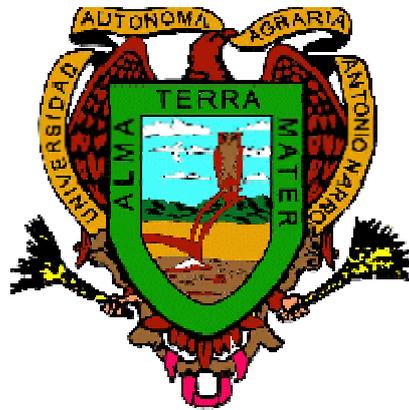


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“Hemograma de becerras con signos clínicos de diarrea asociada a
criptosporidiosis”

POR:

HUGO RUTILIO CENTENO ANAYA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

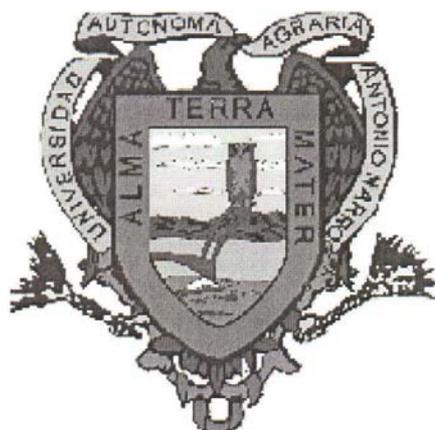
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2010.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



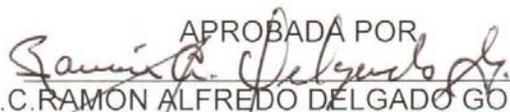
**"HEMOGRAMA DE BECERRAS CON SIGNOS CLÍNICOS DE
DIARREA ASOCIADA A CRIPTOSPORIDIOSIS"**

TESIS

POR:

HUGO RUTILIO CENTENO ANAYA

APROBADA POR


M.C. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ


M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO
COORDINACION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

TORREON COAHULA, MEXICO

JUNIO DEL 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**"HEMOGRAMA DE BECERRAS CON SIGNOS CLÍNICOS DE
DIARREA ASOCIADA A CRIPTOSPORIDIOSIS"**

TESIS

POR:

HUGO RUTILIO CENTENO ANAYA

APROBADA POR

Ramón A. Delgado G.

M.C. RAMÓN ALEREDO DELGADO GONZALEZ

J. Guadalupe Rodríguez Martínez
M.V.Z. J. GUADALUPE RODRIGUEZ MARTINEZ
VOCAL

M. Magdalúpe de la Fuente Salcido

M.C. M. MAGDALUPE DE LA FUENTE SALCIDO
VOCAL

Juan José Muñoz Varela
M.C. JUAN JOSE MUÑOZ VARELA
VOCAL SUPLENTE

Rodrigo Isidro Simón Alonso
M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO
COORDINACIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TORREON COAHUILA, MEXICO

JUNIO DEL 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

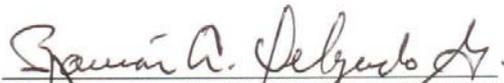
**"HEMOGRAMA DE BECERRAS CON SIGNOS CLÍNICOS DE
DIARREA ASOCIADA A CRIPTOSPORIDIOSIS"**

TESIS

POR:

HUGO RUTILIO CENTENO ANAYA

QUE SE SOMETE A CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



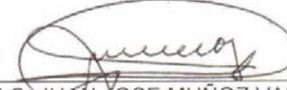
M.C. RAMON ALFREDO DELGADO GONZALEZ


M.V.Z. J. GUADALUPE RODRIGUEZ MARTINEZ

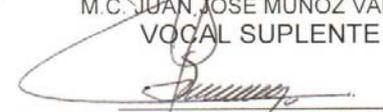
VOCAL


M.C. MA. GADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL


M.C. JUAN JOSE MUÑOZ VARELA

VOCAL SUPLENTE


M.V.Z RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO
COORDINACION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

TORREON COAHUILA, MEXICO

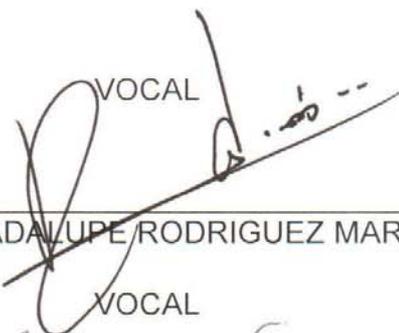
JUNIO DEL 2010

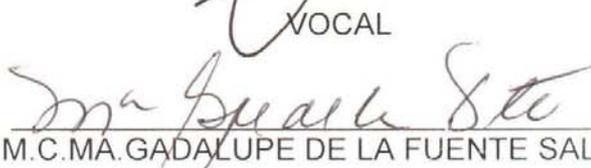
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

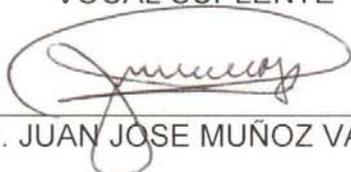
PRESIDENTE DEL JURADO


M.C. RAMON ALFREDO DELGADO GONZALEZ

VOCAL

M.V.Z. J. GUADALUPE RODRIGUEZ MARTINEZ

VOCAL

M.C. MA. GADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE


M.C. JUAN JOSE MUÑOZ VARELA

TORREON COAHULA, MEXICO

JUNIO DEL 2010

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por haberme dado la oportunidad de existir, de tener a la familia hermosa que me vio crecer y por haberme dado la fortaleza para que me esmerara siempre en obtener y lograr todas mis metas y objetivos que me propuse durante toda mi vida

A MIS PADRES:

Sra. María Anaya Sánchez que es mi madre y que me ha guiado por la vida con sabiduría y con amor y que siempre que lo necesite ella está a mi lado así sea para festejar un día importante o para darme un consejo o bien para darme un regaño y explicarme que las cosas que hago no todas están bien pero que siempre hay una solución a cualquier problema muchas gracias mama.

Sr. Rutilio Centeno Villeraldo que es mi padre y que me ha apoyado incondicionalmente en todo lo que hago por ser mi ejemplo a seguir ya que ha sido un padre ejemplar en todos los aspectos y que a pesar de lo difícil que fue para el dejarme llevar a cabo mis sueños lejos de mi hogar supo ser fuerte siempre aunque por dentro estuviera muy triste el siempre me despedía con una sonrisa y con una palmada diciéndome que no me preocupara que todo estaría bien y que le echara muchas ganas que siempre que lo necesitara estaría ahí para apoyarme y así lo ha hecho siempre además de enseñarme a afrontar los problemas por difíciles que parecieran y siempre salir adelante muchas gracias papa.

A MIS HERMANOS:

Fernanda , Verónica, Ángel, Luz que han compartido muchos momentos vellos buenos y malos y que siempre han estado a mi lado incondicionalmente apoyándome en todo y siempre diciéndome que hay que echarle ganas que no queda de otra que lo importante es que siempre estemos unidos y aunque a veces no estemos de acuerdo o discutamos no saben cuánto los quiero y que nunca acabare de agradecerles por todo su apoyo y como dicen ustedes pase lo que pase siempre vamos a estar juntos para superar todo muchas gracias hermanitos

A MIS TIOS:

Sra. Guadalupe Centeno Villeraldo porque siempre que necesitaba alguna cosa y no tenía a donde ir a pedir ayuda siempre estuvo ahí para sacarme de cualquier apuro muchas gracias

Sra. Celia Anaya Sánchez por haberme aconsejado cada que lo necesitaba y haberme asentado los pies en la tierra cada que sentía que volaba muchas gracias

Sra. Ocotlán Anaya Sánchez por ser la que más me consiente y aunque siempre estemos peleando es porque los dos somos igual de necios pero siempre que lo necesito está ahí para lo que sea (le debo varios balones y patinetas jejejeje) muchas gracias.

Sra. Gabriela Tobon Centeno por cubrirme en mis aventuras ante mis papas además de que siempre que la regaba siempre me daba ánimos para volver a hacer las cosas muchas gracias.

Profesor Mariano Lidio Carreón Ambrosio por ser mi cómplice en muchas de mis aventuras y parrandas además de que siempre que necesitaba su carro me lo prestaba aunque eso molestara mucho a mi tía siempre me lo prestaba muchas gracias tío.

A MIS PRIMOS:

Por haber formado parte de mi vida por los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos y que no cambiaría por nada muchas gracias.

A MI NOVIA:

Sindy Castro Velasco Por ser lo más hermoso que tengo en la vida llenarme de felicidad la existencia y porque cada día que paso es maravilloso me haces sentir pleno y seguro de mi mismo además de que a tu lado siempre quiero ser mejor en todos los aspectos para que siempre estés feliz a mi lado te amo mi principa

A MIS AMIGOS:

A mi amiga WESATO por ser una persona incondicional, además de que cada que lo necesitaba me daba un regaño o un consejo y porque desde que la conozco siempre ha sido un gran apoyo para que yo nunca me quedara a mitad del camino muchas gracias.

Israel, Sergio, Aldo, Osbaldo, Ulises, Eduardo, Ángel que además de mis amigos fueron mis compañeros de casa durante estos cinco años donde compartimos muchos momentos buenos y malos pero siempre la pasábamos lo mejor que se podía además de a verme soportado todo este tiempo se los agradezco.

A MI ASESOR:

M.C.V. Ramón Alfredo Delgado Gonzales por todo el apoyo que me brindo para poder llevar a cabo este trabajo y que yo creo que sin él no hubiera sido posible que yo alcanzara a realizar uno de mis más grandes sueños en mi vida muchas gracias medico.

A Olí, Flor y Ana que me ayudaron para llevar a cabo más rápido mi trabajo y que a pesar que tarde algo de tiempo para aprender hacer algunas cosas ellas me tuvieron paciencia muchas gracias.

DEDICATORIAS

A dios por haberme dado la luz y el entendimiento para lograr llevar a cabo uno de mis sueños más anhelados.

A mis padres por el apoyo incondicional que siempre me brindaron y que a pesar de que muchas veces se ponían tristes porque tenía que dejarlos siempre me dieron fuerzas para sobresalir y echarle ganas a todo los quiero mucho

A mis abuelas porque ellas fueron uno de los principales motivos de que yo me fijara metas ya que siempre he sido su orgullo y su negrito consentido al cual siempre que sus papas lo querían castigar lo defendían y le consentían sin importar que hiciera el siempre hacia las cosas bien ante sus ojos las adoro como no se imaginan.

A mis hermanos porque sin ustedes no sería feliz además de su apoyo incondicional en todo y porque gracias a ustedes he entendido muchas cosas que en un principio creí que estaban mal los quiero mucho

INDICE

AGRADECIMIENTOS	6
DEDICATORIAS	9
INDICE DE CUADROS	11
INDICE DE FIGURAS	11
RESUMEN	12
I.- INTRODUCCIÓN.	13
II.- ANTECEDENTES.	14
2.1. Historia.	14
2.2. Etiología.	15
2.3. Morfología.	17
2.4. Ciclo biológico.	18
2.5.- Epidemiología.	21
2.6.- Factores de riesgo.	21
2.7.- Transmisión.	22
2.8.- Patogenia.	23
2.9.- Signos y lesiones.	24
2.10.- Diagnostico.	25
2.11.- Control y prevención.	28
2.12.- Tratamiento.	30
III.- JUSTIFICACIÓN.	31
IV.- OBJETIVOS.	31
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.	32
VI. RESULTADOS.	36
VII.- DISCUSIÓN.	37
VIII.- CONCLUSIÓN.	38
IX. – LITERATURA.	39

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1: Clasificación taxonómica de *cryptosporidium* (Current y Garcia,1991).

CUADRO 2: Nombres de las especies de *cryptosporidium* (Fayer y Ungar, 1986).

CUADRO 3.- Resultados donde se compara el conteo de células sanguíneas con el resultado de la tinción.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo biológico del *Cryptosporidium*

RESUMEN

Con el fin de encontrar una forma de realizar un diagnóstico rápido y seguro de *Cryptosporidium* en becerros neonatos se llevó a cabo el siguiente estudio en el cual comparamos la variación en las células sanguíneas de un hemograma con los resultados de la tinción de *Ziehl-Neelsen* para afirmar que mediante un hemograma podemos acertar un diagnóstico preciso de *cryptosporidium*.

Dentro de este estudio también quisimos diagnosticar la combinación de otro tipo de agentes etiológicos que pudieran afectar el resultado de nuestro estudio.

Por lo que llevamos a cabo una comparación en los resultados de muestras obtenidas de becerros con diarrea sospechosas de *cryptosporidium* con un hemograma para buscar cambios en la concentración de las células sanguíneas.

Palabras clave: Diagnóstico, Frotis, Comparación, Infestación, Medidas de prevención.

I.- INTRODUCCIÓN.

La *criptosporidiosis* es una infección causada por protozoarios del genero *Cryptosporidium* (*apicomplexa: Cryptosporiidae*) que coloniza las células epiteliales, especialmente las que se encuentran a lo largo del tracto digestivo de un amplio espectro de vertebrados (Broglia et al.2008).

Numerosas especies de mamíferos se ha informado como anfitriones de *Cryptosporidium spp.*, parásitos coccidios intestinales que son una causa frecuente de enfermedad diarreica en el hombre (incluidos los inmunosuprimidos o infectados por el SIDA) y los animales (Malgorzata Bednarska et al.1998).

Las enfermedades diarreicas de etiología infecciosa representan uno de los principales problemas de salud en los terneros en el período postnatal. Dado que la infección se localiza en el sitio de la digestión de alimentos y la absorción de nutrientes, el rendimiento y el estado nutricional del huésped infectado es a menudo negativamente afectado. Uno de los patógenos más frecuentes responsables de brotes severos de diarrea, principalmente en los terneros de hasta 1 meses de edad, es el parásito *Cryptosporidium apicomplejo parvum*(Pavel Klein et al 2008).

Entre las especies de animales domésticos, sin duda la que es más afectada por criptosporidiosis es la bovina, en especial los neonatos. Los resultados de encuestas epidemiológicas son muy variables, pero por lo general indican una morbilidad alta (10 - 85%). El síndrome diarreico tiene una etiopatogenia compleja, pues cuando el *Cryptosporidium* es el único causante la mortalidad es baja, pero dependiendo de su asociación con otros agentes infecciosos, el grado de inmunidad y del estado nutricional del huésped, la mortalidad puede ser alta. Las edades más afectadas, conforme a las revisiones son de 4 a 30 días. Mientras más malas son las condiciones sanitarias del ambiente, principalmente en donde permanecen los becerros, mayor será el riesgo de contagio y presencia de la enfermedad (Ortolan y Castro 2003).

La infección se localiza en el intestino delgado y provoca la atrofia de las vellosidades y fusión, con la infiltración de leucocitos en la mucosa intestinal. Aunque la morbilidad es alta, la mortalidad es baja y la recuperación es espontánea. Los linfocitos T mediada por la respuesta inmune han sido implicados en la recuperación de los terneros de la infección por *C. parvum* (Carol R. Wyatt et al 1997).

El diagnóstico de la criptosporidiosis bovina ha sido con más frecuencia la observación de ooquistes de *Cryptosporidium* en frotis fecales teñidos por el método Giemsa o el método Grocott- methanamine Gomeri o en secciones histológicas tomadas en necropsia. Estos métodos presentan dificultades cuando se utiliza para el diagnóstico de rutina. Los ooquistes tienen afinidad por mancha de Giemsa y tienden a desvanecerse en el fondo de proteínas y otros residuos presentes en los frotis fecal, por lo tanto, se pueden pasar por alto, especialmente cuando están presentes en números bajos (Willson y Acres, 1982).

II.- ANTECEDENTES.

2.1. Historia.

El *cryptosporidium parvum*, fue descubierto en 1912 por el parasitólogo americano Edward Ernest Tyzzer, en las glándulas gástricas de ratones del laboratorio en que el había encontrado otra especie previamente,(Barboni et al., 2008).

El *cryptosporidium* es un parasito protozooario intracelular obligado de 4 a 6 micrometros de diámetro que pertenece al phylum apicomplexa el cual incluye a los generos Besnoitia, Caryospora, Eimeria, Frankelia, Isospora, Sarcocystis, y Toxoplasma (Tzipori y col 1980).

Los parásitos protozoarios del género *cryptosporidium* se reproducen dentro de las células epiteliales de los órganos respiratorio y digestivo de los vertebrados (Graff y col 1999).

Desde que el género fue descrito por Tyzzer más de 20 especies de *cryptosporidium* han sido descritas en varios mamíferos hospedadores. Actualmente de 6 a 8 especies de *cryptosporidium* son consideradas validas para

la mayoría de los investigadores, *C. parvum*, *C. muris*, *C. wrairi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. serpentis*, y *C. nasorum* (Morrisette y Sibley 2002).

Los parásitos *cryptosporidium* afectan a una amplia gama de mamíferos, aves, reptiles y peces (Zhu y col 2000).

La especie de mayor interés es el *C. parvum* por la importancia que tiene desde el punto de vista sanitario, debido a su escasa especificidad de hospedador, debido a que puede ser zoonótico. Sin embargo, también se ha demostrado la transmisión de persona a persona de este parásito (Walker y Redelman 2004).

El *cryptosporidium parvum* es el causante de diarreas en el ganado joven en animales neonatos y en individuos inmunodeficientes y se ha reportado en todo el mundo (Malgorzata et al 1998).

2.2. Etiología.

Cada especie o genotipo de *cryptosporidium* tiene una especificidad por un hospedero distinto (Lowery y col 2000).

En la actualidad la identificación de *cryptosporidium spp* y sus genotipos es realizada por el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y análisis de la secuencia de antígenos y genes estructurales (Spano y col 1998).

Cuadro 1: Clasificación taxonómica de *cryptosporidium* (Current y Garcia, 1991).

Clasificación	Nombre	Características biológicas
Phylum	Apicomplexa	Tienen un complejo apical con anillos polares, roprios, micronemas, conoides y microtubulos subpeculiares
Clase	Sporozoasida	La locomoción de las formas invasivas de estos organismos se da por la flexion deslizante del cuerpo u ondulación
Subclase	Coccidiasina	Ciclo sexual con merogonias, gametogonias y esporogonias

Orden	Eucoccidiorida	Merogonias se encuentran presentes en hospederos vertebrados
Suborden	Eimeriorina	Gametos masculino y femenino se desarrollan independientemente
Familia	Cryptosporidiidae	Monoxeno (ciclo de vida de un solo hospedador) con etapas de desarrollo solo debajo de la membrana de la celula hospedadora; ooquistes con cuatro esporozoitos; microgametos sin flagelos

Cuadro 2: Nombres de las especies de *cryptosporidium* (Fayer y Ungar, 1986).

Especie	Autor	Hospedador
<i>C. agni</i>	Barrer y Carbonell, 1974	Ovis aries (oveja domestica)
<i>C. ameivae</i>	Arcay de peraza y Bastardo de San Jose, 1969	Ameiva ameiva (lagartija)
<i>C. anserinum</i>	Proctor y Kemp, 1974	Anser anser (ganso domestico)
<i>C. baileyi</i>	Current, Upton y Haynes, 1986	Gallus gallus (pollo domestico)
<i>C. bivis</i>	Barker y Carbonell, 1974	Bos taurus (bovino Europeo)
<i>C. crotali</i>	Triffit, 1925	Crotalus confluens (víbora)
<i>C. ctencsauris</i>	Duszynski, 1969	Lagartija costarricense
<i>C. cuniculus</i>	Inman y Takeuchi, 1979	Oryctolagus cuniculus (conejo)
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	Felis catis (gato domestico)
<i>C. garnhami</i>	Bird, 1981	Homo sapiens (hombre)

<i>C. lampropeltis</i>	Anderson, Dusynski, Marquardt, 1968	Lampropeltis calligaster (lagartija)
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	Meleagridis gallopavo (pavo)
<i>C. muris</i>	Tyzzer, 1907	Mus musculus (raton domestico)
<i>C. nasorum</i>	Hoover, Hoerr, Carlton, Hinsman y Ferguson, 1981	Naso literatus (pez)
<i>C. parvum</i>	Tyzzer, 1907	Mus musculus (raton domestico)
<i>C. rhesi</i>	Levine, 1981	Macaca mulatta (mono rhesus)
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1981	Víboras colubridas y crotalidas
<i>C. tyzzeri</i>	Levine, 1981	Gallus gallus (pollo domestico)
<i>C. vulpis</i>	Wetzel, 1938	Vulpes vulpes (zorra común)
<i>C. wrairi</i>	Vetterling, Jervis, Merrill, Sprinz, 1971	Cavia porcellus (cerdos de guinea)

2.3. Morfología.

Entre las coccidias los ooquistes del genero de *cryptosporidium* son los más pequeños esféricos y ovoides. El *cryptosporidium muris* tiene un promedio de 5.6 y 7.4 micrometros y el *C. parvum* mide de 4 a 6 micrometros. Son las más infecciosas para la mayoría de las especies (Tzipori y col 1980).

Cada uno de los ooquistes espurulados contiene 4 esporozoitos, compuestos de numerosos gránulos pequeños y limitada por una membrana globular esférica (Morrissette y Sibley, 2002).

La pared de los ooquistes es lisa y sin color de un promedio de 50 nanómetros de grosor. Se estima que aproximadamente un 80% de los ooquistes que se forman tienen una pared gruesa (doble cubierta) y cuando se eliminan con las heces son infectantes para otros animales. Los ooquistes restantes (20%) poseen una pared fina (una unidad de membrana) que se rompe tras su salida de la célula hospedadora, permitiendo la liberación de los esporozoitos que invaden nuevas células epiteliales, este fenómeno es conocido como autoinfección (Fayer y Ungar, 1986; Hodges, 1999).

2.4. Ciclo biológico.

Los coccidios del género *cryptosporidium* tienen un ciclo de vida monoxeno pues todas las etapas de su desarrollo (sexual y asexual) se completan dentro del tracto gastrointestinal de un único huésped. Presentan un estadio exógeno que corresponde a los ooquistes esporulados por las heces de los huéspedes infectados, u otros materiales biológicos como las secreciones respiratorias.

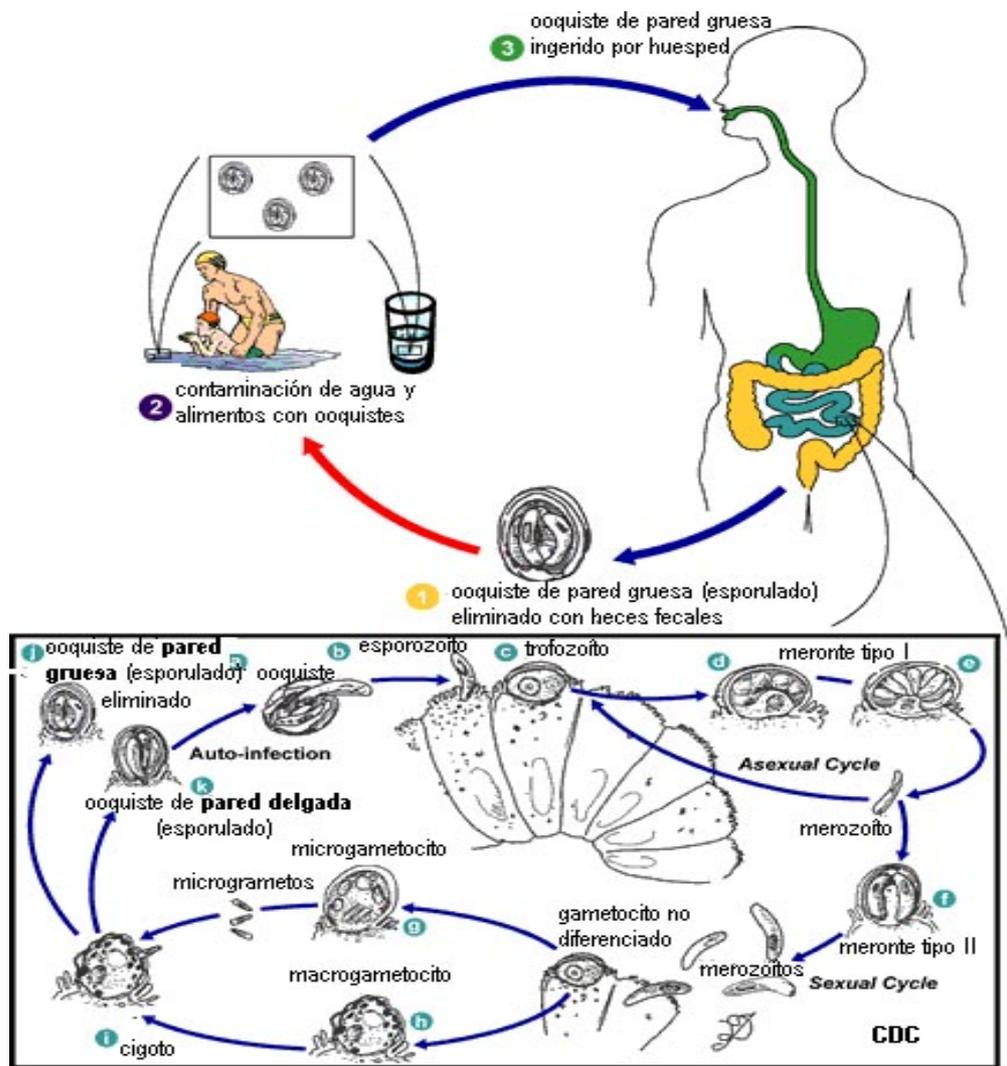


FIGURA1: Ciclo biológico del *Cryptosporidium*

El ciclo biológico comprende básicamente cinco etapas:

- 1.- Desenquistamiento: liberación de esporozoitos infectantes.
- 2.- Esquizogonia – Merogonia: multiplicación asexual en las células del hospedador.
- 3.- Gametogonia: formación de micro y macrogametos.
- 4.- Formación de la pared del ooquiste: para dar lugar a una fase de resistencia en el medio ambiente y así poder infestar a otro hospedador.
- 5.- Esporogonia: formación de esporozoitos infectantes (Lujan y Garbossa, 2008).

El ciclo biológico comienza por la ingestión y la desenquistación de los oocistos en el tracto gastrointestinal del hospedador, liberándose de cada uno de ellos cuatro esporozoitos con una pared de doble capa; la pared de los oocistos de *cryptosporidium spp.* Es similar a la de las otras coccidias, tienen una capa interna y otra externa que se abren y los esporozoitos salen del oocisto (Current y Garcia, 1991).

Los esporozoitos son diferentes porque se encuentran dentro de un trofozoito. La reproducción asexual del parásito se produce mediante dos fases de esquizogonia (o merogonia) de las cuales se forman dos esquizontes en el interior de las células parasitadas. Los esquizontes de primera generación dan lugar a la formación de 6 a 8 merozoitos tipo 1. Cuando el merozoite es maduro cada merozoite puede invadir a una nueva célula del hospedero donde se desarrolla dentro del merozoite 1 a tipo merozoite 2 de los cuales se liberan 4 merozoitos cuando maduran los merozoitos de tipo merozoite 2 invaden a nuevas células del hospedero donde ellos comienzan la multiplicación sexual (gametogonia) diferenciándose de cualquier microgametocitos masculinos y los estados de macrogametos femeninos. En la maduración los microgametos contienen espermatozoides que fertilizarán a los macrogametos. El macrogameto fertilizado se desarrolla dentro de los oocistos cuando se encuentran esporulados en su sitio, en la realización de esporogonia contienen cuatro esporocistos potencialmente infectivos. Algunos oocistos se salen de los cuerpos de los animales por la vía de excremento, considerando que otros sueltan esporozoitos dentro del cuerpo que puede repetir el ciclo de merogonia, gametogonia, y esporogonia (Fayer y Ungar, 1986; Rossi y col, 2005).

El periodo de preparación (tiempo que transcurre entre la ingestión de los oocistos infectantes y la excreción de los mismos) varía de acuerdo al hospedador. Experimentalmente se ha demostrado que oscila entre 2 y 7 días en rumiantes y entre 4 y 22 días en humanos (Vergara y Quilez, 2004).

2.5.- Epidemiología.

En términos epidemiológicos, los ooquistes de *cryptosporidium* presentan características biológicas trascendentales: tamaño pequeño, dureza extraordinaria resistencia al tratamiento con cloro y con ácidos, viabilidad prolongada de hasta varios meses en el ambiente, excreción de estadios infectivos, estas circunstancias unidas a la baja dosis infectante (10 – 100 ooquistes) y la ausencia de un tratamiento farmacológico eficaz, facilita la difusión de la enfermedad, para infectar a otros organismos con un considerable potencial zoonótico (Vergara y Quilez, 2004).

La infección ocurre cuando los animales ingieren los ooquistes esporulados por medio de las heces contaminadas de animales infectados, a través del medio ambiente, alimento o agua y por ooquistes eliminados de otros animales parasitados, que contaminan la cama de la explotación o las ubres de las madres (Sonea y col. 2002).

2.6.- Factores de riesgo.

Tamaño del hato: existe una relación directa entre el número de animales del hato y el riesgo de infección. El riesgo es latente en aquellas explotaciones en la que la carga animal es alta, donde el hacinamiento favorece la transmisión del parásito. La alta carga animal contribuye a que los becerros permanezcan por más tiempo, favoreciendo la acumulación de oocistos y contribuyendo a la contaminación del ambiente (De Graaf, 1999)

Edad de los animales: los becerros neonatos son en particular susceptibles a la infección por *criptosporidium parvum*, se ha observado el parásito en becerros de dos días de nacidos, pero la mayor prevalencia ocurre a las dos semanas de edad. En animales mayores de un mes la excreción de oocistos disminuye sensiblemente. También se ha descrito la presencia del parásito en animales adultos, estos casos generalmente cursan en forma subclínica y con bajos niveles de infección (Scott, 1995; Fayer, 2000).

Condiciones higiénicas, sanitarias y sistemas de manejo: el periodo neonatal resulta el más importante para la exposición de la enfermedad, por ello las

condiciones higiénico-sanitarias están en relación directa con el riesgo de la infección donde los portadores sanos juegan un papel muy importante dentro de las explotaciones donde el becerro se alimenta de la mama, ya que el factor riesgo aumenta debido a la convivencia de los animales infectados con los susceptibles (Garber y col, 1994; Scott, 1995).

2.7.- Transmisión.

La infección ocurre por la ruta fecal-oral con la ingestión de agua y/o alimentos contaminados con ooquistes presentes con la materia fecal de individuos o animales infectados, una vez ingeridos, los ooquistes eclosionan en el tracto gastrointestinal liberando esporozoitos infectantes (Barboni et al 2008).

Después de la ingestión del oocisto por el ternero recién nacido sigue un periodo de incubación de 72 a 96 horas, después del cual se observa la diarrea durante dos a diez días y durante este tiempo son observados los oocistos en las heces (Anusz y col., 1990).

Por esto un gran número de oocistos pueden entrar en sistemas de aguas después de una lluvia fuerte en pastizales o establos con animales infectados. Varios estudios demuestran que *C. parvum* es inocuo en el ambiente y que tiende a estar presente como un patógeno flotante en el agua especialmente donde los estándares de sanidad y la tecnología de tratamiento de aguas son bajos (Current y Garcia, 1991).

Los oocistos también se fijan a la tierra y al estiércol, por esto afectan frecuentemente a los bovinos en un modo complejo y teniendo implicaciones en el transporte de estos oocistos a través de las heces (Kuczynska y col. 2005).

A diferencia de otros coccidianos, los de *cryptosporidium parvum* están completamente esporulados y listos para iniciar la infección inmediatamente después de la excreción (Current y Garcia, 1991).

La infección por *C. parvum* se observa principalmente en los becerros jóvenes desde el nacimiento hasta los 30 días de edad, se le considera una de las mayores causas de diarrea neonatal en los terneros y se le atribuyen pérdidas

económicas significativas en la industria ganadera de carne y de leche (Fayer y Ungar, 1986; Anusz y col, 1990).

2.8.- Patogenia.

La patogénesis de *criptosporidiosis* no está totalmente explicada, pero se ha encontrado que las causas de la destrucción de epitelios intestinales resulta de la reducción de vellosidades y microvellosidades, con hiperplasia de las criptas, *criptosporidium* rompe las uniones de las células epiteliales produciendo, pérdida del epitelio de absorción intestinal y de enzimas digestivas unidas a las membranas, alteración del transporte de nutrientes y electrolitos, disminución de la absorción de la glucosa y aumento de la secreción de cloro (Klein et al, 2008).

Las prostaglandinas alteran el transporte del cloruro de sodio, primariamente por estimulación del sistema nervioso entérico (Fayer, 2004).

Todos estos factores señalan que la *criptosporidiosis* está asociada con mala absorción y diarrea secretoria. Debido a la profusa diarrea experimentada por algunos pacientes, se ha propuesto que el parásito produce una enterotoxina que conduce a la secreción de cloruros, resultando en este tipo de diarrea (Chacin-Bonila y Cheng-ng, 2008).

El síndrome diarreico tiene una etiopatogenia compleja, pues cuando el *criptosporidium* es el único causante la mortalidad es baja, pero dependiendo de su asociación con otros agentes infecciosos, del grado de inmunidad y del estado nutricional del huésped la mortalidad puede ser alta (Luppi y Castro, 2003).

La enfermedad se hace sintomática solo en ausencia de los mecanismos normales de defensa y por lo tanto con un sistema inmune inmaduro. La diarrea suele presentarse en situaciones de estrés como temperaturas bajas, mientras que las edades más afectadas, conforme a las revisiones son de 4 a 30 días, entre mas malas son las condiciones sanitarias del ambiente, principalmente en donde permanecen los becerros, mayor será el riesgo de contagio y presencia de la enfermedad (Luppi y Castro, 2003).

Cryptosporidium parvum causa la pérdida de microvellosidades lo que resulta en mala absorción. Por lo que da como resultado un atrasamiento en el desarrollo del

huésped y en ganado adulto (que es más resistente) solo da como resultado una baja en la producción de leche y en la conversión alimenticia en el ganado de carne (Current y Garcia, 1991).

2.9.- Signos y lesiones.

La infección puede ser asintomática o bien, producir diarreas a veces acompañadas de vomito, dolores espasmódicos en el abdomen y fiebre en los hospedadores aparentemente sanos (Okhuysen y col, 2004).

La enfermedad es caracterizada clínicamente por diarrea profusa y acuosa, a veces con secreciones mucoides teñidas con sangre, deshidratación, emaciación, anorexia, debilidad, o tenesmo. La enfermedad es más severa y letal cuando se complica con otros enteropatógenos como *escherichia coli*, *salmonella spp.*, *rotavirus* o *coronavirus* en hospedadores inmunodeprimidos. *Cryptosporidium* ha sido identificado como el segundo agente infeccioso más común de diarrea en becerros (Fayer y Ungar, 1986).

Las infecciones son subclínicas a partir del primer mes de edad, aunque resulta difícil separar los efectos dependientes de la edad de los derivados de la inmunidad adquirida. En condiciones naturales la mayoría de los animales se infectan durante los primeros días de vida, por lo que los brotes de la enfermedad se manifiestan durante el periodo neonatal y entre la primera y tercera semana de vida (Morrissette y Sibley, 2002).

Los síntomas generalmente se presentan en aproximadamente 3-5 días, aunque en los casos más graves puede prolongarse entre 1 y 2 semanas (Graff y col., 1999).

La diarrea se presenta con la eliminación de un elevado número de ooquistes, que alcanza el máximo entre el día 5-6 post- infección y desaparece entre los días 10-15. La duración del periodo de patencia depende de tales factores como la edad o el estado inmune del hospedador. La mortalidad puede ser elevada si se producen infecciones concurrentes con otros enteropatógenos o en caso de deficiencia en el manejo (Hou y col., 2004).

En la necropsia las lesiones macroscópicas que se observan son una enteritis catarral aguda, con congestión y edema del intestino, que aparece distendido por la acumulación de gas y presenta un contenido amarillento y acuoso. Los nódulos linfáticos mesentéricos están tumefactos y el abomaso frecuentemente contiene coágulos de leche sin digerir (Fayer y Ungar, 1986).

El estudio histológico demuestra que el intestino delgado es la porción más afectada, especialmente la parte final del yeyuno e íleon, donde se observa atrofia de las vellosidades, y sustitución del epitelio dañado por un epitelio cubico, con núcleos desordenados y superficie irregular (Graff y col., 1999).

Las microvellosidades de las células parasitadas aparecen destruidas, mientras que en las criptas de Lieberkuhn se mantiene el epitelio cilíndrico, pero con abundantes figuras mitóticas (Graff y col., 1999).

Las lesiones histológicas incluyen criptas, disminución de la altura de la mucosa, atrofia y fusión de las vellosidades. Bioquímicamente, las actividades enzimáticas de la mucosa disminuyen, la pérdida de las vellosidades, disminuye la actividad enzimática de la mucosa y reduce el área de superficie de la absorción comprometiendo la digestión intestinal y absorción de los nutrientes de la dieta. Ocurren problemas en la digestión y mala absorción de nutrientes en vacas jóvenes infectadas con *cryptosporidium spp.* Y la acumulación y fermentación de los alimentos producen la diarrea (Holland 1990).

2.10.- Diagnostico.

Los métodos usuales para identificar el género *cryptosporidium* pueden agruparse en tres categorías: aquellos que permiten visualizar la morfología general, los que se basan en el empleo de distintos tipos de coloraciones químicas o de inmunofluorescencia y, por último, las pruebas bioquímicas y de biología molecular. Los métodos de detección convencionales incluyen la concentración de heces por técnicas de centrifugación y flotación y la posterior tinción de los extendidos (Días de Ramírez et al, 2002).

El diagnostico clínico de las infecciones por *cryptosporidium* se ha basado primeramente en la detección de oocistos en heces (García y col., 1983).

Una forma de diagnóstico de *criptosporidiasis* se realiza con la identificación de oocistos esféricos de 4 a 5 μm o los estadios intracelulares obtenidos por medio de una biopsia de la mucosa gastrointestinal. La tinción hematoxilina-eosina debería ser suficiente para identificar la morfología de los estadios del parásito intracelular y su localización dentro de las células del epitelio intestinal (Parisi y Tierno, 1995).

Las técnicas que se han desarrollado y optimizado tradicionalmente para el conteo de oocistos de *cryptosporidium* en el agua generalmente no son útiles para la enumeración de oocistos en heces de animales. Esto por la gran cantidad de partículas y material fibroso presente en las heces (Anusz y col., 1990).

Las dificultades en la detección y enumeración de oocistos en muestras fecales están compuestas por las variaciones en la consistencia entre las muestras individuales, la cantidad de muestra utilizada y la cantidad de oocistos perdidos durante los procesos de recolección (Parisi y Tierno, 1995).

Los frotis de las heces teñidos con auramina-rodamina o la tinción de Zielh-Neelsen, que son muy sensibles y específicas, además de la tinción de Giemsa y Kinyoun modificada alcohol-ácido resistente son aprovechados como herramientas para la identificación de oocistos de *cryptosporidium spp.* Aunque una técnica muy precisa es la coloración por el método Zielh-Neelsen, modificado para la detección de oocistos de *cryptosporidium* en heces ya que sin el calentamiento del frotis se observan los oocistos, ácido resistentes, de color rojo brillante sobre un fondo azul (Parisi y Tierno, 1995).

Otras técnicas de heces incluyen la de flotación de Sheather en solución de glucosa en sulfato de zinc (36% saturado) o sedimentación con etilacetato de formalina. Esta solución permite un inmediato reconocimiento de los oocistos teñidos de color rosa usando un alto poder de magnificación, pero los oocistos empiezan a alterarse y a perder sus características esféricas. Otra técnica es por medio de la tinción floreciente, que incluyen naranja de acridina, que causa fluorescencia en oocistos y levaduras; auramina-rodamina, que solo tiñe oocistos pero no siempre uniformemente; y auramina carbol fúscina, con la que también se distingue entre levaduras y *cryptosporidium spp.* Y es significativamente mejor que

la tinción ácido resistente, pero no permite la visualización detallada (Fayer y Ungar, 1986).

Los métodos de inmunofluorescencia han aumentado la sensibilidad y especificidad sobre la de los métodos de tinción convencionales especialmente cuando el número de oocistos en heces es bajo. (García y col., 1983)

Los estudios de prevalencia deben verse especialmente beneficiados con las pruebas de inmunofluorescencia, porque los individuos infectados asintómicamente pueden arrojar oocistos en pequeñas cantidades. La técnica de detección de *cryptosporidium* mediante inmunofluorescencia alcanza hasta un 100% de sensibilidad y de especificidad (Rocholle y col., 1999).

Los oocistos de *cryptosporidium parvum* son detectados en tierra, agua y desechos animales usando inmunoglobulinas marcadas con fluorocromo, con microscopía fluorescente (Arrowood y Sterling, 1989).

En pacientes infectados con uno o más parásitos se usan métodos de diagnóstico con tinción tricromica y tinción ácido resistente modificada, aunque pueden ser insuficientes para demostrar la presencia de estos organismos. El diagnóstico se puede comprobar con un paquete comercial inmunoenzimático que puede ser interpretado en aproximadamente 12 minutos, fijando en formalina con una sensibilidad de 98% y especificidad de 100% (García y col., 2003).

La capacidad de separación inmunomagnética para los oocistos de *cryptosporidium* sedimentados en muestras concentradas es mejor que la de flotación con percoll-sucrosa. Se ha observado la recuperación de oocistos por flotación con percoll-sucrosa de 10 a 96% usando varias matrices de sedimento originadas de muestras de agua ambiental contaminada con oocistos (Bukhari y col., 1998).

Evaluaciones de microscopía inmunofluorescente directa (DFA) con muestras de heces de bovinos han demostrado que este procedimiento puede detectar concentraciones tan bajas como 1000 a 6000 oocistos por gramo de heces (Xiao y Herd, 1993).

Una prueba de hemoaglutinación pasiva con sensibilidad comparable a la de anticuerpos inmunofluorescentes (IFA) también ha sido descrita. De cualquier

forma, la sensibilidad de la (IFA) puede ser influenciada por técnicas de concentración de oocistos y los extremos en la consistencia de o por la inclusión de procesos de lavado para la suspensión de las heces antes de la tinción (Xiao y Herd, 1993).

Las técnicas de PCR también se han utilizado para detectar la presencia de ooquistes del parásito de diversos tipos de muestra, que poseen como principal ventaja la sensibilidad elevada y resultan especialmente idóneas para el procesamiento de muestras con escaso número de ooquistes o para caracterizar el genotipo de diversos aislados de *C. parvum*. La desventaja que tiene es que, son técnicas laboriosas que requieren una infraestructura costosa por lo que su empleo está restringido a algunos laboratorios y no se utiliza para realizar el diagnóstico de la infección en los animales (Reed y col., 2002; Quilez y col., 2003). Para realizar estudios epidemiológicos para evaluar los riesgos de infección de *C. parvum* asociados al agua de bebida y otras fuentes potenciales de exposición son necesarias nuevas pruebas serológicas rápidas y sensibles (Moss y col., 1998).

2.11.- Control y prevención.

El control de esta enfermedad es muy difícil. Mientras que la mayoría de las especies de coccidias entéricas tienen una serie de etapas de desarrollo genéticamente programadas en su ciclo de vida y son incapaces de reciclarse en el huésped, *C. parvum* tiene dos etapas que inician la autoinfección: merozoitos tipo 1 y esporozoitos derivados de los oocistos de pared delgada. Se cree que ambas etapas infectantes del ciclo de vida del *C. parvum* son responsables del desarrollo de infecciones severas en hospederos expuestos solamente a un número reducido de oocistos de pared dura (Current y Garcia, 1991).

Para la prevención de la propagación de *cryptosporidium* u otras coccidias se requiere la eliminación de los oocistos. Sin embargo, bajo condiciones favorables, los oocistos permanecen infectando durante largos periodos de tiempo. Los oocistos de *criptosporidium spp.* Se almacenan en soluciones acuosas a 4⁰ C, donde empiezan a perder su infectividad entre los 2 y 6 meses, pero pueden ser viables de 6 a 9 meses e infectivos en cultivos celulares hasta por 12 meses.las

temperaturas extremas afectan la viabilidad de los oocistos a 65⁰ C por 30 minutos pierde su capacidad de infectar. Esto podía usarse como guía de tratamiento para la comida o agua contaminada, que no se conoce o que es sospechosa. Para la reducción potencial de los oocistos se debe limpiar el agua y comida de la contaminación de heces (Fayer y Ungar, 1986).

Debido a la ausencia de fármacos eficaces en el tratamiento de *criptosporidiosis*, juega un papel importante las medidas higiénicas y de manejo que constituyen la herramienta más eficaz en el control de la enfermedad, con el fin de destruir los ooquistes presentes en el medio y reducir la transmisión de la enfermedad a los animales durante las primeras semanas de vida (Graff y col., 2002).

La limpieza y desinfección de los sitios que se utilizan para los partos y jaulas donde se alojan o se han alojado animales, mediante la utilización de desinfectantes químico o calor húmedo. Aunque los ooquistes son extremadamente resistentes a muchos desinfectantes, las soluciones de amino (5%) y el formaldehído (10%) los destruyen. El peróxido de hidrogeno y el "oocide" (mezcla de amonio e hidróxido sódico) también reducen notablemente la infectividad de los ooquistes, separar los animales enfermos de los sanos y utilizando distinto calzado en el cuidado de ambos para evitar la diseminación de la enfermedad (Quilez y col., 2003).

Otras medidas sanitarias es renovar periódicamente la cama para evitar la acumulación de materia fecal contaminada. Evitar el hacinamiento, reduciendo la densidad de los animales recién nacidos en las zonas de partos y separando los animales por lotes y asegurarse de que los animales recién nacidos tomen calostro de buena calidad y en cantidad suficiente, los anticuerpos calostrales no protegen de la infección, pero reducen la gravedad de los síntomas e incrementan la resistencia de los animales a otros patógenos entéricos. Por esta razón se recomienda que los animales ingieran calostro durante las primeras 6 horas de vida, proporcionando a los animales nacidos de madres primerizas un suplemento de vacas más viejas, debido a que han tenido más contacto con agentes patógenos (Quilez y col., 2003).

2.12.- Tratamiento.

La *criptosporidiosis* es una enfermedad que actualmente no tiene tratamiento satisfactorio a pesar del elevado número de antibióticos o antiprotozoarios que se han evaluado. Por lo que se sugiere la prevención mediante medidas sanitarias como el mejor método para tratar una parasitosis (Tzipori y col.1981).

La *criptosporidiosis* entérica en pacientes inmunocompetentes es autolimitante, y el estado inmunitario del hospedero parece ser lo que determina la severidad y duración de la infección. Los terneros afectados necesitan cuidados intensivos y alojamiento en un ambiente seco y limpio, debe administrárseles antibiótico para prevenir infecciones secundarias y protectores de mucosa además de una terapia de fluidos para neutralizar y prevenir la deshidratación y la pérdida de electrolitos provocada por la diarrea (Current y Garcia, 1991).

A continuación se describen algunos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la *criptosporidiosis*:

El halocur (lactato de halofuginona) está probado como auxiliar en la prevención de la *criptosporidiosis*. Este producto debe administrarse cada 24 horas durante los primeros 7 días de vida en la dosis recomendada por el laboratorio. No repercute en la ingesta de comida ni en la conversión alimenticia, además de dar como resultado un retraso en la infestación de *cryptosporidium* y la eliminación de oocistos se reduce (Trotz-Williams y col., 2005).

El tratamiento basado en decoquinato de sodio a razón de 2.5 mg/kgPV/día, es decir 50 gramos por kilogramo de leche, administrado a las becerras enfermas disminuye la diarrea en un lapso de tres días y los animales pueden recuperarse en una semana (Navetat y col., 2003).

También se ha sugerido el uso de paromomicina en dosis de 1.5 a 2 d/día por 4 días, con lo que se logra una mejoría de los signos y hasta erradicación total del parásito, aunque dosis exageradas del producto pueden provocar toxicidad. Los concentrados de inmunoglobulinas de calostro de bovino azitromicina y lactobin-R han tenido algún éxito experimental. Ningún agente terapéutico se ha identificado plenamente eficaz para la erradicación de la enfermedad (Fayer y col., 2000).

Para contrarrestar los efectos de la deshidratación provocada por la diarrea es necesaria una terapia de fluidos mediante soluciones isotónicas de electrolitos (sodio, potasio, cloruros, glucosa, aminoácidos). A dado resultado satisfactorio la utilización de probióticos que son microorganismos vivos no patógenos que cuando son ingeridos provocan un beneficio en la prevención y tratamiento de la enfermedad. Con diversos microorganismos vivos (*Lactobacillus* spp., *Bacillus subtilis*) que permiten reponer la flora intestinal y son antagonistas con otros microorganismos patógenos. También se pueden utilizar adsorbentes y astringentes como el coalin y pectina (Graff y col., 2002).

III.- JUSTIFICACIÓN.

El trabajo que se llevo a cabo es debido al aumento que se ha descubierto en la intervención de *Cryptosporidium* en problemas de diarrea en terneros en la comarca lagunera principalmente en hatos lecheros.

El trabajo tiene como fin el que por medio de un hemograma completo y una tinción de *Ziehl-Neelsen* se obtenga un diagnostico rápido y confiable de la enfermedad además de que se diferencie de otras enfermedades entéricas que también provoquen diarreas en terneros neonatos. Y así poder llevar a cabo la implementación rápida de un tratamiento enfocado a *Cryptosporidium* para reducir las pérdidas económicas debido a esta enfermedad.

IV.- OBJETIVOS.

Objetivo general: determinar la presencia de *Cryptosporidium* en un hato lechero de la comarca lagunera con presencia de diarrea en terneros.

Objetivos específicos:

- a).- Identificar una variación en las células de defensa de los terneros con diarrea debido a *Cryptosporidium* mediante un hemograma completo
- b).- identificar la presencia de ooquistes en heces de terneros con diarrea en un hato lechero de la comarca lagunera debido a *Cryptosporidium* mediante la técnica de *Ziehl-Neelsen*.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS.

La sangre, sustancia líquida que circula por las arterias y las venas del organismo. La sangre es roja brillante o escarlata cuando ha sido oxigenada en los pulmones y pasa a las arterias; adquiere una tonalidad más azulada cuando ha cedido su oxígeno para nutrir los tejidos del organismo y regresa a los pulmones a través de las venas y los pequeños vasos denominados capilares. En los pulmones, la sangre cede el dióxido de carbono que ha captado procedente de los tejidos, recibe un nuevo aporte de oxígeno e inicia un nuevo ciclo. Este movimiento circulatorio de sangre tiene lugar gracias a la actividad coordinada del corazón, los pulmones y las paredes de los vasos sanguíneos.

Material y equipo: agua, desinfectante, tubos de ensayo al vacío con anticoagulante EDTA, portaobjetos, alcohol metílico, hemocolorantes, aceite de inmersión, microscopio óptico, centrifuga, tubos capilares, cera o plastilina, microcentrifuga y refractómetro, cámara de Neubauer, pipeta de Thoma (para glóbulos blancos y glóbulos rojos), boquilla (para glóbulos blancos y glóbulos rojos), manguera de caucho, solución salina, líquido de Turk, aceite de inmersión.

Procedimiento:

1.- Toma de muestras

- a) Localizar el área de toma de la muestra
- b) Asepsia del área en la cual se pretende trabajar
- c) Extraer la sangre por punción venosa o capilar, asegurando tomar la cantidad suficiente para la prueba que se pretende realizar
- d) Inmediatamente recolectada la muestra en el tubo, hacer movimientos lentos para homogenizar la muestra

2.- Elaboración de frotis

- a) Colocar una gota en un portaobjetos en uno de los extremos
- b) Colocar de canto otro portaobjetos sobre la superficie del primer portaobjetos (en el que se encuentra la gota de sangre) formando un ángulo de 45 grados

- c) Deslizar suavemente y a velocidad moderada el portaobjetos sobre el otro en sentido longitudinal, hasta que la gota de sangre quede bien extendida sobre la superficie del primer porta objetos. El grosor del frotis sanguíneo puede variar según sea el ángulo que formen entre si ambos portaobjetos
- d) Ya realizado el frotis, se fija en alcohol y se deja secar al aire.
- e) Una vez seco el frotis se procede a la tinción hematológica.

3.- Procedimiento de tinción

- a) Reactivo No.1:15 segundos y enjuagar en agua corriente
- b) Reactivo No.2:15 segundos y enjuagar en agua corriente
- c) Reactivo No.3:15 segundos y enjuagar en agua corriente

4.- Dejar secar y observar al microscopio en el objetivo de inmersión (100X)

- c) La Zona ideal corresponde a la zona inmediata del frotis y en ella existe un reparto equilibrado de células

Interpretación de resultados: la cuenta diferencial consiste en identificar cuando menos 100 leucocitos consecutivos y reportar estos valores como porcentaje.

Los leucocitos a identificar en el frotis realizado serán los siguientes: eosinofilos, neutrofilos, células en banda, linfocitos y monocitos.

Procedimiento:

- 1.- una vez tomada la muestra de sangre se deja reposar como minimo una hora.
- 2.- centrifugar la sangre a 2500 rpm durante 5 minutos.
- 3.- separar cuidadosamente el suero el paquete globular.

Determinación del hematocrito:

- 1.- llenar los tubos capilares, no más de la marca indicada en el tubo.
- 2.- sellarlos con cera o plastilina, ocupar dos tubos capilares por muestra.
- 3.-acomodar los tubos capilares encontrados en la microcentrifuga, asegurándose que la parte sellada con cerá o plastilina quede hacia afuera, y cerrar perfectamente la microcentrifuga.
- 4.- llevar el boton de encendido hasta el numero 5 y esperar a que se apague sola.

5.- retirar los tubos capilares y tomar lectura en la tabla para sacar el resultado del hematocrito (para sacar la hemoglobina, el resultado anterior se divide entre tres).

Conteo de eritrocitos:

1.- para el llenado de la pipeta se utilizara solución salina, se llena asta la marca 101, se agita y se procede al llenado de la cámara contadora.

2.- la cuenta de los eritrocitos se lleva a cabo en el área central finamente graduada de la cámara.

3.- se cuentan los cuadros secundarios de las esquinas y el cuadro central (cinco en total).

4.- para el cálculo de la cifra total, la suma de los eritrocitos de los cinco cuadros se multiplica por 10000 y da la cifra total.

Conteo de leucocitos:

1.- la muestra de sangre se mezcla cuidadosamente por inmersión repetida.

2.- se procede al llenado de la pipeta de glóbulo blanco hasta 0.5.

3.- la punta de la pipeta deberá introducirse en el frasco que contiene diluyente, liquido de turk, y se aspira cuidadosamente hasta llegar a la marca 11.

4.- una vez lleno deberá ser agitado, en el agitador de pipetas hasta asegurar la homogeneización de la mezcla.

5.- el siguiente paso consiste en el llenado de la cámara contadora, la cual deberá estar limpia y libre de grasa.

6.- se procede a colocar el cubre objetos sobre la cámara.

7.- nuevamente se agita la pipeta, y se desechan de dos a tres gotas de la pipeta.

8.- posteriormente se procede al llenado por capilaridad, de la cámara sobre las dos hendiduras que será el borde del cubre objetos con la misma.

9.- una vez llena se procede a la observación al microscopio para el conteo de los leucocitos existentes en cuatro de los cuadros grandes del campo, la suma de su conteo se multiplica por 50 para dar el total.

10.- cada cuadro grande posee 16 cuadros secundarios y presenta un área de 1 milímetro cuadrado y su profundidad es de 0.1 mm (cuatro decimas de milímetro cubico a una dilución de 1 a 20).

Técnica de Ziehl-Neelsen

Recolección de las muestras de heces después se lleva a cabo un frotis en un porta objetos, se enjuaga con agua para posteriormente ser teñidos.

Los pasos para que se lleve a cabo la tinción son los siguientes; se sumergen por 30 minutos en Carbol Fucshina, posteriormente se utilizo agua corriente para eliminar el exceso de colorante, se decoloraron el alcohol acido hasta obtener un color rosa en la tinción, se procedió nuevamente en sumergir las muestras en agua corriente para quitar residuos de alcohol acido así como el exceso de colorante, se realizo la tinción por 5 minutos con azul de metileno, después se lavaron las muestras con agua corriente hasta quitar el exceso de colorante, se enjuagaron en alcohol etílico al 96%, y en alcohol absoluto, se clarificaron con xilol y se montaron con resina sintética y se cubre con un cubreobjetos y se observa mediante el microscopio óptico.

VI. RESULTADOS.

Cuadro 3: Resultados donde se compara el conteo de células sanguíneas con el resultado de la tinción.

Datos del ejemplar	Recuento de leucocitos (5-10 mil)	Recuento de eritrocitos (5-10 millones)	Recuento coproparasitologico
9274 02/06/10	21.1	9.53	Negativo
9273 01/06/10	23.2	8.40	Positivo *
9271 31/05/10	23.9	6.41	Negativo
9267 29/05/10	19.8	8.82	Positivo ****
9268 26/05/10	25.9	6.00	Positivo ****
9264 26/05/10	32.7	7.68	Positivo ****
9256 20/05/10	17.4	11.56"	Positivo ****
9249 17/05/10	19.3	9.72	Positivo **
9245 19/05/10	26.5	8.16	Negativo
9241 10/05/10	19.4	1.42"	Negativo
9251 16/05/10	82.7	8.18	Negativo

Se encontró un aumento marcado en los leucocitos en el estudio realizado a un hato de becerras

En la muestra 9256 se encontró un aumento de eritrocitos y en la muestra 9251 una disminución de los eritrocitos

En el examen coproparasitologico obtuvimos resultados positivos y negativos, dentro de los positivos señalamos con asterisco (*) de acuerdo a su severidad

Incipiente 1-10 (*)

Leve 11-20 (**)

Moderado (***)

Severo (****)

VII.- DISCUSIÓN.

Graaf en 1999 experimentalmente inoculo a ratones de laboratorio para provocarle una infección por *cryptosporidium* y así identificar cambios en las células sanguíneas y obtener una forma más rápida de diagnosticarlo en el campo, sin en cambio al obtener resultados y hacer una comparación observo una variación aunque no pudo determinar en si este había sido causado por *cryptosporidium*

Malgorzata el 1998 realizo un estudio en vaquillas para observar cambios en las lecturas de hemogramas que estuvieran asociadas a *cryptosporidium* como causa de diarreas obteniendo valores normales en todas las lecturas y solo registrando cambios cuando se encontraba en asociación con algún otro agente infeccioso (virus, bacterias, hongos).

Ortolan y castro en el 2003 realizaron estudios comparativos para asociar cambios hematológicos en vaquillas con diarrea causada por *cryptosporidiosis*, aunque si hubo cambios en los estándares de las células sanguíneas no pudieron establecer en sí que estos se debieran a causa de la infestación de *cryptosporidium* ya que al hacer un diagnostico diferencial encontraron la presencia de rotavirus y salmonella.

Carol en 1997 experimento con muestras sanguíneas he histológicas de becerras con diarrea para diagnosticar anemias prematuras debido a una combinación de agentes infecciosos entre ellos *cryptosporidium*.

Fayer y byron en 1990 realizaron estudios en becerras neonatas de los 4 días de nacidas hasta el mes de edad donde llevaron a cavo pruebas parasitológicas y sanguíneas con el objetivo de encontrar variaciones en las lecturas de las células sanguíneas de las becerras que resultaran positivas a *cryptosporidium*, sin en cambio realizaron estudios de diagnostico diferencial para aislar algún otro agente infeccioso donde encontraron que el *cryptosporidium* estaba asociado a otros diferentes agentes por lo que no establecieron que fuera el causante de la variación en las células sanguíneas.

En 1994 tzipori evaluó suero sanguíneo de beceras con *cryptosporidiosis* para medir la respuesta inmune durante el periodo de latencia de la enfermedad pero dentro de sus resultados encontró que no había variación de células sanguíneas a menos que hubiera una asociación con otro agente etiológico (virus, bacterias) ya que el *cryptosporidium* por sí solo no causa una variación y que los animales severamente afectados con cuadros de diarrea eran a causa de la combinación de varios factores etiológicos.

Para llevar a cabo un diagnostico preciso de *cryptosporidium* es necesario realizar todas las pruebas de diagnostico que sean necesarias para tener un mínimo de margen de error ya que una prueba de conteo de células sanguíneas (hemograma) no es suficiente para determinar si es causante de la diarrea en un brote de la enfermedad ya que hay un gran número de agentes etiológicos que pudieran estar involucrados.

VIII.- CONCLUSIÓN.

De las pruebas realizadas a beceras neonatas encontramos que hay un porcentaje muy elevado de diarreas a causa de *cryptosporidium*.

Dentro del estudio realizado se obtuvieron resultados insatisfactorios ya que al comparar pruebas de tinción con hemogramas se obtuvo una variación pero no pudimos determinar si el *cryptosporidium* por si solo era el causante de estas ya que en la mayoría de las pruebas se encontraba en asociación con otros agentes etiológicos (rotavirus y salmonella).

Para concluir podemos decir que siempre que haiga una variación de células sanguíneas en beceras con diarreas sospechosas a *cryptosporidium* se tiene que realizar un estudio de diagnostico completo ya que intervienen varios factores (manejo, ambiente, agentes infecciosos) que pueden establecer un problema similar.

IX. – LITERATURA.

Amna Hashim, Marguerite Clyne, Grace Mulcahy, Donna Akiyoshi, Rachel Chalmers, and Billy Bourke (2004). Host cell tropism underlies species restriction of human and bovine *cryptosporidium parvum* genotypes infection and immunity, oct. 2004, p. 6125–6131.

Anthony Blikslager, Elaine Hunt, Richard Guerrant, Marc Rhoads, and Robert Argenzio (2001). Glutamine transporter in crypts compensates for loss of villus absorption in bovine *cryptosporidiosis* am j physiol gastrointest liver physiol 281: 645–653.

A. Grinberg, N. Lopez-Villalobos, W. Pomroy, G. Widmer, H. Smith and A. Tait (2007). Host-shaped segregation of the *cryptosporidium parvum* multilocus genotype repertoire epidemiol. infect. (2008), 136, 273–278.

A. J. Helnrlchs and G. J. Bush (1991). Evaluation of decoquinatate or lasalocid against coccidiosis from natural exposure in neonatal dairy calves j dairy sci 74:3220-3227.

A. J. Heinrichsfl. A. Swartz, R. Drake and P. A. Trave (1990). Influence of decoquinatate fed to neonatal dairy calves on early and conventional weaning systems j dairy sci 73:1851-1856.

A. S. Collick, E. A. Fogarty, P. E. Ziegler, M. T. Walter, D. Bowman, and T. S. Steenhuis (2006). Survival of *cryptosporidium parvum* oocysts in calf housing facilities in the new york city watersheds published in j. environ. qual. 35:680–687.

BrogliA, A., S. Reckinger, S.M. Caccio y K. Nockler (2008). Distribution of *cryptosporidium parvum* subtypes in calves in germany. vet. parasitol. (154):8-13.

By S. J. Achá, I. Kühn, P. Jonsson, G. Mbazima, M. Katouli and R. Möllby 2004. Studies on calf diarrhoea in mozambique: prevalence of bacterial pathogens acta vet. scand 45: 27-36.

Carol R. Wyatt, E. Joan Brackett, Lance E. Perryman, Allison C. Rice-Ficht, Wendy C. Brown, and Katherine I. Orourke 1997. Activation of intestinal intraepithelial t lymphocytes in calves infected with *cryptosporidium parvum* infection and immunity, p. 185–190.

Carolyn Petersen, Jiri Gut, Patricia S. Doyle, Joseph H. Crabb, Richard G. Nelson, and James H. Leech (1992). Characterization of a >900,000-mr *cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostrum immunoglobulin infecrion and immunity, dec. 1992, p. 5132-5138.

David J. Nussbaum, Jerome R. Salord, Dominique D. Rimmele (1999). Evaluation of quantitative latex agglutination for detection of *cryptosporidium parvum*, *e. coli* k99, and rotavirus in calf feces j vet diagn invest 11:314–318.

Derek A. Mosier, Thomas L. Kuhls, K. Rene Simons, and Richard D. Oberst (1992). Bovine humoral immune response to *cryptosporidium parvum* journal of clinical microbiology, dec. 1992, p. 3277-3279.

Díaz de Ramírez, Adelina; Ramírez-Iglesia, Lilido Nelson; Godoy de Plaza, Reina Magaly y Román Rafael(2002). Excreción de oocistas de *cryptosporidium* spp. durante el postparto, en vacas mestizas de doble propósito revista científica vol. xii-suplemento 614-616.

Dirk C. de Graaf, Hans de Coninck, Franz Petry, Ilka B. Eckhout and Johan E. Peeters (2002). Specific bovine antibody response against a new recombinant *cryptosporidium parvum* antigen containing 4 zinc-finger motifs the korean journal of parasitology vol. 40, no. 1, 59-64.

Elaine Hunt, Qiangfu, Martha U. Armstrong, Derralyn K. Rennix, David W. Webster, Joseph A. Galanko, Wunian Chen, Eric M. Weaver, Robert A. Argenzio, and J. Marc Rhoads (2002). Oral bovine serum concentrate improves *cryptosporidial* enteritis in calves pediatric research vol. 51, no. 3.

Elroy D. Mann, Laila H. Sekla and Gudrun Eibisch(1987). *Cryptosporidium* antibodies in manitoba cattle: a pilot study using an indirect fluorescent antibody procedurecan vet j, 28:126-128.

Ellen Jo Baron, Cathy Schenone and Beverly Tanenbaum(1989). Comparison of three methods for detection of *cryptosporidium* oocysts in a low-prevalence population journal of clinical microbiology p. 223-224.

Enrico Lippi Ortolani y Pierre Castro Soares (2003). Aspectos epidemiológicos de la *criptosporidiosis* en becerros de rebaños lecheros parasitol latinoam 58:122–127.

Isabel Villacorta, Johan E. Peeters, Emmanuel Vanopdenbosch, Elvira Ares-Mazas, and Hubert Theys (1991). Efficacy of halofuginone lactate against *cryptosporidium parvum* in calves antimicrobial agents and chemotherapy, p. 283-287.

Jaime M. S. Nina, Vincent Mcdonald, David A. Dyson, Janet Catchpole, Shigehiko, Motohero Iseki, Peter L. Chiodini, and Keith P. W. J. Mcadam (1992). Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three *cryptosporidium* species infeccion and immunity, apr. 1992, p. 1509-1513.

Jorge Lopez, Stanley Dallen, Jeffrey Mitchell (1987). Rotavirus and *cryptosporidium* shedding in dairy calf feces and its relationship to colostrums immune transfer j dairy sci 71:1288-1294.

Johan E. Peeters, Isabel Villacorta, Emmanuel Vanopdenbosch, Danielle Vanderghenst, Muriel Naciri, Elvira Ares-Mazas and Pierre Yvone (1992). *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin a [Iga], Igg, and Igm) after natural and experimental infections infection and immunity, june 1992, p. 2309-2316.

Johan E. Peeters, Isabel Villacorta, Muriel Naciri and Emmanuel Vanopdenbosch (1993). Specific serum and local antibody responses against *cryptosporidium parvum* during medication of calves with halofuginone lactate infection and immunity, oct. 1993, p. 444-4445.

John S. Reif, Lynne Wimmer, John A. Smith, David A. and John M. Cheney (1989). Human *cryptosporidiosis* associated with an epizootic in calves ajph november 1989, vol. 79, no. 11.

J. A. Harp, D. B. Woodmansee and H. W. Moon (1990). Resistance of calves to *cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure infection and immunity, july 1990, p. 2237-2240.

J. A. Harp and J. P. Goff (1997). Strategies for the control of *cryptosporidium parvum* infection in calves j dairy sci 81:289-294.

J. K. Waggoner, M. J. Cecava and K. R. Kazacos (1993). Efficacy of lasalocid and decoquinate against coccidiosis in naturally infected dairy calves' j dairy sci 77:349-353.

Katarzyna Donskow, Anna Bayer, Malgorzata Bednarska and Edward Siński (2005). Experimental transmission of *cryptosporidium parvum* isolates from wild rodents and calves to laboratory bred common voles (*Microtus arvalis*) stefański institute of parasitology, pas 19-24; issn.

Krzysztof Z. Anuszt Patricia H. Mason, Michael W. Riggs and Lance E. Perryman (1990). Detection of *cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay journal of clinical microbiology, dec. 1990, p. 2770-2774.

Lance E. Perryman, Michael W. Riggs, Patricia H. Mason, and Ron Fayer (1990). Kinetics of *cryptosporidium parvum* sporozoite neutralization by monoclonal antibodies, immune bovine serum, and immune bovine colostrum infection and immunity p. 257-259.

Lihua Xiao, Ling Zhou, Monica Santin, Wenli Yang y Ronald Fayer (2007). Distribution of *cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern united states parasitol res (2007) 100:701–706.

Lise A. Trotz-Williams, Brenna D. Jarvie, S. Wayne Martin, Kenneth E. Leslie, Andrew S. Peregrine (2005). Prevalence of *cryptosporidium parvum* infection in southwestern ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves can vet j 2005;46:349–351.

Malgorzata Bednarska, Anna Bayer, Eedward Sinski (1998). Calves as a potential reservoir of *cryptosporidium parvum* and *giardia* sp. ann agric environ med 5:135–138.

Margaretha Carraway, Saul Tziporit and Giovanni Widmer (1997). A new restriction fragment length polymorphism from *cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts infection and immunity, p. 3958–39.

Masaaki Satoh, Kenji Hikosaka, Takako Sasaki, Yoshihisa Suyama, Tokuma Yanai, Minoru Ohta, and Yutaka Nakai (2003). Characteristics of a novel type of bovine *cryptosporidium andersoni* applied and environmental microbiology, jan. 2003, p. 691–692.

Melvin B. Heyman, Laurie K. Shigekuni, and Arthur J. Ammann (1986). Separation of *cryptosporidium* oocysts from fecal debris by density gradient centrifugation and glass bead columns journal of clinical microbiology, apr. 1986, p. 789-791.

Merle E. Olson, Nicole J. Guselle, Ryan M. Ohandley, Mary Lou Swift, Tim A. Mcallister, Murray D. Jelinski, Douglas W. Morck (1997). *Giardia* and *cryptosporidium* in dairy calves in british columbia can vet j 1997; 38: 703-706.

Michael Tilley, Ronald Fayer, Albert Guidry, Steve J. Upton and Byron L. Blagburn (1990). *Cryptosporidium parvum* (apicomplexa: cryptosporidiidae) oocyst and sporozoite antigens recognized by bovine colostrum antibodies infection and immunity, sept. 1990, p. 2966-2971.

Mitchell S. Abrahamsen, Cheryl A. Lancto, Bruce Walcheck, William Layton and Mark A. Jutila (1997). Localization of a/b and g/d t lymphocytes in *cryptosporidium parvum*-infected tissues in naive and immune calves infection and immunity p. 2428–2433.

Mónica Santin, James M. Trout, Lihua Xiao, Ling Zhou, Ellis Greiner C, Ronald Fayer. Prevalence and age-related variation of *cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves veterinary parasitology 122 (2004) 103–117.

M. J. Arrowoodt and C. R. Sterling (1989). Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *cryptosporidium* oocyst detection journal of clinical microbiology, july 1989, p. 1490-1495.

M. L. Hutchison, L. D. Walters, S. M. Avery, F. Munro and A. Moore (2005). Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures applied and environmental microbiology, mar. 2005, p. 1231–1236.

M. Zkan Arslan, Yunus Gicik H. Metin Brdoúan barý Sari (2001). Prevalence of *cryptosporidium spp.* oocysts in diarrhoeic calves in kars province, turkey turk j vet anim sci 25 (2001) 161-164.

Parviz Shayan, Elahe Ebrahimzadeh, Mohamad-Reaza, Mokhber-Dezfouli and Sadegh Rahbari (2008). Recombinant *cryptosporidium parvum* p23 as a target for the detection of *cryptosporidium*-specific antibody in calf será received: 17 march 2008 / accepted: 12 june 2008.

Pavel Klein, Tereza Kleinova, Zdene K Volek , Jirisimunek(2008). Effect of *cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves veterinary parasitology 152 (2008) 53–59.

P.J. Willson and S.D. Acres (1982). A comparison of dichromate solution floatation and fecal smears for diagnosis of *cryptosporidiosis* in calves can. vet. j. 23: 240-246.

Robert E. Holland (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals clinical microbiology reviews, p. 345-375.

Robert K. Ridley, Renee M. Olsen (1991). Rapid diagnosis of bovine *cryptosporidiosis* with a modified commercial acid-fast staining procedure j vet diagn invest 3:182-183.

Ronald Fayer, Albert Guidry and Byron L. Blagburn (1990). Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against *cryptosporidiosis* in neonatal mice infection and immunity, sept. 1990, p. 2962-2965.

Rubén Darío Romero Martínez, Raquel Haydée Pedrozo Prieto, Erasmo Vera (2001). La *cryptosporidiosis* en los terneros recién nacidos. su etiología, patogenia, síntomas, tratamiento y profilaxis revista de ciencia y tecnología.

Saul Tziporit and Iris Campbell (1981). Prevalence of *cryptosporidium* antibodies in 10 animal species journal of clinical microbiology, oct. 1981, p. 455-456.

Saul Tziporit, K. W. Angus, I. Campbell, and E. W. Gray (1980). *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus infection and immunity, dec. 1980, p. 884-886.

Saul Tziporit, William Rand, Jeffrey Griffiths, Giovanni Widmer and Joseph Crabb. Evaluation of an animal model system for *cryptosporidiosis*: therapeutic efficacy of paromomycin and hyperimmune bovine colostrum-immunoglobulin clinical and diagnostic laboratory immunology, july 1994, p. 450-463.

Shiguang Yang, Mark C. Healey, Chunwei Du, and Jianfei Zhang (1996). Complete development of *cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells infection and immunity p. 349–354.

S.E. Sanford and G.K.A. Josephson (1982). Bovine *cryptosporidiosis*: clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves can vet. j. 23: 343-347.

Tim A. Mcallister, Merle E. Olson, andy Fletch, Merv Wetzstein, Toby Entz (1999). Prevalence of *giardia* and *cryptosporidium* in beef cows in southern ontario and in beef calves in southern british columbia can vet j 2005;47–55.

Victoria Ley, James Higgins, and Ronald Fayer (2002). Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination applied and environmental microbiology, july 2002, p. 3455–3461.

William M. Whitmire and James A. Harp (1991). Characterization of bovine cellular and serum antibody responses during infection by *cryptosporidium parvum* infection and immunity, mar. 1991, p. 990-995.

Xigang Leng, Derek A. Mosier, and Richard D. Oberst (1996). Simplified method for recovery and pcr detection of dna from bovine feces applied and environmental microbiology, feb. 1996, p. 643–647.