Cryptosporidium parvum en gastrópodos silvestres como bioindicadores de contaminación fecal en ecosistemas terrestres

Patricia Neira O., Nelson Muñoz S., Bárbara Stanley V., Marianne Gosh C. y M. José Rosales L.

Cryptosporidium parvum in wild gastropods as bioindicators of fecal contamination in terrestrial ecosystems

Cryptosporidium sp oocysts were detected in snails (*Helix aspersa* Müller) and slug (*Deroceras reticulatum* Müller) from the Valparaíso Region, Chile. Snails and slug were collected from public squares and private domestic gardens. *Cryptosporidium* sp oocysts were recovered from faeces of both species. Ziehl Neelsen stain, nested PCR, and sequencing analysis demonstrated a profile similar to that described for genotype C or 2 of the parasite. These results demonstrate that snails and slug could act as a reservoir and mechanic vector of *C. parvum* infection for humans and animals. Moreover, gastropods could serve as bioindicators of fecal soil contamination.

Key words: Gastropods, *Helix aspersa*, *Deroceras reticulatum*, Coccidia, *Cryptosporidium parvum*.

Palabras clave: Gastrópodos, *Helix aspersa*, *Deroceras reticulatum*, Coccidia, *Cryptosporidium parvum*.

Universidad de Valparaíso, Chile.

Facultad de Medicina
Escuela de Medicina
Departamento de Preclínicas
Cátedra de Parasitología (PNO, NMS, BSV, MGC).

Universidad de Granada, España.

Facultad de Ciencias
Departamento de Parasitología
Instituto de Biotecnología (MJRL).

Financiado por Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso (DIPUV 01/2005).

Recibido: 16 de junio de 2009

Aceptado: 12 de mayo de 2010

Correspondencia a:

Patricia Neira Otero
patricia.neira@uv.cl

Introducción

La criptosporidiosis es una infección por protozoos coccidios que afecta a los seres humanos, los animales domésticos y otros vertebrados. En los animales, especialmente en los terneros, previo a su destete, provoca una grave enteritis que ocasiona importante morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas. En los seres humanos, surgió como una importante infección gastrointestinal en la segunda mitad de la década de los años '80, junto con la aparición del SIDA. El protozoo da lugar a una infección aguda autolimitada del aparato digestivo en humanos inmunocompetentes, y una enfermedad crónica, de riesgo vital en pacientes inmunocomprometidos. En nuestra especie, varias son las vías de transmisión posibles, incluida la de persona a persona (antroponótica y la infección zoonótica), a través de la contaminación fecal del agua y los alimentos. Frecuentemente, se desconoce la fuente específica de ooquistes de *Cryptosporidium* implicados en la infección o en la contaminación de alimentos y agua, por carencia de investigación epidemiológica en nuestro país.

En los últimos años, el desarrollo de herramientas moleculares ha permitido detectar y diferenciar los coccidios *Cryptosporidium* en los niveles de especie, genotipo y subgenotipos. A la fecha, en Chile sólo se ha identificado *C. parvum* y *C. hominis* en humanos y *C. parvum* en humanos y otros vertebrados¹. En personas inmunocomprometidas e inmunocompetentes de Perú,

E.U.A., Reino Unido, Portugal, Francia, Japón, Suiza, y Kenia, también se han encontrado casos humanos infectados con *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. felis*²⁻⁹.

Se han observado diferencias geográficas en la prevalencia de infecciones por *Cryptosporidium* zoonóticos y antroponóticos¹⁰, probablemente debido a diferencias en la exposición, en la cantidad y sobrevida de los ooquistes eliminados al medio, que tiende a ser mayor para las infecciones por *C. hominis* que para *C. parvum*.

Uno de los subgenotipos de *C. hominis* se ha identificado en múltiples brotes de origen alimentario y agua en E.U.A. y el Reino Unido^{11,12} lo que indica que ciertos *Cryptosporidium* pueden tener mayor potencial de transmisión que otros.

Cryptosporidium se encuentra en el ambiente en fase de ooquiste (ambientalmente resistente) maduro e infectante al ser excretado en las deposiciones humanas y heces de animales vertebrados infectados y es adquirido por la ingestión de agua o alimentos contaminados. En invertebrados se ha detectado en moluscos bivalvos marinos (ostras, mejillones, berberechos)¹³⁻²², lo que sirve como indicador de contaminación fecal de las aguas. En Chile, el estudio de 642 moluscos bivalvos (choritos, ostras, almejas, machas) y muestras de agua salada obtenidas de playas de la Región de Valparaíso, usando microscopía y pruebas moleculares no ha detectado la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* como contaminante de agua ni mariscos (Neira P, datos no publicados). No se han realizado estudios sobre la contaminación

natural con *Cryptosporidium* en los moluscos gastrópodos silvestres.

No existen en nuestro país normas específicas relativas a la vigilancia de la presencia de *Cryptosporidium* en moluscos terrestres usados para el consumo humano, debido a que la ingesta de estos gastrópodos no es una práctica culinaria habitual en el país, quedando restringida la preparación de caracoles a restaurantes y hoteles; y el helicultivo principalmente destinado a exportación.

Con el objeto de aportar antecedentes sobre la epidemiología molecular de *Cryptosporidium* sp en Chile, el objetivo de este trabajo fue determinar si existe infección en gastrópodos terrestres y conocer la(s) especie(s) involucrada(s) en el caracol de jardín *Helix aspersa* y las babosas de jardín *Deroceras reticulatum*, para ser usado como bioindicadores de la contaminación fecal en ecosistemas terrestres en la Región de Valparaíso, Chile y, eventualmente, en otros territorios.

Material y Métodos

El caracol de jardín *H. aspersa* Müller 1774 y la babosa terrestre *D. reticulatum* Müller, son moluscos de la Clase Gastropoda. Los caracoles pertenecen al Orden Pulmonata, Familia Helicidae y las babosas al Orden Stylommatophora Familia Limacidae.

Los caracoles y las babosas (Figura 1) fueron recolectados desde lugares húmedos asociados a vegetación de plazas públicas y/o jardines de casa, donde se desarrollan y crecen naturalmente. Las babosas también fueron recolectadas de hortalizas, principalmente lechugas, adquiridas para consumo. Fueron transportados al laboratorio y dispuestos en un terrario con condiciones de luz, temperatura y humedad ambiental, posteriormente se situaron sobre una rejilla con el objeto de reunir sus deposiciones en una fuente (Figura 2).

Para determinar la presencia de ooquistes de *Cryptos-*

Figura 1. Caracol (*Helix aspersa*) en jardín (izquierda) y babosa (*Deroceras reticulatum*) en una hoja de lechuga (derecha).

Figura 2. Caracoles dispuestos en terrario (izquierda) y su disposición para la recolección de las fecas (derecha).

poridium se recolectó mezclas de muestras fecales por especie, las que fueron concentradas mediante centrifugación (5.000 rpm por 10 min). Con el sedimento fecal se confeccionó un extendido que fue teñido con la tinción de Ziehl Neelsen modificada. Se consideró muestra positiva a aquella cuyos ooquistes de *Cryptosporidium* sp fueron identificados de acuerdo a sus características morfológicas.

Los ooquistes aislados de los caracoles y babosas fueron sometidos a un proceso de congelación y descongelación para su ruptura y mantenidos a 4°C.

El ADN genómico de *Cryptosporidium* se extrajo de ooquistes en materia fecal mediante un kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), que usa proteinasa K para la digestión en tampón de lisis AL a 70 °C por 10 minutos, y luego una columna de intercambio iónico para su depuración y se eluye en 200 µl de tampón AE. Se almacenó a -20°C hasta su uso. La amplificación mediante RPC anidada de la subunidad 18S de los genes ARNr de *Cryptosporidium*, se realizó de acuerdo a lo publicado por Tiangtip y cols 2002²³, en 25 ml de mezcla de reacción que contenía ADN de *Cryptosporidium* sin cuantificar. La primera RPC se efectuó con los partidores CR-P1: nucleótidos en las posiciones 437-456 (GenBank AF093489) y CR-P2: nucleótidos 1070-1089. El termociclado se desarrolló con una denaturación por 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 94, 60 y 72 °C durante 45, 45 y 60 seg, respectivamente y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de la primera RPC fueron utilizados para una segunda RPC, usando los partidores CR-P3: nucleótidos 525-544 (GenBank AF093489) y CPB-DIAGR: nucleótidos 1015-1036²⁴. Se utilizó las mismas condiciones de RPC primaria a excepción de exclusión del BSA y el termociclado se desarrolló con una denaturación por 3 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 94, 57 y 72 °C durante 30, 30 y 45 seg, respectivamente y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Los productos amplificados en la segunda RPC de la pequeña subunidad (SSU) de los genes ARNr de *Cryptosporidium* fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio bajo transiluminador UV y posteriormente fotografiados. Como control positivo, se usó ooquistes de *C. parvum* aislados de bovino y de pacientes VIH positivos de Chile, además se usó un control negativo¹.

Las especies de *Cryptosporidium* fueron identificadas por secuenciación bidireccional de los productos de RPC generados por RPC anidada de la pequeña subunidad (SSU) del gen del ARNr en 4 alícuotas de ADN de cada muestra. Las secuencias fueron depositadas en GenBank.

Resultados

Se detectó ooquistes en mezclas de muestras de deposiciones de caracoles en 4/10 y de babosas en 1/6 sitios

de recolección (Tabla 1). Ninguno de los gastrópodos de los otros sitios muestreados en la Región de Valparaíso fue positivo.

Las características de los ooquistes (tamaño, forma, superficie, y color a la tinción (Figura 3) fueron consistentes con las observadas en las especies de *Cryptosporidium*.

Los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos a partir de la mezcla de muestras fecales de los caracoles y las babosas, presentaron un patrón electroforético similar al de *C. parvum* (Figura 4) obtenidos de bovino y pacientes con infección por VIH aislados en nuestro laboratorio para la SSU del gen del ARNr (510 pb), en concordancia con lo descrito para la especie bovina o genotipo C.

La secuenciación y posterior comparación con lo publicado en Gen Bank mostró entre 90 y 95% de máxima identidad. Las secuencias parciales fueron depositadas en GenBank con los N° de acceso GQ355896, GQ355897 y GQ355898.

Nota: Adicionalmente se detectó en uno de los caracoles la parasitación por tres larvas de moscas de la Familia *Sarcophagidae* cuyo desarrollo permitió la obtención de los imágos respectivos (Figura 5).

Tabla 1. *Cryptosporidium* sp detectados mediante tinción de Ziehl Neelsen en mezclas fecales de gastrópodos terrestres e identificación de especie mediante RPC anidada y secuenciación

<i>Helix aspersa</i> "caracol"	n de ejemplares examinados	Presencia e identificación de <i>Cryptosporidium</i> sp
Jardín Valparaíso	57	(-)
Jardín C° Mariposas	8	<i>C. parvum</i>
Plaza Simón Bolívar	2	(-)
Parque El Litre	36	(-)
Jardín Curauma	67	<i>C. parvum</i>
Jardín Miraflores	13	<i>C. parvum</i>
Jardín Quilpué	33	<i>C. parvum</i>
Jardín Quilpué	48	(-)
Jardín Quilpué	26	(-)
Jardín V. Alemana	51	(-)
Total	341	
<i>Deroceras reticulatum</i> "babosa"	n de ejemplares examinados	Presencia e identificación de <i>Cryptosporidium</i> sp
Jardín Valparaíso	4	(-)
Plaza Simón Bolívar	36	(-)
Parque El Litre	8	(-)
Jardín Curauma	5	(-)
Jardín Quilpué	3	<i>C. parvum</i> 2 (+)
Jardín V. Alemana	9	(-)
Total	65

Figura 3. Ooquistes de *C. parvum* sp obtenidos en heces de caracol *Helix aspersa* (izquierda) y de *Deroceras reticulatum* (derecha), teñidos con Ziehl Neelsen.

Figura 4. Diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* mediante RPC anidada basada en la secuencia de la SSU del gen ARNr. Carril 1 marcador de peso molecular (100 bp), carril 2- 5 *Cryptosporidium* de caracoles *Helix aspersa* de Chile, carril 6 *Cryptosporidium* de babosas *Deroceras reticulatum* de Chile, carril 7 y 8 *C. parvum* genotipo bovino, *C. parvum* origen humano de Chile, respectivamente.

Discusión

Tanto los caracoles terrestres como las babosas, participan en el ciclo de vida de parásitos de importancia médica y veterinaria. Debido a que no existe una estricta especificidad por los hospedadores intermediarios, ambos moluscos cumplen este rol en el ciclo de nemátodos *Angiostrongylus cantonensis*²⁵ y *A. costarricensis* que producen enfermedad en humanos. *Helix aspersa*²⁶, *D. reticulatum* y *D. laeve*²⁷ se han infectado en forma natural por *Angiostrongylus*, cuyo primer estado larval es eliminado por las heces de roedores y los moluscos los ingieren o son infectados por penetración a través del tegumento, donde producen el tercer estado larval infectante²⁸. En esta infección, los pacientes han manifestado el haber consumido caracoles crudos, previo a enfermar, con un período de incubación que fluctúa entre uno y 25 días²⁹. Otros nemátodos de importancia son las especies de los

Figura 5. Pupas e Imago de *Sarcophaga* sp. (Diptera: Sarcophagidae) recuperados de *Helix aspersa*.

géneros *Aeleurostrongylus* y *Anaflaroides*, parásitos pulmonares del gato doméstico; el primero de ellos presente en gatos de nuestro país^{30,31}.

En este estudio, la presencia de ooquistes de *C. parvum* en caracoles y babosas silvestres se verificó mediante tinción de Ziehl Neelsen (Figura 3) e identificó mediante RPC anidada (Figura 4) y posterior secuenciación. Los ooquistes de *C. parvum* se detectaron por primera vez en estos moluscos gastrópodos terrestres. No existen comunicaciones previas, siendo ésta la primera.

Las características morfológicas de las posibles especies de *Cryptosporidium* de gastrópodos terrestres no se conocen. A la fecha, la caracterización molecular y posterior secuenciación, tal como se utiliza en este trabajo, son dos técnicas específicas para la identificación de *C. parvum* detectados en las muestras de agua y alimentos. El haber detectado la presencia en caracoles y babosas pone en evidencia el riesgo potencial de infección de los seres humanos y animales. Basado en fósiles, el caracol en la dieta humana se remonta al 1800 A.C. Los romanos no sólo los consumían sino que lo consideraban un remedio eficaz para enfermedades del estómago y de las vías respiratorias. Actualmente, el caracol terrestre, no así las babosas, tiene uso culinario, cosmético y terapéutico no tradicional, lo que podría ser un riesgo potencial de criptosporidiosis, si éstos estuvieran contaminados (o infectados) con *Cryptosporidium* sp.

Por su gran valor nutricional, los caracoles son una especie de consumo frecuente por los seres humanos en Francia y España, no así en Chile por lo que en nuestro país, desde este punto de vista parasitario, no representarían un gran riesgo para la población en sus hábitos alimenticios; sin embargo, ambas especies podrían actuar como reservorios y vectores mecánicos del coccidio *Cryptosporidium* para los seres humanos y los animales. Si bien los caracoles y sus huevos se consumen cocidos o en conserva, *C. parvum* corresponde a una especie que parasita a hospedadores vertebrados, lo que implica que los gastrópodos usados para el consumo humano deberían someterse a pruebas para descartar la presencia de este parásito.

En cosmética, suele usarse la baba pura o asociada con otros vehículos, sobre la piel (incluido el rostro); nuestro país la exporta principalmente a Holanda y Australia.

En países donde el consumo es habitual, la recolección silvestre o de criadero y la manipulación de caracoles, sin el adecuado manejo sanitario preventivo generaría la posibilidad de contagio con este patógeno, al ser consumidos crudos o insuficientemente cocidos en el caso de los caracoles o ingeridos accidentalmente por inadecuada manipulación de alimentos, en el caso de las babosas. El haber identificado patrones electroforéticos similares a los de *C. parvum* de origen bovino (Figura 4), de transmisión zoonótica, nos hace suponer que el

ganado y los seres humanos, serían la principal fuente de contaminación por *C. parvum* para los gastrópodos terrestres, lo cual nos permitiría el uso de estos moluscos como biondicadores de contaminación fecal humana y/o animal en ecosistemas terrestres.

Por otra parte, los helícidos son depredados por numerosas especies de invertebrados y vertebrados domésticos como silvestres. Respecto de la salud animal, estos gastrópodos pueden constituir fuente de infección de *Cryptosporidium* y otros parásitos para diversas especies depredadoras de moluscos, ya que son miembros de la red trófica y fuente de alimento para vertebrados e invertebrados. Caracoles y babosas son parasitados por protozoos, helmintos y artrópodos³²⁻³⁶.

La alimentación de las babosas es muy variada, siendo fitófagas, también pueden consumir residuos animales. A diferencia de los caracoles, las babosas no se consumen; sin embargo, pudieran ser ingeridas inadvertidamente debido a alimentos manipulados en forma inadecuada, en especial a través de aquellos vegetales verdes que se consumen crudos y mal lavados, ya que normalmente se ubican en los pliegues de las hojas de los vegetales comestibles (Figura 1).

Las herramientas moleculares, como PCR-RFLP, indican la existencia de dos especies genéticamente distintas: *C. parvum* y *C. hominis*³⁷, este último se encuentra exclusivamente en las infecciones humanas, es decir es una especie antroponótica, mientras que *C. parvum* se encuentra en los seres humanos, así como en los rumiantes domésticos, es decir, es una especie antropozoonótica.

Los marcadores moleculares utilizados en el presente estudio demostraron que los ooquistes de *C. parvum* aislados de caracoles y babosas en las áreas estudiadas, corresponden al genotipo 2 o C, que son los que participan en el ciclo de transmisión zoonótica de la criptosporidiosis. Posiblemente la infección de estos gastrópodos pudiera relacionarse con el uso de estiércol no descontaminado de rumiantes domésticos para la fertilización de los jardines y el contacto de los caracoles y las babosas con las heces en estos casos, podría ser permanente o casual. La inadecuada descontaminación de la tierra, una higiene inapropiada de los alimentos y la mala calidad del agua serían factores predisponentes en la presentación de esta patología enteroparasitaria.

Es difícil evaluar las implicancias de este hallazgo para la salud humana, pero podría existir riesgo de contraer criptosporidiosis por el consumo de caracoles crudos o insuficientemente cocidos y no descontaminados, especialmente en aquellos países donde la especie habitualmente tiene uso culinario. Sin embargo, la gran mayoría de los antecedentes hace recomendable su consumo cocido. Dado que en nuestro país el consumo de caracoles no es una práctica habitual, el riesgo estaría centrado en la práctica popular del uso de los caracoles depositados en

la piel para su descamación o para que la “baba” actúe como suavizante epidérmico.

Deberían ser evaluados los vínculos epidemiológicos entre la contaminación de los moluscos silvestres terrestres con *C. parvum* y las enfermedades diarreicas en la población humana y animal.

La producción masiva de vegetales y animales de consumo, aunque poco contaminados o infectados, permitiría una mayor diseminación de la infección. De esta manera, los heliocultivos formados por helicolección silvestre podrían estar contaminados por protozoos parásitos y podrían infectar a los humanos que los consuman y participen en actividades propias de la producción³⁸.

Las hortalizas y las frutas son vehículos comunes para la transmisión de enteroparásitos que utilizan el fecalismo ambiental directo como mecanismo de transmisión, como lo es *Cryptosporidium*. La elevada prevalencia de este coccidio en las aguas de irrigación de vegetales, sugiere fuertemente el papel de estos alimentos en la transmisión del parásito³⁹. Se ha demostrado la presencia de ooquistes en diversos vegetales⁴⁰.

Las hortalizas y frutas podrían contaminarse no sólo a través del riego con aguas servidas, sino que también a través de la presencia de heces y/o baba de caracoles y babosas contaminadas cuyas secreciones pudiesen persistir a pesar del adecuado lavado de dichas verduras.

El presente estudio es el primero en comunicar la presencia de ooquistes de *C. parvum* en gastrópodos terrestres *H. aspersa* y *D. reticulatum* en Chile (Figura 3) y la literatura científica no contiene reportes de casos de criptosporidiosis humana provocada por el consumo de estos moluscos.

A pesar de que la viabilidad de los ooquistes aislados de estos gastrópodos debe estudiarse para definir el verdadero riesgo de transmisión, este estudio puede ser de importancia para la salud pública en Chile y en los países exportadores donde son usados para su consumo, principalmente España, Francia y Portugal. Si bien en Chile no es habitual el consumo de estos gastrópodos, el uso de éstos en terapia no tradicional (basada en modas o mitos populares), podría tener implicancias para la salud. La detección de *C. parvum* en estos moluscos nos permite sugerir que podrían ser usados como bioindicadores para el monitoreo de la contaminación del medio ambiente terrestre con agentes patógenos zoonóticos o antroponóticos. *Helix aspersa* y *D. reticulatum* podrían tener un importante rol en la transmisión de *C. parvum* al hombre, por lo que cabría recomendar entre las medidas

preventivas:

- Impedir la ingestión de caracoles o babosas crudos o insuficientemente cocidos, así como la carne cruda de otros hospederos que son depredadores de estos moluscos.
- Preconizar el lavado correcto de vegetales y frutas, el que debe incluir la eliminación de babosas y caracoles de ellas.
- No ingerir agua no potable.
- Impedir que los niños jueguen con babosas y caracoles vivos e incluso que se los lleven a la boca.
- Impedir el uso cosmético del caracol sobre la piel, especialmente del rostro.

En conclusión, hemos identificado la presencia de ADN con gran identidad a *C. parvum* genotipo zoonótico en 4/10 de los grupos de caracoles y en 1/6 de los grupos de babosas (Tabla 1) estudiados en la región de Valparaíso, Chile. Este trabajo sugiere, por primera vez en Chile y el mundo que los caracoles y babosas pueden servir de reservorio o vectores mecánicos al transportar un genotipo de *Cryptosporidium*, que puede constituir un potencial peligro para la población. Se requiere continuar con estudios epidemiológicos que permitan entender las verdaderas consecuencias, de este hallazgo, en la salud humana y animal.

Agradecimientos: A PhD Mario Párraga, a Bióloga Sra. Victoria Devia, T.M. Sr. Ivo Carrasco por su apoyo en las técnicas moleculares y secuenciación de las mismas.

Resumen

Se detectó ooquistes de *Cryptosporidium* sp en caracoles (*Helix aspersa* Müller) y babosas (*Deroce-ras reticulatum* Müller) de la Región de Valparaíso, Chile. La recolección de caracoles y babosas se efectuó en parques públicos y jardines de diferentes hogares. Los ooquistes de *Cryptosporidium* sp fueron recuperados de las deposiciones de ambas especies. Después de la tinción de Ziehl Neelsen y la RPC anidada, el análisis de secuenciación demostró un patrón similar a lo descrito para el genotipo C o 2 del parásito. Estos resultados demuestran que los caracoles y babosas podrían actuar como reservorio y vectores mecánicos de la infección por *Cryptosporidium. parvum* para humanos y animales. Además, estos gastrópodos podrían ser usados como bio-indicadores de contaminación fecal del suelo.

Referencias

- 1.- Neira-Otero P, Muñoz-Saldías N, Sánchez-Moreno M, Rosales-Lombardo M J. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. and genotypes in Chile. *Parasitol Res* 2005; 97: 63-7.
- 2.- Alves M, Matos O, Spano F, Antunes F. PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 291-7.
- 3.- Morgan U, Weber R, Xiao L, Sulaiman I, Thompson R C A, Ndiritu W, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (3): 1180-3.
- 4.- McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Díaz S, Nichols G L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (11): 3984-90.
- 5.- Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Perú. *J Infect Dis* 2001; 183: 492-7.
- 6.- Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelièvre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (10): 3472-80.
- 7.- Akiyoshi D, Dilo J, Pearson C, Chapman S, Tumwine J, Tzipori S. Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species *Infect Immun* 2003; 71 (4): 1828-32.
- 8.- Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1017-23.
- 9.- Leoni F, Gallimore CI, Green J, McLauchlin J. Characterization of small double stranded RNA molecule in *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Parasitol Int* 2006; 55 (4): 299-306.
- 10.- Xiao L, Ryan U M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17 (5): 483-90.
- 11.- CDC. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water United States, 2003--2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55 (No. SS-12): 1-30.
- 12.- Jones M, Boccia D, Kealy M, Salkin B, Ferrero A, Nichols G, et al. *Cryptosporidium* outbreak linked to interactive water feature, UK: Importance of guidelines. *Euro Surveillance* 2006; 11 (4-6): 126-8.
- 13.- Chalmers M, Sturdee A P, Mellors P, Nicholson V, Lawlor F, Kenny F, et al. *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: a preliminary report. *Letters Appl Microbiol* 1997; 25 (5): 380-4.
- 14.- Fayer R, Lewis E J, Trout J M, Graczyk T K, Jenkins M C, Higgins J, et al. *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 706-10.
- 15.- Freire-Santos F, Oteiza-López A M, Vergara-Castiblanco C A, Ares-Mazas E, Álvarez-Suárez E, García-Martin O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *J Parasitol* 2000; 86: 853-4.
- 16.- Gómez-Bautista M, Ortega-Mora L M, López-Rodas V, Costas E, Tabares E. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and cockles (*Cerastoderma edule*). *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (5): 1866-70.
- 17.- Lowery C J, Nugent P, Moore J E, Millar B C, Xiru X, Dooley J S. PCR-IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiol Infect* 2001; 127(3): 545-53.
- 18.- Graczyk T K, Fayer R, Lewis E J, Trout J M, Farley C A. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol Res* 1999; 85 (7): 518-21.
- 19.- Graczyk T K, Marcogliese D J, de Lafontaine Y, Da Silva A J, Mhangami-Ruwende B, Pieniazek, N J. *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St Lawrence River. *Parasitol Res* 2001; 87 (3): 231-34.
- 20.- Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Martínez-Urtaza J, García Martín O, Ares-Mazás M E. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: The need for new quality control standards. *Int J Food Microbiol* 2003; 87: 97-105.
- 21.- Gómez-Couso H, Freire-Santos F, Amar C F L, Grant K A, Williamson K, Ares-Mazás M E, et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int J Food Microbiol* 2004; 91: 279-88.
- 22.- Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Ares-Mazás E. Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods *Vet Parasitol* 2006; 141 (1-2): 60-5.
- 23.- Tiangtip R, Jongwutiwes S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop Med Intern Health* 2002; 7 (4): 357-64.
- 24.- Johnson D W, Pieniazek N J, Griffin D W, Misener L, Rose J B. Development of PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water sample. *Appl Environ Microbiol* 1995; 62: 3849-55.
- 25.- Alicata J E. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Advanc Parasit* 1965; 3: 223-48.
- 26.- Thiengo S C, Amato S B, Aventino A, Araújo J L B. Estudo sobre os hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971. *Rev Bras Parasitol Vet* 1993; 2: 64.
- 27.- Maurer R L, Graeff-Teixeira C, Thomé J W, Chiaradia L A, Sugaya H, Yoshimura K. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca: Gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44: 53-4.
- 28.- Thiengo S C. Mode of infection of *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 277-8.
- 29.- Wang X, Huang H, Dong Q, Lin Y, Wang Z, Li F, et al. A clinical study of eosinophilic meningoencephalitis caused by angiostrongyliasis. *Clin Med J* 2002; 115 (9): 1312-15.
- 30.- González H, Torres P. *Aelurostrongylus abstrusus* en el gato doméstico. Primera comunicación en Chile. *Arch Med Vet* 1971; 3: 118-24.
- 31.- Torres P, Hott A, Boehnwald H. Protozoos, helmintos y artrópodos en gatos de la ciudad de

- Valdivia y su importancia en el hombre. Arch Med Vet 1972; 4: 20-9.
- 32.- John O, Corliss J, Smith A, Foulkes J. A species of *Tetrahymena* from the British garden slug *Milax budapestensis*. Nature 1962; 196: 1008-9.
- 33.- Burch JB. A soil protozoan infesting land snails. Ann Rept Bull Am Malacol 1961; 27 (No paginado).
- 34.- Cribb T H. Introduction of a *Brachylaima* species (Digenea: Brachylaimidae) to Australia. Int J Parasitol 1990; 20 (6): 789-96.
- 35.- Conte A, Bonnet A. Sur un nématode nouveau *Angiostoma heliciis* n. sp. parasite de l'appareil génital d'*Helix aspera* (Müll). Comptes rendus des séances de la Société de biologie 1903; 55: 198-9.
- 36.- Wilson M J, Glen D M, George S K. The rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a potential biological control agent for slugs. Biocontrol Science and Technology 1993; 3 (4): 503- 11.
- 37.- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton S. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 72-97.
- 38.- Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol 2004; 126: 37-56.
- 39.- Ortega Y, Roxas C, Gilman R. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Perú. Am J Trop Med Hyg 1997; 57: 683-6.
- 40.- Monge R, Chinchilla M, Reyes L. Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. Biol Trop 1996; 44: 369-75.