

FECHA DE ADQUISICIÓN	
NUM. DE INVENTARIO	00080
PROCEDENCIA	
NUM. CALIFICACIÓN	
PRECIO	
DIST.	



TL00080

SF967
.C79
.M37 2006
TESIS LAG
Ej.1

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

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**FRECUENCIA DE CRYPTOSPORIDIOSIS EN VACAS Y
VAQUILLAS HOLSTEIN, APARENTEMENTE SANAS,
DURANTE EL RETO.**

POR:

JONATHAN GILBERTO MARTÍNEZ VIGIL

T E S I S

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

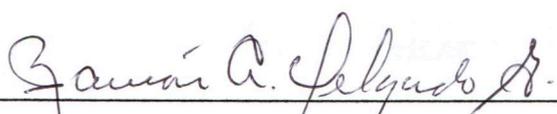
TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2006.

**FRECUENCIA DE CRYPTOSPORIDIOSIS EN VACAS Y
VAQUILLAS HOLSTEIN, APARENTEMENTE SANAS, DURANTE
EL RETO.**

**TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR
DE ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE: 
M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ.

VOCAL: 
M.V.Z. JOSÉ GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL: 
M.V.Z. JUAN MANUEL GUILLÉN SÁENZ.

VOCAL SUPLENTE: 
DR. HORACIO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

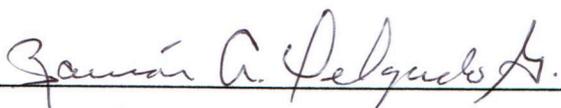
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

FRECUENCIA DE CRYPTOSPORIDIOSIS EN VACAS Y
VAQUILLAS HOLSTEIN, APARENTEMENTE SANAS, DURANTE
EL RETO.

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

PRESIDENTE DEL JURADO



M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ.

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
AAP - UL

INDICE

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Etiología.....	3
2.2 Morfología.....	4
2.3 Ciclo Biológico.....	5
2.4 Diagnóstico.....	6
2.5 Epidemiología.....	8
2.6 Transmisión.....	9
2.6.1 fuentes y rutas de transmisión.....	10
2.7 Signos y Lesiones.....	10
2.8 Patogenia.....	12
2.9 Tratamiento y Prevención.....	13
III JUSTIFICACION.....	15
IV OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo General.....	16
4.2 Objetivos Específicos.....	16
V. MATERIAL Y METODOS.....	17
VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	18
VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	19
VIII. LITERATURA CITADA.....	20

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

**GILBERTO MARTÍNEZ MENDOZA Y BLANCA MAYELA
VIGIL GALVÁN**

Con todo mi cariño, respeto, admiración y amor; por haberme dado todo su amor y comprensión en los momentos más difíciles; por ser mis manos y mis pies cuando yo no podía hacer las cosas por mi mismo, quiero agradecerte principalmente a ti mamita: por tu tenacidad y dureza cuando debiste tenerla y ser lo más tierna cuando más necesitaba un abrazo.

Gracias mamita por haberme detenido cuando todavía no estaba listo para volar, y... por dejarme volar cuando el momento ha llegado.

Gracias a sus consejos y sus enseñanzas, esos recuerdos son el tesoro más grande que quedan conmigo; que dios me los bendiga siempre, los admiro y los quiero mucho.

Gracias por ser mis padres, gracias a ustedes soy lo que soy... gracias.

A MIS HERMANAS

**KARLA IVONNE MARTÍNEZ VIGIL Y BLANCA
ELIZABETH MARTÍNEZ VIGIL**

Por ser tan lindas y tenaces, por conseguir lo que siempre han querido, cuídense mucho, mejores hermanas en el mundo no pude haber pedido.

A MI ESPOSA:

M.V.Z XOCHITL SOSA CHAVEZ

Por ser lo que siempre había soñado de una mujer, por tu apoyo, tu tiempo, y sobre todo tu cariño, comprensión y amor. Tal vez no fuiste mi pasado, pero ahora eres mi presente y mi futuro. No pudiste ser más oportuna, llegaste en el momento en que más te necesitaba...gracias.

A MI COMPAÑERA Y AMIGA:

M.V.Z. ALMA SOCORRO SALINAS ÁVILA

Gracias Saly por ser mi amiga, por apoyarme mucho, por darme tus consejos, tu amistad y sobre todo tu tiempo. Por conocerme más de lo que yo creía, por creer en mi y por ser como eres.

No te deseo suerte por que se que no la necesitas, eres muy inteligente y se que alcanzaras todos tus sueños, cuídate y espero encontrarnos en un futuro con prosperidad y reconocimientos.

A MI COMPAÑERO Y AMIGO:

M.V.Z. JUAN JOSÉ ESPINOZA VARGAS

Gracias por ser una buena persona, por hacerme sentir que contaba con un hermano y, sobre todo por ayudarme a resolver y a recordar todos esos pequeños líos en que nos metíamos. Lo único que te puedo desear son triunfos y sobre todo salud hermano.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma mater por cobijarme en su seno, alimentarme de sabiduría y brindarme un espacio, haberme formado como Médico Veterinario Zootecnista.

Al Mc. Ramón A. Delgado González, con cariño y admiración, por brindarme la oportunidad en la realización de este sueño; agradezco su valioso tiempo, sin usted no hubiera sido posible lograrlo y sobre todo por ser un gran amigo.

Al M.V.Z. José Guadalupe Rodríguez Martínez, M.V.Z. Juan Manuel Guillén Sáenz y al Dr. Horacio Hernández Hernández. Con Admiración y respeto, les agradezco infinitamente su paciencia, así como también por ser parte de mi formación como profesionalista, sinceramente muchas gracias.

A mis compañeros y amigos. Les agradezco a ustedes por todos esos recuerdos Universitarios que quedan de todos nosotros, me los llevo, aunque se alejen y tal vez algunos de nosotros no nos volvamos a ver jamás, se quedan conmigo en los recuerdos, y quiero que sepan que no son mis amigos son mis hermanos, cuídense, y espero volverlos a ver algún día.

RESUMEN

Se realizó un muestreo en 20 hatos lecheros de la Comarca Lagunera, con una población de 34,713 vacas en producción y 4,041 vacas y vaquillas en reto. Se tomaron 81 muestras de heces, 53 de vacas y 28 de vaquillas de la población total, con un máximo de 20 días antes del parto, todas ellas aparentemente sanas. Se realizaron frotis con las heces, se tiñeron con la técnica de Ziehl Neelsen modificada y fueron observadas al microscopio a 40 aumentos. 16 de los hatos muestreados por nosotros que tenían antecedentes de positividad a *Cryptosporidium spp* en becerras, sin embargo, en ninguno se observaron ooquistes en las vacas y vaquillas del presente estudio. Se discuten los resultados y se sugiere que se realicen estudios con otras técnicas de diagnóstico, para descartar que las vacas y vaquillas en reto aparentemente sanas, puedan ser un factor involucrado en la transmisión de *Cryptosporidium spp*.

I. INTRODUCCION.

Cryptosporidium spp es un parásito entérico obligado del Phylum Apicomplexa y es una importante causa de enfermedades diarreicas en el mundo. El modo de infección es por vía fecal-oral, en alimentos y agua, y es iniciada cuando los esporozoitos son liberados de los ooquistes, estos se fijan al tracto intestinal e invaden a las células epiteliales de la mucosa (Hashim *et al.*, 2006).

Al parecer *Cryptosporidium parvum* ocasiona el problema en rumiantes neonatos y es considerado como un agente etiológico importante en el síndrome de diarrea neonatal en becerros, corderos y cabritos, causando considerables pérdidas económicas directa e indirectamente (De Graafa *et al.*, 1999).

Los becerros recién nacidos son particularmente susceptibles a la infección y pueden excretar billones de ooquistes cuando desarrollan la cryptosporidiosis. Recientes estudios indican que en los animales adultos, el ganado asintomático también excreta ooquistes, y el total del número de ooquistes excretados puede ser considerable debido a la cantidad de heces producidas (Kuczynska *et al.*, 2005).

Las pérdidas económicas asociadas con esta enfermedad no son únicamente debido a la mortalidad resultante, sino también al retardo en el crecimiento de los animales, el costo de medicamentos, la asistencia veterinaria y el incremento de trabajo involucrado (De Graafa *et al.*, 1999).

Estudios recientes en la Comarca Lagunera indican que el problema es frecuente en becerras, alrededor del 20 % de los hatos están infectados, y el origen de la infección generalmente es desconocida, por tal motivo el objetivo de la presente investigación es identificar y determinar la frecuencia de cryptosporidiosis en vacas y vaquillas en reto aparentemente sanas que pudieran transmitir la infección a sus crías.

II. ANTECEDENTES.

En el ganado bovino, fueron reconocidas dos especies del género *Cryptosporidium*: *C. parvum* y *C. andersoni* (sin. *C. muris* tipo bovino). El primero, coloniza el intestino delgado y representa un importante agente etiológico del síndrome diarreico de los becerros. En los bovinos adultos también ha sido reportada esta especie, en los que generalmente cursa de forma subclínica y presenta bajos niveles de infección. *C. andersoni*, se desarrolla en el abomaso, es más común en bovinos adultos y aunque presenta amplia distribución, su prevalencia es baja. Aparentemente no causa enfermedad manifiesta, pero la producción de leche se ha visto significativamente reducida en las vacas afectadas (Díaz de Ramírez *et al.*, 2000).

El género *Cryptosporidium* afecta a varias especies entre los que se encuentran los humanos y una amplia variedad de hospedadores. Inicialmente casi todos los aislamientos en humanos fueron asignados como *C. parvum*. Dentro de este género se han descrito dos genotipos: el tipo 1, genotipo humano y el tipo 2, genotipo del ganado, ambos son culpables de iniciar una infección en humanos. Sin embargo los dos genotipos difieren significativamente en sus genes y en la variedad en los hospedadores (Xiao *et al.*, 1999; Atwill *et al.*, 1997).

Estos parásitos infectan una amplia variedad de hospedadores vertebrados. En algunas especies son limitadas a grupos de hospederos particulares, como es el caso de *Cryptosporidium baileyi*, que infecta a pollos (Spano *et al.*, 1997).

Los ooquistes se fijan a la tierra infectando frecuentemente el estiércol de los bovinos en un modo complejo y teniendo implicaciones en el transporte de los ooquistes a través de este (Kuczynska *et al.*, 2005).

2.1 Etiología.

Phylum: Apicomplexa; Levine, 1970

Clase: Sporozoa; Levine, 1988

Subclase: Coccidia; Leuckart, 1879

Order: Eucoccidiida; Leger and Duboscq, 1910

Suborden: Eimeriina; Leger, 1911

Familia: Cryptosporidiidae; Leger, 1911

Género: *Cryptosporidium*; Tyzzer, 1907 (Current y Lyne, 1991).

Las especies del género *Cryptosporidium* que son frecuentemente consideradas como especies verdaderas incluyen a:

- C. andersoni* (ganado),
- C. baileyi* (pollos y algunas otras aves),
- C. canis* (perros),
- C. felis* (gatos),
- C. galli* (aves),
- C. hominis* (humanos),
- C. meleagridis* (aves y humanos),
- C. molnari* (peces),
- C. muris* (roedores y algunos otros mamíferos),
- C. parvum* (rumiantes y humanos),
- C. wrairi* (cuyos),
- C. saurophilum* (lagartos y serpientes) y
- C. serpentis* (serpientes y lagartos).

Otros morfológicamente distintos a *Cryptosporidium* spp han sido encontrados en peces, reptiles, aves y mamíferos, pero tienden a no ser nombrados (Xiao *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2004).

Así mismo, en humanos se ha reconocido que *C. hominis* tiene una semejanza muy estrecha en el hospedero, morfológicamente similar a *C. parvum* y

estudios de transmisión cruzada han ayudado a distinguir entre ambos (Akiyoshi *et al.*, 2002).

Las primeras conclusiones fueron que *C. hominis* no infectaba experimentalmente a animales como ratones, becerros, corderos y lechones jóvenes, pero estudios recientes han demostrado claramente que becerros, corderos y lechones puede ser infectados con *C. hominis* (Akiyoshi *et al.*, 2002).

2.2 Morfología.

Aunque los ooquistes de muchos *Cryptosporidios* son de una medida morfológica similar, la morfología de los ooquistes puede desempeñar un papel crucial en la diferenciación de algún *Cryptosporidio*, incluso entre las especies intestinales en mamíferos hay diferencias significativas en la morfometría. Por lo tanto, la descripción de la especie se debe acompañar por una serie de medidas morfológicas, de longitud y anchura (Xiao *et al.*, 2004).

Los *Cryptosporidios* en el medio ambiente se encuentran como ooquistes de 5 micrómetros de diámetro, los cuales contienen cuatro esporozoitos. Los esporozoitos son móviles, de 0.5 a 1 micrómetros los cuales se adhieren e invaden las células epiteliales del tracto gastrointestinal. Aquí el parásito se replica en ocho merozoitos, estos abandonan a las células del hospedador rompiéndolas, infectando a otras células y completando el ciclo asexual en el ciclo biológico (Clark., 1999).

Las especies de *Cryptosporidium* han sido identificadas en base a la especificidad del hospedero, en la morfología del ooquiste y en el sitio de la infección (Mosier y Oberst, 2000).

2.3 Ciclo biológico.

El ciclo biológico es monoxeno ya que todas sus fases sexuales y asexuales ocurren en un mismo hospedador. Diversos aislamientos de *C. parvum* en becerros y humanos revelan que el ciclo de vida de este parásito es similar al de otras coccidias (e.g. *Eimeria* e *Isospora* spp) que infectan a mamíferos (Bankier *et al.*, 2003).

El ooquiste es viable en el excremento y en rumiantes el ciclo biológico comienza por la ingestión y desenquistamiento de los ooquistes en el tracto gastrointestinal del hospedador, liberándose de los ooquistes 4 esporozoitos, donde la multiplicación asexual es llamada esquizogonia, y a la sexual es donde se presenten división de núcleos de este parásito, esta etapa es llamada merogonia. La temperatura corporal de los mamíferos ($\pm 37^{\circ}\text{C}$), las sales biliares y posiblemente la tripsina son los factores que más influyen en esta fase. La esporulación de los ooquistes es solo en estado exógeno y consiste en 4 esporozoitos con una pared de doble capa; la pared de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp, es similar al de las otras coccidias, tienen una capa interna y otra externa, las cuales se abren y los esporozoitos salen de las ooquiste. Una vez liberados, los esporozoitos alcanzan el borde luminal de los enterocitos mediante movimientos de contracción, extensión y deslizamiento. Allí se invaginan a manera de dedos de guante, siendo englobados por la membrana de la célula hospedadora, que encapsula el parásito en el interior de la vacuola parasitadora (Current y Lyne, 1991) y se desarrollan a estadios de trofozoitos, el trofozoito pasa a ser la merogonia, que es la siguiente fase (ectomerogonia) donde ocurre la multiplicación asexual dentro de las células del hospedero, se forman 8 ó 4 merozoitos dependiendo si es una esquizogonia de I ó de II generación. Se reconoce la existencia de 2 tipos de esquizontes, el de tipo I es el primero en aparecer en el ciclo biológico y tiene 8 merozoitos; el tipo II cuenta con 4 merozoitos. Los tipo I pueden generar nuevas merogonias de primera generación o formar merozoitos tipo II, de estos se desarrollan los macro y microgametos, la mayoría de los merozoitos tipo II que entran en las células hospedadoras forman macrogametos, y solo unos

cuantos forman microgametos, los cuales, contienen 16 microgametocitos en su interior. Los microgametos no tienen flagelo, y se unen a los macrogametos gracias al flujo intestinal. Esto lleva a que los microgametocitos fertilicen a los macrogametocitos (Peeters *et. al.*, 1989; Current y Lyne, 1991).

La unión de macro y microgametocitos produce la formación de la pared de los ooquistes, esta genera la resistencia del ooquiste hacia el medio ambiente y así logra transmitirse de un hospedador a otro, en el ooquiste, surgirá la formación de esporozoitos infectivos dentro de la pared de los mismos. Los ooquistes son arrojados por las heces o quizás por secreciones de las vías respiratorias (Current y Lyne, 1991).

Cada generación del parásito puede desarrollarse o madurar dentro de 12 a 14 horas. El ciclo de vida es rápido y autoinfectivo, pueden verse un gran número de células parasitadas a lo largo del intestino pero por lo general los sitios de infección secundaria es en el duodeno (Le Chevallier *et. al.*, 1990).

2.4 Diagnóstico.

El diagnóstico clínico de cryptosporidiosis está principalmente basado en la presencia de ooquistes en el excremento. Los métodos de observación incluyen las técnicas de flotación, sedimentación y tinciones de frotis de heces. Sin embargo, la cryptosporidiosis no puede ser clínicamente distinguible de otras enfermedades diarreicas causadas por otros organismos infectivos. (Fayer y Ungar, 1986; Wee *et al.*, 1996).

El diagnóstico de la cryptosporidiosis resulta de la identificación de los ooquistes esféricos de 5 micrómetros de diámetro, o de alguno de los estadios intracelulares obtenidos por biopsia de la mucosa gastrointestinal. En tejidos, una muestra teñida con hematoxilina y eosina (H y E) debería ser suficiente para identificar la morfología de los estadios intracelulares del parásito en su localización dentro de las células epiteliales del intestino (Clark, 1999).

Las etapas endógenas del parásito en el borde de las células epiteliales pueden ser detectadas histológicamente con la tinción H y E, al fijar muestras intestinales de 1 a 2 horas después de la muerte (Angus *et al.*, 1998).

Las observaciones de campo en terneros han mostrado excreción de ooquistes que coincide con la enfermedad clínica, y con el tiempo los ooquistes se vuelven numerosos en heces (Angus *et al.*, 1998).

También se puede utilizar la técnica de auramina/rodamina, seguida por la tinción de Ziehl Neelsen, esta es muy sensible y específica aprovechada como herramienta para la identificación de los ooquistes de *Cryptosporidium* (Clark, 1999).

Con la técnica del método Ziehl Neelsen modificada para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en heces sin usar calentamiento, se observan los ooquistes ácido resistentes, de color rojo brillante sobre un fondo azul. En algunos se ven corpúsculos internos que corresponden a los esporozoitos. También se puede usar tinción Giemsa (Parisi y Tierno, 1995).

La técnica de anticuerpos fluorescentes no puede diferenciar especies de *Cryptosporidium* en humanos y animales vertebrados. Las pruebas moleculares tienen algunas ventajas en la sensibilidad para detectar y diferenciar entre especies de *Cryptosporidium* o genotipos. Sin embargo, estas pruebas son susceptibles al efecto de muchos inhibidores que se presentan en las muestras. En la identificación de este protozooario, el método que normalmente se usa es la purificación del ooquistes con la extracción de ADN (Jiang *et al.*, 2005).

Se han comparado los tres métodos de diagnóstico más utilizados: La visualización de los ooquistes con Ziehl Neelsen, la inmunofluorescencia y la identificación de antígenos por estudios inmunosorbentes ligado a enzimas (ELISA) en materia fecal, y se ha encontrado que todos tiene una sensibilidad y

especificidad de 96 a 98%, de acuerdo a las posibilidades de los laboratorios y de los costos de los reactivos (Quílez *et al.*, 1996; De Arango *et al.*, 2006).

2.5 Epidemiología.

Estudios recientes de muestras fecales en animales asintomático de Canadá, proponen que la presencia de *Cryptosporidium* es de alrededor del 20% en ganado, ovejas y caballos, y de un 10% en los cerdos (Juraneck, 1995).

Continuos reportes, han demostrado que el predominio de esta enfermedad afecta animales recién nacidos y jóvenes. La falta de maduración de la flora intestinal, de respuestas inmunes son ligadas a la predisposición de esta infección (Mosier y Oberst, 2000).

Los ooquistes de *C. parvum* están ampliamente distribuidos en el ambiente de muchas explotaciones ganaderas, y son ingeridos por el ternero recién nacido. Siguiendo de un período de incubación de 72 a 96 horas, la diarrea se observa dentro de 2 a 10 días, siendo durante estos periodos observables los ooquistes en heces (Anusz *et al.*, 1990).

La potencial contaminación en el agua varía temporalmente, incrementándose con la actividad en nacimientos y durante el pico de lluvias o en animales en producción (Wallis *et al.*, 1996).

La severidad de la enfermedad depende de la presencia de tres factores; el hospedero (infecciones continuas, malnutrición, inmunodepresión); el agente (la cepa genotípica) y el medio ambiente (la dosis de exposición) (Mosier y Oberst, 2000).

Una vez ingeridas, los ooquistes liberan los esporozoitos por exposición de ácidos biliares en el intestino delgado, donde estos penetran a las células

epiteliales. Los individuos infectados pueden presentar, diarrea acuosa, pero también puede ser asintomático (Goodgame, 1996).

2.6 Transmisión.

El *C. hominis* es transmitido en un ciclo antropozoonótico y el *C. parvum* en un ciclo zoonótico (Hashim *et al.*, 2006).

La ruta de transmisión es la fecal-oral, a través del contacto directo con el animal o humanos infectados y a través de la ingestión de agua o alimento contaminado. Esta transmisión de la enfermedad puede ser de forma directa de individuo a individuo o indirectamente de individuo-medioambiente-individuo a través de superficies contaminadas fecalmente, así como por vía de la ingestión fecal en alimentos y agua contaminada (Wallis *et al.*, 1996).

Los brotes son causados por una exposición directa en las fuentes de agua contaminadas y terminan cuando la contaminación es removida. Un individuo obtiene la infección por medio de la transmisión de patógenos hacia un individuo más susceptible (Wallis *et al.*, 1996).

En los humanos, los más predisponentes a la infección por *Cryptosporidium* son aquellos que: 1) beben agua que no esta tratada ni filtrada; 2) Los involucrados en prácticas de establo y 3) Veterinarios por su contacto con animales de granja (Casemore *et al.*, 1994; Goodgame, 1996; Juranek, 1995 y Keusch *et al.*, 1995).

Otra posible fuente de infección que debería ser considerada, son los roedores de los establos (De Graafa *et al.*, 1999).

2.6.1 fuentes y rutas de transmisión:

La infección por *C. parvum* se observa principalmente en los becerros jóvenes del nacimiento a 30 días de edad (Fayer y Ungar, 1986).

Los ooquistes se fijan a la tierra afectando frecuentemente al estiércol de los bovinos en un modo complejo y debería tener implicaciones por como los ooquistes pueden ser transportados a través del estiércol (Hansen y Ongerth, 1991).

Las infecciones clínicas o subclínicas también pueden desarrollarse en cerdos, gatos, perros, caballos, pollos, pavos, gansos, reptiles, roedores, conejos, animales exóticos y salvajes. Frecuentemente, pero no siempre, afecta al aparato respiratorio y conjuntivas. El estrés en los becerros hacen que se produzca una transmisión cruzada con el hombre, y puede afectar a varios hospedadores de otras especies (Angus, 1998).

Aun cuando las condiciones medioambientales en invierno no favorecen el nacimiento de moscas los ooquistes de *C. parvum* están presentes en estiércol, estos ooquistes, pueden ser transportados por las moscas en cualquier época del año. En invierno de una similar intensidad como en el verano (Fayer *et al.*, 2000).

2.7 Signos y lesiones.

La infección por *C. parvum* en el epitelio intestinal puede producir vellosidades romas, hiperplasia de la cripta, destrucción del citoesqueleto y disminución de la absorción de sodio (McCole *et al.*, 2000).

El abomaso con frecuencia contiene leche sin digerir formando coágulos, y el intestino delgado presenta enteritis con la mucosa hiperémica, pero no

hemorrágica. El contenido intestinal en ocasiones es amarillento y acuoso y puede existir acúmulo de gas en ciego y colon (Ortega *et al.*, 1999).

Las lesiones se clasifican en dos modelos patológicos:

- La muerte celular es el resultado directo de la invasión parasitaria, de la multiplicación y excreción.
- El daño celular podría ocurrir a través de la inflamación mediada por las células-T, produciendo atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas.

Los dos modelos anteriores producen distorsión en la estructura de las vellosidades y es acompañado por mala absorción de nutrientes y diarrea (Goodgame, 1996).

La enfermedad es caracterizada clínicamente por diarrea profusa y acuosa, a veces mucosa teñida con sangre, deshidratación, emaciación, anorexia y tenesmo. La enfermedad es más severa y letal cuando se complica con otros enteropatógenos como *E. coli*, *Salmonella*, *Rotavirus* y *Coronavirus*, en los hospedadores inmunodeprimidos (Arslan *et al.*, 2001).

Estudios actuales mencionan al *Cryptosporidium* spp como una causa común de diarrea aguda y persistente, los signos van desde diarreas intermitentes, dolor abdominal y fiebre variable. En individuos inmunocompetentes, los signos son mucho más graves. Afectando más a enfermos inmunodeprimidos, que a los inmunocompetentes. Estos con un comienzo rápido, usualmente de 1-2 semanas después de la exposición (Fayer y Ungar, 1986; De Arango *et al.*, 2006; Juranek, 1995)

Entre las especies más afectadas por criptosporidiosis se encuentran los bovinos, en especial los neonatos. La morbilidad es variable y va desde 10 hasta 85% y algunas veces puede llegar al 100%. El síndrome diarreico tiene una etiopatogénia compleja; el *Cryptosporidium* como único causante de la

enfermedad, provoca una mortalidad baja, pero asociado con otros agentes infecciosos, una inmunidad baja y un estado nutricional deficiente del hospedero, provoca que la morbilidad sea alta (Ortolani y Soares, 2003).

2.8 Patogenia.

No se ha definido el mecanismo de la diarrea causada por *C. Parvum*. Algunos estudios se sugiriere que la enfermedad esta mediada por una enterotoxina, lo cual provoca mala absorción de nutrientes, debido a la alteración de las vellosidades. Esta mala absorción lleva a un sobre crecimiento bacteriano que complicaría esta condición (Robinson *et al.*, 2001).

El *Cryptosporidium* se encuentra a lo largo de todo el tracto digestivo, desde la faringe hasta el recto, siendo el yeyuno el sitio de mayor predilección. Además, se ha descrito en vesícula biliar, vía pancreática y aparato respiratorio. Los hallazgos histológicos son inespecíficos, observándose en el intestino distintos grados de alteración con atrofia de vellosidades que va de leve a severa, y dilatación de las criptas (Graczyk *et al.*, 1999; Bankier *et al.*, 2003).

Durante la invasión se establece un único compartimiento intracelular del hospedador en el que el parásito se divide. Las células del epitelio normalmente son columnares, estas a menudo son acortadas significativamente después de la invasión por el parásito (Elliott y Clark., 2000).

La proliferación del *Cryptosporidium* ocurre por invasión de las células del hospedero seguido por el crecimiento del parásito y la división celular. La célula de hospedador es lisada por la replicación de los parásitos. Los parásitos liberados de la lisis celular del hospedero no crecen o se someten a una

división extracelular y mas rápidamente reinvasen a otras células del hospedero, para sobrevivir los ciclo los que se repiten, la replicación del parásito, la lisis celular del hospedero, y la invasión celular del parásito de nuevas células se asocian al aumento del daño hacia el tejido por la infestación y por lo tanto puede dañar la función intestinal (Guerrant, 1997; Morrissette y Sibley, 2002).

2.9 Tratamiento y prevención.

La eficiencia parcial en el tratamiento y prevención de la cryptosporidiosis en los rumiantes incluye decoquinato de sódio. La importancia de la protección calostrual en rumiantes neonatos antagonizan la infección por *C. parvum*. La destrucción de los ooquistes en los corrales e instalaciones usadas como parideros aplicando calor y/o desinfectantes químicos, el uso de camas limpias como medidas preventivas en el área de partos, tiene buenos resultados, la separación de los animales enfermos de los sanos durante los brotes de diarrea, una correcta administración de calostro a los neonatos ayuda a la prevención de brotes de cryptosporidiosis y minimiza la mortalidad y la morbilidad del hato infectado (De Graafa *et al.*, 1999).

Así, la mejor medida actualmente disponible en la práctica clínica para tratar con esta enfermedad es la implementación de medidas sanitarias adecuadas, con el propósito de evitar el contacto del neonato con el parásito en lo posible, y prevenir la propagación de la enfermedad a otros animales (Harp y Goff, 1998).

Como medida fácil y preventiva se sugiere hacer el aislamiento, limpieza y manejo de los animales infectados ya que estos animales infestados constituyen una fuente de la infección e infestación para los animales sanos (Harp y Goff, 1998).

Se debe realizar la limpieza y desinfección de las instalaciones, para prevenir la acumulación de ooquistes y otros patógenos en la cama, los pisos, las paredes, depresiones, unidades de bebederos, etc. Los ooquistes son sensibles a temperaturas altas, el uso de agua caliente a alta presión, permitiendo posteriormente que las instalaciones se des sequen durante varios días antes de reintroducir a los animales, puede tener buenos resultados (Harp y Goff, 1998).

La gruesa pared de los ooquistes de *Cryptosporidium* permite que persista y se distribuya en el ambiente, además, provee resistencia a sustancias tales como el cloro. El agua potable y de piscinas que han sido tratadas con cloro puede contar con la presencia de *Cryptosporidium* debido a su resistencia (Guerrant, 1997).

El exitoso control hacia el *C. parvum* en el campo pudiera requerir de vacunas que generan una rápida respuesta inmune mediadas por células en los becerros en los primeros días de vida (Harp y Goff, 1998).

III. JUSTIFICACION.

En la Comarca Lagunera recientemente se han realizado estudios epidemiológicos de cryptosporidiosis en becerros encontrándose que el 25.51% tuvieron positividad y por lo tanto la finalidad del presente trabajo es analizar una de las posibles fuentes de contaminación que pudiera estar involucrada en la infección, tomando como factor de riesgo la eliminación de los ooquistes de *C. parvum* por parte de vacas y vaquillas antes del parto, en hatos lecheros conocidos con infecciones crónicas de esta enfermedad.

IV. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General.

Determinar la frecuencia de *Cryptosporidium spp* en heces de vacas y vaquillas aparentemente sanas durante el reto o parto, en los establos de la Comarca Lagunera, utilizando la tinción de Ziehl Neelsen modificada.

4.2 Objetivos Específicos.

4.2.1 determinar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium spp* en heces de vacas y vaquillas aparentemente sanas durante el reto o parto, por medio de análisis microscópicos con tinción de Ziehl Neelsen modificada.

4.2.2 Establecer la frecuencia de eliminación de *Cryptosporidium parvum* en vacas y vaquillas aparentemente sanas durante el reto o parto.

V. MATERIAL Y METODOS.

Fase de campo. El trabajo de campo se realizó en 20 hatos lecheros de la Comarca Lagunera, con una población de 34,713 de vacas adultas de las cuales 4,041 fueron vacas y vaquillas en reto. Se tomaron muestras del 2% (81 muestras) de las vacas secas y vaquillas, máximo 20 días antes del parto, todas ellas aparentemente sanas. Las heces fueron recolectadas del recto en bolsas plásticas estériles, y mantenidas en refrigeración para posteriormente procesarlas.

Fase de laboratorio. Las muestras se trabajaron en el laboratorio de parasitología de la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna.

Procedimiento de la tinción. Se realizaron frotis con las heces frescas en portaobjetos y se dejaron secar al aire, se enjuagaron con agua, para teñirlas con la técnica de Ziehl Neelsen modificada. De acuerdo a los siguientes pasos; se sumergieron por 30 minutos en Carbol Fuchshina, posteriormente se sumergieron en agua corriente hasta quitar el exceso de colorante, se decoloraron en alcohol ácido al 1 % (alcohol al 70% al 1% de ácido clorhídrico) hasta obtener un color rosa en la tinción, se procedió a sumergir en agua corriente para quitar los residuos del alcohol, así como el exceso del colorante, se realizó contratinción con azul de metileno por 5 minutos, después se lavó con agua corriente hasta quitar el exceso de colorante. Las muestras se prepararon para observarlas al microscopio, utilizando resina sintética y cubreobjetos, para ello se aclararon las muestras con alcohol etílico al 96%, alcohol etílico absoluto y Xilol.

Interpretación de las observaciones. Los criterios de evaluación se basaron en la observación de los ooquistes de color rojo brillante sobre un fondo azul.

Se observaron con el objetivo 40X, se contabilizaron 50 campos ópticos antes de considerar un caso negativo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados indican que del 100% de las muestras de vacas y vaquillas aparentemente sanas en reto, ninguna mostró la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium*. Lo que contrasta con lo encontrado por Díaz de Ramírez *et al.*, (2000) y Lorenzo-Lorenzo *et al.*, (1993) ya que en investigaciones separadas obtuvieron una alta proporción de vacas periparturientas y en línea de ordeño que excretaron ooquistes de *Cryptosporidium spp.* Ellos reportaron que en vacas aparentemente sanas se han encontrado de 25 a 1.8×10^4 ooquistes por gramo de heces (opg), con una media de 900 opg de *C. parvum*. Ellos consideraron que tomando un recuento medio de 445 opg con una producción de 30 kg/día de heces por vaca, se pueden excretar más de 30 millones de ooquistes por día. Referido por Anderson (1998), otros resultados como los de Atwill *et al.*, (1998) indicaron que en vacas y vaquillas periparturientas, en el suelo y postes, no hubo presencia de ooquistes.

Probablemente las becerras por su edad sean más susceptibles a la infección por *Cryptosporidium*, lo que coincide con las investigaciones hechas por Harp y Goff (1998) y con otras investigaciones como las llevadas por Faubert y Litvinsky (2000).

La técnica que se llevó acabo en la investigación fue la de Ziehl Neelsen, esta se utilizó por ser económica y rápida para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium spp* (Kehl *et al.*, 1995). En un estudio realizado por Quílez *et al.*, (1996), se compararon las técnicas de Zielh-Neelsen, inmunofluorescencia y ELISA, y se encontraron que las tres pruebas evaluadas tuvieron sensibilidad y especificidad de un 96 a 98%. Sin embargo, existen otros estudios (Morgan *et al.*, 1998) que sugieren que pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene una sensibilidad y especificidad de hasta 100% hacia el *Cryptosporidium*.

VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.

En la Comarca Lagunera en una muestra de vacas y vaquillas en reto, alrededor de 20 días antes del parto, no se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

De acuerdo a los resultados obtenidos y a las investigaciones revisadas, se sugiere realizar otros tipos de estudios en vacas y vaquillas alrededor del parto y buscar otras fuentes de infección como los roedores, ya que estos sufren de la infección cryptosporidial que puede ser transmitida a becerros por la vía fecal-oral siendo estos una fuente de transmisión importante.

También se recomienda la utilización de técnicas de diagnóstico, más especializadas como ELISA y PCR para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium*.

Por último es muy importante tomar medidas preventivas de salud pública ya que presenta un peligro por ser una enfermedad zoonótica

VII. LITERATURA CITADA

1. Akiyoshi, D.E., X. Feng, M. A. Buckholt, G. Widmer, y S. Tzipori. 2002. Genetic Analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. *Infect. Immun.* 70:5670–5675.
2. Anderson, B.C. 1998. Cryptosporidiosis in Bovine and Human Health. *J. Dairy Sci.* 81 (11): 3036-3041
3. Angus, K.W. 1998. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review. *J. R. Soc. Med.* 76:62-70.
4. Anusz, K., P. Mason y M. Riggs. 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Bovine Feces by Monoclonal Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* 28. (12): 2770-2774.
5. Arslan, M. Ö., Y. Gicikh, y B. Sari. 2001. Prevalence of *Cryptosporidium spp.* Oocysts in Diarrhoeic Calves in Kars Province Turkey. *J. Vet. Anim. Sci.* 7: 161-165.
6. Atwill, R., R. A. Sweitzer, M. Pereira, I.A. Gardner, D. Van Vuran y W. M. Boyce. 1997. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl Environ Microbiol.* 63: 3946–3949.
7. Atwill, E. R., J. A. Harp, T. Jones, P. W. Jardon, S. Checél, y M. Zylstra. 1998. Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* for calfhooD infection. *Am. J. Vet. Res.* 59:1116–1121.

8. Bankier, A. T., H. F. Spriggs, B. Fartmann, B. A. Konfortov, M. Madera, C. Vogel, S. A. Teichmann y A. Ivens. 2003. Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Res* 13(8): 1787-1799.
9. Casemore, D.P., C.A. Garder, y O'Mahony, 1994. C. Cryptosporidial infection, with special reference to nosocomial transmission of *Cryptosporidium parvum*: a review. *Folia Parasitol.* ; 41 (1): 17-21.
10. Clark D. 1999. New Insights into Human Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4): 554-563.
11. Current W. y Lynne S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4(3) 325-358.
12. De Arango M., Rodríguez D., y Prada N., 2006. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en materia fecal de niños entre un mes y trece años en un hospital local colombiano. *Colombia Médica.* 37 (2):112-115.
13. De Graafa D., Vanopdenboscha E., Ortega-Mora L.M., Abbassi H y Peeters J. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals International. *J. Parasitol.* 30 (29): 1269-1287.
14. Díaz de Ramírez A., Ramírez-Iglesia., Lilido N., de Plaza G., Magali R. y Román R. 2000. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. durante el postparto, en vacas mestizas de doble propósito. *Revista Científica.* 12 (2): 614-616.

15. Elliott, D. A. y D. P. Clark. 2000. *Cryptosporidium parvum* induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface. *Infect Immun* 68(4): 2315-2322.
16. Faubert, G.M. y Litvinsky, Y. 2000. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between rams and calves on a dairy farm. *J. Parasitol.* 86:495-500.
17. Fayer R., Knight R., B. Mhangami-Ruwende, B.J. Trout, A. Da Silva y K. Graczyk. 2000. Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63(3):178-183.
18. Fayer, R., y B.L.P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50:458-483.
19. Goodgame R. 1996. Understanding Intestinal Spore-Forming Protozoa: *Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora, and Cyclospora*. *Ann Intern Med.* 124 (4): 429-441.
20. Graczyk, T. K., M. R. Cranfield y R. Fayer. 1996. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum* Pathogenesis and impact. *Am J Trop Med Hyg.* 54(3): 274-279.
21. Guerrant R. 1997. Cryptosporidiosis: An Emerging, Highly Infectious Threat University of Virginia School of Medicine Charlottesville, Virginia, USA. *J. Anim. Sci.* 3 (1): 324-327.

22. Hansen, J.S., y J.E. Ongerth. 1991. Effects of time and watershed characteristics on the concentration of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2790-2795.
23. Harp J. A. y J. P. Goff. 1998. Strategies for the Control of *Cryptosporidium parvum* Infection in Calves. *J. Dairy Sci.* 81 (1): 289.
24. Hashim A., G. Mulcahy, B. Bourke y M. Clyne. 2006. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with Primary Human and Bovine Intestinal Cells. *Infect. Immun.* 74 (1): 99–107.
25. Jiang, J., K. A. Alderisio, A. Singh y L. Xiao. 2005. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl Environ Microbiol.* 71(3): 1135-1141.
26. Juranek D. D. 1995. Cryptosporidiosis: Sources of Infection and Guidelines for Prevention. *J. Clin. Infec. Dis*; 21(1): 57-61.
27. Kehl, K. S., H. Cicirello y P. L. Havens. 1995. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol.* 33(2): 416-418.
28. Keusch, G.T., D. Hamer, A. Joe, M. Kelley, J. Griffiths, y H. Ward. 1995. Cryptosporidia. *Schweiz Med Wochenschr*, 125 (18): 899-908.
29. Kuczynska E., D. Shelton y Y. Pachepsky. 2005. Bovine Manure on *Cryptosporidium parvum* Oocyst Attachment to Soil. *Appli. Environ. Microbiol.* 71(10): 6394–6397

30. Le Chevallier, M.W., T.M. Trok, M.O. Burns y R.G. Lee. 1990. Comparison of the zinc sulfate and immunofluorescence techniques for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium*. *J. Clin. Microbiol.* 82(9):75-82.
31. Lorenzo-Lorenzo, M. J., E. Ares-Mazas y I. Villacorta. 1993. Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Vet. Parasitol.* 47:9-15.
32. McCole, D. F., L. Eckmann, F. Laurent y M. F. Kagnoff. 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun.* 68(3): 1710-1713.
33. Morgan, U. M., L. Pallant, B. W. Dwyer, D. A. Forbes, G. Rich y R. C. Thompson. 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol.* 36(4): 995-998.
34. Morrissette N., y D. Sibley. 2002. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *J. Microbiol Rev.* 66 (1): 21-38.
35. Mosier D.A., y RD. Oberst. 2000. Cryptosporidiosis: a global challenge. *Ann N Y Acad Sci*; 916: 102-111.
36. Okhuysen P., G. Rogers, A. Crisanti, F. Spano, D. Huang, C. Chappell, y S. Tzipori. 2004. Antibody Response of Healthy Adults to Recombinant Thrombospondin-Related Adhesive Protein of *Cryptosporidium* 1 after Experimental Exposure to *Cryptosporidium* Oocysts clinical and diagnostic laboratory. *J. Immun. Sci.* 11 (2): 235-238.

37. Ortega, M. L. M., B. M. Gómez y V. F. A. Rojo. 1999. *Parasitología Veterinaria*. España, McGraw - Hill interamericana. 3^{er} Ed.
38. Ortolani E., y P. Soares. 2003. *Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros*. *Parasitol Latinoam*. 58: 122 – 127
39. Parisi, M. T. y P. M. Tierno. 1995. Evaluation of new rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Cryptosporidium* oocysts in untreated stool specimens. *J Clin Microbiol*. 33(7): 1963-1965.
40. Peeters, J.E., A. Mazás, E., Masschelein, W.J., Villacorta-Martinez de Maturana, I. y Debacker, E. 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol*. 55:1519-1522.
41. Quílez, C. J., A. C. Sánchez, M. E. Del Cacho y B. F. López. 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón. *Vet. Parasitol*. 67: 83-88.
42. Robinson, P., P. C. Okhuysen, C. L. Chappell, D. E. Lewis, I. Shahab, A. Janecki y A. C. White. 2001. Expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in jejuna of volunteers after experimental challenge with *Cryptosporidium parvum* correlates with exposure but not with symptoms. *Infect Immun*. 69(2): 1172-1174.
43. Spano, F., L. Putignani, J. McLauchlin, D. P. Casemore, y A. Crisanti. 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *J. Microbiol.* 150:209–217.

44. Wallis P.M, S.L. Erlandsen, J.L. Isaac-Renton, M.E. Olson, W.J. Robertson, H. van Keulen. 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ. Microbiol.* 62:2789-2797.
45. Wee S., Joo h., y Kang Y. 1996. evaluation for detection of *Cryptosporidium* oocysts in diarrheal feces of calves. *Korean J. Parasitol.* 34 (2): 121-126.
46. Xiao L., Fayer R., Ryan U., y Upton S. 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol Rev.* 17 (1): 72-97.
47. Xiao L., Sulaiman I., Fayer R., y Altaf A Lal. 1998. Species and Strain-specific Typing of *Cryptosporidium* Parasites in Clinical and Environmental Samples Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. *Appl. Environ. Microbiol.* 93(5): 687-692.
48. Xiao, L., U. M. Morgan, J. Limor, A. Escalante, M. Arrowood, W. Shulaw, R. C. Thompson, R. Fayer, y A. A. Lal. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3386-3391.