5, 12-13.
- Tyzzar, E., (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protis.* 26, 394-412.
- Tzipori, S. and H. Ward (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4 (10), 1047-1058.
- Vetterling, J. M., H. R. Jervis, T. G. Merrill, and H. Sprinz (1971). *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *The Journal of Protozoology* .18 (2), 243-247.

- White, A. C., C. L. Chappell, C. S. Hayat, K. T. Kimball, T. P. Flanigan, and R. W. Goodgame (1994). Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial. *The Journal of Infectious Diseases* 170 (2), 419-424.
- Willis, J.E., J.T.McClure, J.Davidson, C. McClure and S.J. Greenwood (2013) Global occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in shellfish: Should Canada take a closer look?. *Food Research International* (52)119–135.
- Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan, and S. J. Upton (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17 (1), 72-97.

## Anexo

### 1. Solución Salina de Fosfatos (PBS) concentración 1X

Los reactivos se pesaron, se pusieron en un matraz aforado de 1.0 L, y se aforó con agua destilada. La solución se esterilizó en autoclave, etiquetó y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

| Solución                         | Peso Molecular | Peso ( g.) | Molaridad (mM) |
|----------------------------------|----------------|------------|----------------|
| NaCl                             | 58.44          | 8.0        | 137            |
| KCl                              | 74.56          | 0.2        | 2.68           |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 142.0          | 1.15       | 3.21           |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 136.04         | 0.25       | 2.0            |

### 2. Alcohol ácido al 2% (100 ml)

En un matraz Erlenmeyer de 100 ml se colocaron 2.0 ml. de ácido clorhídrico por las paredes y con mucho cuidado. Se adicionó el alcohol al 70% y se llevó a un volumen final de 100 ml. Posteriormente se etiquetó y almacenó en un frasco con gotero.

| Reactivo          | Volumen ( ml) |
|-------------------|---------------|
| Etanol al 70%     | 98            |
| Ácido clorhídrico | 2             |

### 3. Verde brillante al 0.5 %

Se pesó 0.5 g. de colorante verde brillante y se diluyó en 100 ml de agua destilada. Se etiquetó y almacenó en frasco con gotero.