

Revisiones



***Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Encephalitozoon intestinalis*, oportunistas emergentes**

***Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Encephalitozoon intestinalis* emergent opportunists**

Joana Barbosa^{1,4*}, Maria José Espinar^{1,2,4}, Acácio Gonçalves Rodrigues^{1,3,4} & Cidália Pina-Vaz^{1,2,4}

RESUMEN

Es un hecho conocido que las infecciones oportunistas por protozoos y hongos han aumentado en los últimos años, debido especialmente al aumento de las infecciones por VIH. *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* y *Encephalitozoon intestinalis* son protozoos y hongo, respectivamente, mundialmente reconocidos como agentes oportunistas emergentes, responsables de brotes epidémicos provocados por la ingestión de agua potable contaminada, incluso después de una correcta desinfección. La ingestión de estos protozoos puede provocar diferentes grados de enfermedad, entre aguda o leve (población sana) hasta situaciones más graves y agresivas, hasta a veces mortales (pacientes inmunocomprometidos y/o inmunodeprimidos). A pesar de ser responsables de muchos brotes epidémicos, su diagnóstico de laboratorio permanece arduo y trabajoso, incluso utilizando las nuevas técnicas desarrolladas en los últimos años. En esta revisión se resumen las consideraciones generales de estos oportunistas emergentes, así como los métodos de diagnóstico más usuales, incluso los más recientes y específicos.

Palabras clave: Oportunistas emergentes, protozoos, hongos, *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia*, *Encephalitozoon intestinalis*.

SUMMARY

Epidemiological data, regarding parasitic and fungi opportunist infections, have changed in the last years, especially due to HIV infection. Cryptosporidium spp., Giardia lamblia and Encephalitozoon intestinalis are protozoan and fungi, respectively, worldwide known as opportunistic emergent agents, being responsible by epidemic outbreaks after ingestion of contaminated water, even following a correct disinfection treatment. Its ingestion can cause different effects on individuals' health, from light or acute among the healthy population, to serious, aggressive or even deadly among the immunodepressed or immunocompromised patients. Contaminated water ingestion can result in outbreaks but protozoa laboratory diagnosis still remains very laborious, even after the development of more sensitive and specific techniques in the last years. In this paper, a revision of these emergent opportunists, their main characteristics and diagnostic tools are described, including the most recent and specific techniques.

Keywords: emergent opportunists, protozoan, fungi, *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia*, *Encephalitozoon intestinalis*.

INTRODUCCIÓN

Desde los tiempos antiguos, las enfermedades parasitarias han sido reconocidas como causa de

enfermedad en el ser humano. Su impacto en la salud mundial sigue siendo, hoy en día, muy importante, suponiendo gran parte del gasto sanitario de un país. Estas infecciones pueden causar enfermedad

¹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

² Department of Microbiology, Hospital S. João, Porto, Portugal

³ Burn Unit and Department of Plástica and Reconstructive Surgery, Hospital S. João, Porto, Portugal

⁴ CINTESIS (Centro de Investigação em Tecnologias e Sistemas de Informação em Saúde), Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

*Autor de correspondencia: gui75@sapo.pt

aguda o leve en población sana, y de forma más grave, agresiva y hasta a veces mortal en pacientes inmunocomprometidos, trasplantados, neutropénicos y, sobre todo, en los infectados con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana).

Las infecciones causadas por agentes parasitarios oportunistas han aumentado en los últimos años. Muchos de los brotes epidémicos descritos se deben a una baja vigilancia epidemiológica, fallo en las medidas de control, desconocimiento de la fuente y, a veces, de la vía de transmisión de la enfermedad. Algunas especies de protozoos, como *Cryptosporidium* spp y *Giardia lamblia*, y el hongo *Encephalitozoon intestinalis*, están reconocidos mundialmente como responsables de brotes epidémicos después de ingestión de agua potable contaminada (Fayer *et al.*, 2000; Canada, 2004; Fricker *et al.*, 2004). La ingestión de este tipo de parásitos puede provocar diferentes grados de enfermedad, siendo la diarrea aguda y/o crónica el síntoma más común (Ali & Hill, 2003; Aygun *et al.*, 2005; Davies & Chalmers, 2009). Debido a sus grandes potenciales patogénicos *C. spp.*, *G. lamblia* y *E. intestinalis* fueron incluidos en la lista de la EPA (Environmental Protection Agency) de contaminantes microbianos del agua potable, "NIAID Category A, B, and C Priority Pathogens" (Didier & Weiss, 2006).

Cryptosporidium spp.

Cryptosporidium spp. fue identificado como patógeno oportunista humano en inmunodeprimidos en 1976 y, después del brote infeccioso ocurrido en 1992 en Milwaukee (Wisconsin, E.U.A.) en que cerca de 403 000 individuos fueron infectados con agua contaminada con *C. parvum*, fue reconocido como agente infeccioso también en inmunocompetentes (Arora & Arora, 2009; Coco *et al.*, 2009). A pesar de que el género *Cryptosporidium* es diferente de los otros coccidios, actualmente se reconocen 17 especies siendo *C. parvum* y *C. hominis* los más frecuentemente aislados en el hombre (García & Bruckner, 1997; Carey *et al.*, 2004). Todo su ciclo de vida ocurre en un único hospedador (humanos, animales y aves) e incluyen las fases de reproducción sexual y asexual, terminando con la liberación de ooquistes de las heces contaminadas al medio ambiente (Aygun *et al.*, 2005; Coco *et al.*, 2009). Los ooquistes son redondos (4-6 µm de diámetro), poseen 4 esporozoitos (estructuras internas infecciosas) y, debido a su doble pared celular, presentan elevada resistencia a los desinfectantes y

oxidantes usados para tratamiento del agua (García & Bruckner, 1997; Carey *et al.*, 2004). Permanecen viables en el medio ambiente hasta 6 meses (20°C) o 18 meses (4°C) (Canada, 2004; Fricker *et al.*, 2004). Las vías de transmisión son fecal-oral y por ingestión del agua y/o alimentos contaminados; está descrita también la transmisión por contacto directo con personas o animales contaminados (Fricker *et al.*, 2004; Davies & Chalmers, 2009). En los últimos años se han descritos en Reino Unido, Japón, Australia y E.U.A. varios brotes epidémicos provocados por la ingestión de agua contaminada con *Cryptosporidium* spp. debido a la práctica de deportes en piscinas públicas, por la ingesta de vegetales y por el consumo de bebidas contaminadas (Aygun *et al.*, 2005; Coco *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2007). Dentro del género, *C. parvum* es de los protozoos más prevalentes en todo mundo y su incidencia alcanza el 40% entre la población de riesgo, los inmunodeprimidos especialmente los afectados por HIV/Sida (Carey *et al.*, 2004); en países desarrollados la prevalencia en la población con Sida es de 10-15% de las diarreas crónicas y de 30-50% en países en desarrollo (Barboni *et al.*, 2008). Actualmente, ha sido detectada su presencia asintomática en lactantes y niños con edades inferiores a 5 años (Davies & Chalmers, 2009).

La enfermedad resultante de la infección es la criptosporidiosis, con sintomatología intestinal (dolores abdominales tipo cólico, náuseas y vómitos) y el 92% de los infectados presentan diarrea líquida con moco pero sin sangre ni leucocitos, dependiendo del estado inmunológico del hospedador (Carey *et al.*, 2004; Coco *et al.*, 2009; Davies & Chalmers, 2009). La infección en inmunocompetentes se considera autolimitada y el tratamiento se basa en rehidratación (oral o intravenosa), dieta y toma de antiosmóticos (Canada, 2004; Pantenburg *et al.*, 2009). No obstante, para inmunodeprimidos existe el riesgo de desarrollar diarreas fulminantes siendo necesaria la administración de antirretrovirales (ARV) con inhibidores de la proteasa a fin de aumentar el número de CD4+ (Davies & Chalmers, 2009; Pantenburg *et al.*, 2009). En cuanto a la terapéutica utilizada, hasta ahora ninguno de los fármacos experimentados *in vivo* e *in vitro* resultó totalmente eficaz aunque nitazoxanida, paromomicina y espiramicina pueden ayudar en el control de los síntomas (Arora & Arora, 2009; Coco *et al.*, 2009; Davies & Chalmers, 2009; Pantenburg *et al.*, 2009). Sin embargo, lo más práctico es reducir o eliminar la presencia de ooquistes en el medio ambiente con la

aplicación de medidas de prevención y tratamiento en aguas potables (Arora & Arora, 2009; Coco *et al.*, 2009). En Estados Unidos y Europa ya existe una reglamentación específica que determina que el nivel máximo permitido en agua de consumo humano es de 10 ooquistes/100L, así como otros indicadores de detección, control e higiene (Canada, 2004; Karanis *et al.*, 2007). Se recomienda, también, la higiene personal y el aislamiento de niños y trabajadores en recuperación con criptosporidiosis (Davies & Chalmers, 2009); así como los profesionales de la salud que tratan los pacientes con criptosporidiosis (Arora & Arora, 2009).

Giardia lamblia

Giardia spp, descrita por Van Leeuwenhoek en 1681, fue denominada *Giardia lamblia* (syn: *duodenalis*, syn: *intestinalis*) en 1915 por Styles. Su taxonomía y clasificación genotípica ha sido muy discutida ya que depende del hospedador (Ali & Hill, 2003; García & Bruckner, 1997; Smith *et al.*, 2007). Actualmente se considera que las estirpes que infectan a humanos pertenecen a assemblage A y B, y son de origen animal (Ali & Hill, 2003; Hunter & Thompson, 2005; Smith *et al.*, 2007). El ciclo de vida es directo y simple, sin hospedadores intermediarios, y con dos formas celulares: una vegetativa (trofozoíto) y una forma de latencia (quiste). Esta es muy resistente y viable hasta 3 meses en condiciones favorables en el medio ambiente (Fricker *et al.*, 2004; García & Bruckner, 1997). Una vez ingerido el quiste, se liberan en el intestino delgado los dos trofozoítos, que se adhieren a mucosa intestinal y se reproducen asexualmente por fisión binaria longitudinal. Puede ocurrir que en condiciones desfavorables, el enquistamiento ocurra en el íleon, originando quistes y liberándolos a través de las heces al medio ambiente (García & Bruckner, 1997). Es posible reproducir el ciclo de vida *in vitro* de desenquistamiento y enquistamiento, en condiciones controladas y medios de cultivo propios (bicarbonato, tripsina, sales biliares y otros) (Lauwaet *et al.*, 2007).

Este parásito se encuentra distribuido mundialmente y su reservorio principal es el hombre, que elimina quistes para el medio ambiente, pudiendo reiniciarse así de nuevo el ciclo de vida (Dorny *et al.*, 2009; Fricker *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007). La transmisión ocurre por vía fecal – oral, desde que haya contacto con material, agua o alimentos contaminados con heces; necesita una dosis infectante baja (10 a 100

quistes viables). Esto, asociado a la alta resistencia que posee a los diferentes tratamientos explica su elevada incidencia mundial (Canada, 2004; Dorny *et al.*, 2009). Es más frecuente entre niños, sobre todo en guarderías, hospitales y orfanatos; en Europa y América del Norte, su incidencia es de 2-7% en cuanto que en países subdesarrollados puede superar el 40%.

La infección por *G. lamblia* se denomina giardiasis, se presenta clínicamente desde asintomática hasta una diarrea acuosa ligera o crónica (Ali & Hill, 2003). Puede ser erradicada naturalmente sin necesidad de fármacos (Robertson *et al.*, 2010); sin embargo para evitar el desarrollo de una enfermedad crónica se puede utilizar antimicrobianos (Busatti *et al.*, 2009; García & Bruckner, 1997). Metronidazol es el antibiótico más utilizado, aunque actualmente se han descrito casos de *G. lamblia* resistentes. No obstante, existen otros (albendazol, tinidazol o furazolidona) que pueden ser usados como antiparasitarios en casos de colonización intestinal con estirpes resistentes pero la reproducibilidad de resultados *in vitro* es diferente del *in vivo* (Cruz *et al.*, 2003; Gomes, 2009). Igual al *Cryptosporidium* spp., también es importante la prevención puesto que, según la OMS, los dos protozoos normalmente están presentes en simultáneo en aguas contaminadas (Canada, 2004; Fricker *et al.*, 2004).

Encephalitozoon intestinalis

Encephalitozoon intestinalis pertenece al Microsporidiosis (o Microspora), un grupo inicialmente llamado de “yeast like fungi”, pero reclasificado de Sporozoa en 1882 por Edouard-Gérard Balbiani pues que era assemblage de los protozoa intracelulares obligatorios formadores de esporos (Corradi & Keeling, 2009). En la segunda mitad del siglo XX, con los estudios de microscopía electrónica que han demostrado la ausencia de algunas de características de los eucariotas (e.g. aparatos de Golgi y mitocondrias), así como los estudios de rRNA, se creó que los Microsporidiosis serían descendientes directos de Archeozoa. No obstante, con la descodificación del genoma de *Encephalitozoon cuniculi* y la descubierta de mitosomas, entre otras características típicas de hongos (como la quitina en la pared celular), todos los Microspora fueron reclasificados para el Reino Fungi, filo Zygomycota y clase Microsporidia (Corradi & Keeling, 2009; Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012). La infección en hombres causada por Microsporidiosis se

denomina de microsporidiosis y, por tradición y por la sintomatología, se sigue estudiando en muchos casos relacionado con el grupo de los protozoos.

Encephalitozoon intestinalis es uno de los Microsporidios que infectan al hombre y uno de los más prevalentes, como también el *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem* y *Encephalitozoon cuniculi*; estos también son muy prevalentes en pacientes inmunodeprimidos con microsporidiosis (Arora & Arora, 2009; Thellier & Breton, 2008). Los esporos, sus formas de resistencia fuera del hospedador infectado, pueden variar de tamaño (1-4 µm), forma (oval o redonda) y de ciclo de vida entre especies (reproducción - fisión binaria, mitosis o múltiplo - y localización celular) (Keeling & Fast, 2002; Thellier & Breton, 2008). A pesar de eucariotas, presentan ribosomas 70S y túbulos o filamentos polares, característica específica e importante para la invasión de la célula infectada. Varios estudios han demostrado que pueden permanecer viables desde 98 días hasta 2 años (4°C) o 16 días - meses (22°C) (Didier *et al.*, 2004). La infección puede causar diarrea grave persistente y síndrome de mala absorción, principalmente en pacientes con SIDA, así como en niños, pacientes trasplantados, viajeros y ancianos (Arora & Arora, 2009; Didier & Weiss, 2006). No está claro cómo se produce la infección con este parásito y se desconoce las diferentes vías de transmisión (Marshall *et al.*, 1997; Wiwanitkit, 2006). La prevalencia es mundial pero sólo fueron reseñadas tasas de 1 y 50% de infección, dependiendo de los métodos de diagnóstico, región geográfica y población estudiada (Marshall *et al.*, 1997; Noda Albelo *et al.*, 2013).

La diarrea líquida es el principal síntoma de la infección por *E. intestinalis*, junto con dolor abdominal, pérdida de peso, pérdida de apetito, deshidratación y gases (flatulencia); en algunos casos puede cursar con la muerte (Leiro *et al.*, 2004). La microsporidiosis no es exclusiva de aquellos infectados por el virus del VIH y con concentraciones de linfocitos T CD4 + por debajo de 50/mL, también afecta a receptores de trasplantes de órganos, pacientes sometidos a quimioterapia inmunosupresora y entre individuos inmunocompetentes, tales como, viajeros, niños y ancianos (Noda Albelo *et al.*, 2013). Actualmente no existe un tratamiento totalmente eficaz para la microsporidiosis y los fármacos más utilizados son albendazol (un inhibidor de la tubulina) y fumagillin

(antibiótico derivado del hongo *Aspergillus fumigatus*) entre otros menos eficaces (Santillana-Hayat *et al.*, 2004). Albendazol es efectivo contra la mayoría de los microsporidios particularmente para los *Encephalitozoon* spp., pero contra *Enterocytozoon bieneusi* muestra una modesta eficacia. Así, para la infección por *E. bieneusi*, fumagillin sistémica ha mostrado beneficios en el tratamiento de pacientes VIH positivos (dosis recomendada: 60 mg/día por 14 días) y en pacientes portadores con compromiso inmune diferentes al ocasionado por el VIH. Pero, como fumagillin es medulotóxico, se puede usar un análogo menos tóxico, TNP-470, como opción para los pacientes (Noda Albelo *et al.*, 2013). Sin embargo, el mejor tratamiento es el usado para tratar la infección con el VIH, medicamentos ARV, igual que en la criptosporidiosis (Didier *et al.*, 2004; Didier & Weiss, 2006). La forma más efectiva de prevenir es evitar la transmisión a través del agua y alimentos contaminados, al igual que *Cryptosporidium* spp. y *G. lamblia*, usando desinfectantes, radiaciones gama o UV y ebullición del agua durante 5 min (Didier & Weiss, 2006, Santillana-Hayat *et al.*, 2004).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La identificación y diagnóstico de todos los agentes infecciosos oportunistas anteriormente descritos (*Cryptosporidium* spp., *G. lamblia* y *E. intestinalis*) se puede realizar a través de variadas técnicas (directas o indirectas), con diferentes especificidades, sensibilidades, limitaciones, ventajas, desventajas y dependen del tipo de muestra usada. Las heces son normalmente la muestra más utilizada para identificación de los (o) quistes/esporos y se utilizan técnicas de concentración (sedimentación o flotación) de muestras, seguida de separación de los detritus orgánicos y células parasitarias (Fricker *et al.*, 2004, Thiriat *et al.*, 1998). Cuando se pretende detectar en agua, los métodos son diferentes, requiriendo 100 a 1000L de agua para concentración (Fricker *et al.*, 2004). Es importante indicar que la recuperación de los parásitos es variable según la solución y técnica ejecutada para concentración.

Para una mejor visualización microscópica convencional y aumento de sensibilidad deben ser utilizadas diferentes coloraciones, dependiendo del patógeno protozoario a identificar. El método tradicional de diagnóstico para *Cryptosporidium* spp es la microscopia tras tinción por Ziehl-Neelsen, para *G.*

lamblia puede ser con tricromo y para *E. intestinalis* la Gram modificada, tricromo modificada o plata. Pero, el tiempo de realización de las técnicas de tinción es largo y necesita de expertos microscopistas para observar las formas de latencia de los protozoos (Gutiérrez-Cisneros *et al.*, 2011).

No obstante, la utilización de anticuerpos específicos asociados con fluorocromos ha sido usada en microscopia de inmunofluorescencia (IMF) con mejores resultados de sensibilidad y especificidad, y es la técnica aplicada en la rutina clínica (Thiriat *et al.*, 1998). También, han sido utilizadas técnicas para la identificación de antígenos a través de pruebas inmunoenzimáticos EIA (Enzyme Immunosorbent Assay) o ELISA (Enzyme – Linked – I Immunosorbent – Assay) pero con resultados variados (Lequin, 2005).

Otros métodos son los ensayos inmunocromatográficos para la detección de antígenos de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en heces. Esos son fáciles de realizar, rápidos, no requieren personal con experiencia ni equipos especiales y procesan muestras individuales; pero, la mayoría de los casos, es necesario utilizar heces recientes (< 24h), sin conservantes, o congeladas a -20°C. En estudios ya realizados se ha demostrado una menor sensibilidad que los ELISA (sensibilidad 58-97,2%, especificidad 99-100%) y grandes diferencias entre los distintos métodos inmunocromatográficos comercializados (Fuentes Corripio *et al.*, 2010; Gutiérrez-Cisneros *et al.*, 2011).

Desde los años 90 ha sido ampliamente utilizadas técnicas moleculares, como la PCR (Polymerase Chain Reaction), para la identificación de parásitos en muestras clínicas y ambientales presentando elevada sensibilidad e especificidad (Sousa *et al.*, 2006), aunque no son muy utilizadas en rutina debido a su elevado precio.

Por último, otro método que presenta gran sensibilidad y especificidad es la Citometría de Flujo asociada a fluorescence activated cell sorting. Este método, desarrollado en los años 60, utiliza diferentes fluorocromos y presenta sensibilidades y especificidades superiores que todas las otras técnicas. El análisis celular multiparamétrico permite la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Las principales ventajas de CMF son la automatización, la rapidez y permite el procesamiento de un gran número de muestras por día, así como el análisis sin

lisar de las células (Alvarez-Barrientos, 2000; Givan, 2005; Shapiro & Nebe-von-Caron, 2005; Pina-Vaz & Rodrigues, 2010). Ya están disponibles diferentes protocolos citométricos aplicados a la Microbiología, en los últimos años han sido desarrollados protocolos para detección de los protozoos emergentes (Barbosa *et al.*, 2008a; 2008b; 2009; Hsu *et al.*, 2005; Montemayor *et al.*, 2007).

CONCLUSIÓN

Los protozoos (*Cryptosporidium* spp. y *G. lamblia*) y el hongo (*E. intestinalis*) emergentes son responsables de enfermedades intestinales en el hombre, pero con diferentes grados de gravedad dependiendo del tipo de estado inmunológico de los pacientes. La contaminación del hombre puede ocurrir por diferentes vías, pero el agua es la principal vía de infección, una vez que estos protozoos son resistentes a gran mayoría de los tratamientos físico químicos usados para desinfección del agua potable. No hay un tratamiento antiparasitario totalmente eficaz para criptosporidiosis y microsporidiosis, siendo el mejor tratamiento la combinación de fármacos antiparasitarios con medicamentos ARV; para giardiasis, el antibiótico más común es el metronidazol pero actualmente han sido descritos casos de resistencia. Así, la aplicación de diferentes medidas de prevención en el tratamiento del agua, es importante para evitar brotes epidémicos en la población.

Por fin, nuevas metodologías de diagnóstico en Parasitología han sido desarrolladas en los últimos años, aumentando la sensibilidad de diagnóstico de estos protozoos; no obstante, es necesario continuar a desarrollar o optimizar técnicas que sean sensibles, específicas, rápidas y más informativas para el diagnóstico de las infecciones de estos protozoos emergentes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Ali S. A. & Hill D. R. (2003). *Giardia intestinalis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**: 453-460.
- Alvarez-Barrientos A., Arroyo J., Canton R., Nombela C. & Sanchez-Perez M. (2000). Applications of

- flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 167-195.
- Arora D. R. & Arora B. (2009). AIDS - associated parasitic diarrhoea. *IJMM.* **27**: 185-190.
- Aygun G., Yilmaz M., Yasar H., Aslan M., Polat E., Midilli K *et al.* (2005). Parasites in nosocomial diarrhoea: are they underestimated? *J. Hosp. Infect.* **60**: 283-285.
- Barboni G., Candi M., Villacé M. I., Leonardelli A., Balbaryski J. & Gaddi E. (2008). Criptosporidiosis intestinal en niños con HIV/SIDA. *Medicina (B. Aires).* **68**: 213-218
- Barbosa J., Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A. G. & Pina-Vaz C. (2008a). Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. *TMAID.* **6**: 234-39.
- Barbosa J., Costa-de-Oliveira S., Rodrigues A.G. & Pina-Vaz C. (2008b). Optimization of a flow cytometry protocol for detection of *Cryptosporidium parvum* in hospital tap water and human stools. *Cytometry A.* **73**: 44-48.
- Barbosa J., Rodrigues A. G. & Pina-Vaz C. (2009). A cytometric approach for detection *Encephalitozoon intestinalis*: an emergent agent. *CVI.* **16**: 1021-1024.
- Busatti H. G., Santos J. F. & Gomes M. A. (2009). The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? *Biologics.* **3**: 273-287.
- Canada, Health Guidelines [editorial]. (2004). Protozoa: Giardia and *Cryptosporidium*. Ottawa, Ontario, Canada.
- Capella-Gutiérrez S., Marcet-Houben M. & Gabaldón T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biology.* **10**: 47.
- Carey C. M., Lee H. & Trevors J. T. (2004). Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum*. and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* **38**: 818-862.
- Coco V. F., Cordoba M. A. & Basualdo J. A. (2009). Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev. Argent. Microbiol.* **41**: 185-196.
- Corradi N. & Keeling P. J. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal. Biol. Ver.* **23**: 1-8.
- Cruz A., Sousa M. I., Azeredo Z., Leite E., Figueiredo De Sousa J. C. & Cabral M. (2003). Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. *AAC.* **51**: 1017-1020.
- Davies A. P. & Chalmers R. M. (2009). Criptosporidiosis. *Br. Med. J.* **339**: 963-967.
- Didier E. S., Stovall M. E., Green L. C., Brindley P. J., Sestak K. & Didier P. J. (2004). Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* **126**: 145-166.
- Didier E. S. & Weiss L. M. (2006). Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**: 485-492.
- Dorny P., Praet N., Deckers N. & Gabriel S. (2009). Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.* **163**: 196-206.
- Fayer R., Morgan U. & Upton S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* **30**: 1305-1322.
- Fricker C. R., Medema G. D. & Smith H. V. (2004). Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, Cyclospora). 70-118. In: Guidelines for Drinking Water Quality. WHO. 3rd ed. WHO editorial. Genève, Switzerland.
- Fuentes Corripio I., Gutiérrez Cisneros M. J. & Ormaechea T. G. (2010). Diagnóstico de las parasitosis intestinales mediante detección de coproantígenos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **28 (Supl 1)**: 33-39.
- García L. S. & Bruckner D. A. (1997). *Diagnostic Medical Parasitology*. 3rd ed. ASM Press. Washington, USA.
- Givan A. (2005). Flow cytometry: an introduction. 1-32. In: *Methods in Molecular Biology: Flow*

- Cytometry Protocols*. Hawley T. S., Hawley R. G., editors. 2nd ed. Totowa NJ: Humana Press. New York, USA.
- Gomes M. A. (2009). The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: where are we? *In Vitro*. **3**: 273-287.
- Gutiérrez-Cisneros M. J., Martínez-Ruizb R., Subiratsc M., Merinod F. J., Millánb R. & Fuentes I. (2011). Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de *Giardiaduodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. **29**: 201-203
- Hunter P. R. & Thompson R. C. A. (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol*. **35**: 1181-1190.
- Hsu B. M., Wu N. M., Jang H. D., Shih F. C., Wan M. T. & Kung C. M. (2005). Using the flow cytometry to quantify the *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Environ. Monit. Assess*. **104**: 155-162.
- Karanis P., Kourenti C. & Smith H. (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water. Health*. **5**: 1-38.
- Keeling P. J. & Fast N. M. (2002). Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Ann. Rev. Microbiol*. **56**: 93-116.
- Lauwaet T., Davids B. J., Reiner D. S. & Gillin F. D. (2007). Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr. Opin. Microbiol*. **10**: 554-559.
- Leiro J., Cano E., Ubeira F. M., Orallo F. & Sanmartín M. L. (2004). In vitro effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *AAC*. **48**: 2497-2501.
- Lequin R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem*. **51**: 2415-2418.
- Marshall M. M., Naumovitz D., Ortega Y. & Sterling C. R. (1997). Waterborne Protozoan Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev*. **10**: 67-85.
- Montemayor M., Galofré B., Ribas F. & Lucena F. (2007). Comparative study between two laser scanning cytometers and epifluorescence microscopy for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in water. *Cytometry A*. **71**: 173-179.
- Noda Albelo A., Cañete R. & Pérez K. B. (2013). Microsporidiosis gastrointestinal: una actualización. *Rev. Med. Electrón*. **35(2)**: 167-181.
- Pantenburg B., Cabada M. M. & White A. C. (2009). Treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther*. **7**: 385-391.
- Pina-Vaz C. & Rodrigues A. G. (2010). Evaluation of antifungal susceptibility using flow cytometry. *MIMB*. **638**: 281-289.
- Robertson L. J., Hanevik K., Escobedo A., Mørch K. & Langeland N. (2010). Giardiasis - why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol*. **26**: 75-82.
- Santillana-Hayat M., Sarfati C., Fournier S., Chau F., Porcher R., Molina J. M. & Derouin F. (2004). Effects of chemical and physical agents on viability and infectivity of *Encephalitozoon intestinalis* determined by cell culture and flow cytometry. *AAC*. **46**: 2049-2051.
- Shapiro H. M. & Nebe-von-Caron G. (2005) Multiparameter flow cytometry of bacteria. In: Hawley T. S., Hawley R. G., editors. *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*. 2nd ed. Totowa NJ: Humana Press; p. 33-43.
- Smith H. V., Cacció S. M., Cook N., Nichols R. A. B. & Tait A. (2007). *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol*. **149**: 29-40.
- Sousa M. C., Morais J. B., Machado J. E. & Poiareda-Silva J. (2006). Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *J. Euk. Microbiol*. **53**: 174-176.
- Thellier M. & Breton J. (2008). *Enterocytozoon bieneusi* in humans and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite*. **15**: 349-358.

- Thiriat L., Sidaner F. & Schwartzbrod J. (1998). Determination of Giardiacyst viability in environmental and faecal samples by immunofluorescence, fluorogenic dye staining and differential interference contrast microscopy. *Lett Appl. Microbiol.* **26**: 237-242.
- Wiwanitkit V. (2006). Intestinal Parasite Infestation in HIV Infected Patients. *Curr HIV Res.* **4**: 87-96.

Recibido el 22/11/2012
Aceptado el 19/09/2013
