

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



CRYPTOSPORIDIUM EN BECERROS

POR

ROBERTO DAMIÁN SANTIAGO

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN/COAHUILA, MÉXICO

OCTUBRE DE 2012

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



CRYPTOSPORIDIUM EN BECERROS

MONOGRAFÍA

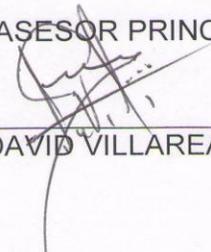
POR

ROBERTO DAMIAN SANTIAGO

MONOGRAFIA QUE SOMETE A LA CONSIDERACION DEL H.JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO
DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR PRINCIPAL


MC.DAVID VILLAREAL REYES

TORREON/COAHUILA, MEXICO

OCTUBRE DE 2012

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



CRYPTOSPORIDIUM EN BECERROS
MONOGRAFÍA
POR

ROBERTO DAMIAN SANTIAGO

APROBADO POR:

M.C. DAVID VILLAREAL REYES
ASESOR PRINCIPAL

M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONZO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**



TORREON/COAHUILA, MEXICO

OCTUBRE DE 2012

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

CRYPTOSPORIDIUM EN BECERROS

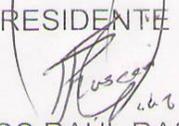
MONOGRAFIA QUE SOMETE A LA CONSIDERACION DEL H. JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO
DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

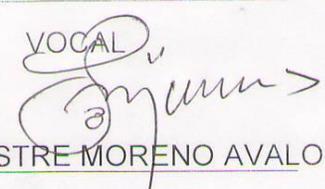
PRESIDENTE DEL JURADO


M.C. DAVID VILLAREAL REYES

PRESIDENTE


M.V.Z. CARLOS RAUL RASCON DIAZ

VOCAL


M.V.Z. SILVESTRE MORENO AVALOS

VOCAL


M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONZO

VOCAL SUPLENTE

TORREON/COAHUILA, MEXICO

OCTUBRE DE 2012

AGRADECIMIENTOS

A dios principalmente por haberme dado la dicha de la vida, para mí siempre fue un ejemplo de motivación, el creer el saber que todos tenemos un objetivo en este mundo y yo al cumplirlo se lo agradezco.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por tener la bondad de llevar las convocatorias, a todo rincón del país ya que sin eso jamás me hubiera enterado de esta magnífica universidad, y por ofrecer carreras tan maravillosas como es la Médico Veterinario Zootecnista.

Y agradezco desde en el muy afondo de mi corazón a toda mi familia, a mi mama, a mi papa que ya no está conmigo pero que sé que le causa una gran felicidad haber terminado esta carrera que fue lo que siempre él quiso, a todas mis hermanas, tíos y primos.

DEDICATORIAS

A mi familia por todo el apoyo que me brindaron en todos estos años de estudio, tanto económico como motivacional, a mi mamá en especial, que era una de las más emocionadas para que yo estudiara la carrera de Médico Veterinario, aparte de que fue ella la que siempre me tubo en este ambiente de los animales.

A mis hermanos, también por sus consejos, que siempre me decían que le echara todas las ganas y aprovechara todo lo que fuera posible de la carrera, por alientarme y enseñarme todo lo que ellos ya sabían de animales sobre todo en cuestión de manejo.

A mis 6 hermanas por, sus cariños palabras de motivación y sobre todo en lo económico que gracias a ellas, es posible que este ahora a este mi último pasó para ser Médico Veterinario.

Por último a los médicos de la escuela, gracias por aportar sus conocimientos, principalmente a un Médico de clínica de Bovinos y un Doc. De clínica de pequeñas especies gracias.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
3. ETIOLOGIA.....	7
4. TAXONOMIA.....	9
5. MORFOLOGIA.....	10
6. DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA.....	11
7. SITUACIÓN NACIONAL.....	16
8. CICLO BIOLÓGICO.....	18
9. TRANSMISIÓN.....	21
10. PATOGENIA.....	24
11. HALLAZGOS CLINICOS.....	26
12. LESIONES.....	28
13. INMUNIDAD.....	28
14. DIAGNOSTICO.....	29
14.1 Diagnóstico de laboratorio.....	30
14.2 Umbral en la detección de heces.....	31

14.3 Preparación de frotis fecales (o fluidos corporales apropiados) tras la concentración por flotación o sedimentación.....	32
14.4 Flotación.....	33
14.5 Flotación por sacarosa.....	34
14.6 Flotación por sal.....	34
14.7 Métodos convencionales de tinción.....	35
14.8 Método de Ziehl—Neelsen modificado (mZN).....	36
14.9 Características diagnósticas de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. teñidos con MZN.....	36
14.10 Características diagnósticas de los ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. Teñidos con AP.....	37
14.11 Métodos inmunológicos.....	37
a) Inmunofluorescencia directa.....	38
b) Detección de antígenos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por enzimoimmunoensayo.....	38
c) Detección de antígenos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por inmunocromatografía.....	38
14.12. Métodos de reconocimiento del ácido nucleico.....	39
15. tratamiento.....	39
16. INMUNOPROFILAXIS.....	43
17. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	44
A) Reducción de la exposición.....	44
B) Resistencia inespecífica.....	45
18. REFERENCIAS.....	46

1.- INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria producida por el protozoo *Cryptosporidium* spp., organismo que se desarrolla y multiplica en las células epiteliales del aparato digestivo de vertebrados (Ortega y col., 1999). Este organismo presenta interés en salud pública debido a su carácter zoonótico y ha sido identificado con frecuencia en bovinos (Becher y col., 2004; Santín y col., 2004), en los cuales constituye uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal (De La Fuente y col., 1999; Moore y Zeman, 1991; Naciri y col., 1999; Uga y col., 2000).

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Es similar al de otros coccidios. Todas las etapas de desarrollo endógeno (asexual y sexual) del parásito, ocurren en la superficie apical de los enterocitos, dentro de una vacuola parasitófora en posición intracelular pero extracitoplasmática (Fayer y col., 1997) culminando con la formación del oocisto, estado infeccioso del parásito, que se elimina en grandes cantidades con las heces y es capaz de sobrevivir durante largos periodos en el ambiente (Hunter y Thompson, 2005).

Se ha demostrado la existencia de al menos dos genotipos distintos ("humano" y "ganado"), que son indistinguibles morfológicamente. El genotipo ganado está presente en un amplio rango de hospedadores, según se puede determinar por los aislados obtenidos en diferentes especies de mamíferos, incluyendo humanos.

Mientras que el otro genotipo, circularía solamente entre los humanos. Se estima que el mismo, sería responsable del 70 % de los casos de criptosporidiosis en la población humana y al genotipo bovino le correspondería al menos el 30 %, con el agravante que este último infecta a una amplia gama de hospedadores y tiene importancia zoonótica (Wisnivesky, 2003).

Los animales de explotación pecuaria pueden ser importantes fuentes para la contaminación ambiental. Ovinos, caprinos, equinos y otras especies de importancia zootécnica, son susceptibles a la infección por *Cryptosporidium parvum* y eliminan ooquistes, sin embargo, a los bovinos se les atribuye el mayor riesgo, debido a su número, amplia distribución, alta incidencia y niveles de infección. En tal sentido, se calcula, que un ternero infectado puede eliminar alrededor de 6×10^{11} ooquistes durante su primer mes de vida (Uga y col., 2000).

Las tasas de excreción de ooquistes disminuyen sensiblemente en animales mayores de un mes (Garber y col., 1994; Xiao y Herd, 1994), no obstante, estos animales pueden contener y eliminar ooquistes de *Cryptosporidium* spp., sin presentar sintomatología alguna actuando como portadores sanos, capaces de diseminar la infección (Naciri y col., 1999; Scott y col., 1995).

La presencia de *Cryptosporidium* spp. En las heces de los bovinos fue estudiada en muchos países, con prevalencias que oscilan entre 2,4 y 100%. En nuestro país, existe poco conocimiento sobre la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en bovinos, con excepción de los datos reportados para la provincia de Buenos Aires por Bellinzoni y col. (1990), Del Coco y col. (2008) y Pinto de Almeida Castro y col. (2009), con un rango de prevalencia entre 17 y 93,4%.

Se realizó un estudio de la prevalencia en becerras entre uno y 60 días de edad en la zona centro del estado de Veracruz y la comarca lagunera, México. El estudio fue de tipo transversal con muestreo de conveniencia con un muestreo de abril a julio del 2009 (comarca lagunera) y de enero a febrero de 2010 (Veracruz). De las 460 becerras muestreadas en la Comarca Lagunera, se obtuvo una prevalencia por medio de la prueba Inmuncromatografía de flujo latera (IFL) de 19.35% y un 18.04% con la prueba de Ziehl-Neelsen (ZN); la prevalencia entre los municipios tuvo un rango de 9.80 – 35% con la prueba de IFL y con la ZN 7.84 – 35%. La prevalencia por rango de edad fue de 35.62% (1 – 15 días), 7.59% (16 – 30 días) y 0% (31 – 45 días y 46 – 60 días) con a prueba de IFL y con ZN 7.84 –

35% Godoy salinas febrero 2011. La prevalencia por rango de edad fue de 35.62% (1 – 15 días), 7.59% (16 – 30 días) y 0% (31 – 45 días y 46 – 60 días) con la prueba de IFL; La cual fue muy parecida con la prueba de ZN, con la excepción del intervalo de 1 – 15 días (32.88%) Godoy Salinas.

PALABRASCLAVES: *Cryptosporidium parvum*, diarrea neonatal, diagnostico, prevención y control, tratamiento.

2.- ANTECEDENTES

Tyzzar fue el primero en describir, a principios del siglo XX, una infección en el ratón común (*Mus musculus*), debida a un protozoo del género *Cryptosporidium*(1). En 1955 Slavin señaló a este protozoo como causa posible de diarreas en pavos (2). Más tarde, en el decenio de 1970, se comprobó su presencia en los terneros (3). Sin embargo, hasta que no se describieron una serie de diarreas en pacientes humanos de SIDA —de los que algunos murieron— y se comprobó que el agente causal era un criptosporidio, no se prestó demasiada atención al agente etiológico (4).

Las criptosporidiosis atrajeron pronto la atención de la población de EE.UU. a causa del brote que se produjo en Milwaukee (Wisconsin) en 1993, debido al consumo de agua contaminada del abastecimiento público (5). Se tardaría poco tiempo en demostrar que era uno de los problemas más graves y difíciles de controlar al que se enfrentaban las autoridades que gestionaban el abastecimiento

de agua a las ciudades. Algunas publicaciones ulteriores (6, 7) dieron cuenta de la difusión por todo el mundo y de la importancia zoonótica del género *Cryptosporidium* (véase Tabla I.1).

TABLA I.1. *Brotos de criptosporidiosis, agentes transmisores y especies responsables.*

Año	Ciudad o Estado	Transmitido por	Especie responsable
1993	Milwaukee, Wis. EE.UU.	Agua	<i>C. hominis</i>
1993	Maine, EE.UU.	Alimentos	<i>C. parvum</i>

1996	British Columbia, Canadá.	Agua	<i>C. parvum</i> (Cranbrook); <i>C. hominis</i> (Kelowna)
1997	Pennsylvania, EE.UU.	Contacto con animales	<i>C. parvum</i>
1998	Washington, EE.UU.	Alimentos	<i>C. hominis</i>
2000	Irlanda del Norte, RU.	Agua x 2	<i>C. parvum</i> y <i>C. hominis</i>
2002	Queensland, Australia.	Alimentos	<i>C. parvum</i>
2003	Francia.	Agua	<i>C. hominis</i>

TABLA I.2. *Especies de Cryptosporidium, hospedadores, autores, año de publicación y cita bibliográfica.*

<i>Especies</i>	<i>Hospedadores</i>			
	<i>Nombre científico</i>	<i>Nombre vulgar</i>	<i>Autores y Años</i>	<i>Citas</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Raton común</i>	<i>Tyzzler 1912</i>	27
	<i>Bos taurus</i>	<i>Vacuno</i>	<i>Pancieria et al.,</i>	3
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Hombre</i>	<i>Nime et al., 1976</i>	28
	<i>Sus scrofa</i>	<i>Cerdo</i>	<i>Kennedy et al., 1977</i>	29
	<i>Ovis aries</i>	<i>Oveja</i>	<i>Barker et al., 1974</i>	30

	<i>Capra hircus</i>	<i>Cabra</i>	<i>Tziperi et al., 1982</i>	31
	<i>Equus caballus</i>	<i>Caballo</i>	<i>Snider et al., 1978</i>	32
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Hombre</i>	<i>Morgan-Ryan, et al. 2002</i>	33
<i>C. muris</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Raton comun</i>	<i>Tyzzar, 1910</i>	34
<i>C. nasorum</i>	<i>Naso litoratus</i>	<i>Nasol</i>	<i>Hoover et al., 1981</i>	35
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallo pavo</i>	<i>pavo</i>	<i>Slavin, 1955</i>	2
<i>C. bailey</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallina</i>	<i>Current et al., 1986</i>	39
<i>C. serpentis</i>	<i>Elaphe gutlata</i>	<i>Serpiente cornuda2</i>	<i>Levine, 1980</i>	40
<i>C. wairi</i>	<i>Cavia porcellus</i>	<i>Cobaya</i>	<i>Vetterling et al., 1971</i>	42
<i>C. felis</i>	<i>Félix catis</i>	<i>Gato</i>	<i>Iseki, 1979</i>	43
<i>C. cania</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Perros</i>	<i>Wilson et al., 1983</i>	45
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Vacunos</i>	<i>Lindsay, 2000</i>	47
<i>C. saurophilum</i>	<i>Eumeces</i>	<i>Lagartos</i>	<i>Koudela et al., 1998</i>	48

3.- ETIOLOGIA

Está causada por protozoos incluidos en el género *Cryptosporidium*, que comprenden de organismos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales del aparato digestivo y respiratorio de vertebrados habiéndose descrito infecciones en más de 170 especies de ellos (Ortega et al 1999). Las diarreas como causa principal de muerte presentan registros entre 52 al 70 % (NAHMS 1996). Muchas investigaciones se han realizado sobre *Cryptosporidium*, acerca de cómo este protozoario afecta a humanos y animales hace más de 30 años (Pancieria et al., 1971; Navin y Juranek, 1984), en ciertos estudios epidemiológicos *Cryptosporidium parvum* ha sido aislado de múltiples especies de mamíferos, incluyendo el ganado, siendo así el que afecta exclusivamente al hombre *Cryptosporidium hominis* (Hunter y Thompson, 2005). La forma más común de infectarse con este parásito es por vía fecal-oral (Fayer et a., 2000). *C. parvum* es responsable del 85% de infecciones gastrointestinales en becerros no destetados, pero solo el 1% en post-destetados. Los post-destetados y el ganado adulto son mayormente infestados por *C. bovis*, *C. andersoni*, y el genotipo *C. deerike* (Santin et al., 2004).

Los hospedadores susceptibles se infectan a través de la ingestión de los ooquistes esporulados (Fayer et al., 2000). En el ganado bovino *C. parvum* ha sido identificado como uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal (Naciri et al., 1999). Esto debido a que los ooquistes de *criptosporidium* son infectante desde el momento en que son excretados por el hospedero ya que resisten al medio ambiente, por lo que sobreviven por largos tiempos en diferentes ambientes (Olson et al., 2004).

Los becerros infectados pueden excretar un gran número de ooquistes, arriba de 10^8 por gramo de heces (Uga et al., 2000) su ciclo incluye una primera fase que es asexual que prolifera en la superficie de la mucosa, y la segunda fase sexual es intracelular, tiene un desarrollo extra-citoplasmático, esta fase termina con la formación de ooquistes, fase infectiva del parásito, que es eliminada en grandes cantidades en las heces (Hunter y Thompson, 2005).

Una muestra positiva es la que llega a presentar uno o más ooquistes de *Cryptosporidium* por frotis; los cuales se observan como unos cuerpos redondos ligeramente elípticos de 5 micras de tamaño, teñidos de color fucsia con algunas granulaciones oscuras en su interior, contrastando con el azul de fondo del frotis (Romero et al., 2001).

Los ooquistes de *Cryptosporidium* están totalmente esporulados y son infecciosos cuando son excretados, son parásitos monoxenos e intracelulares facultativos. Recientemente se ha descrito diferencias en el ciclo de vida por una pequeña subunidad (ssu) rRNA entre *cryptosporidium* y otras coccidias, la cual sugiere que este podría estar más cercanamente relacionado con los gregarines (Carreno et al., 1999). Todo el ciclo de vida ocurre en los enterocitos en vacuolas parasitoforas situada en el borde de la cerda entre la membrana del plasma y el citoplasma o en el lumen (Smith et al., 2005).

El mecanismo por el cual los ooquistes llegan a la eclosión es poco entendido, tanto como el del hospedero como el de parásito. In vitro los estudios de eclosión para *C. parvum* tratan de imitar las condiciones biológicas de un organismo tales como la temperatura de 37°C, fluctuaciones de PH, sales biliares, agentes reductores, proteasas y tiempo; pero aun así existe una incomprensión en la jerarquía o sinergismo de los mecanismos específicos por la falta de estandarización de los métodos (Robertson et al., 1993; Kato et al., 2001; Smith et al., 2005). Lo que sí es un hecho es que los rangos de eclosión disminuyen con una temperatura de 4°C con lo cual se da soporte a la hipótesis de que al

incrementarla a 37°C se activa la eclosión, incluso en la ausencia de estímulo alguno por parte del hospedero (Fayer y Leek, 1984; Reduker y Speer, 1985). Para que *C. parvum* pueda iniciar la infección la primera barrera que tiene que atravesar es el moco que protege al intestino con lo cual el ooquistes del parásito no puede entrar en contacto directo con las vellosidades intestinales, pero este también tiene un método para degradar esta mucosidad la cual es que el esporozoito segrega proteinasa de cisteína la cual puede llegar a degradar la barrera y llegar a un contacto con los receptores del enterocito (Coombs et al., 1997). En becerros que son destinados para la producción de carne, la prevalencia de *C. parvum* puede ser muy alta en los sistemas de manejo intensivo (Naciri et al., 1999), pero esta prevalencia es aun baja comparada con la de becerros de ganadería lechera a pesar de que estos fueron criados bajo las mismas condiciones (Kvác et al., 2006).

4.- TAXONOMIA

Cryptosporidium parvum es un protozoo intracelular descrito en 1907.

Taxonómicamente, se encuadra dentro del:

Phylum *Apicomplexa* (presentan complejo apical)

Clase *Sporozoa* (reproducción sexual y asexual con formación de ooquistes), subclase *Coccidiasina* (el ciclo presenta merogonias, gametogonias y esporogonias)

Orden *Eucoccidiorida* (hay esquizogonia)

Suborden *Eimeriorina* (se desarrollan macro y microgametos de forma independiente, y el cigoto es inmóvil)

Familia *Cryptosporidiidae* (los ooquistes presentan cuatro esporozoitos y ciclo vital monoxeno, es decir, con un solo hospedador).

Los géneros *Plasmodium*, *Babesia*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Cyclospora*, *Isospora* y *Eimeria* son también coccideos. Se han descrito 20 especies dentro del género *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium parvum* es la especie que se asocia a enfermedad humana, aunque también puede encontrarse en otros

hospedadores, ya que no existe una completa especificidad de huésped.

5.- MORFOLOGIA

Los parásitos son esféricos o elípticos. En las células epiteliales del intestino presentan un tamaño entre 2 y 6 μm y se encuentran localizados en vacuolas parasitóforas.

Los ooquistes presentan cuatro esporozoitos, sin esporocistos, son ovoides y pueden medir entre 4,5 y 7,9 μm . Tienen ocho cromosomas de tamaños moleculares semejantes y presenta uno de los genomas más pequeños de los organismos unicelulares eucarióticos.

El ciclo se completa en un solo hospedador en dos días. La infección se produce por ingestión de ooquistes, provenientes de la contaminación fecal ambiental o de una persona o animal infectados. La exquistación se produce por contacto con agentes reductores, generalmente sales biliares o enzimas digestivas, aunque puede producirse de forma espontánea. Aparecen cuatro esporozoitos móviles con forma de plátano que invaden la pared del epitelio intestinal. Se forma una vacuola parasitófora superficial formada por dos membranas provenientes del hospedador y por otras dos provenientes del parásito; esto hace que tenga localización intracelular, pero extracitoplasmática. Aparecen merozoitos intraluminalmente y, mientras algunos infectan otras células epiteliales del hospedador (originando un proceso de autoinfección), otros maduran sexualmente y forman zigotos. El ooquiste, que contiene cuatro nuevos esporozoitos, es infectivo al excretarse por las heces.

Los ooquistes están recubiertos de una pared gruesa que les confiere protección en el medio ambiente, pero un 20% de éstos presentan una pared fina y, por lo tanto, exquistan endógenamente, originando un fenómeno de autoinfección. En el medio ambiente se mantienen infecciosos durante meses en un intervalo amplio de temperaturas. La autoinfección es importante clínicamente, ya que la ingestión de pocos ooquistes puede originar procesos clínicos graves. La exquistación

espontánea, en ausencia de sustancias reductoras, explica las infecciones pulmonares por este microorganismo.

6.- DISTRIBUCCION GEOGRAFICA

Hamnes et al., (2006) En Noruega se realizó un estudio para determinar la prevalencia del *Cryptosporidium* en tres diferentes áreas, en el estudio los hatos con menos de cinco o más de 40 vacas fueron excluidas. El resto de los hatos en cada área fueron seleccionados por al azar. Estos hatos fueron contactados por correo electrónico y por teléfono. El periodo de muestreo fue de junio del 2001 a marzo del 2003, todos los becerros muestreados se encontraban estabuladas. La edad de los becerros que se muestreo fue de 3 a 183 días. Para su análisis se utilizó el método de microscopia por flotación descrita por Olson et al. (1997) y los resultados fueron: 53% de prevalencia (72 de 136) entre las granjas y un 12% (167 de 1,386) entre los becerros y el nivel de ooquistes de *Cryptosporidium* fue bajo en la mayoría de los becerros infectados (Hamnes et al., 2006). Olson et al. (2004) Demostró que *Cryptosporidium* tiene emergencia como un parásito importante en el ganado lechero por su alta patogenicidad y su significativo potencial en la salud pública por su transmisión zoonótica. Otros estudios como el del Robertson y Gjerde (2001) han demostrado que *Cryptosporidium* tiene mayor prevalencia en las fuentes de agua de Noruega.

Bjorkman et al. (2003) en Suecia determinaron, a través de un estudio en 75 hatos, la presencia y significancia de *C. parvum* en becerros de Suecia, por medio de la técnica de Ziehl – Neelsen modificada. Se muestrearon un total de 270 becerras de una edad de 1 día de nacidas hasta 90 días de edad, se identificó que el 11% (16/146) en heces diarreicas, *C. parvum* fue hallada en becerras con una edad que comprendía de 7- 84 días de edad.

En Galicia, Nueva España Castro-Hermida et al. (2006) tomaron muestras de 734 animales, seleccionados al azar de 60 hatos, estos animales se dividieron en 12 grupos de edades distribuidos en grupos del: <1 mes (53), 1-5 meses (30), 6-11 meses (31), 12-16 meses (72), 17-20 meses (64), 21-24 meses (96), 3 años (94),

4 años (74), 5 años (67), 6 años (67), 7-8 años (63) y 9-13 años (23); dando como resultado una prevalencia general de todos los animales del 14.20% (104/734), provenientes de 40 diferentes hatos (66.70%), la prevalencia de ganado infectado tuvo un intervalo entre 58.50% en becerros <1 meses y 7.90% en animales con una edad de entre 7-8 años llegando a la conclusión de que el porcentaje de infección disminuyó significativamente con el incremento de la edad.

Las infecciones más recurrentes se presentaron en los grupos de becerros de 1-5 meses (23.30%) y de 6-11 meses (25.80%) (Castro-Hermida et al., 2006).

En el área de Cheshire, Inglaterra Brook et al. (2008) muestreo becerros no destetados con el propósito de llevar a cabo un estudio sobre la prevalencia y los factores de riesgo asociados con *Cryptosporidium* spp. Se recolectaron muestras del 50% de los becerros no destetados existentes en cada granja o un mínimo de cinco por cada una, se obtuvo una muestra directa del recto del animal y se depositó en contenedores estériles conservándose a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento. Numerosas variables fueron tomadas en cuenta tales como: tipo de alojamiento de los becerros (individual, grupal, sexado o mezclados, m² por becerro, profundidad de la cama y limpieza de esta), si estaban identificados, registro de nacimientos, si estaban limpios de la cola, de los cuartos traseros y de los flancos, también se tomó en cuenta la consistencia de las heces (Hughes, 2001) y con esto el color de estas (crema/naranja, café/crema o café) (Brook et al., 2008). Las muestras fueron primeramente examinadas por medio de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen, también con un kit comercial de inmunoensayo (ProSpect *Cryptosporidium* Microplate Assay; Remel, Lenexa, Kansas, USA), y si resultaban positivas a cualquiera de estas, se les examinaba posteriormente por medio de PCR de 18S rRna gene locus (Xiao et al., 1999).

De un total de 215 muestras recolectadas de 41 hatos, el 28% fueron positivas confirmadas por PCR (60/215), por hatos hubo un 66% de prevalencia (27/41) lo que indica que en todos los hatos hubo al menos un animal positivo, la prevalencia en los hatos muestreados fue desde un 11 hasta un 67%, y la media fue del 36%, la mayoría de las muestras fueron clasificadas como *Cryptosporidium parvum*

(50/54) (Brook et al., 2008). En cuanto a los factores de riesgo analizados, el grosor de la cama contó mucho, ya que con la profundidad de 11-15 cm la infección en esos animales fue mucho menor que con la de 0-5 cm; la consistencia de la heces no fue concluyente con el grado de infección ya que la consistencia se puede alterar por la alimentación del becerro y con respecto a la edad se llegó a la conclusión de que los becerros con una edad entre los ocho y 21 días presentan más riesgo que los bovinos con edades mayores, el odds ratio que se obtuvo en animales con 8-14 días fue de 6.11 y con 15-21 días fue de 5.77 (Brook et al., 2008).

Watanabe et al., (2005) identificaron por primera vez el genotipo *C. parvum* en heces fecales de Taiwan, por medio de técnicas de Ziehl Neelsen modificada (ZNm), Ensayo de Inmunofluorescencia (IFA) tipificando por medio de a técnica de PCR (gen 18s Rrna); para este estudio utilizaron muestras de ganado bovino y cabras de la región, los bovinos fueron catalogados en diferentes rangos de edad como menos de un mes, de uno a tres meses, de tres a seis meses de 6 a 24 meses, y ganado adulto con una edad mayor de 24 meses; el total de muestras tomadas fueron 460 de 27 hatos, para las cabras se tomó una edad de 5 días a 6 años, con lo cual reunieron un total de 123 animales de 10 hatos.

La prevalencia reportada en una investigación fue de 37.60% (173/460) para el ganado y en cabras se obtuvo una prevalencia de 35.80% (44/123), en cuanto a las consistencias de las heces de bovinos se obtuvo que las heces diarreicas hubo una frecuencia de 41.50% (59/142), y un 39.80% (107/269) en heces no diarreicas. Las heces fecales se encontraron positivas por medio de la prueba IFA fueron posteriormente tipificadas por medio de PCR, confirmando que lo encontrado en heces era *C. parvum*, de manera similar ocurrió en tres cabras.

En la India Rajkhowa et al. (2006), realizaron un estudio para conocer la prevalencia de *Cryptosporidium parvum* en mithuns (*Bos frontalis*) y la prueba que utilizaron fue un kit de ELISA, con lo cual se reportó una prevalencia del 56%, la mayor prevalencia que se encontró fue en los mithuns de 1-6 meses de edad con 81% y la menor fue la que se encontró en los animales de más de dos años de

edad con 42%. En cuanto a la consistencia de las heces se observó una prevalencia del 94% en las heces diarreicas, menor fue en las no diarreicas con 51%. En la manera de vivir de los animales también hubo diferencia ya que se reportó que los mithuns bajo un sistema semi-intensivo tuvieron una mayor prevalencia (64%) en comparación con los de vida libre (40%) (Rajkhowa et al., 2006). Posteriormente en tres diferentes regiones de la India por medio de la técnica de PCR de 18S SSU rRNA reveló que el 30.20% de 457 muestras fecales obtenidas de bovinos neonatos estaban infectadas con *Cryptosporidium parvum* (Paul et al., 2007). La prevalencia más alta reportada fue en los meses de lluvia con 37.30%. En el 32.30% de los becerros muestreados se observó una diarrea aguda, los menores de 15 días de edad mostraron mayor afección con un 45.10% de prevalencia. En cuanto a la región en donde se tomaron las muestras, se identificó que en la parte norte hubo mayor frecuencia (35.40%) en comparación con la este o sureste. Con esto se llegó a la conclusión de que *C. parvum* fue la única especie de *Cryptosporidium* que prevaleció en los becerros en las tres diferentes regiones muestreadas en la India (Paul et al., 2008).

Burenbaatar et al. (2008) en Mongolia reportaron por primera vez la prevalencia y genotipificación de *cryptosporidium*, en total de 439 muestras de ganado bovino, 16 de cabras jóvenes y 5 de borregos, por medio de la técnica de inmunofluorescencia (IFT) posteriormente se analizaron las muestras positivas por medio de PCR. Los resultados de IFT indicaron que 116 muestras provenientes de ganado fueron positivas, con una prevalencia total de 26.40% por otro lado también resultó que el 19.10% de los animales muestreados eran becerros de menos de un año de edad. Con respecto a la tipificación, de las 116 muestras positivas 47 fueron analizadas por medio de PCR de las cuales 11 fueron positivas, mostrando que la especie de *cryptosporidium* era *C. andersoni* en becerros de uno a tres meses de edad, una presentó *C. bovis* y no se encontraron oquistes de *Cryptosporidium* en las muestras fecales provenientes de las cabras o borregos.

En Tailandia Nuchjangreed et al. (2008) por medio de las técnicas tinción ácido-rápida y posteriormente PCR determinaron la prevalencia y tipificación de

Cryptosporidium fueron encontradas en una frecuencia de 13% (26/200) y por medio de PCR se detectó un 9.63% (8.83) de prevalencia, con lo cual se obtuvo en resultado de que existe *C. parvum*.

Safavi et al. (2010) realizaron un estudio costo control matched 1:1 en becerros con la edad menor de un mes, las muestras fueron colectadas por un periodo superior en seis meses de un total de 112 animales, con signo clínico de diarrea. Las muestras fueron analizadas para poder identificar *Cryptosporidium* spp. Por medio de la técnica de Ziehl- Neelson. Los oquistes de este estuvieron presentes en 51.80% de los becerros con diarrea y un 21.40% en los becerros control. Dentro de los becerros con diarrea la prevalencia más alta estuvo ubicada en la edad de 8 – 14 días 70.50% y la más baja en animales con una edad de 20 a 30 días (23.80%).

En Zambia Geurden et al. (2006), estimaron la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., en tres sistemas diferentes de manejo, las muestras fueron colectadas de becerros con una edad de tres meses. 250 muestras fueron colectadas de hatos lecheros, 238 de ganado de carne y 256 de hatos de ganado tradicional, todas las muestras fueron analizadas por medio de un kit comercial copro-antigen ELISA (Techlab® *Cryptosporidium* test). Las prevalencias en becerros lecheros, becerros de carne y tradicionales fueron de 42.80%, 8.0% y 6.3% respectivamente, en cuanto a los hatos que mostraron al menos un animal infectado se distribuyó de la siguiente manera: 75.70% de los hatos lecheros, 44% de los hatos de carne y 15.20% de los hatos tradicionales. Tanto *C. parvum* como *C. bovis* fueron identificados por medio de la amplificación genotípica y en un becerro de ganado de carne se identificó *C. suis* (Geurden et al., 2006).

En la provincia de Heilongjiang, china et al. (2009) realizaron un trabajo con 507 muestras fecales de seis hatos de la región, las cuales sometieron las muestras de tinción ácido-rápido, modificado por las muestras provenientes de becerros no destetados, y para los post-destetados y para ganado adulto se realizó la prueba de flotación, sheather. Obtuvieron que 5.33% (27/507) de las muestras resultaron positivas a *cryptosporidium* por medio de la examinación al microscopio;

posteriormente se prosiguió a la tipificación y encontraron que 26 de los especímenes fueron identificados como *C. andersoni*.

7.- SITUACION NACIONAL

En tres estados de la zona central de México Maldonado-Camargo et al. (2008), determinó la prevalencia y factores de riesgo para la excreción de *C. parvum* en becerros de la raza Holstein-Freisian. Las muestras fueron recolectadas solo una vez por cada becerro y la técnica que se utilizó fue Kinyoun para detección de *C. parvum*; la información de cada becerro y del manejo en el área de maternidad, alojamiento y alimentación fue obtenido por medio de un cuestionario estandarizado. La prevalencia se distribuyó así, de 31 hatos 29 tuvieron becerros infectados por *C. parvum*. La prevalencia total fue del 25% (128/512) y por cada estado fue de 28% (51/185), 29% (33/112) y 20% (44/215), para Hidalgo, Jalisco y México respectivamente; la edad de los animales está fuertemente asociada a un riesgo, lo máximo que se encontró fue en la edad de 15 días (Maldonado-Camargo et al., 1998). Usando efectos mezclados en regresión logística para el efecto aleatorio en el hato, la alimentación, la limpieza y el que hubiera una conexión entre el área de maternidad y los demás puestos, con lo cual se hizo una fuerte asociación en cuanto al factor de riesgo (Odds Ratio); y se especuló que la asociación entre comenzar a alimentar con grano a los becerros con una mayor excreción de *C. parvum* da una mayor incidencia y el limpiar el área de maternidad con los mismos instrumentos sin desinfectarlos también incremento el riesgo de excreción de *C. parvum*, esto es porque el personal usó la misma escoba para limpiar el área de las becerreras con el área de maternidad, así fue como se infectaron lo becerros recién nacidos (Maldonado-Camargo et al., 1998).

Posteriormente se realizó otro estudio en el estado Tabasco en el municipio de Balancán en el cual se identificó dos de las 14 especies del *Cryptosporidium*, se colectaron muestras de heces de 100 becerros destetados y menores un año, mantenidos en pastoreo. Las heces se diluyeron en solución salina fisiológica y se

hicieron frotis tiñéndose con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada y se observaron a 100 X en busca de ooquistes. El porcentaje de becerros positivos fue del 67% (Cortés et al., 2006).

Otro estudio realizado en México, fue en Cuajinicuilapa, Guerrero. De 381 becerros recién nacidos hasta tres meses de edad. Se realizó un muestreo piloto para estimar el tamaño de muestra en una población finita, se aplicó encuestas a los ganaderos para saber acerca del manejo de los becerros. Se colectaron muestras de heces por vía rectal. La concentración de ooquistes se hizo con la técnica de Faust (Sulfato de Zinc), se realizó la técnica de Inmunofluorescencia directa. Se reportó lo siguiente: 12 muestras positivas a ooquistes de *C. parvum* (3.1%). En prevalencia por edad se encontró el mayor porcentaje (1.3%) en becerros de una semana de edad. En cuanto a los factores de riesgo se obtuvo una asociación estadística significativa con la variable zootécnica de alojamiento (Fitz et al., 2006).

En la zona centro del estado de Veracruz, México Aguilar et al. (2007) realizó un estudio en bovinos de carne, siendo un muestreo de tipo transversal en una población de becerros de un día de nacidos hasta seis meses de edad; en cinco municipios (Medellín, Jamapa, Ignacio de la Llave, Tlalixcoyan y Veracruz), el muestreo lo realizó durante los meses de febrero-mayo 2007. Las muestras las procesó por microscopía directa, por medio de la técnica de flotación (Faust) con sulfato de zinc (44%); después por medio de la técnica de tinción de Kinyoun modificada. Los resultados que obtuvo fueron con una prevalencia general de 78% para criptosporidiosis en una población de 186 becerros, por municipio fue para Medellín con 17%, Jamapa 12%, Ignacio de la Llave 15%, Tlalixcoyan 13% y Veracruz 20%; en cuanto a la edad se separó en grupos de un día a cuatro meses, cinco meses y seis meses con prevalencias de 47%, 17% y 14% respectivamente (Aguilar et al., 2007).

8.- CICLO BIOLÓGICO

Los recientes descubrimientos de nuevas formas de desarrollo extracelulares, junto con la capacidad de *Cryptosporidium* de completar todo su ciclo biológico sin necesidad de células hospedadoras (62) demuestran que *no es un parasito intracelular obligado*.

Dado que *Cryptosporidium* no necesita invadir célula hospedadora alguna para completar su ciclo, podríamos preguntarnos con Thompson *et al.* (51) .porque el parasito se comporta como tal *in vivo*? y .cual es la cuantía de población criptosporidiosa extracelular *in vivo*? Su número varía dependiendo del *status* inmunológico y de otros factores del hospedador.

Su nicho intracelular, pero extracitoplasmico, le permite al parasito evadirse del control inmune y aprovecharse del transporte de solutos a través de la membrana de los *villi* de la célula hospedadora y de la vacuola parasitofora (63).

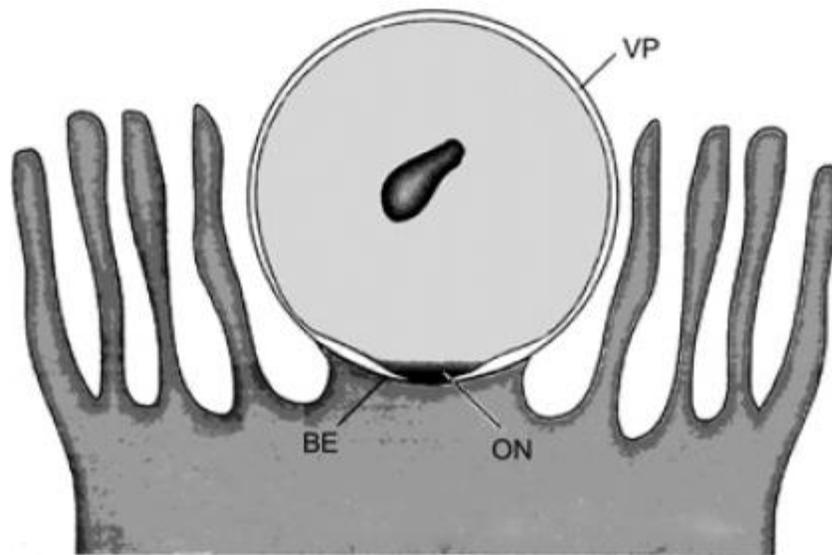


FIGURA I.1. Localización del criptosporidio en la célula hospedadora (VP = Vacuola Parasitofora; BE = Banda Electrónica Densa; ON = Organela Nutricia). Representación esquemática. Referencia (51).

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* es complicado e implica fases de desarrollo sexual y asexual (Figuras I.2 y I.3). El ooquiste esporulado es la única

El 80% aproximadamente de los ooquistes formados al terminar el ciclo son ooquistes de pared gruesa; el hospedador los expulsa con las heces si se localizan en el tracto gastroenterico, o vía aerosoles y por la secreción nasal, si se ubican en el respiratorio. Sin embargo, un 20%, aproximadamente, de los ooquistes no desarrollan pared gruesa por lo que se denominan ooquistes de pared delgada. Son los responsables de autoinfecciones debidas al reciclado continuo de esporozoitos por exquistación de los ooquistes de pared delgada.

Por lo expuesto, el género *Cryptosporidium* tiene dos ciclos autoinfectantes mediados por los merozoitos de tipo I y por los ooquistes de pared delgada.

Thompson *et al.* (51) analizan con detalle los trabajos publicados sobre las diferentes formas de desarrollo de *Cryptosporidium* tanto *in vitro* (cultivos celulares y cultivos libres de células), como *in vivo* en modelos animales. Su lectura es muy de recomendar, al igual que las publicaciones de Arrowood (58) y Hijjawi (39, 62) ya citadas.

9.- TRANSMISIÓN

En el ganado vacuno se han hallado dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *C. andersoni*, si bien en 2004 Santin *et al.* (82) encontraron un nuevo genotipo de *C. parvum*. Precisamente el enteropatógeno más corriente de los terneros, en su primera semana de vida, es *C. parvum*, que puede ir acompañado de otros patógenos, como virus, bacterias y *Giardia*.

La criptosporidiosis cursa como una enfermedad diarreica, de gravedad variable, que en los individuos con buen estatus inmune desaparece pronto, mientras persiste en los inmunodeprimidos, causándoles gran debilidad y terminando, a veces, con el éxito letal.

Un solo ooquiste es suficiente para causar la enfermedad en los hospedadores susceptibles (9). Los ooquistes se transmiten corrientemente siguiendo la ruta fecal-oral, por contacto directo de hospedador-hospedador y vía

los alimentos y el agua contaminados; por último también se ha comprobado la transmisión por inhalación, vía aerosoles o gotitas de exudaciones al toser y estornudar (10). El carácter zoonótico de los criptosporidios lo han confirmado una serie de estudios epidemiológicos con animales de renta, de compañía y silvestres y algunas infecciones contraídas accidentalmente por veterinarios, estudiantes y auxiliares de clínicas veterinarias (11). Los alimentos manipulados por operarios infectados o enfermos de criptosporidiosis y los expuestos al agua contaminada han servido de fuentes de criptosporidios para otros alimentos (12,13). Los vegetales cosechados en suelos abonados con estiércol también son una fuente potencial de infección, sin embargo, para la especie humana el agua contaminada es la fuente de contagio más importante.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* permanecen viables en el agua 140 días y son muy resistentes a la mayoría de desinfectantes corrientes (17) lo que dificulta mucho e incluso impide su destrucción por la cloración normal de las aguas. Algunos brotes de criptosporidiosis se han debido a la contaminación con ooquistes de las aguas superficiales.

En tres estados de la zona central de México Maldonado-Camargo et al. (1998) determinaron la prevalencia y factores de riesgos para la excreción de *C. parvum* en becerros de la raza Holstein. Se especuló que la asociación entre comenzar a alimentar con granos a los becerros con una mayor excreción de *C. parvum* debido a que el personal utilizó la misma escoba, para limpiar el área de las becerros con el área de maternidad, así fue como se infectaron los becerros recién nacidos.

Los resultados en ensayos se comprueba que la vaca es un portador y fuente de infección de los terneros neonatos, la categoría de mayor susceptibilidad de contraer la infección, ya que un ternero de 1 día de vida fue positivo a *Cryptosporidium* proveniente de una madre portadora. Estos hallazgos están estrechamente relacionados al sistema de partos del establecimiento en estudio; en donde el lugar del parto es el mismo predio desde hace varios años, sin medidas de control para disminuir la carga de microorganismos del suelo ni el

número de vacas que paren anualmente en forma continua (aprox. 550). Estos factores favorecen a la permanencia del ooquiste en el sistema ya que están perfectamente adaptados para la supervivencia en el ambiente. En estas condiciones de manejo, las ubres de las vacas se contaminan con los ooquistes eliminados en su materia fecal y por contacto con el suelo. Algunos investigadores como Díaz de Ramírez (2002) en un estudio observó un 57% de vacas que excretaron ooquistes durante el posparto y el 81% de las muestras positivas presentaron niveles bajos de ooquistes. Faubert y Litvinsky 2000 concluyeron que los neonatos adquieren la infección poco tiempo después de su nacimiento como consecuencia de la eliminación fecal de ooquistes por las vacas periparturientas, especialmente durante el periodo de parto y estimaron que éstas pueden, potencialmente, excretar más de 13 millones de ooquistes por día. (Díaz de Ramírez 2002). Los resultados reflejan una problemática que afecta a los terneros entre la primera y tercer semana de vida y alcanza su máxima expresión (87%) en la segunda semana con cargas infectantes altas y muy altas coincidentes con episodios diarreicos con heces mucosas y/o sanguinolentas. Lo observado es como resultado que en este período el parásito completa su ciclo comenzando la manifestación de signos clínicos en los terneros y la eliminación de ooquistes en la materia fecal; además este período es la edad de mayor susceptibilidad del ternero a microorganismos enteropatógenos causales de disturbios entéricos, los que pueden favorecer la patogenicidad de los ooquistes. La bibliografía coincide con lo observado, y define a esta enfermedad en un período entre la primera a tercera semana de vida (en un rango de 3 a 30 días) (Lippi Ortolani y Castro Soares 2003, Romero Martínez et al 2001, Kirpatrick 1995). Se observó que en la cuarta semana de vida, además de la disminución de terneros positivos respecto a la segunda semana, disminuye la carga parasitaria en forma notable, coincidiendo esto con datos recopilados de un trabajo que obtuvo una frecuencia de esta enfermedad relativamente baja en la cuarta semana y en el segundo mes de vida. (Lippi Ortolani y Castro Soares 2003). No se descarta la posibilidad de que en cada episodio diarreico registrado haya existido uno o más agentes etiológicos involucrados ya que no se realizaron estudios de bacteriología y virología de las

muestras obtenidas. De igual manera el haber observado durante el período de estudio el 93,4% de los terneros positivos a *Cryptosporidium* de los cuales el 33 % coincidió con conteos importantes de ooquistes y que el 50 % además presentó conteos elevados entre 2 días antes o posteriores a los signos diarreicos, podemos afirmar que es uno de los principales agentes que ocasiona disturbios entéricos con el consecuente síndrome de mala absorción.

10.- PATOGENIA

Los cambios producidos por efecto de la criptosporidiosis en los hospedadores humanos y animales (diarrea, pérdida de peso y otros) al principio no se entendieron suficientemente bien, pero investigaciones recientes con modelos animales han aclarado mucho la fisiopatología de la enfermedad y la comprensión de los signos clínicos. El complicado ciclo biológico del parásito, la variedad de formas que albergan los hospedadores, las diversas especies de *Cryptosporidium* existentes y su predilección por los diferentes tejidos de las distintas especies hospedadoras contribuyen a dificultar la comprensión de las interacciones parásito-hospedador. En la Tabla I.3 se muestra la especificidad tisular de algunas especies de *Cryptosporidium*.

En infecciones experimentales con *C. parvum* los signos clínicos aparecen entre los 2-7 días después de contagiados los animales, y dependiendo de su estado inmunitario el periodo prepatente (es decir, el tiempo transcurrido entre la infección y la dispersión de ooquistes) varía de algunos días a varios meses y hasta años (64).

Las células intestinales se infectan con los esporozoitos que emergen de los ooquistes de pared gruesa, que se ingieren con los alimentos y también con los que producen los ooquistes de pared delgada, que se originan en los enterocitos infectados, en los que ha tenido lugar la reproducción sexual y asexual. Otras formas extracelulares que se desarrollan en el lumen intestinal, también pueden infectar a las células epiteliales del intestino delgado (62). Después de la

infección inicial las formas endógenas se desarrollan y diseminan la infección por todo el intestino delgado y grueso. A veces, también se infectan la mucosa gástrica, conducto biliar, vesícula biliar y epitelio del tracto respiratorio (vease Tabla I.3). Algunas especies de *Cryptosporidium* atacan preferentemente a la mucosagástrica del ratón (*C. muris*), otras el abomaso de rumiantes (*C. andersoni*) y otras el tracto respiratorio aviar (*C. baileyi*). La invasión y colonización de la superficie epitelial del intestino altera y desplaza el borde en cepillo, con pérdida de superficie y acortamiento y fusión de los *villi*, lo que causa un defectuoso transporte de nutrientes y electrolitos. Por todo ello la criptosporidiosis cursa con mala absorción y diarrea.

Estudios epidemiológicos moleculares han demostrado la presencia en la especie humana de, al menos, dos genotipos singulares y distintos de *C. parvum*,

TABLA I.3. *Especificidad tisular de diferentes especies de Cryptosporidium**.

Especies	Hospedadores	Tejidos principales	Tejidos secundarios
<i>C. hominis</i>	Humanos	Intestino delgado, intestino grueso	Estómago, conducto biliar y vesícula biliar
<i>C. parvum</i>	Humanos, Bovinos, Ovinos, Caprinos, Cerdos y Ratones	Intestino delgado	Estómago, conducto biliar, vesícula biliar y tracto respiratorio
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Abomaso	
<i>C. muris</i>	Ratones	Intestino	
<i>C. meleagridis</i>	Gallinas, Pavos	Intestino, cloaca, bolsa de Fabricio	Molleja
<i>C. baileyi</i>	Gallinas	Tráquea, bronquios, pulmones, sacos aéreos	Intestino, cloaca, bolsa de Fabricio
<i>C. serpentis</i>	Reptiles	Estómago	
<i>C. nasorum</i>	Peces	Estómago, intestino	

* Fuente: Thompson *et al.* (51).

el genotipo humano (o genotipo 1) y el bovino (o genotipo 2) (66). El primero se ha reclasificado y denominado *C. hominis* (33) por una serie de razones: infecta solo a la especie humana, mientras que *C. parvum* lo hace, además de a los humanos,

a vacunos, lanares, cabras, cerdos y ratones. Ambos genotipos muestran diferencias genéticas (66-68) y en los cerdos genotóxicos los cursos de la enfermedad son distintos (55). Finalmente en infecciones mixtas por ambas especies no se ha observado intercambio de material genético alguno (9).

Súmese a lo dicho que su taxonomía es todavía bastante controvertida y que tampoco está clara la epidemiología de las distintas especies. Por tanto, se necesitan más estudios para confirmar la validez de las especies de *Cryptosporidium*, no solo con fines taxonómicos sino también para mejorar su diagnóstico y tratamiento (55).

La posibilidad actual de observar en cultivos *in vitro* todas las formas de su ciclo biológico ha puesto de manifiesto la existencia de otras nuevas, antes desconocidas, y asimismo ha permitido demostrar que no es un parásito intracelular obligado; Hijawi *et al.* (62), comparando los ciclos biológicos de dos especies de gregarinas (*Mattesia dispora* y *M. geminate*) con el de *Cryptosporidium* observaron entre ellos muchas similitudes. Comentando estos resultados Thompson *et al.* (51) concluyeron que se necesitan análisis filogenéticos profundos del género *Cryptosporidium* y de otros miembros de los Apicomplexa, añadiendo después que, independientemente de que deban incluirse o no entre las gregarinas, también hay que investigar si pertenece a un posible orden nuevo, dentro de los Apicomplexa. Hoy se admite que *Cryptosporidium* es una mezcla fenotípica y genotípicamente heterogénea de especies y de genotipos morfológicamente idénticos.

11.- HALLAZGOS CLINICOS

En el ganado vacuno se han hallado dos especies de *Cryptosporidium*, *C. parvum* y *C. andersoni*, si bien en 2004 Santin *et al.* (82) encontraron un nuevo genotipo de *C. parvum*. Precisamente el enteropatógeno más corriente de los terneros, en su primera semana de vida, es *C. parvum*, que puede ir acompañado de otros patógenos, como virus, bacterias y *Giardia*.

Los terneros infectados suelen iniciar la difusión de ooquistes de *C. parvum* los 2 días de edad (83), si bien lo más corriente es que ocurra cuando tienen entre 1 y 4 semanas, durando la infección unas dos semanas. La enfermedad se manifiesta por una diarrea (generalmente de color amarillo pálido, con mucosidad y a veces muy acuosa), acompañada de depresión, anorexia y dolor abdominal. Frecuentemente se complica por los patógenos concurrentes, como virus (rotavirus y otros), bacterias (*E. coli* y *Salmonella* principalmente) y protozoos (*Giardia*). Los terneros mueren por deshidratación y colapso cardiovascular.

En las granjas con criptosporidiosis endémicas la morbilidad alcanza el 100% pero la mortalidad es muy escasa o ausente. Los anticuerpos del calostro y de la leche protegen a los terneros neonatos al bloquear la invasión parasitaria e inmovilizar en el lumen intestinal a las formas criptosporidiosicas. Los micronutrientes influyen en el curso de la enfermedad (p. ej., la deficiencia de Selo empeora), como han confirmado Huang y Yang en animales modelo (84).

La gran concentración de ooquistes en las granjas superpobladas influye en la mayor incidencia de criptosporidiosis. Otro factor de riesgo que actúa aumentando la probabilidad de difusión de los ooquistes son las operaciones de limpieza de la yacija del establo y de las excretas pues si los operarios que las llevan a cabo, no atienden bien a su desinfección y a la de su utillaje (horquillas, cepillos, carretillas, etc.) se convierten en agentes activos de difusión (85). Las granjas cuyo aporte principal de agua procede de pozos tienen menores concentraciones de parásitos que las que utilizan como abrevaderos zanjas, balsas o pequeños regatos (86). La contaminación de los abrevaderos por defecación de los animales parasitados en su entorno da lugar a infecciones en otras reses, por lo tanto, es otro factor a tener en cuenta.

La leche puede contaminarse por una higiene defectuosa de las ubres de las vacas de ordeno y ya se han señalado brotes humanos de criptosporidiosis por el

consumo de leche cruda (87, 88). De aquí la conveniencia, una vez más, desometer la leche antes de su venta a temperaturas y tiempos de pasteurización.

12.- LESIONES

Atrofia de las vellosidades e inflamación de las criptas intestinales y pérdida de enzimas digestivas del borde luminal, consustitución de los enterocitos dañados por una población celular inmadura con baja capacidad enzimática y escasa absorción de los azúcares. Esta patología coadyuva en los signos clínicos de diarrea por medio de la fisiopatología mixta de la mala digestión, de la mala absorción, y de los efectos osmóticos acompañados o no de factores secretores e inflamatorios. Por añadidura, la lesión de las microvellosidades predispone a infecciones con *E. coli*, con virus o con *Salmonella* sp. Histológicamente, un gran número de parásitos están anclados en las microvellosidades de los enterocitos absorbentes.

En las infecciones leves, solamente unos pocos parásitos están presentes, no existiendo cambios histológicos evidentes en el intestino. Las vellosidades son más cortas de lo normal, con hiperplasia de las criptas y un filtrado celular inflamatorio mixto.

13.- INMUNIDAD

La infección por *C. parvum*, según se ha demostrado en rumiantes, da lugar a una cierta inmunidad adquirida frente al parásito, en la que intervienen factores celulares y humorales. De hecho, se ha demostrado un incremento en la producción de mucus intestinal, principalmente en la parte media y final del intestino delgado.

Según Ortega(1999) en rumiantes neonatos infectados,se detectan IgG específicas a los 7días de vida, aumentando sus niveleshasta el día 30 y éstas se mantienenelevadas durante períodos prolongados.Tanto las IgM como IgA alcanzansu valor máximo en torno a los 15 díasde vida. La cinética que sigue la IgAespecífica del mucus intestinal estárelacionada con la edad en que losanimales se infectan. Los títulos sonmás elevados, y la respuesta es mástemprana, en los animales infectadosde mayor edad.

Hasta el momento no se conoce el papel de los anticuerpos séricos ni tampoco la función de los producidos localmente, aunque se ha observado que la administración de calostrohiperinmune resulta beneficiosa en neonatos infectados. En consecuencia, aunque se ha demostrado el desarrollo de resistencia frente a las reinfecciones, no se conocen con exactitud los distintos factores responsables de la misma (celulares y humorales).

14.- DIAGNOSTICO

No hay ninguna prueba prescrita para el diagnóstico de la infección por *Cryptosporidium*. La detección deooquistes de especies de *Cryptosporidium* o antígenos, en una muestra recogida y manipulada adecuadamentees suficiente para el diagnóstico positivo, y los métodos preferidos para la recogida de las muestras no soninvasivos. No existen técnicas de cultivo *in-vitro* reproducibles y disponibles para amplificar el número deparásitos antes de la identificación, por lo que los métodos elegidos son la detección de los ooquistes (el estadiode transmisión), del antígeno de *Cryptosporidium* y/o del ADN a partir de las heces o de líquidos corporalesadecuados. Además de estas pruebas, se puede utilizar la tinción de hematoxilina y eosina para unaconfirmación histológica del diagnóstico post mórtem, es útil para el diagnóstico confirmativo y común en todo el mundo, por lo que no se describirá en este capítulo.

Se pueden realizar análisis adicionales para la identificación de especies y/o del subtipo de *C. parvum* con elADN de *Cryptosporidium* mediante técnicas

moleculares, como la PCR-RFLP y/o la secuenciación de los productos amplificados de zonas genéticas definidas. Esto no solo confirma el diagnóstico sino que permite discriminar más de lo que es posible mediante morfología o morfometría en la que se utiliza el microscopio.

Para especies de *Cryptosporidium* que infectan el tracto gastrointestinal (cuadro 1), el diagnóstico inicial se basa en la detección de ooquistes en las heces por técnicas convencionales de tinción, colorantes fluorescentes, inmunofluorescentes o de la presencia de antígenos (coproantígenos) de *Cryptosporidium* en las heces por ensayo de inmunoenzima (ELISA) o por métodos inmunocromatográficos (IC). La mayoría de los métodos de diagnóstico se han desarrollado utilizando *C. parvum* por su importancia comercial y su frecuencia. Existe evidencia circunstancial que indica que en algunas muestras los métodos que se describen a continuación no sirven para detectar todos los aislamientos. Se espera que tales métodos detecten la mayoría de las infecciones por *C. parvum*, pero se sabe poco sobre su utilidad para detectar otras especies a partir de material clínico.

La comprobación de ooquistes de *Cryptosporidium* y de antígenos específicos de *Cryptosporidium* en muestras fecales es la prueba más apropiada en la mayoría de las ocasiones. Muchas infecciones que causan morbilidad y/o mortalidad en los mamíferos se deben probablemente a la criptosporidiosis por *C. parvum*. Las especies de *Cryptosporidium* responsables se pueden determinar posteriormente por PCR-RFLP o por secuenciación del ADN aislado. No hay estándares internacionales para la preparación de ooquistes purificados, antiseros, antígenos, anticuerpos monoclonales (MAb) o hibridomas, aunque existen en el mercado varios ooquistes purificados y equipos para la detección de coproantígenos utilizando anticuerpos monoclonales.

14.1 Diagnóstico de laboratorio

Las propiedades diagnósticas de los ooquistes de *C. parvum* observables en suspensión, utilizandomicroscopía de contraste interdiferencial de Nomarski (DIC), son las siguientes. Los ooquistes son lisos, con pared celular gruesa, sin color, con formas esféricas o ligeramente ovoides que cuando están desarrollados (esporulados) contienen cuatro esporozoitos alargados libres (es decir, no contenidos en un esporocisto) y un cuerpo citoplasmático residual. El tamaño medio de los ooquistes de *C. parvum* es de $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$ (rango de 4–6 μm).

Normalmente, el diagnóstico se establece por métodos microscópicos convencionales, y se utilizan con frecuencia el método modificado de Ziehl–Neelsen (mZN) y el de auramina-fenol (AP) en frotis fecales sin concentrar (5, 6, 32, 37). Cuando se espera un número bajo de ooquistes en las muestras, o cuando se necesitan ooquistes purificados para investigaciones moleculares, la concentración de los ooquistes de las muestras fecales puede aumentar la sensibilidad de la detección. Las mejores opciones para concentrar ooquistes de las heces son soluciones de azúcares (por ejemplo, solución Sheather), sales como el sulfato de zinc, la formalina-éter (formalina-etil acetato) o técnicas de concentración específicas, tales como la separación inmunomagnética (32, 33, 37).

14.2 Umbral de detección en heces

La mayoría de los métodos de tinción y fluorescencia para la detección de ooquistes y las técnicas ELISA e IC para la detección de antígenos de *Cryptosporidium* son relativamente insensibles. Estos métodos pueden detectar ooquistes en animales clínicamente enfermos, pero pueden no ser lo bastante sensibles como para detectar la infección en animales clínicamente normales. Anusz *et al.* (2) han descrito un límite de detección de 106 ooquistes por ml de heces utilizando la modificación de mZN de Kinyoun en frotis fecales sin concentrar. La concentración de ooquistes en la muestra puede aumentar la sensibilidad de la detección. En muestras humanas positivas a ooquistes, se necesitan entre 1×10^4 y 5×10^4 ooquistes por g de heces sin concentrar para obtener una eficacia de detección del 100%, utilizando el método de tinción mZN

de Kinyoun (41). Las variaciones en la consistencia fecal influyen en la facilidad de la detección, siendo más fácil detectar ooquistes en concentrados de muestras de diarrea acuosa que de muestras fecales sólidas (41). Además de técnicas microscópicas, se han descrito en la literatura varios ELISA de captura de antígeno e IC con límites de detección del orden de 3×10^5 – 10^6 ooquistes por ml (2, 29, 37), lo que indica que no ofrecen una sensibilidad mayor que los métodos microscópicos.

En muestras fecales bovinas, no se detectaron ooquistes en muestras sembradas con 10.000 ooquistes de *C. parvum* por g después de la sedimentación por formol-éter y mediante análisis por tinción con AP o por inmunofluorescencia (IF). Cuando los ooquistes se concentraron utilizando flotación en sacarosa, el nivel de detección fue de 4.000 ooquistes por g mediante ambos métodos de tinción. Después de la flotación en sal, se pudieron detectar de forma fiable 4000 ooquistes por tinción con AP, pero el límite de detección aumentó a 6.000 ooquistes por g utilizando tinción por IF (41). Webster *et al.* (42) compararon también la microscopía con la PCR, y encontraron que la PCR, conjuntamente con la separación de los ooquistes de muestras fecales por partículas inmunomagnéticas (IMS) detectó cinco ooquistes por ml de heces diluidas, que corresponde a 80–90 ooquistes por g. Incluso considerando la dilución de las muestras fecales sólidas que se necesita para llevar a cabo la IMS, esto representa un aumento de la sensibilidad de varios órdenes de magnitud respecto a los métodos convencionales de coprodiagnóstico. Actualmente se dispone de varias pruebas sensibles basadas en la PCR (véase la sección B.1. *Métodos de reconocimiento del ácido nucleico*).

14.3 Preparación de frotis fecales (o fluidos corporales apropiados) tras la concentración por flotación o sedimentación

Ningún método de flotación o sedimentación es específico para los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Los líquidos que se emplean para la flotación son más densos que los parásitos que se van a concentrar y se diseñan para una gravedad específica definida utilizando un hidrómetro adecuado disponible por

Los suministradores de material de laboratorio más importantes. Los parásitos concentrados por métodos de flotación o sedimentación se pueden identificar mediante los métodos descritos en este capítulo. Los líquidos de flotación/sedimentación pueden interferir a veces con las pruebas de diagnóstico.

El exceso de sacarosa puede reducir tanto la unión de los ooquistes a los portaobjetos de vidrio como la posterior unión del anticuerpo; la exposición prolongada a NaCl puede distorsionar la morfología y la morfometría, y la formalina puede reducir la sensibilidad de las reacciones de PCR. Cuando se concentran los ooquistes, se puede eliminar el exceso de líquido de flotación/sedimentación lavando el concentrado en agua y volviéndolo a centrifugar. Después se aspira el sobrenadante y se desecha, teniendo cuidado de no alterar el precipitado. Estos métodos de concentración son adecuados para cualquier líquido corporal que pudiera contener ooquistes.

14.4. Flotación

El principio de la flotación utiliza un medio de suspensión líquido, que es más denso que los ooquistes que se van a concentrar. Por consiguiente, cuando se mezclan con el líquido de flotación, los ooquistes suben hasta la superficie y pueden ser tomados de la película superficial y detectados utilizando el método de referencia. Para que un líquido de flotación sea útil en diagnósticos, en los que la morfología y la morfometría son factores críticos, el medio de suspensión no solamente debe ser más pesado que el objeto que va a flotar sino que no debe producir un encogimiento o deformación capaz de convertir al objeto en algo no diagnosticable (32). Los métodos de flotación en sacarosa, los de flotación en sulfato de zinc y los de flotación en sal saturada son adecuados para la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium*. La siguiente es una descripción de los métodos utilizados para preparar soluciones de flotación y para concentrar ooquistes.

14.5 Flotación en sacarosa

La solución de sacarosa (gravedad específica: 1,18) se prepara en un vaso de precipitado de vidrio añadiendo 256 g de sacarosa a 300 ml de agua desionizada. La solución se calienta suavemente (<60°C) y se agita continuamente con la ayuda de un agitador magnético sobre un agitador con placa caliente, hasta que la sacarosa se disuelva totalmente. La solución de sacarosa se coloca en hielo o en un refrigerador hasta que su temperatura se ajuste a 4°C. La solución de sacarosa fría se transfiere a un cilindro medidor de 500 ml y se ajusta su gravedad específica a 1,18 añadiendo suficiente agua fría desionizada (4°C). La solución de sulfato de zinc se transfiere a una botella de vidrio con tapa de rosca, se etiqueta, se pone la fecha, las iniciales y se almacena a 4°C hasta su utilización.

14.6 Flotación en sal

Se prepara una solución de sal saturada (gravedad específica 1,2) añadiendo aproximadamente 200 g de cloruro de sodio a 200 ml de agua desionizada. La solución se calienta suavemente (<60°C) y se agita continuamente con la ayuda de un agitador magnético sobre un agitador con placa caliente. Se añaden cantidades pequeñas de cloruro de sodio (aproximadamente 10 g) a intervalos de 10 minutos hasta que la solución se sature. La solución salina saturada se decanta en una botella de vidrio limpia y se coloca en hielo o en un refrigerador hasta ajustar la temperatura a 4°C. La solución de sal saturada fría se transfiere a un cilindro medidor de 500 ml y se ajusta su gravedad específica a 1,2 añadiendo agua fría desionizada (4°C). La solución de sal saturada se transfiere a una botella de vidrio con tapón de rosca y se etiqueta, se pone la fecha, las iniciales y se almacena a 4°C hasta su utilización.

La salmuera es una solución acuosa concentrada de NaCl, que tiene una gravedad específica entre 1,120 y 1,200 dependiendo de las impurezas de la sal utilizada. Aunque resulta adecuada para la concentración de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., algunos cistos de protozoos pueden llegar a deformarse o abrirse en este líquido de flotación. El tiempo óptimo para examinar las muestras obtenidas por flotación en salmuera está entre 5 y 20 minutos tras su recuperación de la flotación. La flotación en centrifugación se ha utilizado también para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium* (y otros ooquistes de parásitos y óvulos) de las heces. La mayor parte de los métodos de flotación se basan en modificaciones de la técnica de Clayton-Lane, en la que los ooquistes se concentran por flotación y se recogen como gota pendiente en la parte inferior de un cubre de vidrio colocado sobre el menisco positivo del líquido de flotación. La centrifugación se utiliza para separar las partículas más densas que el líquido de flotación de los ooquistes y otras partículas que flotarán sobre la superficie del líquido de flotación. La inclusión de una fase de centrifugación acelera la separación de los ooquistes de otras partículas (y por tanto, la concentración de ooquistes) y minimiza el riesgo de que el líquido de flotación afecte adversamente a la morfología y morfometría de los ooquistes. El operador debería tener en cuenta los temas relacionados con salud y seguridad, incluyendo las heridas por laceración y pinchazo, asociadas al manejo de los cubres.

14.7 Métodos convencionales de tinción

Tanto el método mZN como el AP son eficaces para detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en heces (5, 6, 32, 37). Los portos teñidos con mZN deben examinarse con una lente objetivo $\times 40$ y los potenciales ooquistes se deben confirmar y medir con la lente objetivo $\times 100$ (morfología y morfometría) utilizando un microscopio de campo claro con un ocular de $\times 10$. Los portos teñidos con AP necesitan un microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) (excitación a 490 nm; emisión a 510 nm). Un filtro UV (excitación a 355 nm, emisión a 450 nm) puede ayudar a visualizar los

esporozoitos teñidos con AP. Los portas teñidos con AP se pueden analizar con lentes de objetivo de x20 y los ooquistes con morfología típica se pueden confirmar con lentes de objetivo x40. El objetivo x100 debe utilizarse para todas las medidas morfométricas (tamaño). Los ooquistes teñidos con AP observados con los filtros para FITC o UV pueden medirse incrementando lentamente el voltaje (intensidad luminosa) de la fuente luminosa de campo claro, de modo que las imágenes por fluorescencia y por campo claro se puedan ver a la vez. El objeto se puede medir entonces con el calibrador ocular.

14.8 Método de Ziehl—Neelsen modificado (mZN)

Fucsina fenicada fuerte: Disolver 20 g de fucsina fenicada en 200 ml de metanol absoluto y mezclar con un agitador magnético hasta su disolución. Añadir con cuidado 125 ml de fenol líquido (GPR [80% p/p en agua destilada]) hasta que se mezcle bien y llevar el volumen final a 1.675 ml con agua desionizada.

Mezclar exhaustivamente. Filtrar antes de usar a través de papel de filtro Whatman No. 1 para eliminar restos, y conservar en una botella de reactivo stock. Marcar con fecha e iniciales. Guardar el reactivo stock en la oscuridad a temperatura ambiente.

También se dispone de preparaciones comerciales. A menudo la concentración de fucsina básica puede variar entre límites aceptables de 1–3%.
1% de metanol ácido: Se añaden cuidadosamente 20 ml de ácido clorhídrico (GPR/SLR) a 1.980 ml de metanol absoluto y se mezcla. Se pasa a una botella de reactivo stock, y se marca con la fecha e iniciales.
0,4% de verde malaquita: Se añaden 2 g de verde malaquita a 480 ml de agua desionizada y se mezcla con un agitador magnético. Se filtra a través de papel de filtro Whatman No.1, se pasa a una botella de reactivo stock, y se marca con la fecha e iniciales.

14.9 Características diagnósticas de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. teñidos con mZN

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Se tiñen de rojo en un fondo verde pálido. El grado y proporción de la tinción varían con los ooquistes individuales. Además, las estructuras internas toman el colorante con distinta afinidad. Algunos pueden aparecer amorfos mientras que otros contienen las formas características de los esporozoitos. Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se presentan como discos con 4–6 µm de diámetro. Las levaduras y los restos fecales se tiñen de rojo mate. Algunas esporas bacterianas pueden retener también el color rojo, pero son muy pequeñas y no originan confusión.

14.10 Características diagnósticas de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Teñidos con AP.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Parecen circulares u ovoides y muestran una fluorescencia típica verde-manzana sobre un fondo oscuro. Los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* son circulares o conforma anular, con diámetro de 4–6 µm. Si es posible, se examina la preparación con un filtro para UV (excitación a 355 nm, emisión a 450 nm), ya que los esporozoitos son visibles más fácilmente bajo UV que con el filtro para FITC. Con el filtro para UV, los ooquistes son de color verde pálido y los esporozoitos, amarillo verdosos.

14.11 Métodos inmunológicos

Han resultado útiles tres sistemas de detección inmunológica de ooquistes de *Cryptosporidium* y se han comercializado varios kits. Cada uno tiene un nivel similar de sensibilidad y puede emplear muestras fecales concentradas y no concentradas, dependiendo del número probable de ooquistes en la muestra. Los equipos basados en la inmunofluorescencia, en los que se utiliza MAb anti-*Cryptosporidium* conjugado con isotiocianato de fluoresceína que reconoce los epítomos expuestos en la superficie de los ooquistes (FITC-C-MAb), son más específicos, y pueden ser más sensibles a la hora de detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en los frotis de heces que las técnicas de tinción convencionales. Comparados con las técnicas de tinción convencionales, los equipos de detección

basados en anticuerpos (inmunofluorescencia, ELISA e inmunocromatografía) parencaros, si se tienen en cuenta que a muchos de ellos se les atribuye un umbral de detección similar.

d) Inmunofluorescencia directa

En la inmunofluorescencia directa, un anticuerpo marcado con FITC contra epítomos superficiales específicos del género se une a los ooquistes de los criptosporidios presentes en la muestra. Utilizando un sistema de filtro para FITC, la excitación con luz UV (longitud de onda de máxima excitación 490 nm, longitud de onda media de emisión 530 nm) causa que los ooquistes marcados muestren una fluorescencia verde-manzana brillante.

b) Detección de antígenos de *Cryptosporidium* spp. Por enzimo inmunoensayo

En el ELISA se busca la presencia de antígenos de criptosporidios en las heces (coproantígeno). Dependiendo del material comercial, los coproantígenos de *Cryptosporidium* se capturan y desarrollan con una mezcla de anticuerpos mono y policlonales. Si se exceptúan el aumento del número de muestras y la automatización, los equipos de detección de antígenos no ofrecen más sensibilidad ni ventajas que los métodos descritos.

c) Detección de antígenos de *Cryptosporidium* mediante inmunocromatografía

En vez de apoyarse en la difusión molecular para estipular la tasa de unión al antígeno mediante el anticuerpo de captura como en el formato ELISA, que normalmente tarda aproximadamente una hora por cada reacción, en la inmunocromatografía de flujo lateral (IC), la velocidad de unión del antígeno al anticuerpo de captura ligado a la fase sólida se aumenta por la acción de la absorción. Esto atraerá rápidamente a todos los fluidos a través de una membrana incluida en la cajita para inmunocromatografía y reduce el tiempo requerido para el análisis de horas a minutos o segundos. Los antígenos solubles

de *Cryptosporidium* en la muestra de prueba son atraídos dentro de la membrana y entran en contacto y se unen a los anticuerpos inmovilizados obtenidos contra los antígenos de *Cryptosporidium*, lo cual aumenta drásticamente la velocidad de la interacción del anticuerpo-antígeno. Las reacciones positivas son cualitativas y se ven como una banda de color en un lugar específico de la membrana, normalmente identificado por una línea en la caja inmunocromatográfica.

14.12 Métodos de reconocimiento del ácido nucleíco

La PCR es más sensible que los métodos convencionales y las pruebas inmunológicas para detectar ooquistes en las heces, aunque la sensibilidad de los métodos publicados varía entre 1 y 10⁶ ooquistes. A menudo estas técnicas están restringidas a los laboratorios especializados.

15.- TRATAMIENTO

La rehidratación oral o intravenosa y el aporte de electrolitos es el tratamiento sintomático más sencillo e importante hasta que los enfermos (humanos o animales) adquieren suficiente inmunidad específica; generalmente se completa con antidiarreicos inespecíficos (caolín, pectina y loperamida). Son muchos los quimioterápicos ensayados contra la criptosporidiosis, pero ninguno ha respondido con la eficacia deseada (152). Tan pobre respuesta la explica Sterling (136) por la singular ubicación intracelular del parásito que le permite utilizarla como “mecanismo de escape” y como protección contra los fármacos anticriptosporidiosicos.

En el año 2002, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) aprobó el uso en Pediatría del fármaco nitazoxanida (NTZ, AliniaTM) para tratar la diarrea infantil, en niños de 1-11 años debida a *C. parvum* y *Giardia lamblia*. La eficacia de este antiprotozoario sintético se estudió en niños con ensayos doble ciego y control de placebo; se observó una duración más corta de la diarrea y un tiempo de excreción de ooquistes con las heces más breve (137, 138), pero su seguridad y eficacia en los adultos y en pacientes inmunodeficientes, no se

ha establecido todavía (139). Lo que si se ha visto (140) es que algunos antirretrovirales inhibidores de la proteasa, como el Indinavir actúan directamente en *C. parvum* interfiriendo su ciclo biológico.

En la Tabla I.5 se señalan algunos medicamentos cuyo uso clínico ha demostrado que son eficaces contra algunas criptosporidiosis. Los antibióticos aminoglicosidos, como la paromomicina en los terneros y ratones infectados con *C. parvum* y en las aves parasitadas con *C. baileyi*, disminuyen la duración del periodo latente, la difusión de ooquistes y los síntomas clínicos (141). La administración, durante 2-3 días, de dosis relativamente grandes (6-15 mg/kg peso vivo/día) de lasalocid –un antibiotico ionoforo polieter– constituyo un tratamiento eficaz de la criptosporidiosis aguda de terneros muy jóvenes (142), pero suministrado durante dos semanas a dosis profilácticas (8 mg/kg peso vivo/día) resulto muy toxico (143). Dosis menores de lasalocid no mostraron eficacia alguna frente a infecciones por *C. parvum*.

La azitromicina (un antibiótico macrolido), sola o combinada con la paromomicina, mejora en la especie humana los síntomas clínicos (144). La β -ciclodextrina (un excipiente usado en la industria farmacéutica para mejorar la estabilidad y solubilidad de ciertos fármacos), la utilizaron con éxito Castro Ermida y colaboradores (145) para tratar ratones infectados experimentalmente y corderos que se infectaron de forma natural. Se admite que actúa eliminando los ooquistes y otras formas extracelulares parasitas al provocar una diarrea osmótica.

También se han ensayado otras terapias alternativas, como el suero hiperinmune y el calostro bovino hiperinmune que contienen anticuerpos contra las proteínas de superficie de *C. parvum*; frente a esporozoitos se han ensayado, asimismo, anticuerpos monoclonales (160, 161). La administración de probióticos se ha comprobado que reduce la duración del curso clínico y el recuento de ooquistes, eliminados por ratones infectados experimentalmente (162, 163). Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que los caldos de cultivo de

bacterias lácticas, libres de células, reducen significativamente la viabilidad de los oocistos (164). Aunque no se conocen suficientemente los mecanismos implicados en la protección contra la criptosporidiosis, los estudios realizados sugieren que las bacterias probióticas podrían usarse como agentes terapéuticos frente a las especies de *Cryptosporidium* (162).

Tabla I.5. *Fármacos clínicamente eficaces en el tratamiento de las criptosporidiosis.*

Fármaco	Nombre comercial	Dosis humanas	Dosis animales	Bibliografía
Paramomicina	Humatina	500-750 mg PO, bid/qid (adultos) 25-35 mg/kg/día PO tid dividido (Pediátricas)	Temeros: 100 mg/kg/día PO Corderos: 100-200 mg/kg/día PO Cabritos: 100 mg/kg/día PO	(144), (146), (147), (148)
Azitromicina	Zitromax	500 mg PO quid (adultos)		(144)
Roxitromicina	Numerosos	300 mg bid PO (adultos)		(149)
Lactato de Halofuginona	Halocur		Temeros, corderos, cabritos 100 mg/kg/sid, durante 7 días	(150), (151)
Nitazoxanida	Alinia	100-200 mg PO (adultos)		(138)
Letrazuril		50-100 Mg/día (adultos)		(153)
Decoquinato	Deccox		Terneros: 2.5-10 mg/kg Cabras: 2,5 mg/kg	(151), (154)
β -ciclodextrina			Ovejas: 500 mg/kg/sid, 3 días	(138)
Yemas de huevos superinmunes		60 mL/día durante 3 semanas		(155)
Anti <i>Cryptosporidium</i> bovino		20 mL/h durante 10 días	Temeros: 200 mL bid	(156), (157), (158), (159)
Inmunoglobulina		20-80 g/día	Corderos: 50 mL bid	

Fuente: Thompson *et al.* (51).

Abreviaturas latinas y su significado: *bid* (*bis in die*) = dos al día; *PO* (*per os*) = Vía oral; *sid* (*semel in die*) = una al día; *tid* (*ter in die*) = tres al día.

16. INMUNOPROFILAXIS

La vacunación con proteínas implicadas en la patogénesis de los criptosporidios (Por ejemplo, glicoproteínas GP40, GP47, GP15, CS4, etc.), aunque no es una práctica corriente, constituye todavía una estrategia atractiva en la lucha contra las criptosporidiosis (165). Se admite que ambas respuestas inmunes, la humoral y la mediada por células, están implicadas en la eliminación de los criptosporidios. Se ha observado que los hospedadores infectados, en buen estado de salud, esto es, con ambos sistemas inmunes intactos son muy resistentes a la reinfección y a desarrollar un cuadro clínico.

En las especies ganaderas y en ciertas poblaciones humanas, la inmunoprofilaxis es la estrategia preferida pero en la industria farmacéutica todavía no se dispone de vacunas para la venta. Se admite que la inmunidad mediada por células es el sistema fundamental para eliminar de los hospedadores las especies de *Cryptosporidium* que albergan (166). Esto se ha comprobado en modelos animales carentes de algunos elementos de su sistema inmune (por ejemplo, ratones SCID) y también supervisando la respuesta inmune a hospedadores con deficiencias en su sistema inmunitario, mediado por células, a causa de defectos genéticos, infecciones, etc. (166). La respuesta humoral es menos importante a este respecto, Dann *et al.* (167) han demostrado en animales y en voluntarios humanos respuestas específicas anticuerpo-parasito, sin eliminación de parásitos, pero en otros estudios la resistencia a la infección la han atribuido a respuestas locales debidas a IgA e IgM (166).

Se ha demostrado (véase más atrás) que los anticuerpos policlonales del suero y del calostro hiperinmune reducen la difusión de ooquistes. En terneros y corderos neonatos los anticuerpos ingeridos con el calostro, atravesando la mucosa intestinal, pasan a la circulación durante las primeras 24 horas de vida y más tarde se secretan en la luz intestinal, proporcionando una inmunización pasiva que dura 1-2 meses. La protección de los terneros recién nacidos se logró con anticuerpos policlonales IgG contra ooquistes completos con los antígenos P23, CP5/60 y CP15 antes citados. También se ha visto que la inmunización pasiva con suero

hiperinmune proporciona respuestas clínicas en voluntarios humanos y modelos animales crónicamente infectados (166,168). En resumen, aunque son limitados los trabajos de este tipo, se piensa que los anticuerpos específicos contra *Cryptosporidium*, uniéndose a una o más formas criptosporidiosicas extracelulares, previenen la invasión de los enterocitos y su unión a los mismos.

El vacunar a los animales muy jóvenes, cuyo sistema inmune no está suficientemente formado, no es de recomendar. En el caso de grandes masas animales la vacunación es cara y por otra parte los animales adultos sanos, mantenidos en buenas condiciones higiénicas, en caso de enfermar, en muy raras ocasiones mueren. Nuestras lagunas de conocimiento en la respuesta inmune del hospedador frente a la infección, son barreras que hay que superar para desarrollar una terapéutica eficaz contra la criptosporidiosis.

17.- PREVENCIÓN Y CONTROL

Hasta que no se dispongan de vacunas y drogas efectivas, las medidas basadas en las prácticas de manejo, nutrición e higiene del rebaño, que contribuyan a minimizar el grado de exposición al agente infeccioso y que aumente el nivel de resistencia de los neonatos, pueden reducir significativamente la morbilidad y la difusión del parásito.

- a) Reducción de la exposición: si se consigue a prevenir la infección en las primeras dos a tres semanas de vida, mediante la reducción de ooquistes en el ambiente, los efectos de *C. parvum* posiblemente sean leves y transitorios. Esto se logra con las medidas que aseguren que los becerros sean alojados en un ambiente con reducida contaminación. El empleo de potreros o parideras, limpios, secos, y sin ocupación reciente por otros animales, genera condiciones apropiadas para los recién nacidos. Además, es conveniente que las vacas no permanezcas mucho tiempo en estos locales, y que a carga animal no sea alta.

Los becerros que presentan diarrea deben ser aislados, esto es de gran importancia, ya que, contribuirá a evitar la difusión de la enfermedad.

Igualmente debe evitarse la presencia de otras especies animales en las explotaciones pecuarias.

- b)** Resistencia inespecífica: para lograr un aumento en la resistencia se debe proporcionar buena alimentación a la madre y al neonato, permitiendo que estos consuman calostros durante las primeras horas de vida. Incluso la implementación de un programa adecuado de vacunación de las vientres gestantes, contra otros agentes causantes de diarrea, transferiría inmunoglobulinas específicas vía calostro materno y podría reducir la incidencia de diarrea cuando se asocia a medidas de manejo apropiadas.

En definitiva, la combinación de estas medidas, puede ayudar a controlar la infección, aunque las variaciones de tamaño de rodeo, sistemas de explotación, disponibilidad de instalaciones y del personal encargado, así como otros aspectos de las explotaciones ganaderas hacen difícil señalar procedimiento que se apliquen a todas las situaciones.

REFERENCIAS

- 1., Mosier, D. A. & Oberst, R. D. (2000) Cryptosporidiosis. A global challenge. *Annual New York Academy of Sciences*. **916**: 102-11.
- 2., Pereira, S. J., Ramirez, N. E., Xiao, L. & Ward, L. A. (2002) Pathogenesis of human and bovine *Cryptosporidium parvum* in gnotobiotic pigs. *Journal of Infectious Diseases*. **186**: 715-718.
- 3.-Thompson, R. C. A. (2003) Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infectious. *Journal of Parasitology*. **89**: S134-S140.
- 4.- Petry, F. (2004) Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis*. **10**: 586-601.
- 5.-Thompson, R. C. A., Olson, M. E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M. S. &
- 6.-Enomoto, S. (2005) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*. **59**: 77-158.
- 7.-Godoy E. 2007 Prevalencia de cryptosporidium spp. E identificacion de factores de riesgo en becerras de Veracruz y la Comarca Lagunera, Mexico.
- 8.-Smith et al., 2005 Santi M. Fayer R. 200. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from.
- 9.-Mohammadi G. R., Naghibi A., 2010. Prevalence of cryptosporidium spp. Infection in some dairy herds of mashhad and association with diarrhea in newborn calves.
- 10.- Handley R. M. 2006. *Giardia duodenalis* and cryptosporidium ssp.
- 11.- Ameni G. Hewinson G. vordemeier M. 2008. Appraisal of interpretation criteria for the comparative tuberculim test for diagnosis.
- 12.- Aguilar B.G. Romero S.D., Martinez H. D., 2007. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp., en sistemas ganaderos de carne en el centro de Veracruz, Mexico. Xx reunión Científico-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz. IX simposio internacional y IV Congreso Nacional de Agricultura sostenible.

13.- Ameni G., Hewinson G., Aseffa A., Young D., Vordermeier M. 2008. Appraisal of interpretation criteria for the comparative, intradermal tuberculin test for diagnosis of tuberculosis in cattle in central Ethiopia. *Clin. Vac. Immunol.*

14. Saeij, J. P., Boyle, J. P. & Boothroyd, J. C. (2005a) Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology*. **21**: 476-481.

15. Boothroyd, J. C. (2009) *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *International Journal for Parasitology*. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.003.

16. Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R. & Dubey, J. P. (2006) Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the Royal National Academy of Sciences USA*. **103**: 11423-11428.

17. Saeij, J. P., Arrizabalaga, G. & Boothroyd, J. C. (2008) A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2 CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistence. *Infection and Immunity*.

18. Hitziger, N., Dellacasa, I., Albiger, B. & Barragan, A. (2005) Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by *in vivo* bioluminescence image. *Cell Microbiology*.

19. Pepper, M., Dzierszinski, F., Crawford, A., Hunter, C. A. & Roos, D. (2004) Development of a system to study CD4⁺-T-cell responses to transgenic ovalbumin expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infection and Immunology*.

20. Saeij, J. P., Collier, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W. & Boothroyd, J. C. (2007) *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature*.

21. Shirafuji, H., Xuan, X., Kimata, I., Takashima, Y., Fukumoto, S., Otsuka, H., Nagasawa, H. & Suzuki, H. (2005) Expression of P23 of *Cryptosporidium parvum* in *Toxoplasma gondii* and evaluation of its protective effects. *Journal of Parasitology*.

22. Gajria, B., Bahl, A., Brestelli, J., Dommer, J., Fischer, S., Gao, X., Heiges, M., Iodice, J., Kissinger, J. C., Mackey, A. J., Pinney, D. F., Roos, D. S., Stoeckert, Jr. C. J., Wang, H. & Brunk, B. P. (2008) ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Research*.

23. Knight, B. C., Kissane, S., Falciani, M., Salmon, M., Stanford, M. R. & Wallace, G. R. (2006) Expression analysis of immune response genes of Muller cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Neuroimmunology*.
24. Fouts, A. E. & Boothroyd, J. C. (2007) Infection with *Toxoplasma gondii* bradyzoites has a diminished impact on host transcription relative to tachyzoite infection. *Infection and Immunity*.
25. Kim, S. K., Karasov, A. & Boothroyd, J. C. (2007) Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain in host control of parasite replication in the intestine. *Infectious Immunology*.
26. El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrum, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G. & Dubremetz, J. F. (2006) The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modelling. *Proteomics*.
27. Coopens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C. & Joiner, K. A. (2006) *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*.
28. Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, T. M., Boothroyd, J. C. & Bradley, P. J. (2007) *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryote Cell*.
29. Saeij, J. P., Boyle, J. P., Grigg, M. E., Arrizabalaga, G. & Boothroyd, J. C. (2005b) Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infectious Immunology*.
30. El Hajj, H., Lebrum, M., Arold, L. T., Vial, H., Labesse, G. & Dubremetz, J. F. (2007) ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathology*.3, e14.
31. Seeber, F., Aliverti, A. & Zanetti, G. (2005) The plant-type ferredoxin-NADP⁺-reductase/ferredoxin redox system is a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Current Opinion in Pharmacology Research*.
32. Crawford, M. J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D. S. & Seeber, F. (2006) *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO Journal*.
33. Blanchard, N., Gonzalez, F., Schaeffer, M., Joncker, N. T., Cheng, T., Shastri, A. J., Robey, E. A. & Shastri, N. (2008) Immunodominant protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Natural Immunology*.
34. Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Sheran, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh S. & Sher, A.

(2005)TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*.

35. Aosai, F., Rodriguez Pena, M. S., Mun, H. S., Fang, H., Mitsunaga, T., Norose, K., Kang, H. K., Bae, Y. S. & Yano, A. (2006) *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones*.

36. Peyron, F., Lobry, J. R., Musset, K., Ferrandiz, J., Gomez-Marin, J. E., Petersen, E., Meroni, V., Rausher, B., Mercier, C., Picot, S. & Cesbron-Delauw, M. F. (2006) Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes and Infection*.

37.-Thompson, R. C. A., Olson, M. E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M. S. & Enomoto, S. (2005) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*.

38.- Del Coco, V. F., Córdoba, M. A., Basualdo, J. A. *Cryptosporidium* infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 2008, vol. 158, p. 31-35.

39.- Pinto De Almeida Castro, A., Bilbao G., Echevarria, H., Moran, P., Catena, M., Cacciato, C., Monteavaro, C. *Livestock Research for Rural Development*, 2009,

40.-Huynh, M. H. & Carruthers, V. B. (2006) *Toxoplasma* MJC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLOS Pathology*.

41.- Bradley, P. J., Ward, C., Cheng, S. J., Alexander, D. L., Coller, S., Coombs, G.H., Dunn, J. D., Ferguson, D. J., Sanderson, S. J., Wastling, J. M. & Boothroyd, J. C. (2005) Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*.

42.- Jung, C., Lee, C. Y. & Grigg, M. E. (2004) The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface protein. *International Journal for Parasitology*.

43. Kim, S. K., Karasov, A. & Boothroyd, J. C. (2007) Bradyzoite-specific surface antigen SRS9 plays a role in maintaining *Toxoplasma gondii* persistence in the brain in host control of parasite replication in the intestine. *Infectious Immunology*.

44.- Rachinel, N., Buzoni-Gatel, D., Dutta, C., Mennechet, F. J., Luangsay, S., Minns, L. A., Griggs, M. E., Tomavo, S., Boothroyd, J. C. & Kasper, L. H. (2004)

The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*.
Journal of Immunology.

45.-El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrum, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G. & Dubremetz, J. F. (2006) The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modelling. *Proteomics*.

46.-Minns, I. A., Menard, L. C., Foureau, D. M., Darche, S., Ronet, C., Mielcarz, D. W., Buzoni-Gatel, D. & Kasper, L. H. (2006) TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*.
Journal of Immunology.

47.- Vyas, A., Kim, S. K., Giacomini, N., Boothroyd, J. C. & Sapolsky, R. M. (2007) Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*.

48.- • Ferre , I., Benito -Peña , A., García , U., Osoro , K. Ortega -Mora , L.M. 2005. Effect of different decoquinat treatments on cryptosporidiosis in naturally infected cashmere goat kids. *Vet. Rec.*, 157: 261-262.

49.-• Quílez , J; Sánchez Acedo , C; Avendaño , C; del Cacho ,E. López Bernad , F. Efficacy of two peroxygen. Based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*. Mayo. 2005. 2479-2483.

50.-• Sánchez Acedo , C; Quílez Cinca , J; del Cacho Malo ; López Bernad , F; Causapé -Valenzuela , A.C. E. 2005 Prevalencia de parasitación por *Cryptosporidium* en animales de abasto. Libro Jubilar. Homenaje a Guillermo Suárez. ISBN: 84-609-7113-9 pp.391-396

51.-• Sánchez Acedo , C; Quílez Cinca , J; del Cacho Malo , E. 2007. Enfermedades emergentes transmitidas por el agua: criptosporidiosis. *Doctori Solsona Amicorum Liber. Ateneode Zaragoza*. D.L. Z- 2.398. pp. 78-89.