

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DETERMINACIÓN DE *CRYPTOSPORIDIUM spp.* POR MEDIO DE LA
TÉCNICA DE ELISA EN UN HATO COMERCIAL DE BOVINOS
PRODUCTORES DE LECHE EN LA REGIÓN LAGUNERA DE
COAHUILA.**

POR:

BRAULIO ALAMILLA ALDANA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DETERMINACIÓN DE *CRYPTOSPORIDIUM spp.* POR MEDIO DE LA
TÉCNICA DE ELISA EN UN HATO COMERCIAL DE BOVINOS
PRODUCTORES DE LECHE EN LA REGIÓN LAGUNERA DE
COAHUILA.**

POR:

BRAULIO ALAMILLA ALDANA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DETERMINACIÓN DE *CRYPTOSPORIDIUM* spp. POR MEDIO DE LA
TÉCNICA DE ELISA EN UN HATO COMERCIAL DE BOVINOS
PRODUCTORES DE LECHE EN LA REGIÓN LAGUNERA DE
COAHUILA.**

TESIS POR:

BRAULIO ALAMILLA ALDANA

ASESOR PRINCIPAL



MC. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

TESIS

**DETERMINACION DE *CRYPTOSPORIDIUM spp.* POR MEDIO DE LA
TECNICA DE ELISA EN UN HATO COMERCIAL DE BOVINOS
PRODUCTORES DE LECHE EN LA REGION LAGUNERA DE
COAHUILA.**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

PRESIDENTE DEL JURADO



MC. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



MC. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

**DETERMINACION DE CRYPTOSPORIDIUM spp. POR MEDIO DE LA
TECNICA DE ELISA EN UN HATO COMERCIAL DE BOVINOS
PRODUCTORES DE LECHE EN LA REGION LAGUNERA DE
COAHUILA.**

TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISION DEL COMITÉ
PARTICULAR DE ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE:



MC. ERNESTO MARTINEZ ARANDA

VOCAL



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL



MC. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

VOCAL SUPLENTE



MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTINEZ

DEDICATORIAS

A DIOS: POR DARMER LA VIDA, SALUD, Y ESTAR PRESENTE A MI LADO SIEMPRE, Y POR HABERME DADO OTRA OPORTUNIDAD PARA RETOMAR EL CAMINO DEL ESTUDIO, DARMER LA SATISFACCIÓN DE CONVERTIRME EN UN PROFESIONISTA Y POR TENER A SU LADO A LAS DOS PERSONAS QUE CRIARON Y ME GUIARON SIEMPRE.

A MI MADRE: LA SRA. Y PROFESORA ELVIA ALDANA AVILES QUIEN DIO LA VIDA POR MÍ Y ME DIO LA FUERZA DE SEGUIR ADELANTE A CADA MOMENTO Y NUNCA ABANDONARME, AUNQUE EN CUERPO ESTÁ AUSENTE EN MI CORAZÓN SIEMPRE ESTARÁ Y NUNCA DEJARA VENCERME ANTE LAS ADVERSIDADES. A ELLA LE DEDICO MI CARRERA Y MIS LOGROS. GRACIAS POR DARMER LA VIDA MAMA DONDE QUIERA QUE ESTÉS.... A TU MEMORIA. TE AMO.

A MI PADRE: BRAULIO ALAMILLA LOZANO: QUE ME APOYO EN MOMENTOS DIFÍCILES, Y QUE EN MIS DECISIONES ME HA APOYADO, A PESAR DE SU CARÁCTER, TE QUIERO PAPA.

A MI ABUELA: FLORENCIA AVILES DANIEL QUIEN TAMBIÉN DIO LA VIDA POR MÍ Y MIS HERMANAS, Y HASTA EL ULTIMO DÍA DE SU EXISTIR ME ÍNSITO A ESTUDIAR Y ME TRANSMITIÓ SU IDEA DE SIEMPRE ESTAR EN CONSTANTE SUPERACIÓN Y EN UNIÓN CON MIS HERMANAS.

A MIS HERMANAS: LESLIE JOSETH ALAMILLA ALDANA Y KAREN ALAMILLA ALDANA Y FORMARON DOS RETOS IMPORTANTES PARA SUPERARME, Y QUE CUANDO ME ENCONTRABA CAÍDO, SE DIERON TIEMPO PARA HABLARME, DARMER UN CONSEJO.

A MIS SOBRINOS: QUE SON COMO MIS HIJOS, ME REFIERO A JORGE LUIS DANIEL ALAMILLA Y DAFNE JOSETH DANIEL ALAMILLA POR TENER LA SONRISA MÁS LINDA DEL MUNDO AMBOS. LOS AMO HIJOS, GRACIAS POR SIEMPRE ESPERARME EN CASA.

A MI NOVIA: KARINA PÉREZ ESCAMILLA: POR APOYARME DURANTE TODO ESTE TIEMPO QUE FUE UNA ETAPA MUY DIFÍCIL EN LA CUAL, MÁS QUE MI NOVIA, FUE MI AMIGA Y COMPAÑERA DURANTE 5 AÑOS DE MI CARRERA, EN MI FORMACIÓN PROFESIONAL, ESTAR EN BUENAS, MALAS Y NUNCA DEJARME SOLO.

A MIS SUEGROS: POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE ME DIERON DURANTE MI CARRERA, Y ESAS LLAMADAS ALENTADORAS QUE RECIBÍA DE PARTE DE MI SUEGRA.

A MIS AMIGOS DURANTE MI CARRERA: MC. ERNESTO MARTINEZ ARANDA, MVZ. J. GUADALUPE RODRIGUEZ MARTINEZ, JOSE ALBERTO RODRIGUEZ OCHOA, JESUS MEJIA ACOSTA, OSBALDO DAIR CRUZ MARTÍNEZ, JUAN ROBERTO ESTEBAN ANDRES, SELMA ELIZABETH BATARSE MOORE, CESAR CASTELAN MORELOS, YAHAIRA ESCALANTE CORTES, VANIA LORENA LIZARRAGA GRIMES.

MY BROTHERS: MARTIN PÉREZ ESCAMILLA, FRANCISCO PÉREZ AZPEITIA, EVER TREJO, ELISEO PÉREZ, ADAN LUIS ALDANA VARGAS, YAHIR LOZANO.

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS POR TODOS LOS ACONTECIMIENTOS EN MI VIDA, QUE AUNQUE EN UN MOMENTO HUBO DIFÍCILES AHORA SÉ QUE HAY ALGO MEJOR ADELANTE Y LE AGRADEZCO EL QUE ME DIO LA OPORTUNIDAD DE ABANDONAR LOS MALOS PASOS Y GUIARME A DIARIO POR UN CAMINO COMPLICADO PERO MUY BUENO. GRACIAS DIOS MÍO.

A MI “ALMA TERRA MATER” QUIEN ME ACOBIJO EN SUS AULAS PARA MI FORMACIÓN PROFESIONAL Y EN ELLA CONCLUIR ESTE CICLO DE MI VIDA.

A LOS MC. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA, MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALES, MC. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ, MVZ. JOSÉ GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ. QUIENES ME BRINDARON EL APOYO Y TIEMPO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

GRACIAS.

RESUMEN

Se tomaron muestras de heces de 46 becerras Holstein Friesian, con presencia de diarrea para determinar por la técnica de ELISA la presencia de cryptosporidiosis de un hato comercial de la comarca lagunera. Para esto se utilizo un KIT comercial del instituto pourquier. la fase de laboratorio se llevo a cabo en el laboratorio de diagnostico de la universidad autónoma agraria Antonio narro unidad laguna.

Los resultados obtenidos indican que la prevalencia de cryptosporidiosis determinada mediante esta técnica es baja (13%), lo que coincide con lo encontrado en otras investigaciones realizadas usando la técnica modificada de Ziehl-Neelsen.

Podemos sugerir que la técnica de ELISA es un método rápido para la detección de cryptosporidiosis. El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. Por medio de la técnica de ELISA en un hato comercial de bovinos productores de leche en la región lagunera de Coahuila, se recolectaron 46 muestras de becerras que presentaban diarrea.

Palabras clave: Cryptosporidiosis., ELISA, diarrea, diagnostico.

INDICE

DEDICATORIAS	-i-
AGRADECIMIENTOS	-ii-
RESUMEN	-iii-
INDICE	-iv-
INDICE DE FIGURAS	-v-
I.- INTRODUCCION	1
II.- JUSTIFICACION	2
III.- OBJETIVO	3
IV.-REVISION DE BIBLIOGRAFIA	4
4.1 Historia	4
4.2 Taxonomía y Ciclo biológico	5
4.3 Especies validas de <i>Cryptosporidium</i>	7
4.4 Epidemiologia	8
4.5 Tratamiento	13
4.6 Mecanismos antigénicos	14
4.7 Perdida de la Infectividad	16
4.8 Métodos de diagnostico	17
V.- MATERIALES Y METODOS	19
VI.- RESULTADOS	20
VII.- DISCUSION	22
VIII.- LITERATURA CITADA	23

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Clasificación taxonómica de *Cryptosporidium spp* **5**
- Fig. 2.** Ciclo biológico de *Cryptosporidium spp* **7**
- Fig. 3.** Donde se observa la especie de *Cryptosporidium* validas; el o los hospedero(s) principalmente afectado(s) –primera columna- y el o los hospederos de menor importancia que son afectados por las especies de *Cryptosporidium* –segunda columna- **8**
- Fig. 4.** Donde se observa la prevalencia del ganado infectado de 1 semana de edad a > de 2 años por especie y genotipo derivado en todos los animales examinados en 14 granjas en 7 estados durante un periodo de 4 años. **12**
- Fig.5.** Transmisión documentada de *Cryptosporidium parvum* entre mamíferos. La dirección de las flechas indica la ruta de infección. En algunos casos especiales con humanos, las flechas son unidireccionales porque revelan estudios que no han sido conducidos. **12**
- Fig. 6.** Donde se observa el porcentaje de animales positivos y negativos a *Cryptosporidium spp*. **20**
- Fig.7.** Donde se observa la edad y el peso promedio de las becerras muestreadas en un hato lechero y que resultaron positivas y negativas a la presencia de *Cryptosporidium* mediante la técnica de ELISA. **21**

I.- INTRODUCCIÓN

Desde que E. E. Tyzzer (1912) parasitólogo Americano describiera al *C. Muris*, organismo que probablemente Clarke, en 1895, observara por primera vez y al cual describió como una enorme espora (Current y Garcia, 1991).

Al menos tres especies de *Cryptosporidium* con marcadas diferencias biológicas que infectan al ganado han sido identificadas: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium andersoni* (formalmente conocido como *Cryptosporidium muris*), y *Cryptosporidium bovis* (formalmente conocido como *Cryptosporidium* genotipo bovino B). El *Cryptosporidium parvum*, infecta al intestino delgado principalmente en becerros lactantes así como humanos y otros animales, provocándoles un cuadro de tipo diarreico. El *Cryptosporidium andersoni*, infecta el abomaso de ganado joven y maduro; infección que ha sido implicada como causa en la reducción de la producción láctea, no así, a signos de otra enfermedad. Y el *C. Bovis* que recientemente ha sido hallado principalmente en ganado de 2 a 11 meses de edad (Fayer *et.al.*, 2006).

Los protocolos usados para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces incluyen pruebas como la de Giemsa, la técnica modificada de Kinyoun, el uso de la Inmunofluorescencia (IFA), sin embargo, la sensibilidad de esta puede estar influenciada por la concentración de ooquistes y la consistencia de las heces (Leng *et.al.*, 1996). La prueba de Western Blot o “prueba de oro” (Priest *et.al.*, 1999), también ha sido usada la morfología de los ooquiste (Fayer *et.al.*, 2006). Otra alternativa consiste en realizar frotis fecales directos y diversas tinciones negativas, entre las que destaca la tinción de Heine. Las técnicas de concentración, usando las técnicas de flotación con diferentes soluciones (sacarosa de Sheather, sulfato de zinc, sulfato magnésico, cloruro sódico). Así como técnicas de sedimentación con formol-éter o formol-acetato de etilo, entre las que se incluyen tinciones basadas en las propiedades ácido-resistentes de los ooquistes (Ziehl-Neelsen modificada, tinciones con safranina como la de Baxby o Köster modificada) y las tinciones con fluorocromos como la auramina-rodamina. Conviene tener en cuenta que el umbral de detección de ooquistes en las muestras de heces es variable dependiendo de la técnica utilizada (Quilez *et.al.*, 2003).

II.- JUSTIFICACION

El inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), ha sido desarrollado para detectar la respuesta de inmunoglobulinas M (IgM) y IgG contra antígenos de los ooquistes de *Cryptosporidium* (Ungar y Nash, 1986), también, ha sido usada para el coprodiagnóstico de cryptosporidiosis en humanos (Leng *et.al.*, 1996). La técnica de ELISA usa anticuerpos monoclonales o policlonales frente a componentes de la pared (Quilez *et.al.*, 2003). En diversos trabajos realizados en hatos lecheros de la Región Lagunera, se ha demostrado la presencia y se ha determinado la prevalencia de *Cryptosporidium*, sin embargo, el método usado para determinar la presencia de este parásito ha sido por medio de la técnica modificada de Ziehl-Neelsen, técnica que requiere de tiempo y habilidad del que la realiza, por lo que este trabajo pretende utilizar la técnica de ELISA como método de diagnóstico rápido para la determinación de la presencia de *Cryptosporidium* como un componente del complejo diarreico de las terneras.

III.- OBJETIVO

Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. En un hato lechero comercial de bovinos Holstein de la Región Lagunera mediante la técnica de ELISA, muestreado en el mes de noviembre del 2008.

IV.- REVISION DE BIBLIOGRAFIA

4.1.- HISTORIA

El primer individuo en establecer el género *Cryptosporidium* y reconocer esta multiespecie fue Ernest Edward Tyzzer, aunque probablemente Clarke, en 1895 la observó por primera vez; Tyzzer describió la especie, *C. muris*, de las glándulas gástricas de un ratón de laboratorio. Posteriormente, realizó una más completa descripción de su ciclo de vida y subsecuentemente describe una segunda especie, también de un ratón de laboratorio, el *C. parvum*.

El *C. parvum* difiere de los tipos de especie en que no solamente puede infectar al intestino delgado y el estomago. Este parasito fue comúnmente confundido con otros parásitos del género *Apicomplexa*, especialmente con la coccidia del género *Sarcocystis*. Porque al igual que el género *Cryptosporidium*, algunas especies de *Sarcocystis* al desenquistarse los esporozoitos, liberan también cuatro esporoquistes. Una variedad de géneros nombrados y no nombrados fueron erróneamente asignados a este género. Estudios subsecuentes de la ultraestructura, demostraron que el estado endógeno del *Cryptosporidium* posee un único organelo de adhesión, este es la llave para definir el género y la familia, y actualmente es un componente integral en la definición taxonómica desde 1961.

Después del reconocimiento de las verdaderas diferencias entre el *Cryptosporidium* y el *Sarcocystis*, el concepto erróneo de un hospedero estricto fue aplicado a las especies de *Cryptosporidium*. Esto dio la creación de múltiples especies entre ellas *C. agni* en ovejas, *C. anserinum* en gansos, *C. bovis* en ganado, *C. cuniculus* en conejos, *C. garnhami* en humanos, y *C. rhesi* en monos. Subsecuentes estudios demostraron que el aislamiento del *Cryptosporidium* en diferentes especies animales puede frecuentemente ser por la transmisión de una especie hospedera a otra. Como resultado del uso de la morfología, el desarrollo biológico, la especificidad del hospedero, la histopatología y la biología molecular, han sido nombradas nuevas especies como, *C. andersoni* para el ganado, *C. canis* para los perros, *C. hominis* para los humanos, y *C. Molnari* para el pescado (Xiao *et. al.*, 2004; Current y Garcia, 1991; Marshall *et. al.*, 1997).

La cryptosporidiosis es una enfermedad frecuentemente hallada en animales jóvenes que provoca diarrea, pérdida de peso, mortalidad en un (40%), y una elevada morbilidad la cual puede alcanzar el 100% al final del periodo de excreción. Afecta a ruminantes, tales como becerros, corderos y cabritos, los cuales son susceptibles en un periodo de tiempo a la cryptosporidiosis, volviéndose relativamente resistentes a la infección con la edad (Mancassola *et. al.*, 1995). Dos genotipos de *C. parvum* han sido identificados por técnicas moleculares. El genotipo 2, zoonotico o “animal-adaptado” es transmisible entre ganado y humanos, considerando que el genotipo adaptado al humano es exclusivo para la población humana (Graczyk *et. al.*, 2000).

4.2.-TAXONOMIA Y CICLO BIOLÓGICO

TABLE 1. Taxonomic classification of *Cryptosporidium*

Classification	Name	Biological characteristics
Phylum	Apicomplexa	Invasive forms have apical complex with polar rings, rhoptries, micronemes, conoid, and subpellicular microtubules
Class	Sporozoasida	Locomotion of invasive forms by body flexion gliding, or undulation
Subclass	Coccidiasina	Life cycle with merogony, gametogony, and sporogony
Order	Eucoccidiorida	Merogony present; found in vertebrate hosts
Suborder	Eimeriorina	Male and female gametes develop independently
Family	Cryptosporidiidae	Homoxenous (one host life cycle), with developmental stages just under the membrane of the host cell; oocyst without sporocysts and with four sporozoites; microgametes without flagella

Fig. 1 Clasificación taxonómica de *Cryptosporidium spp.*

(Current y Garcia, 1991).

El ciclo evolutivo del *Cryptosporidium* comprende distintas fases: Esquizogonia o fase de reproducción asexual; tiene lugar después de la ingestión de ooquistes esporulados, con liberación de esporozoitos (células móviles alargadas en forma de coma y envueltas por una doble membrana) los esporozoitos, los cuales parasitan las células epiteliales del tracto gastrointestinal, estos penetran a las células epiteliales en donde se produce la maduración del trofozoito el cual se encuentra rodeado por 4 membranas, las dos externas constituyen la membrana parasitófora. El proceso de desenquistación

usualmente requiere condiciones reducidas, enzimas pancreáticas, y sales biliares; sin embargo, esto es posible porque los ooquistes de *Cryptosporidium* necesitan una solución acuosa para estimular la desenquistación. El esquizonte proviene del trofozoito dando lugar a 4 u 8 merozoitos, según se trate de esquizonte de primera o segunda generación. Gametogonia: consiste en una diferenciación sexual en macrogametocitos y microgametocitos a partir de los merozoitos que se encontraban en el esquizonte. Por la fusión de los gametos se forma el cigoto y posteriormente el ooquiste. Esporogonia: es la última fase; tiene lugar “*in situ*” y conduce a la formación de ooquistes esporulados que contienen 4 esporozitos desnudos, existiendo unos ooquistes de pared delgada (20% del total) que se desenquistan dentro del hospedador, dando lugar a la autoinfección endógena o retroinfección, y ooquistes de pared gruesa (80% del total), los cuales se excretan al medio externo.

Los esporozoitos penetran al enterocito y se desarrollan dentro los trofozoitos. El estado de trofozoito es intracelular dentro de la membrana celular pero es extracitoplasmático. Este estado se divide por multiplicación asexual y se forman seis u ocho núcleos, los cuales maduran dentro a merozoitos de tipo I –merontes-. Este estado de merozoitos puede desarrollar a merontes tipo II e iniciar la multiplicación sexual y los ooquistes desarrollados pueden reiniciar la multiplicación sexual a merontes tipo I. Los cigotos formados después de la fertilización resisten al medioambiente debido a la formación de esporogonias donde los ooquistes esporulados contienen cuatro esporozoitos. Estos ooquistes esporulados son liberados en las heces y pueden transmitir la infección de un hospedero a otro. Aproximadamente 20% de los cigotos se desarrollan dentro de la pared celular del ooquiste, los cuales representan las formas autoinfectivas del ciclo de vida y estas pueden mantener el parasito en el hospedero (Marshall *et al.*, 1997; Fayer y Ungar, 1986; Current y Garcia, 1991; Compañ Barco *et al.*, 1991; Petersen *et al.*, 1992; Steele *et al.*, 1995).

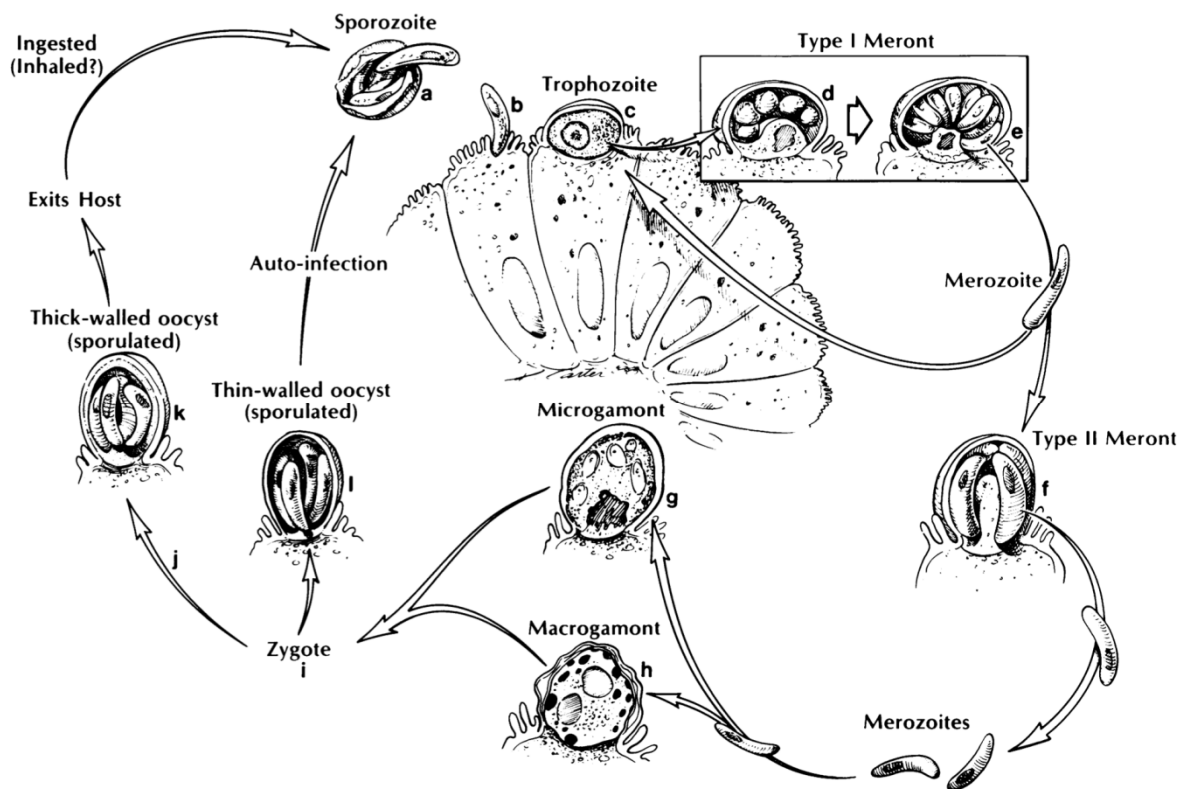


Fig. 2 Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. El esporozoito se desenquista del ooquiste esporulado y entra en las microvellosidades de una célula epitelial, donde se transforma a trofozoito. Los trofozoitos, se multiplican para formar meronte tipo I (esquizontes). Un merozoito tipo I que es producto de un meronte tipo I, y da origen a merontes tipo 2. Un merozoito tipo 2 deja el meronte tipo 2 para formar macrogametos y microgametos. El microgameto fertiliza al macrogameto, que se desarrolla en un ooquiste. Los ooquistes esporulan en el sitio y pueden liberar esporozoitos para la autoinfección o salir del cuerpo por medio de las heces (Fayer y Ungar, 1986).

4.3.- ESPECIES VALIDAS DE *CRYPTOSPORIDIUM*

Las especies nombradas de *Cryptosporidium* que son consideradas como especies incluyen *C. andersoni* (ganado), *C. Bailey* (gallinas y otras aves), *C. canis* (perros), *C. felis* (gatos), *C. galli* (aves), *C. hominis* (humanos), *C. meleagridis* (aves y humanos), *C. molnari* (peces), *C. muris* (roedores y otros mamíferos), *C. parvum* (rumiantes y humanos), *C. Wrairi* (cuyos), *C. saurophilum* (víboras y lagartijas), y *C. serpentis* (víboras y lagartijas) (Fig. 3). Otras especies de *Cryptosporidium* morfológicamente distintos han sido encontrados en peces, reptiles, aves y mamíferos pero no han sido nombradas. (Xiao *et. al.*, 2004).

Species	Major host	Minor host
<i>C. muris</i>	Rodents, bactrian camels	Humans, rock hyrax, mountain goats
<i>C. andersoni</i>	Cattle, bactrian camels	Sheep
<i>C. parvum</i>	Cattle, sheep, goats, humans	Deer, mice, pigs
<i>C. hominis</i>	Humans, monkeys	Dugongs, sheep
<i>C. wrairi</i>	Guinea pigs	
<i>C. felis</i>	Cats	Humans, cattle
<i>C. canis</i>	Dogs	Humans
<i>C. meleagridis</i>	Turkeys, humans	Parrots
<i>C. baileyi</i>	Chicken, turkeys	Cockatiels, quails, ostriches, ducks
<i>C. galli</i>	Finches, chicken, capercalles, grosbeaks	
<i>C. serpentis</i>	Snakes, lizards	
<i>C. saurophilum</i>	Lizards	Snakes
<i>C. molnari</i>	Fish	

Fig. 3.- Donde se observa la especie de *Cryptosporidium* validas; el o los hospedero(s) principalmente afectado(s) –primera columna- y el o los hospederos de menor importancia que son afectados por las especies de *Cryptosporidium* –segunda columna- (Fayer y Ungar, 1986).

4.4.- EPIDEMIOLOGIA

La especie *Cryptosporidium* es un parasito protozoario que se encuentra distribuido alrededor del mundo y es hallado en el epitelio gastrointestinal de aves, reptiles, peces y mamíferos (Ungar y Nash, 1986; Janoff y Reller, 1987). El *Cryptosporidium parvum* es un agente etiológico importante en el síndrome diarreico neonatal en el ganado, corderos y cabritos, el cual causa considerables pérdidas directa e indirectamente (De Graff *et. al.*, 2002). En humanos y ganado, primariamente becerros, corderos y niños, cryptosporidiosis es una enfermedad entérica seria causada por un parasito protozoario coccidial *Cryptosporidium parvum*, el resultado es una diarrea, deshidratación, pérdida de peso y algunas veces la muerte. *C. parvum* fue detectada en cabritos en 1981, pero desde esta fecha, pocos documentos han sido referidos a la cryptosporidiosis en cabritos (Mancassola *et. al.*, 1995). El agua es un importante medio de transmisión, entre otros aspectos por su dispersión y la elevada resistencia que poseen los ooquistes a los tratamientos comunes de potabilización ya que se necesita como mínimo 80 mg/l de cloro libre para su destrucción, esta concentración es 400 veces más la máxima permitida en agua para consumo humano (0.2 a 1.5 mg/l) (Díaz Cinco *et al.*, 2003). El *Cryptosporidium* fue reconocido en el ratón en 1907 y en diarrea en humanos en 1976 (Magi *et. al.*, 2006).

También se han encontrado ooquistes en aguas residuales y de ríos, por lo

que otro mecanismo de transmisión conllevaría la vía hídrica, siendo por tanto la infección común a otras infecciones entéricas. Por ello, se considera a la Criptosporidiosis como una de las potenciales causas de la diarrea del viajero (Compañ Barco *et al.*, 1991). Estudios epidemiológicos han demostrado que el *Cryptosporidium* es más prevalente en países en desarrollo (5% a 10%) que en países desarrollados (1% a 3%) (Iqbal *et al.*, 1999; Díaz Cinco *et al.*, 2003). La cryptosporidiosis es endémica en países en desarrollo, tales como México, y es un resultado en la pobre sanitización y las condiciones de vida (Leach *et al.*, 2000).

La especie *Cryptosporidium* es un parásito del Phylum Apicomplexa que infecta a los bordes de las microvellosidades del epitelio del tracto gastrointestinal en un amplio rango de hospederos vertebrados, incluidos humanos. Los individuos infectados muestran un amplio espectro de manifestaciones clínicas, pero la patogenicidad del *Cryptosporidium* varía con la especie de parásito y el tipo, edad y estatus inmune del hospedero. En algunos animales, la infección con *Cryptosporidium* no está asociada a signos clínicos y es considerada como autolimitante. En algunos animales, tales como reptiles infectados con *Cryptosporidium serpentis* o en individuos inmunocomprometidos, la infección es frecuentemente crónica y eventualmente puede ser letal (Xiao *et al.*, 2004).

La transmisión de una variedad de parásitos de importancia veterinaria y de salud pública realizada por las moscas ha sido reconocida, incluye los parásitos coccidiales tales como *Sarcocystis spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Isospora spp.*, y *Eimeria tenella*. La infección por *Cryptosporidium parvum* es particularmente prevalente en ganado antes del destete. El papel de los vectores mecánicos tales como las moscas como diseminadores de la infección de ooquistes de *C. parvum* en el medio ambiente y el rol de estas en la epidemiología de la cryptosporidiosis ha sido intensamente discutida pero pobremente dilucidada, bajo condiciones de laboratorio la mosca doméstica (*Musca domestica*) transporta mecánicamente ooquistes de *C. parvum* y observaciones preliminares indican que también puede ocurrir de manera natural (Graczyk *et al.*, 2000).

La cryptosporidiosis es frecuentemente la causa de diarrea en humanos, y varios grupos de ellos son particularmente susceptibles a la cryptosporidiosis. En países desarrollados, la infección con *Cryptosporidium* ocurre en su mayoría en niños menores de 5 años, con el pico de ocurrencia en niños de 2 años. En niños con múltiples episodios de cryptosporidiosis, se indica que se adquiere

inmunidad a la infección en un corto periodo de vida (Xiao *et. al.*, 2004).

Entre las especies de animales domésticos, sin duda la que es más afectada por la cryptosporidiosis es la bovina, en especial los neonatos. Los resultados de encuestas epidemiológicas son muy variables, pero por lo general indican una morbilidad alta (10-85%). El síndrome diarreico tiene una etiopatogenia compleja, pues cuando el *Cryptosporidium* es el único causante la mortalidad es baja, pero dependiendo de su asociación con otros agentes infecciosos, del grado de inmunidad y del estado nutricional del huésped, la mortalidad puede ser alta. Las edades más afectadas, conforme a las revisiones son de 4 a 30 días. Mientras más insalubres son las condiciones sanitarias del ambiente, principalmente en donde permanecen los becerros, mayor será el riesgo de contagio y presencia de la enfermedad. Al hablar respecto a la contaminación del medio ambiente, la mayoría de los autores trata el asunto de manera genérica y se limita al relato y correlación del binomio efecto – causa en consideración a la escasa literatura nacional acerca de las diarreas del ganado relacionadas con el *Cryptosporidium* y a la poca información existente sobre su frecuencia en animales portadores asintomáticos y de su contaminación (Lippi Ortolani y Castro Soares, 2003).

Los becerros neonatos pueden ser particularmente susceptibles a la infección y pueden excretar por arriba de 30 billones de ooquistes en un periodo de una a 2 semanas. Basado en una encuesta sobre 7,369 animales de 1,103 granjas localizadas en 28 estados de EEUU, se encontró que más del 50% de los animales con 2 semanas y que un 22.4% del total del ganado (edad, de 1 a 17 semanas) resultaron positivas a *C. parvum*. Los autores concluyeron que virtualmente todos los hatos con más de 100 vacas están infectadas con *C. parvum*. Otros autores hallaron que las vacas adultas excretan por encima de 18,000 ooquistes por gramo de heces y estas aparentemente están sanas. Basados en un promedio donde existen 900 ooquistes por gramo de heces y donde la excreción total de heces es de 40 kg por día, un adulto podría excretar cerca de 36 millones de ooquistes al día (Kuczynska y Shelton, 1999). Los ooquistes de *Cryptosporidium* son esféricos (los de *C. parvum*, miden cerca de 3 a 5.1 μm de diámetro) y son excretados a un número de hasta 2×10^5 o de 2×10^7 ooquistes por g de heces por becerro (Ongerth y Hstibbs, 1987).

El impacto económico de la cryptosporidiosis es comparable con el de la infección de rotavirus. El promedio de pérdidas anuales debido a la

cryptosporidiosis bovina en Estados Unidos fue subestimada en 6.2 millones de dólares en 1978, pero recientemente el dato sugiere que el estimado fue menor. Los animales infectados excretan un elevado número de ooquistes. La media total de ooquiste excretados en animales infectados experimentalmente están en 2.5×10^{10} (Villacorta *et al.*, 1991).

Numerosos reportes han sugerido que la transmisión de *Cryptosporidium* a humanos por otros humanos infectados es posible por medio de la transmisión sexual y el contacto no sexual (en la casa y en los hospitales), la ingestión de agua de bebida o el alimento por contacto de animales infectados (Colford *et al.*, 1996).

Varios estudios han reportado la prevalencia de la infección en la población del ganado por *C. parvum*. En un estudio nacional en las granjas en Estados Unidos en 1,103 vacas, el parásito fue detectado en 59% de las granjas, y aproximadamente la mitad de todos los animales infectadas estaban entre 7 y 21 días de edad. En el estado de Washington, *C. parvum* fue recuperado de las heces un 41% en ganado lechero de 7-21 días, mientras que en Manitoba. *C. parvum* fue detectado en 63% de los hatos. El *C. parvum* fue identificado en 88.7% de 505 animales en Québec. Actualmente, no existen drogas o vacunas que sirvan para la prevención o tratamiento del parásito.

Sin embargo, recientemente la halofuginona, una quinazolinona, ha mostrado que tiene actividad contra *C. parvum*. Posteriormente, trabajos de investigación indican que el lactato de halofuginona (Halocur®) es efectivo en la reducción y secreción de los ooquistes de *C. parvum* y en la prevención de diarrea (McKnight *et al.*, 2003).

En un estudio realizado en durante cuatro años de investigación en 541 vacas de 2 años de edad se observó que el total de la prevalencia de animales infectados por *Cryptosporidium* fue elevada en animales antes del destete y declina en animales adultos. Durante este tiempo fueron observados tres especies de *Cryptosporidium* y un genotipo: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* y el genotipo ligado a venado de *Cryptosporidium*, respectivamente.

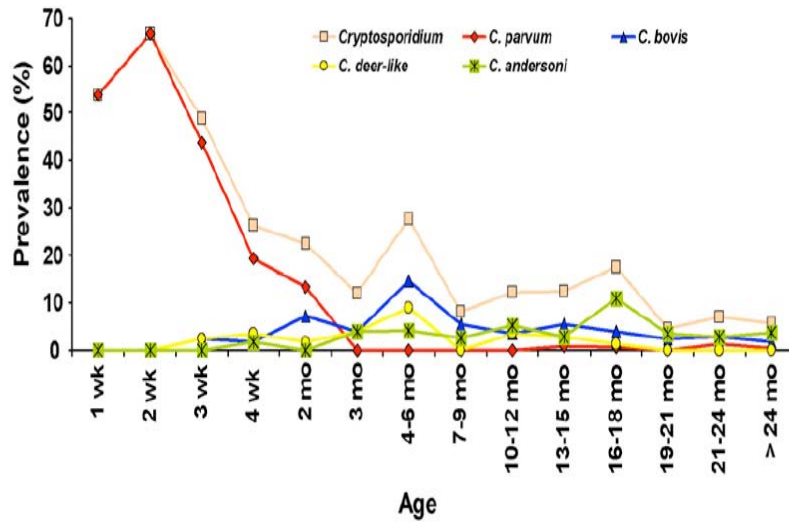


Fig. 4. Donde se observa la prevalencia del ganado infectado de 1 semana de edad a > de 2 años por especie y genotipo derivado en todos los animales examinados en 14 granjas en 7 estados durante un periodo de 4 años. (Fayer *et. al.*, 2007)

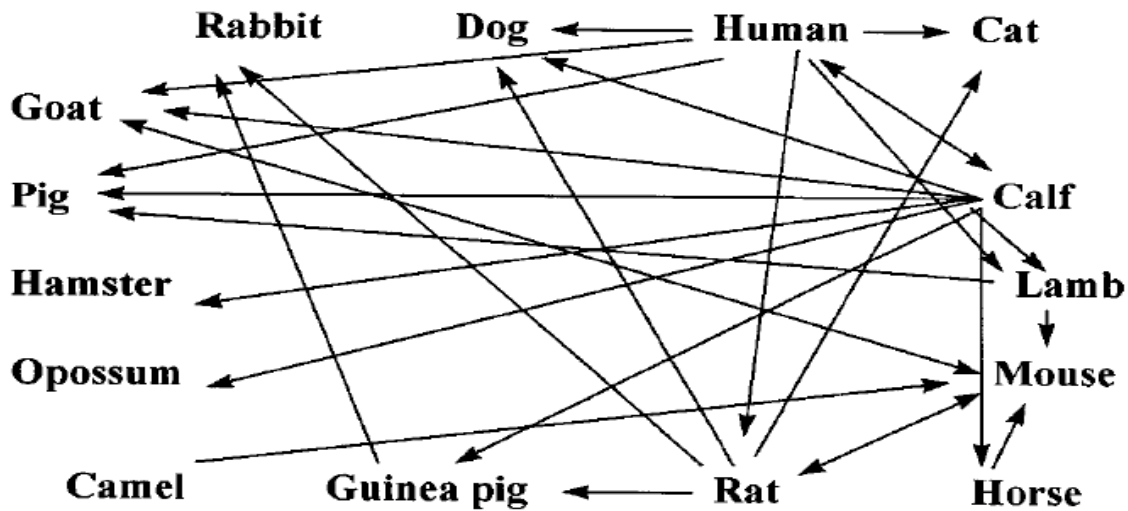


Fig.5.- Transmisión documentada de *Cryptosporidium parvum* entre mamíferos. La dirección de las flechas indica la ruta de infección. En algunos casos especiales con humanos, las flechas son unidireccionales porque revelan estudios que no han sido conducidos. (Pell, 1997)

4.5.- TRATAMIENTO

En el tracto gastrointestinal, los ejemplos de defensa innata incluyen procesos físicos, tales como peristalsis y excreción por las células epiteliales y barreras químicas, que incluyen acidificación gástrica, moco, ácidos biliares, y proteínas. Entre las proteínas, las cuales contribuyen a la defensa de microorganismos están varios péptidos recientemente identificados en los extractos gastrointestinales de la mucosa gastrointestinal. *In situ* el análisis de hibridación ha demostrado que algunos de estos péptidos son sintetizados por las células epiteliales. Otros péptidos antibióticos aparecen como productos de leucocitos que migran hacia el intestino (Tarver *et. al.*, 1998).

No existe una quimioterapia disponible para este organismo. El tratamiento de soporte de forma oral y rehidratación intravenosa son el tratamiento para pacientes inmunocompetentes. Para individuos inmunocomprometidos, el tratamiento puede estar ligado a la vida. Para el tratamiento de la infección se han usado numerosas drogas antiparasitarias y antimicrobianas pero no se ha probado su efectividad. Reportes sugieren que la espiamicina tiene mediana efectividad (Marshall *et. al.*, 1997; McDonald *et. al.*, 1990).

A la fecha, algunas drogas han sido probadas para la terapia de profilaxis. Unas pocas de estas (lasalocid en becerros y halofuginona en corderos y ganado) son efectivas, pero no están comercialmente disponibles debido a que la dosis necesaria provoca toxicidad en los animales. Recientemente varios estudios mostraron eficiencia con el uso de la paromomicina *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de cryptosporidiosis en humanos con SIDA y en animales (ratones y ganado). El aminoglucosido paromomicina es bien absorbido de forma oral a dosis de 3.5 mg. Está disponible comercialmente y tiene un espectro antimicrobial amplio (Mancassola *et. al.*, 1995).

Más de 90 agentes quimioterapéuticos y regímenes terapéuticos han sido probados en humanos y animales infectados con *C. parvum*. La falla en las terapias de control de cryptosporidiosis tiene como consecuencia grave el desarrollo crónico de diarrea criptosporidial. El descubrimiento de péptidos líticos (cecropines) y la identificación de estos (magaininas) en la piel de ranas ha abierto una nueva área de investigación dentro de los compuestos antimicrobiales. Las proteínas anfipáticas que constituyen esta nueva clase de agentes son generalmente muy pequeñas, menos de 36 aminoácidos (con peso

molecular de <4,000 Da), y aparentemente con caras hidrofílicas e hidrofóbicas, estas facilitan la interacción con las membranas. Los cecropines, magaininas, y análogos sintéticos de estas moléculas forman canales iónicos en las membranas celulares lipídicas (Arrowood *et. al.*, 1991).

Una amplia variedad de drogas, entre ellas agentes antiparasitarios como la pirimetamina, artemisina y drogas como la trimetoprim-sulfametoxazole, no han mostrado su eficacia sobre *C. Parvum*. Sin embargo, la dapsona, minociclina y los inhibidores dihidrofolato reductasa muestran buena actividad in-vitro e in-vivo contra la coccidia. La Azitromycina a dosis de 8 mg/l, claritromycina en 8 mg/l, roxitromicina en 16 mg/l y la espiramycin a dosis de 16 mg/l en combinación con minociclina en dosis de 2 mg/l y la pirimetamina a 0.05 mg/l mostraron reducción significativa en el conteo de los ooquistes liberados (Giacometti *et. al.*, 1996). Desafortunadamente, ninguna de las 79 drogas probadas experimentalmente para la cryptosporidiosis muestran clara actividad. Recientemente, Naciri e Yvord reportaron que el lactato de halofuginona, una variante química anticoccidial del bromohidrato de halofuginona, detiene la excreción experimental de ooquistes en corderos infectados (Villacorta *et. al.*, 1991).

4.6.- MECANISMOS ANTIGENICOS

El suceso de transferencia de inmunoglobulinas por la madre depende de la calidad y cantidad de inmunoglobulinas en el calostro y la cantidad consumido y absorbido por el neonato. El yeyuno es el sitio más activo de absorción de inmunoglobulinas. La absorción por las células epiteliales en el yeyuno son capacitadas para poseer receptores los cuales median la unión y transporte de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas calostrales son selectivamente absorbidas a través del epitelio del yeyuno, y transferidas intracelularmente, y liberadas dentro de los vasos linfáticos. Las moléculas de inmunoglobulinas entran en la circulación por medio del conducto torácico intestinal. El neonato normal succiona calostro después del nacimiento, y las inmunoglobulinas en el suero son detectadas en 4 horas, en el ganado y cerdo tres horas. En corderos, las inmunoglobulinas han sido detectadas intactas en el ducto linfático torácico de 6 a 120 minutos después de la administración duodenal. La absorción por las células epiteliales pueden absorber las inmunoglobulinas del calostro cerca de 24

posteriores al nacimiento y 48 horas en corderos y cerdos. Sin embargo. La eficacia de la absorción en estos tiempos son reducidos. Esto ha sido observado en ganado y cerdos porque la absorción de inmunoglobulinas son más eficientes durante las primeras 4 horas posnacimiento (Holland, 1990; Riggs y Perryman, 1987).

En ratones inmunodeficientes la infección de *C. parvum* ha mostrado que los linfocitos T son importantes en la prevención intestinal crónica y que los linfocitos CD41 y el gamma interferón (IFN-g) son requeridos para acabar con la infección persistente. Sin embargo, en estudios en ratones los cuales no han definido los mecanismos de la mucosa intestinal el hospedero inmunocompetente se recupera de la enfermedad. La infección localizada en el intestino delgado resulta en la atrofia de las vellosidades y su función, con infiltración leucocitaria dentro de la mucosa intestinal. A pesar de la elevada morbilidad, la mortalidad es baja y la recuperación es espontánea. La respuesta inmune mediada por los linfocitos T ha sido implicada en la recuperación del ganado por la infección de *C. Parvum* (Wyatt *et. al.*, 1997).

La infección es autolimitante y la inmunidad está basada en inmunoglobulinas y células T. Los antígenos predominantemente reconocidos por los anticuerpos de *C. parvum* forman un rango amplio en la inmunidad animal. El resultado de la clonación de antígenos de superficie resulto en la expresión de: CP15, el CP15/60 y el P23. El CP15 y el P23 han sido implementados en el desarrollo de vacunas pasivas para cryptosporidiosis en rumiantes (De Graff *et. al.*, 2002). En el ratón lactante, los anticuerpos monoclonales usados contra la superficie de las proteínas de los esporozoitos limitan el desarrollo del parásito. La administración profiláctica de suero hiperinmune de calostro bovino (HBC) resulta en la reducción significativa en el número de parásitos en ratones y ganado infectados con *C. parvum* (Tilley *et. al.*, 1990). La infección de humanos y animales con *C. parvum* muestra el desarrollo de inmunoglobulinas características G (IgG), IgA, y IgM como respuesta de los anticuerpos con antígenos de bajo peso molecular 27- y 17-kDa. Trabajos preliminares sugieren que la presencia de anticuerpos contra esos dos antígenos inmunodominantes es asociado a la protección de la infección durante los síntomas. Estos antígenos pueden ser importantes durante la invasión de la célula hospedadora, desde la administración oral de anticuerpos monoclonales contra el antígeno de 27-kDa es capaz de reducir la infección en el

ratón neonato. En el pasado, la respuesta a los anticuerpos ha sido seguida por el uso de extracto de desechos de ooquistes con antígenos usados en ELISA o el ensayo de Western Blot (Priest *et. al.*, 1999).

Como un resultado de la infestación masiva de cryptosporidiosis que ocurrió en Milwaukee, Wisconsin, afectando un estimado de 403,000 individuos. El *Cryptosporidium* ha sido reconocido en todo el mundo como una causa común de infecciones gastroentericas las cuales tienen como característica resultante una diarrea que en algunos casos puede ser profusa y prolongada. Esta fue ampliamente documentada como enfermedad transmitida por el agua en los Estados Unidos. La persistencia, severidad y la presentación de la infección dependen de una variedad de características del parásito y el hospedero. (Meinhardt *et. al.*, 1996; Harp y Goff, 1998; Giacometti *et. al.*, 1996).

4.7.- PERDIDA DE LA INFECTIVIDAD

El medioambiente puede ser otra fuente de infección debido a la alta resistencia de los ooquistes (la infectividad únicamente es destruida por el frío o el calor a -18° C durante 24 horas o a 65° C durante 30 minutos, y como agentes químicos sólo el hidróxido de amonio al 5 por 100 y el formaldehído al 10 % pueden ser eficaces), lo cual posibilita una vía de transmisión indirecta (Compañ Barco *et al.*, 1991). La completa pérdida de infectividad fue observada con 5 días a 37.8 °C y 2 semanas de 15 a 20.8 °C. Los ooquistes almacenados a 48 °C experimentalmente pierden progresivamente la infectividad: la infectividad no fue detectada después de los 60 días en agua destilada, 80 días en albúmina sérica al 5%, 100 días en fosfato bufferado, y 190 días en dicromato potásico al 2.5% (Fayer y Nerad, 1996). El mecanismo inmune exacto para la respuesta a este no ha sido bien definido. Sin embargo, se ha reportado que la infección crónica con *C. parvum* establecida en un ratón infectado puede ser tratada *in vivo* con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8. Además, durante la infección crónica la excreción de ooquistes cesa seguida de una transferencia de células linfoides al sistema inmune. Este dato indica que la respuesta mediada por las células son necesarias para la recuperación y resistencia de la criptosporidiosis (Whitmire y Harp, 1991). Los ooquistes de *Cryptosporidium* son extremadamente resistentes a los más comunes desinfectantes. La viabilidad no se ve afectada por la exposición al hipoclorito de sodio en concentración de 1.05 al 3% por 18 h.

Pero la exposición a formalina al 10%, o al 5 a 10% de amonio, y al 70 o 100% fue necesaria para eliminar completamente la infectividad. Treinta minutos de exposición a temperaturas entre 65°C o el congelamiento disminuye la infectividad. Un reciente estudio donde se examinó la influencia del ozono y el dióxido de cloro sobre la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en agua de bebida mostró que el tratamiento con 1.11 ppm de ozono (1.11 mg/l) elimina completamente la infectividad en 5 min. Y que 15 a 30 min. Con una exposición a 0.43 ppm de dióxido de cloro reduce significativamente la cantidad de la producción de ooquistes en un ratón inoculado con ooquistes) (Korich *et. al.*, 1990). El tratamiento de la leche a base de elevar y reducir la temperatura (HTST), o por medio de la pasteurización es un practica estandarizada en los países desarrollados y ha eliminado varias enfermedades infecciosas que se transmiten por vía láctea (Harp *et. al.*, 1996). Recientemente se demostró que el uso secuencial de ozono seguido de cloro libre fue capaz de inactivar a los ooquistes de *Cryptosporidium*. Estos resultados sugieren que la combinación de desinfectantes a través de la sinergia de desinfectantes químicos puede tener acción sobre diversos sitios de acción sobre el ooquiste (Venczel *et. al.*, 1997)

4.8.- METODOS DE DIAGNOSTICO

El método convencional que incluye la tinción por medio de Ziehl-Neelsen, los cuales son comúnmente usados para el diagnóstico. Los ooquistes se tiñen de rojo y se deben diferenciar de *Cyclospora*. Sin embargo, por medio del microscopio convencional es tardado y tedioso y requiere experiencia para identificar a los ooquistes. Además, el diagnostico convencional es limitado puesto que determina solo muestras con menos de 50,000 a 500,000 ooquites por gramo de heces. Los ooquistes excretados generalmente pueden ser intermitentes e ir de altos a leves. La biopsia del intestino delgado no es usualmente necesario para el diagnostico. En efecto, la biopsia puede darnos falsos negativos, y depende del área infectada porque el parasito se encuentra en áreas de distribución las cuales no son concentradas (Hoepelman, 1996; Morgan *et. al.*, 1998). Los métodos convencionales para la identificación incluyen examinación fecal usando coloraciones como la de auramine-rodamina. (C. Kehl *et. al.*, 1995).

Se incluyen una amplia variedad de técnicas para la detección de ooquistes de *Cyptosporidium* oocysts. Las técnicas de coloración, sin embargo, consumen tiempo y requieren de experiencia en el microscopio, y la sensibilidad y especificidad varían con el numero ooquistes eliminados. Este es comúnmente usado para el diagnostico de *Cyptosporidium* donde ELISA puede detectar mas especímenes de *Cryptosporidium* en la examinación microscópica, y es suficientemente sensible y específica para detectar casos clínicos de cryptosporidiosis. Algunos reportes describen la prevalencia de la infección de *Cryptosporidium* por técnicas de examinación microscópica convencional en becerros y pavos diarreicos y no diarreicos han sido reportados. Sin embargo, existen pocos estudios de determinación de antígenos fecales (Sevinc *et al.*, 2003). El diagnostico de cryptosporidiosis en esta especie está basada en la detección de los ooquistes en las heces, más recientemente se utiliza el inmunoenzayo ligado a enzimas (ELISA) para detectar antígenos de *C. parvum* antígenos en el suero algunos anticuerpos parasitarios. La presencia de especies de *Cryptosporidium* en el medioambiente está determinado por el análisis de muestras concentradas por el uso de antiooquistes monoclonales (Ortega Mora *et. al.*, 1992).

V.- MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en los meses de Noviembre y Diciembre de 2008, contando con dos fases: fase de campo y fase de laboratorio. Ambas se realizaron en el municipio de Torreón, ubicado en la Región Lagunera de Coahuila, México. La cual se encuentra en una Latitud 26° 23' N y longitud 104° 47' W y 1100 a 1400 msnm). La Región Lagunera presenta un clima desértico, con una precipitación promedio que oscila entre los 200 y 250 mm, y una temperatura de 27 °C.

La fase de campo se realizó en el mes de Noviembre de 2008 en la Promotora Láctea de la Laguna SPRL, donde se tomaron muestras de heces directamente del recto del animal de 46 becerras Holstein con edades que fluctuaban entre 1 y 64 días de edad, posteriormente fueron identificadas y refrigeradas para su posterior manejo en el laboratorio.

La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Unidad Laguna, en este, las muestras de heces obtenida durante la fase de campo, fueron sometidas a la prueba de detección de *Cryptosporidium* mediante la técnica de ELISA (mediante el Kit comercial del Instituto pourquier).

VI.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos nos muestran que del total de las 46 muestras obtenidas, solo 6 (13.04%) resultaron positivas, mientras que 40 de estas (86.96%), resultaron negativas.

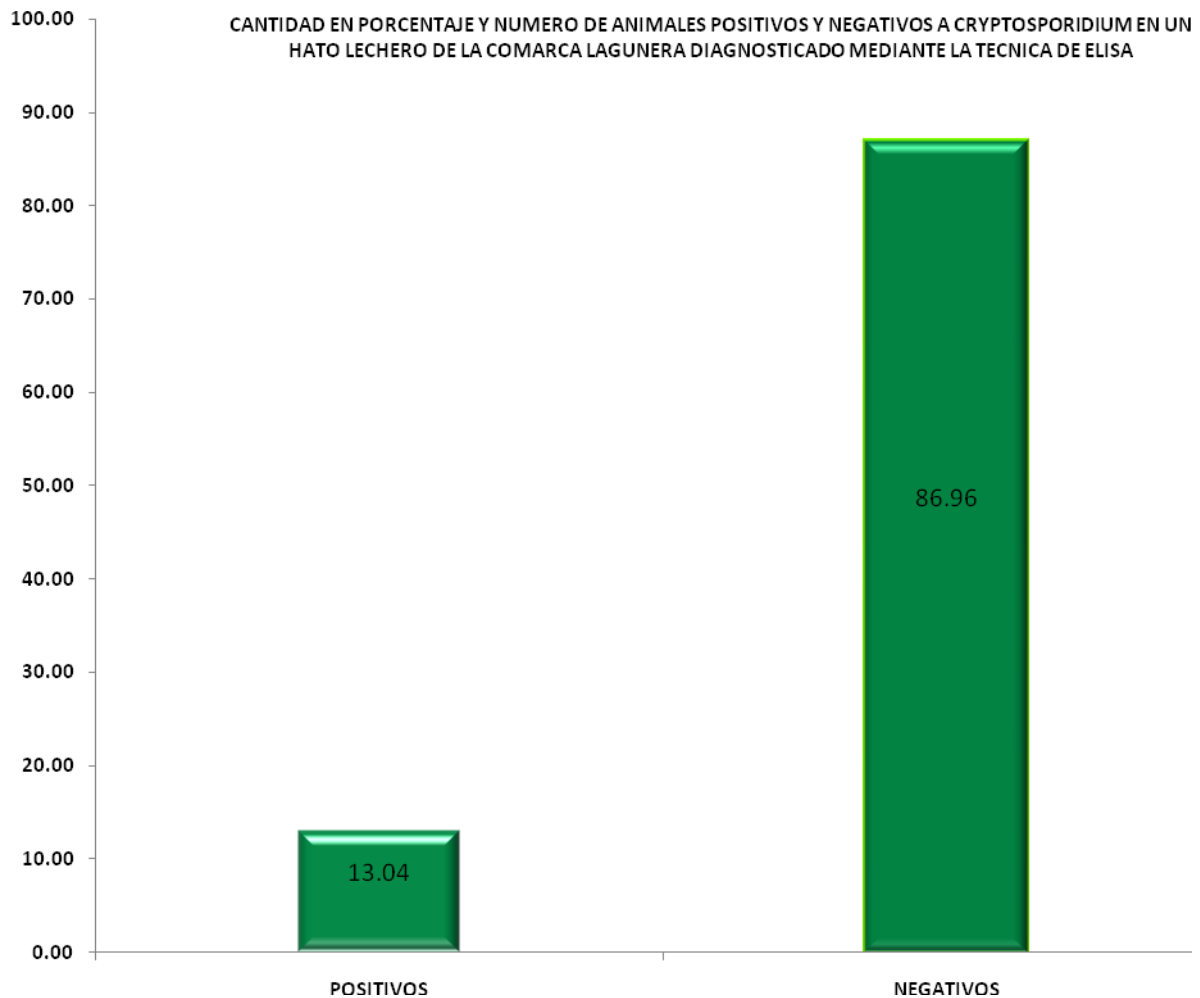


Fig. 6 Donde se observa el porcentaje de animales positivos y negativos a *Cryptosporidium* spp mediante la técnica de ELISA en un hato lechero de la Región Lagunera

En efecto, al promediar los grupos de animales positivos y negativos a la presencia de cryptosporidiosis, y al tomarse en cuenta la edad y el peso al nacimiento, ningún grupo mostró diferencias en cuanto a la presencia del parásito, lo que sugiere que estas características no influyen sobre la presencia o no de la cryptosporidiosis.

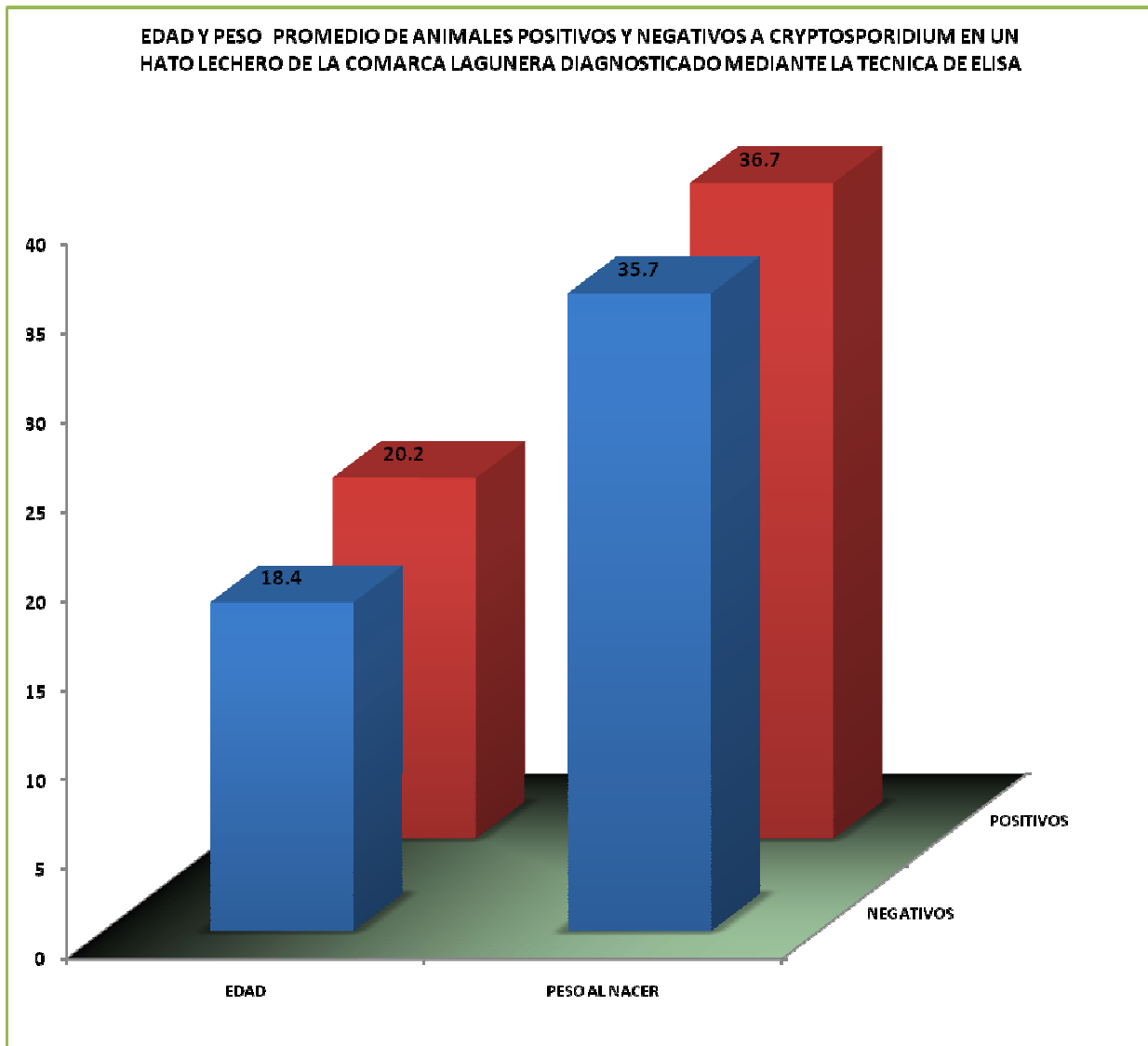


Fig.7 Donde se observa la edad y el peso promedio de las becerras muestreadas en un hato lechero y que resultaron positivas y negativas a la presencia de *Cryptosporidium* mediante la técnica de ELISA.

VII.- DISCUSION

Nuestros resultados coinciden con lo encontrado por otros autores, donde se refiere que la sensibilidad y especificidad de esta prueba sobrepasa a aquellas, tales como tinciones rápidas, además de ser más específicas en animales con presencia de diarrea. Sin embargo, contrastan con los porcentajes de animales infectados, esto probablemente se deba a la cantidad de animales muestreados. Así pues, la técnica de ELISA es comúnmente usada para el diagnóstico de cryptosporidiosis. Esta ha sido reportada para detectar mas especímenes de *Cryptosporidium* que la examinación microscópica, y es suficientemente sensitiva y específica para detectar casos clínicos de cryptosporidiosis (Sevinc *et al.*, 2003). En estudios recientes se encontró que la prueba de ELISA se mostro mas especifica que tinciones acidas rápidas. Estos hallazgos confirman lo de otros reportes, donde de 62 muestras, 51 resultaron positivas a ELISA en becerros con diarrea. Mientras que en animales no diarreicos, 11 de 20 resultaron positivos a la tinción acida rápida, pero todas fueron positivas a ELISA. Esta especificidad fue alta para becerros diarreicos y no diarreicos. La presencia de la infección de *Cryptosporidium parvum* fue más comúnmente observada en animales de 4 a 30 días de edad y en becerros diarreicos. La prueba es altamente especifica y sensibilidad comparada con las técnicas de flotación (Sevinc *et al.*, 2003; Butler y Mayfield, 1996). Aunque la respuesta a *Cryptosporidium* se da por IgA, IgM, y IgG la respuesta de detección por ELISA y IFA, el juego de estos anticuerpos en el papel de la protección inmunitaria es cuestionable (Current y Garcia, 1991). Comparando al menos dos técnicas microscópicas de diagnostico de la infección, en términos de personal y economía, la técnica de ELISA es mucho mas practica. Las muestras son fáciles de preparar por ELISA, aunque las muestras refrigeradas tienen un efecto adverso sobre la prueba de ELISA en las muestras positivas, pero no sobre las negativas. En resumen, la prueba de ELISA se describe como una prueba simple en lugar de dos o más técnicas convencionales microscópicas. La prueba puede eliminar estructuras que son complicadas de identificar por procesos de la tinción y reconocer la morfología de los ooquistes pequeños de *Cryptosporidium*. (Ungar, 1990). Al comparar la sensibilidad para la detección de los ooquistes. ELISA, resulto más sensible a la detección de ooquistes (3×10^5 /ml de heces) que aquellos examinados por pruebas acidas rápidas (1×10^6 /ml de heces (Anusz *et al.*, 1990)

VIII. - LITERATURA CITADA:

- Anusz, K. Z., P. H. Mason, M. W. Riggs, and L. E. P. Erryman. 1990. Detection of cryptosporidium parvum oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 2770-2774.
- Arrowood, M. J., J. M. Jaynes, and M. C. Healey. 1991. In vitro activities of lytic peptides against the sporozoites of cryptosporidium parvum. *antimicrobial agents and chemotherapy* 35: 224-227.
- Butler, B. J., and C. I. Mayfield. 1996. *Cryptosporidium* spp. - a review of the organism, the disease, and implications for managing water resources. Waterloo Centre for Groundwater Research Waterloo, Ontario, Canada.
- C. Kehl, K. S., H. Cicirello, and P. L. Havens. 1995. Comparison of four different methods for detection of *cryptosporidium* species. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 416-418.
- Colford, J., John M. , I.B. Tager, A.M. Hirozawa, G.F. Lemp, T. Aragon, and C. Petersen. 1996. Cryptosporidiosis among Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *American Journal of epidemiology*. 144:807-816.
- Compañ Barco, M. D., A. L. González, and M. M. M. Suárez Varela. 1991. Consideraciones epidemiológicas sobre criptosporidiosis. *Rev San Hig Púb* 65: 363-370.
- Current, W. L., and L. S. Garcia. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 325-358.
- De Graaf, D. C., H. De Coninck, Petry Franz , I. B. Eeckhout, and J. E. Peeters. 2002. Specific bovine antibody response against a new recombinant *cryptosporidium parvum* antigen containing 4 zinc-finger motifs. *The Korean Journal of Parasitology* 40: 59-64.
- Días Cinco, M. E., E. E. Leyva Michel, V. Mata Haro, y H. Gonzáles Ríos. 2003. Incidencia y viabilidad de cryptosporidium parvum en el agua potable de ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista internacional de contaminación ambiental* 19: 67-72.
- Fayer, R., and T. Nerad. 1996. Effects of low temperatures on viability of *cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1431-1433.
- Fayer, R., M. n. Santín, J. M. Trout, and E. Greiner. 2006. Prevalence of species and genotypes of cryptosporidium found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern united states. *Veterinary Parasitology* 135: 105-112.

- Fayer, R., M. Santin, and J. M. Trout. 2007. Prevalence of cryptosporidium species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern united states compared with younger cattle from the same locations. *Veterinary Parasitology* 145: 260–266.
- Fayer, R., and B. L. P. Ungar. 1986. Cryptosporidium spp. And cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews* 50: 458-483.
- Giacometti, A., O. Cirioni, and G. Scalise. 1996. In-vitro activity of macrolides alone and in combination with artemisin, atovaquone, dapson, minocycline or pyrimethamine against *cryptosporidium parvum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 38: 399-408.
- Graczyk, T.K., R. Fayer, K. Ronald, B. Mhangami-Ruwende, J.M. Trout, A.J. Da Silva, and N.J. Pieniazek. 2000. Mechanical Transport and Transmission of *Cryptosporidium parvum* Oocysts BY Wild Filth Flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,. 63:178–183.
- Harp, J. A., R. Fayer, B. A. Pesch, and G. J. Jackson. 1996. Effect of pasteurization on infectivity of *cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2866–2868.
- Harp, J. A., and J. P. Goff. 1998. Strategies for the control of cryptosporidium parvum infection in calves. *J Dairy Sci* 81: 289–294.
- Hoepelman, A. I. M. 1996. Current therapeutic approaches to cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37: 871-880.
- Holland, R. E. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews* 3: 345-375.
- Iqbal, J., M. Arif Munir, and M. A. Khan. 1999. *Cryptosporidium* infection in young children with diarrhea in Rawalpindi, Pakistan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 868–870.
- Janoff, E. N., and L. B. Reller. 1987. Cryptosporidium species, a protean protozoan. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 967-975.
- Korich, D. G., J. R. Mead, M. S. Madore, N. A. Sinclair, and C. R. Sterling. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on cryptosporidium parvum oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1423-1428.
- Kuczynska, E., and D. R. Shelton. 1999. Method for detection and enumeration of *cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2820–2826.

- Leach, C. T., F. C. Koo, T. L. Kuhls, S. G. Hilsenbeck, and J. H. B. 2000. Prevalence of *cryptosporidium parvum* infection in children along the texas-mexico border and associated risk factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62: 656–661.
- Leng, X., D. A. Mosier, and O. R. D. 1996. Simplified method for recovery and pcr detection of *cryptosporidium* DNA from bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 643–647.
- Lippi Ortolani, E., and P. Castro Soares. 2003. *Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros*. *Parasitol Latinoam* 58: 122 - 127.
- Magi, B., V. Canocchi, G. Tordini, C. Cellesi, and A. Barberi. 2006. *Cryptosporidium* infection: Diagnostic techniques. *Parasitol Res* 98: 150–152.
- Mancassola, R., J. M. Reperant, M. Naciri, and C. Chartier. 1995. Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrobial agents end chemotherapy* 39: 75–78.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega, and C. R. Sterling. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *clinical microbiology reviews* 10: 67–85.
- McDonald, V., R. Stables, D.C. Warhurst, M.R. Barer, D.A. Blewett, H.D. Chapman, G.M. Connolly, P.L. Chiodini, and K.P.W.J. McAdam. 1990. In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium parvum* and Screening for Anticryptosporidial Drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 34:1498-1500.
- McKnight, D., B. Jarvie, A. Peregrine, K. Leslie, and P. Sharpe. 2003. Evaluation of the effect of halofuginone lactate (halocur®) on performance and occurrence of c. *Parvum* in post-natal dairy calves.
- Meinhardt, P. L., D. P. Casemore, and K. B. Miller. 1996. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiologic Reviews* 18: 118-136.
- Morgan, U.M., L. Pallant, B.W. Dwyer, D.A. Forbes, G. Rich, and R.C.A. Thompson. 1998. Comparison of PCR and Microscopy for Detection of *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens: Clinical Trial. *Journal of clinical microbiology*. 36:995–998.
- Ongerth, J. E., and E. H. Hstibbs. 1987. Identification of cryptosporidium oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 672-676.
- Ortega Mora, L. M., J. M. Troncoso, F. A. Rojo-Vázquez, and M. Gómez-Bautista. 1992. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against cryptosporidium parvum oocysts. *Infection and Immunity* 60: 3442-3445.

- Pell, A. N. 1997. Manure and microbes: Public and animal health problem? *J Dairy Sci* 80: 2673–2681.
- Petersen, C., J. Gut, J. H. Leech, and R. G. Nelson. 1992. Identification and initial characterization of five cryptosporidium parvum sporozoite antigen genes. *Infection and Immunity* 60: 2343-2348.
- Priest, J.W., J.P. Kwon, D.M. Moss, J.M. Roberts, M.J. Arrowood, M.S. Dworkin, D.D. Juranek, and P.J. Lammie. 1999. Detection by Enzyme Immunoassay of Serum Immunoglobulin G Antibodies That Recognize Specific *Cryptosporidium parvum* Antigens. *Journal of clinical microbiology*. 37:1385–1392.
- Quílez, J., C. Sánchez-Acedo, and E. del Cacho. 2003. Criptosporidiosis de los pequeños rumiantes. *Peq. Rum.* 4: 1-7.
- Riggs, M. W., and L. E. Perryman. 1987. Infectivity and neutralization of cryptosporidium parvum sporozoites. *Infection and Immunity* 55: 2081-2087.
- Sevinc, F., K. Irmak, and M. Sevinc. 2003. The prevalence of *cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoeic and non- diarrhoeic calves. *Revue Méd. Vét.* 154: 357-361.
- Steele, M.I., T.L. Kuhls, K. Nida, C.S. Reddy Meka, I.M. Halabi, D.A. Mosier, W. Elliott, D.L. Crawford, and R.A. Greenfield. 1995. A *Cryptosporidium parvum* Genomic Region Encoding Hemolytic Activity. *Infection and immunity*. 63:3840–3845.
- Tarver, A.P., D.P. Clark, G. Diamond, J.P. Russell, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, K.S. Cohen, D.E. Jones, R.W. Sweeney, M. Wines, S. Hwang, and C.L. Bevins. 1998. Enteric α -Defensin: Molecular Cloning and Characterization of a Gene with Inducible Intestinal Epithelial Cell Expression Associated with *Cryptosporidium parvum* Infection. *Infection and immunity*. 66:1045–1056.
- Tilley, M., R. Fayer, A. Guidry, S. J. Upton, and B. L. Blagburn. 1990. *Cryptosporidium parvum* (apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocyst and sporozoite antigens recognized by bovine colostrum antibodies. *Infection and Immunity* 58: 2966-2971.
- Ungar, B. L. P. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of cryptosporidium antigens in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 2491-2495.
- Ungar, B. L. P., and T. E. Nash. 1986. Quantification of specific antibody response to cryptosporidium antigens by laser densitometry. *Infection and immunity* 53: 124-128.

- Venczel, L. V., M. Arrowood, M. Hurd, and M. D. Sobsey. 1997. Inactivation of *cryptosporidium parvum* oocysts and *clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1598–1601.
- Villacorta, I., J. E. Peeters, E. Vanopdenbosch, E. Ares Mazas, and H. Theys. 1991. Efficacy of halofuginone lactate against *cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 283-287.
- Whitmire, W. M., and J. A. Harp. 1991. Characterization of bovine cellular and serum antibody responses during infection by *cryptosporidium parvum*. *Infection And Immunity* 59: 990-995.
- Wyatt, C.R., E.J. Brackett, L.E. Perryman, A.C. Rice-Ficht, W.C. Brown, and K.I. O'Rourke. 1997. Activation of Intestinal Intraepithelial T Lymphocytes in Calves Infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infection and immunity*. 65:185–190.
- Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan, and S. J. Upton. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72–97.