

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LESIONES
CAUSADAS POR *Cryptosporidium* spp EN BECERROS**

POR:

NORMA ANGELICA MURCIA SOLIS

TESIS

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2009

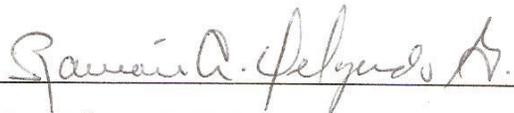
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA
ANIMAL**

TESIS

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LESIONES
CAUSADAS POR *Cryptosporidium* spp. EN BECERROS**

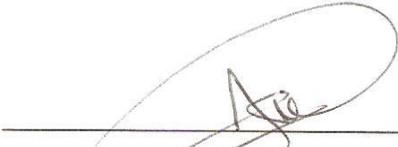
APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



MC. JOSÉ LUÍS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS



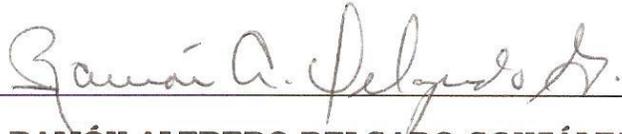
**COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN
REGIONAL
CIENCIA ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LESIONES
CAUSADAS POR *Cryptosporidium* spp. EN BECERROS**

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

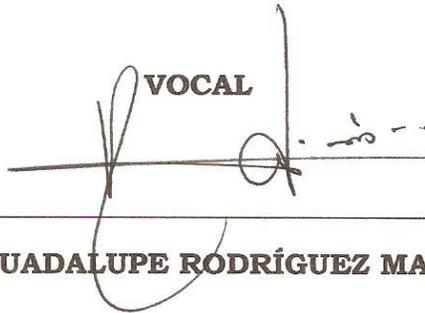
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE:



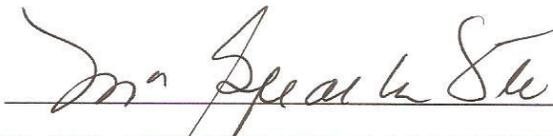
MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL



MVZ. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTINEZ

VOCAL



MC. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE



MC. JUAN JOSÉ MUÑOZ VARELA

INDICE

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Etiología	3
2.2. Clasificación taxonómica	4
2.3. Morfología	5
2.4. Ciclo biológico	8
2.5. Epidemiología	10
2.6. Fuentes de infección	13
2.7. Transmisión	14
2.8. Patogenia	16
2.9. Signos y lesiones	17
2.10. Diagnóstico	19
2.11. Prevención y tratamiento	22
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	26
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
VII. LITERATURA CITADA	33

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Cryptosporidium</i>	6
Cuadro 2. Especies reconocida de <i>Cryptosporidium</i> su huésped específico predominante y localización primaria de la infección	7

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> e infección de las células epiteliales	11
Figura 2. Patogénesis de <i>Cryptosporidium parvum</i>	18
Figura 3. Enteritis catarral con criptitis	28
Figura 4. Criptitis, a) Dilatación quística, b) Detritos celulares	28
Figura 5. Enteritis catarral, a) Dilatación de criptas, b) Detritos celulares, c) Células caliciformes	29
Figura 6. Enteritis catarral con criptitis, crónica. Obsérvese la fibroplasia alrededor de la cripta dilatada	29
Figura 7. Enteritis catarral. Obsérvense los neutrófilos	30
Figura 8. Enteritis necrótica, a) Necrosis de vellosidades, b) hemorragias	31
Figura 9. Enteritis necrótica, a) Necrosis de vellosidades, b) Hemorragias	31
Figura 10. Porcentaje 11 (26.2%) de muestras compatibles con criptosporidiosis	32
Figura 11. Lesiones en intestino, en el duodeno se observaron 13 muestras con alteraciones, en el yeyuno 12, y en el íleon 8	32

RESUMEN

Se tomaron 42 muestras de intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) de becerros sacrificados en el rastro municipal de Torreón, Coahuila. Se fijaron en formol al 10%, amortiguada con fosfatos con un pH de 7.4, se fijaron un mínimo de 48 horas, se incluyeron en parafina y se tiñeron con la técnica de rutina de Hematoxilina y Eosina, para determinar por medio de estudio histopatológico la presencia de criptitis y necrosis de vellosidades, características de criptosporidiosis. La interpretación se llevó a cabo por observación directa en el microscopio de luz visible, realizando una descripción de las lesiones observadas.

Los resultados obtenidos en el estudio muestran una frecuencia de lesiones causadas por *Cryptosporidium* spp en un porcentaje de 26.2% positivas y 73.8% mostraron otras alteraciones. En el presente estudio se demostró las lesiones características de *Cryptosporidium* spp así como otras alteraciones que pueden causar enteritis mixtas, asociadas a la infección. Se mencionan el control, la prevención y tratamientos, así como la resistencia a antibióticos.

Los exámenes parasitológicos comunes no permiten la identificación de coccidios por lo que estudios histopatológicos son de utilidad para determinar el perfil epidemiológico de la infección por criptosporidias y para determinar la variedad y prevalencia de lesiones que afectan la superficie de las células epiteliales.

Palabras clave: *Cryptosporidium* spp, criptosporidiosis, histopatología becerros, enteritis con criptitis.

I. INTRODUCCIÓN

La *Cryptosporidiosis* es una infección muy común en el ganado a nivel mundial, y para la industria lechera, no sólo se ha vuelto una preocupación debido a las pérdidas económicas directas asociadas con la infección, sino también por la perspectiva de salud pública y el potencial de contaminación medio ambiental con el ooquiste, la mayoría de los autores tratan el asunto de manera genérica y se limitan al relato y correlación del binomio efecto - causa (**Lippi y Castro 2003**). Recientemente los estudios moleculares de *Cryptosporidiosis* en el ganado han mostrado tres especies que son responsable en la mayoría de las infecciones ganaderas (el *Cryptosporidium parvum*, *bovis* y *andersoni* y genotipo *C. deer-like*) (**Santín et al., 2008**), el *C. parvum* es el más importante, infectando un gran rango de mamíferos, incluso los humanos (**Gómez et al., 2006; Sunnotel et al., 2006**). La mortalidad de Terneros debido a la cryptosporidiosis, sobre todo en la recepción de los animales y la falta de desinfección es normalmente el más grande problema de las pérdidas son así principalmente indirectas, debidas a los costos extras asociado con el cuidado de animales enfermos, y al deterioro de crecimiento (**Klein et al., 2008**). La cryptosporidiosis tiene una distribución universal, con elevada prevalencia en los países menos desarrollados, especialmente de África y América Latina. La infección comienza con la ingestión de agua y/o alimentos contaminados con ooquistes presentes con la materia fecal de individuos o animales infectados (**De la Ossa et al., 2007**). Se caracteriza por gastroenteritis severa y diarrea. Los organismos pueden ser transmitidos a través del agua y se ha encontrado en las fuentes de agua inacabadas. *Cryptosporidium* spp., se ha encontrado predominantemente en los mamíferos tal como las ovejas, caballos, cabras, cerdos, perros, gatos, y ganado. A través de la excreción y el proceso de estiércol extendiendo en la tierra de cultivo, estas poblaciones contaminan el ambiente (**Barwick et al., 2003**) El diagnóstico de la criptosporidiosis se debe realizar preferentemente mediante la identificación del parásito en muestras de los animales afectados utilizando diversas técnicas de laboratorio (**Quílez et al., 2003**), entre ellas la microscopía, las técnicas inmunológicas y moleculares (**Servinc et al., 2003**), aunque el pequeño tamaño

de los ooquistes y su similitud con diversas levaduras exige el empleo de técnicas coprológicas y tinciones diversas de recuperación e identificación de ooquistes de *Cryptosporidium*, a partir de heces se ha señalado el máximo rendimiento en la tinción de Ziehl-Neelsen (**Barco et al., 1991**), así mismos ha sido diagnosticado histológicamente en las microvellosidades intestinales de la mucosa obtenida por medio de una biopsia (**Current y Garcia 1991**).

De acuerdo a estos antecedentes y considerando que no hay estudios a nivel de rastro de la criptosporidiosis en becerras y tomando en cuenta que es una enfermedad zoonótica, la finalidad de la presente investigación es realizar análisis de intestinos e identificar lesiones características de *Cryptosporidium* spp.

II. ANTECEDENTES

El *Cryptosporidium parvum*, fue descubierto en 1912 por el parasitólogo americano Edward Ernest Tyzzer, en las glándulas gástricas de ratones del laboratorio en que él había encontrado otra especie previamente, *C. muris* recientemente en el año 1976 fue hallado en dos casos de diarrea en seres humanos (**Barboni et al., 2008**). El *Cryptosporidium parvum*, es un parásito intracelular perteneciente al *Phylum Apicomplexa* (**Hashim et al., 2004**). Hay 14 especies descritas actualmente dentro del género *Cryptosporidium* y más de 33 genotipos de *C. hominis*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, y *C. suis* (**Ruecker et al., 2005**). La Cryptosporidiosis es una enfermedad emergente ocasionada por protozoarios del género *Cryptosporidium* que afectan a un amplio rango de vertebrados y presentan una gran capacidad para reproducirse y diseminarse. En el ganado bovino, fueron reconocidas dos especies de este género: *Cryptosporidium parvum* y *C. andersoni*. La primera, coloniza el intestino delgado y constituye 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. No obstante, en ocasiones se han señalado altas prevalencias y excreción de hasta $1,8 \times 10^4$ ooquistes por gramo de heces. La otra especie, 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., 2002; Fayer et al., 2006**).

2.1. Etiología

Las especies nombradas de *Cryptosporidium* que son consideradas actualmente válidas incluyen el *C. andersoni* (ganado), *C. baileyi* (pollos y algunas otras aves), *C. canis*. (perros), *C. felis* (gatos), *C. galli* (aves), *C. hominis* (humanos), *C. meleagridis* (pájaros y los humanos), *C. molnari* (el pez), *C. muris* (los roedores y algunos otros mamíferos), *C. parvum* (los ruminantes y humanos), *C. wairi*

(cuyos), *C. saurophilum* (lagartos y serpientes), *C. serpentis* (serpientes y lagartos) y *C. suis* (cerdos) (**Xiao et al., 2004; Ryan et al., 2005**).

2.2. Clasificación taxonómica

Los coccidios son parásitos obligados de vertebrados e invertebrados superiores que presentan ciclos de vida complejos, monoxenos o heteroxenos, e infectan células epiteliales del intestino, hígado u otros órganos. Se clasifican taxonómicamente dentro del *Phylum Apicomplexa*, el cual está conformado por numerosos géneros de parásitos eucariotas patógenos de los seres humanos (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora*), ganado bovino (*Theileria*, *Babesia*), aves de corral (*Eimeria*) y animales domésticos (*Sarcocystis*, *Neospora*). Una característica del *Phylum Apicomplexa* es la de un conjunto de organelas en la zona apical-roptrías, micronemas, gránulos densos, conoide, microtúbulos, microporos- sólo visibles por microscopía electrónica, responsables de la capacidad de estos microorganismos para invadir las células y multiplicarse como parásitos intracelulares. Las roptrías, micronemas y gránulos densos contienen una mezcla compleja de proteínas que son secretadas, ya sea en el extremo apical del zoíto o dentro de la célula, y cumplen funciones de adhesión, unión específica a la célula huésped, locomoción y formación de la vacuola parasitófora. El conoide es un cono de fibrillas que favorece la penetración de las células del huésped; los microtúbulos están relacionados con la motilidad del parásito y los microporos participan en la ingestión de alimento durante la vida intracelular. Los estadios invasivos especializados -zoítos- poseen motilidad direccional de deslizamiento a lo largo de su eje longitudinal. Para ciertos géneros del *Phylum Apicomplexa* -*Caryospora*, *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Toxoplasma*- características biológicas tales como la especificidad de huésped, tamaño, forma y estructura interna del ooquiste, presencia de esporoquistes y esporozoítos, resultan suficientes para identificar a la mayoría de las especies. Sin embargo, cuando los ooquistes presentan morfología común a varias especies y son tan pequeños que su estructura interna no es visible, la identificación de la especie ya no es tan sencilla. Esta dificultad se presenta con todas las especies del género *Cryptosporidium*, con el agravante de que los pequeños ooquistes son

fácilmente confundibles con otras partículas habitualmente halladas en heces o en muestras ambientales (levaduras, microalgas, hongos). Tradicionalmente, las especies de *Cryptosporidium* fueron clasificadas por las características morfológicas de los ooquistes y por su habilidad de infectar a un único huésped específico, **(Luján y Garbossa, 2008)** y el sitio anatómico de infección **(Jellison et al., 2004)**.

Sin embargo, ciertas particularidades del género *Cryptosporidium* parecerían diferenciarlo de otros coccidios:

- La localización peculiar dentro de la célula huésped, intracelular pero extracitoplasmática, que confina los estadios de desarrollo endógeno a la superficie apical de las células epiteliales;
- La unión del parásito a la célula huésped a través de una organela multimembranosa en la base de la vacuola parasitófora que facilita la incorporación de nutrientes desde la célula huésped;
- La presencia de dos tipos morfo funcionales de ooquistes, los de paredes gruesas que son excretados, y los de paredes delgadas, responsables de la iniciación del ciclo auto-infectivo en el huésped infectado; – el tamaño pequeño de los ooquistes que carecen de estructuras morfológicas tales como micrópilo, esporoquistes y gránulos polares y, finalmente,
- La insensibilidad a todos los agentes anticoccidiales probados **(Luján y Garbossa, 2008)**.

2.3. Morfología

Aunque el ooquistes de muchos *Cryptosporidium* spp son morfológicamente similares, las medidas morfométricas de los ooquistes puede jugar un papel vital en la diferenciación. Por ejemplo, las especies establecidas en los pájaros pueden diferenciarse de los reptiles fácilmente en base al tamaño y la forma de ooquiste. Incluso entre las especies intestinales en los mamíferos, hay diferencias significantes morfométricas, por consiguiente, cada descripción de la especie debe acompañarse por una serie de medidas morfológicas de una población de los ooquistes, *C. hominis*, es morfológicamente idéntico al *C. parvum*., 4.6 a 5.4 µm

por 3.8 a 4.7 μm (la media, 4.2 μm) con una proporción de largo y ancho de 1.21 a 1.15 μm (la media, 1.19 μm) (**Xiao et al., 2004**).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Cryptosporidium*

CLASIFICACION	NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS
Phylum	<i>Apicomplexa</i>	Formas invasoras tiene complejo apical con revestimiento polar, roptrías, micronemas, conoides y microtúbulos.
Clase	<i>Sporozoasida</i>	La locomoción de organismos maduros por la flexión del cuerpo, deslizamiento, y ondulación.
Subclase	<i>Coccidiosina</i>	Ciclo de vida con merogonias, gametogonias y esporogonias.
Orden	<i>Eucoccidiorida</i>	Presencia de merogonias en vertebrados.
Suborden	<i>Eimeriorina</i>	Desarrollo independiente de gametos masculinos y femeninos.
Familia	<i>Cryptosporidiidae</i>	Monoxeno con desarrollo debajo de la superficie la de membrana de la célula hospedadora, ooquiste fuera de los esporoquistes y con cuatro esporozoites, microgametos con flagelo.

(**Fayer y Ungar, 1986**).

Entre los coccidios, el género *Cryptosporidium* tiene ooquistes pequeños, esféricos u ovoides, y promedian 7.4 por 5.6, μm . para el de *C. muris*. y 5.0 por 4.5, μm . para el de *C. parvum*, especies infecciosas para la mayoría de mamíferos. Una vez esporulado el ooquiste contiene cuatro sporozoitos y un residuo compuesto de numerosos gránulos pequeños. La pared del ooquiste es lisa y descolorida promedia 50 el μm . de espesor. Los sporozoitos son generalmente redondos tienen un núcleo, y *C. muris* mide, 11.1 por 1.0 el μm . y *C. parvum* 4.9 por 1.2 μm . Cada trofozoitos mide de 2.0 a 2.5 μm . son de forma redonda u oval con un el núcleo

grande, de 1.0 a 1.3 μm . de diámetro y los merontes aproximadamente 4 a 5 μm **(Fayer y Ungar 1986)**.

Cuadro 2. Especies reconocida de *Cryptosporidium* su huésped específico predominante y localización primaria de la infección

ESPECIES DE CRYPTOSPORIDIUM	DIMENSIONES DE LOS OOQUISTES (MM)	SITIO DE INFECCIÓN	HOSPEDADOR
<i>C. andersoni</i>	5.0-6.5X6.0-8.1	Estomago	Bovinos, camellos
<i>C. baileyi</i>	4.6X6.2	Tráquea, bursa de Fabricio, cloaca	Gallinas, pavos
<i>C. bovis</i>	4.7 6-5.35X4.17-4.76	Intestino delgado	Bovinos
<i>C. canis</i>	4.95X4.71	Intestino delgado	Caninos, humanos
<i>C. fayeri</i>	4.5-5.1X3.8-5.0	Epitelio intestinal	Canguro rojo
<i>C. felis</i>	4.5X5.0	Intestino delgado	Gatos
<i>C. galli</i>	8.5-8.8X6.2-6.4	Pro ventrículos	Aves
<i>C. hominis</i>	4.5X5.5	Intestino delgado	Humanos, monos
<i>C. macropodum</i>	No proporcionado	Intestino	Canguro gris
<i>C. meleagridis</i>	4.0-4.5X4.6-5.2	Intestino delgado	Pavos
<i>C. molnari</i>	4.72X4.47	Estomago	Peces
<i>C. muris</i>	5.6X7.4	Estomago	Roedores, mamíferos
<i>C. parvum</i>	4.5X5.5	Intestino delgado	Bovinos, ovejas, cabras, humanos
<i>C. scophthalmi</i>	3.7-5.03X3.03-4.69	Epitelio y lumen intestinal	Peces
<i>C. serpentis</i>	4.8-5.6X5.6-6.6	Estomago	Serpientes, lagartijas
<i>C. suis</i>	5.05x4.41	Intestino delgado	Cerdos
<i>C. varanii</i>	4.2-5.2x4.4-5.6	Intestino y mucosa cloacal	Lagartos
<i>C. wrairi</i>	4.0-5.0x4.8-5.6	Intestino delgado	cobayos

(Luján y Garbossa, 2008).

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 excretados por las heces de los huéspedes infectados, u otros materiales biológicos como las secreciones respiratorias.

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 **(Luján y Garbossa, 2008)**.

La infección ocurre mediante la ingestión de ooquistes esporulados, estadios infectantes de pequeño tamaño (4,5-5,5 µm) que cuando se eliminan con las heces de los animales y humanos parasitados ya contienen 4 esporozoitos, los cuales escapan a través de una fisura que se abre en la pared del ooquiste, y por tanto son directamente infectantes para otro hospedador. Al parecer las fluctuaciones de pH en el tracto gastrointestinal, las sales biliares, las enzimas pancreáticas y la temperatura favorecen **(Vergara y Quílez, 2004; Luján y Garbossa, 2008)**. El desenquistamiento tiene lugar normalmente en el intestino delgado y se produce mediante la disolución de la sutura de la pared del ooquiste, que permite la salida de los cuatro esporozoitos. Al igual que en otros coccidios, la exposición a condiciones reductoras, enzimas y sales biliares son importantes en el desenquistamiento, aunque los ooquistes de *Cryptosporidium* también pueden desenquistarse en ausencia de tales factores lo que explica que puedan multiplicarse en localizaciones extraintestinales **(Vergara y Quílez, 2004)** Los

esporozoítos alcanzan las microvellosidades del intestino delgado y se integran en una invaginación en dedo de guante de una célula epitelial para formar la vacuola parasitófora, Dentro de la vacuola, el parásito, que en este estadio recibe el nombre de trofozoíto, comienza un ciclo de multiplicación asexual (esquizogonia o merogonia) y luego continúa con una multiplicación sexual (gametogonia) **(Luján y Garbossa, 2008)**, que a diferencia de otros coccidios se localiza en posición intracelular pero extracitoplasmática, aspecto que según algunos autores puede influir en la escasa eficacia de los fármacos antimicrobianos para inhibir el desarrollo del parásito. La reproducción asexuada se produce mediante dos fases de esquizogonia, en el curso de las cuales se desarrollan dos tipos de esquizontes que tras la rotura de la vacuola parasitófora liberan a la luz intestinal ocho y cuatro merozoítos, respectivamente. La reproducción sexuada o gametogonia se inicia cuando estos últimos parasitan nuevas células y da lugar a la formación de macro y microgametos. Los microgametos se liberan de la vacuola parasitófora y se introducen en células parasitadas por macrogametos, donde tiene lugar la fecundación. La formación del cigoto va seguida por la secreción de una o dos cubiertas que lo envuelven para formar el ooquiste. A partir de aquí se inicia el proceso de esporogonia en el cual el cigoto sufre uno o más ciclos de división mitótica, en el interior de la célula hospedadora mediante dos divisiones asexuales del cigoto y tiene como consecuencia la formación de un ooquiste que contiene 4 esporozoítos infectivos alargados y un cuerpo residual **(Slapeta y Keithly, 2004; Vergara y Quílez, 2004; Lujan y Garbossa, 2008)**.

Se estima que aproximadamente un 80% de los ooquistes tienen una pared gruesa (doble cubierta) y son directamente infectantes para otros animales cuando se eliminan con las heces, mientras que los ooquistes restantes (20%) poseen una pared fina (una unidad de membrana) que se rompe tras su salida de la célula hospedadora y permite la liberación de los esporozoítos que invaden nuevas células epiteliales. Este fenómeno, conocido como autoinfección, no se produce en la mayoría de los coccidios y se considera responsable de la persistencia de las infecciones por *Cryptosporidium* en ausencia de reinfección exógena y de una respuesta inmune protectora. El periodo de prepatencia (tiempo

que transcurre entre la ingestión de los ooquistes 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 Quílez, 2004**).

En la figura 1 una se muestra el ciclo de vida de *Cryptospondium*, en los paneles A, y E, muestran un *Cryptosporidium parvum* esporozoito y vinculados a la participación de una serie de células epiteliales in vitro en un modelo de la criptosporidiosis biliar.

Paneles A, B, C y D son micrografías de barrido electrónico, y los paneles E y F de transmisión micrografías de electrones. Un panel muestra un esporozoito adjuntado a la superficie de la membrana apical de una célula epitelial biliar. Paneles B y C muestran una esporozoito invadiendo una célula huésped y la protrusión de la membrana de células epiteliales de todo el parásito en su sitio de fijación. Paneles D y E se presenta un organismo envuelto por la membrana celular acogida y la formación de una vacuola. En el Grupo E, la zoíto se ha puesto en contacto con las microvellosidades adjuntas a la célula epitelial, con su extremo anterior insertado en la membrana de la célula anfitrión (flecha), y está en proceso de ser internalizado.

Una densa banda se forma cuando el parásito se reúne la célula epitelial. Grupo F muestra una biopsia intestinal de un paciente con la inmunodeficiencia adquirida intestinal y el síndrome de la criptosporidiosis. La barra representa a 1 micra (**Chen et al., 2002**).

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

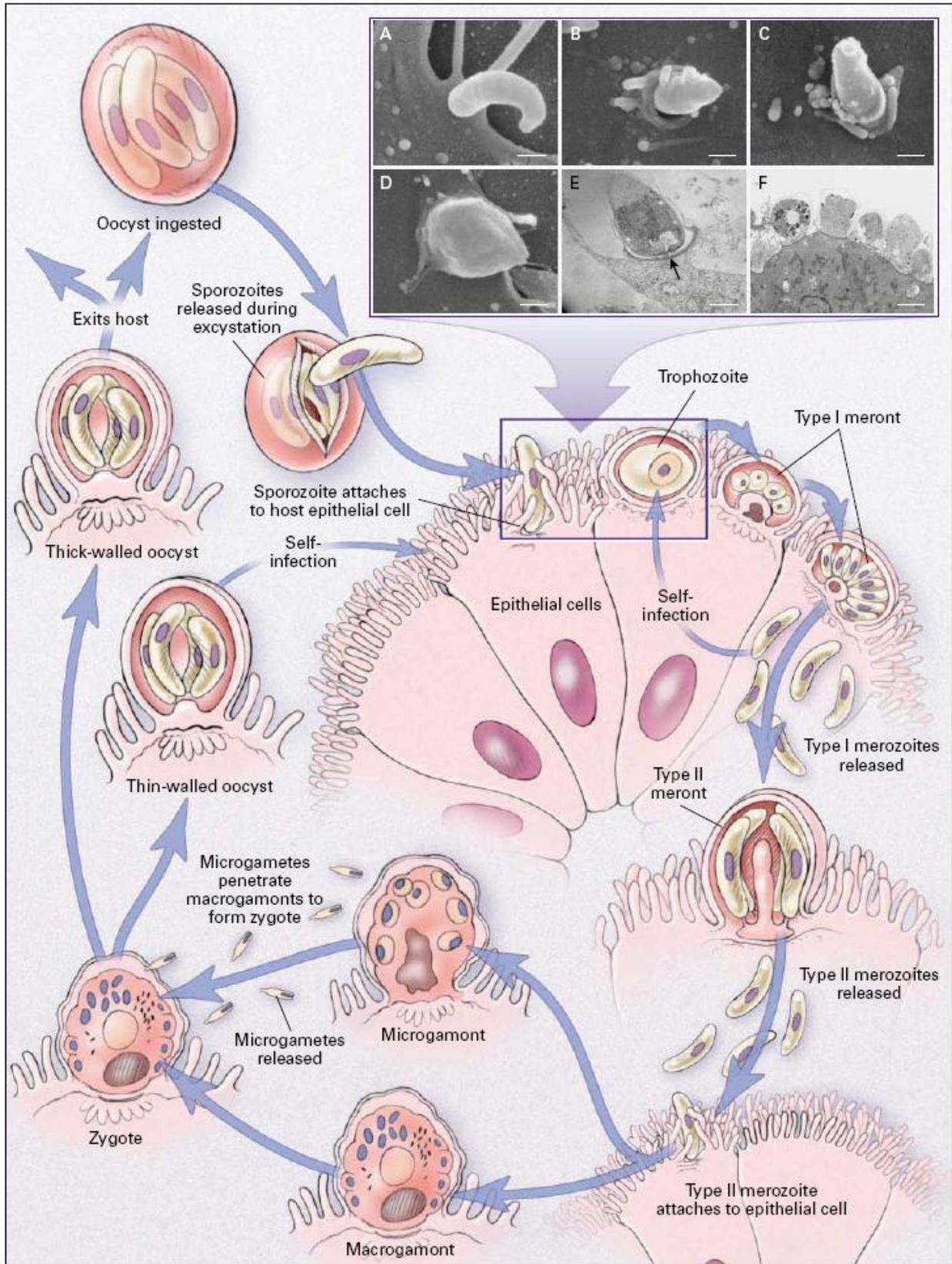


Figura 1. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* e infección de las células epiteliales

ausencia de un tratamiento farmacológico eficaz, facilita la difusión de la enfermedad, para infectar a otros organismos con un considerable potencial zoonótico **(Vergara y Quílez, 2004; Luján y Garbossa, 2008)**.

Un estudio experimental ha demostrado que muchos ooquistes mantienen su infectividad para ratones lactantes cuando se mantienen hasta 6 meses en soluciones acuosas a 20°C, siendo necesarias temperaturas de hasta 70°C para inactivarlos. La pasteurización de la leche (71,7°C durante 15 segundos) asegura su destrucción, al igual que la desecación durante 4 horas. Los ooquistes son igualmente resistentes al frío y muchos se mantienen viables hasta 8 horas a -20°C, aunque a -70°C son destruidos inmediatamente incluso en presencia de crioprotectores.

No obstante, uno de los reservorios de mayor interés está representado por los animales infectados eliminadores de ooquistes en sus heces, que pueden transmitirse al hombre por contacto directo o al contaminar los alimentos y especialmente el agua de bebida.

Ya se ha mencionado la extrema resistencia de los ooquistes a diversos factores a los que cabe añadir los métodos de potabilización del agua. Algunas combinaciones de coagulación, floculación y filtración permiten eliminar hasta el 99,9% de los ooquistes existentes, pero la mayoría de los sistemas utilizados tienen una eficacia mucho menor. La desinfección con cloro tampoco asegura la potabilidad del agua, ya que los ooquistes resisten concentraciones muy superiores a las utilizadas rutinariamente en los procesos de potabilización, por lo que *Cryptosporidium* se considera uno de los microorganismos de transmisión hídrica más resistentes **(Vergara y Quílez, 2004)**.

Las infecciones coexistentes con el spp de Salmonella., Clostridium, el perfringens, enterotoxigenico el coli de Escherichia, el rotavirus, el coronavirus y el virus de la diarrea bovina raramente pueden ocurrir, pero fue declarado que el

spp de *Cryptosporidium* era el patógeno primario, y causa morbilidad alta y mortalidad en los animales **(Sevinc et al., 2005)**.

Aunque la infección por *C. parvum* se encuentra ampliamente distribuida en el ganado bovino, los datos sobre prevalencia muestran variaciones. Estas podrían estar relacionadas con las condiciones epidemiológicas, la zona geográfica estudiada, la historia clínica del rebaño, el sistema de explotación, las prácticas de higiene, el manejo y la edad al momento de muestreo de los bovinos e incluso, con el número de muestras examinadas por animal **(Díaz de Ramírez et al., 2002)**.

2.6. Fuentes de infección

La fuente principal de infección son los pezones de la madre, ya que los terneros permanecen al pie de ella, mamando el calostro de la glándula mamaria, que está contaminada con los ooquistes de *Cryptosporidium*, llegando el protozoo primeramente al intestino delgado, específicamente en las vellosidades, luego al ciego y colon.; según el resultado de esta investigación, que ha encontrado 71% de muestras positivas en el examen del sedimento del lavado de los pezones. Esta afirmación se demuestra también con el 43% de las muestras fecales positivas, en terneros de 2 a 7 días de edad, cifra poco usual en otras investigaciones. La otra fuente de infección son los baldes de leche sustituto. Sumado a la gran cantidad de moscas que son vectores mecánicos. La etiología determinante son los animales adultos portadores y eliminadores de ooquistes, clínicamente sanos del mismo establecimiento **(Romero et al., 2001)**.

Se ha llegado a considerar a este parásito como un verdadero problema de salud pública, pues se han descrito brotes epidémicos transmitidos por aguas fluviales, acueductos, piscinas y alimentos **(De Arango et al., 2006)**. Existe evidencia que fuentes de agua son el primer factor para la transmisión, así como también frutas y alimentos contaminados.**(Fernandez, 2000; Eisenberg et al., 2004; Muñoz-Salazar et al., 2009)**.

A través de la excreción y el proceso de estiércol extendido en las tierras de labor, estas poblaciones contaminan el ambiente, *Cryptosporidium* experimentalmente puede moverse a través de los varios tipos de la tierra y se resiste a las presiones medioambientales como la temperatura y pH, indicando su potencial para contaminar y sobrevivir en el ambiente **(Barwick et al., 2003)**.

En las explotaciones ganaderas, la principal fuente de contagio la constituyen los propios animales enfermos, que contaminan con sus heces la cama de la explotación. Los terneros parasitados pueden eliminar diariamente hasta 2×10^9 ooquistes y en torno a 10^{10} durante el curso de la enfermedad, motivo por el cual la prevalencia suele ser superior en explotaciones con un elevado número de animales y determinados factores, como el hacinamiento y las condiciones higiénicas deficientes que se consideran factores de riesgo. Las anteriores consideraciones justifican que la presentación clínica de la enfermedad esté asociada con la época de partos, observándose un marcado incremento en la incidencia de nuevos casos al final de la misma como consecuencia de la contaminación progresiva de la explotación a lo largo de la paridera **(Vergara y Quílez, 2004)**.

2.7. Transmisión

La infección comienza 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 liberan esporozoítos infectantes **(Barboni et al., 2008)**. Los individuos Immunocompetentes experimentan la gastroenteritis a corto plazo, mientras los pacientes del inmunocompromietidos pueden padecer la diarrea crónica **(Dalle et al., 2003)**.

Muchas especies de *Cryptosporidium* están presentes en los animales desempeñando un papel importante en la transmisión puesto que pueden actuar como portadores asintomáticos que eliminan un reducido número de ooquistes, aunque suficiente para infectar a los animales recién nacidos. El *C. parvum*

infecta a rumiantes principalmente confinado a los individuos jóvenes, además, las ovejas del postparturientas pueden verter concentraciones de ooquistes bajas (100 a 5,700 g del ooquiste) **(Johnson et al., 2005)**.

Los humanos lo adquieren por ambos humano-a-humano y por sendas de transmisión de zoonóticas **(Zhou et al., 2004)**. Los animales son considerados los más importantes actualmente como depósitos de dicha enfermedad **(Giacometti et al., 2000)**.

El agua es un importante medio de transmisión, entre otros aspectos por su dispersión y la elevada resistencia que poseen los ooquistes a los tratamientos comunes de potabilización, ya que se requieren como mínimo una concentración mayor de 80 mg/ L de cloro libre para su destrucción **(Korich et al., 1990)**, ésta concentración es 400 veces la máxima permitida en agua para consumo humano (0.2 a 1.5 mg/ L). Por otro lado, el agua recién procesada que sale de la planta potabilizadora puede contaminarse en el trayecto antes de llegar al usuario por daños en las tuberías **(Díaz et al., 2003)**. Se estima que 80 a 96% de aguas de la superficie en los Estados Unidos se contamina con *Cryptosporidium* **(Kuhn et al., 2002)**.

Las anteriores consideraciones han dado notoriedad a la criptosporidiosis como enfermedad de transmisión hídrica, debido a que puede diseminarse en poco tiempo a grandes grupos de población. Asimismo, se deben destacar los brotes de criptosporidiosis asociados al uso lúdico del agua en piscinas, parques acuáticos, lagos, etc., que en los últimos 12 años han afectado a más de 10.000 personas en los Estados Unidos y que han sido favorecidos por factores como la frecuente contaminación del agua, la resistencia de los ooquistes al cloro, la baja dosis infectante y la elevada densidad de bañistas en determinadas épocas. Finalmente, la ingestión de alimentos contaminados con heces de animales infectados o por manipuladores de los mismos también se considera una vía de transmisión de la enfermedad, habiéndose documentado diversos brotes de criptosporidiosis

humana de este tipo asociados a la ingestión de productos como sidra, ensaladas o leche incorrectamente pasteurizada **(Vergara y Quílez, 2004)**.

La mayoría de los casos de transmisión zoonótica se han descrito en granjeros y en estudiantes de veterinaria y se han relacionado con el manejo de terneros parasitados, aunque otros autores han observado que un elevado número de casos humanos coinciden con los brotes de criptosporidiosis en corderos, lo que sugiere la importancia de otras especies animales como reservorios de la infección **(Vergara y Quílez, 2004)**.

2.8. Patogenia

La patogénesis de criptosporidiosis no está totalmente explicada, pero se ha encontrado que las causas de la destrucción de epitelios intestinales resultan de la reducción de vellosidades y microvellosidades, con hiperplasia de las criptas, *Cryptosporidium* rompe las uniones de las células epiteliales produciendo **(Chacín-Bonila y Cheng-Ng, 2008)**, 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 **(Chacín-Bonila y Cheng-Ng, 2008)**.

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

hace sintomática sólo en ausencia de los mecanismos normales de defensa, y por tanto con un sistema inmune inmaduro. La diarrea suele presentarse en situaciones de estrés como temperaturas bajas (**Romero et al., 2001**), mientras que las edades más afectadas, conforme a las revisiones son de 4 a 30 días, entre 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 (**Lippi y Castro, 2003**).

Cryptosporidium parvum causa la pérdida de microvellosidades y borramiento, lo que resulta en malabsorción. El organismo se activa por el factor nuclear-kB (NF-kB) y otros sistemas. La activación de NF-kB induce la producción de citocinas y quimiocinas, como la interleucina-8, para desencadenar una reacción inflamatoria y anti-apoptótica de supervivencia, señales directamente en las células infectadas (supuestamente facilitar la del organismo capacidad para sobrevivir y propagar). *C. parvum* induce la secreción de prostaglandina E2 (PGE2) en el lumen. La actividad de una enterotoxina, que produce la secreción de cloruro *in vitro*, se ha detectado en extractos de heces de los infectados terneros. *C. parvum* induce la apoptosis en las células epiteliales, por lo daños en la barrera epitelial. *C. parvum* produce diferentes grados de atrofia de las vellosidades por un mecanismo desconocido, lo que produce la malabsorción.

2.9. Signos y lesiones

El *C. parvum* infecta las células del epitelio que recubren el tracto digestivo y es muy común en muchas especies animales (**Dalle et al., 2003**). Los signos clínicos principales en los pequeños rumiantes recién nacidos son la apatía, depresión, anorexia, dolor abdominal y diarrea particular, acompañado por eliminación de un número grande de ooquistes infectivos, produciendo la pérdida de peso, y crecimiento durante las primeras semanas de vida (**Gómez et al., 2006**). Aunque se observa una variedad de signos clínicos, el más común es la diarrea, que puede ser moderada e intermitente en algunos casos, pero profusa y acuosa en otros con presencia frecuente de moco, rara vez teñida de sangre y con una duración de 2 a 14 días. A veces la diarrea puede estar acompañada de

fiebre, anorexia, deshidratación, debilidad y pérdida de peso. El período de la incubación es 5 a 28 días con una media de 7.2 días (**Butler y Mayfield, 1996; Marshall et al., 1997; Díaz de Ramírez, 2002**).

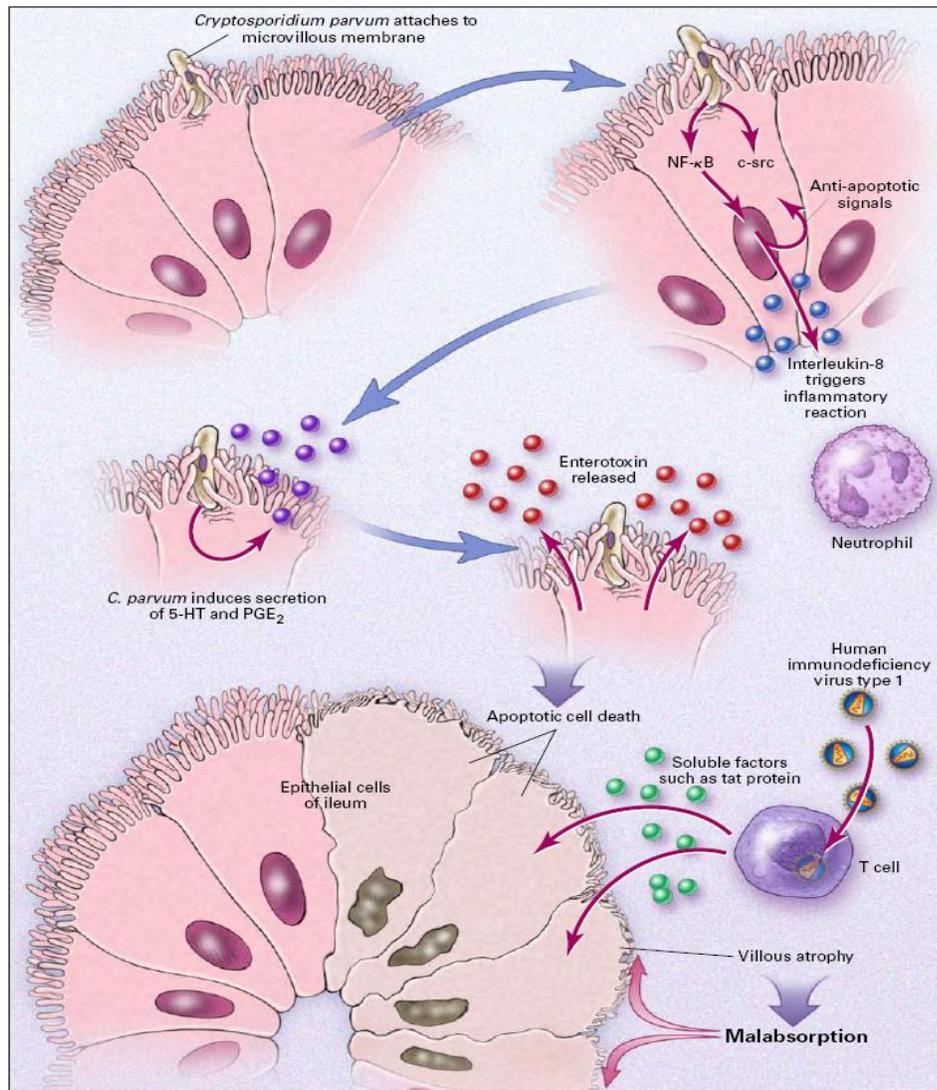


Figura 2. Patogénesis de *Cryptosporidium parvum* (**Chen et al., 2002**).

En *C. parvum*, la infección se caracteriza por la lesión de la mucosa y atrofia de vellosidades con la infiltración propia de la lámina por las células inflamatorias. (**Lacroix-Lamandé et al., 2002**). La inmunosupresión es el principal factor asociado con el desarrollo de la infección y contrario a lo que sucede con los individuos inmunocompetentes el cuadro clínico no se auto limita y se acompaña de alta morbilidad, dada sobre todo por cuadros de diarrea persistente, deshidratación y desnutrición (**De Arango et al., 2006**).

El ooquiste *Cryptosporidium* es muy resistente a la desinfección con cloro, y la fuente de estas infecciones es al tomar agua contaminada con *Cryptosporidium*, la infección puede diseminarse al hígado, el páncreas, y el tracto respiratorio, el bazo, los riñones, el corazón, el rumen, el retículo, el omaso, el bomaso, el íleon, cecum, colon, y las glándulas suprarrenales. Estas infecciones probablemente representan extensiones de una intestinal, más que una infección primaria extra intestinal o diseminada **(Cox, 2002; Masuno et al., 2006; Chacín-Bonila y Cheng-Ng, 2008).**

2.10. Diagnóstico

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. Por lo general, se aplican métodos de tinción diferencial –safranina, Ziehl-Neelsen modificado, Kinyoun, dimetil sulfóxido-carbol fucsina que tiñen los ooquistes de rojo y contratiñen el fondo de azul o verde según se utilice azul de metileno o verde de malaquita. Las técnicas de tinción negativa con nigrosina, verde brillante y verde de malaquita tiñen las levaduras y las bacterias pero no los ooquistes. El empleo de los colorantes fluorogénicos rodamina y auramina puede facilitar la detección. Debido a que la excreción de ooquistes puede ser intermitente deben analizarse al menos dos muestras independientes de materia fecal para disminuir la probabilidad de diagnósticos falsos negativos. Se han desarrollado también diversas técnicas inmunológicas que abarcan desde simples reacciones de aglutinación de partículas de látex o hemoaglutinación reversa pasiva, hasta el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales marcados con sustancias fluorescentes para la detección de ooquistes por microscopía de fluorescencia, inmunocromatografía en fase sólida para la detección de antígenos en materia fecal o enzimoimmuno ensayos para detección de anticuerpos

específicos circulantes. Estos métodos pueden presentar reacciones cruzadas con otros microorganismos. Como alternativa al diagnóstico convencional se han desarrollado una variedad de protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ácidos nucleicos. Si bien es altamente sensible, los falsos positivos que resultan de la detección de ácidos nucleicos desnudos de microorganismos no viables o de contaminantes del laboratorio, limitan su empleo a los laboratorios de investigación. En comparación con la microscopía, cada determinación individual insume más tiempo de manipulación, el costo es mayor, son necesarios controles internos adecuados y deben eliminarse los inhibidores enzimáticos presentes en las muestras. Una ventaja del uso de las técnicas moleculares es que han provisto información sobre la variabilidad genética de *Cryptosporidium* que permitió demostrar, precisamente, que *C. parvum* no es una especie uniforme sino que abarca distintos genotipos o especies crípticas. La detección de ooquistes en agua requiere el procesamiento de grandes volúmenes (10 a 100 litros) para lograr la concentración previa de los microorganismos. Las técnicas de filtración pueden resultar un tanto complicadas ya que, además, requieren la recuperación de los ooquistes tanto de la superficie de las membranas filtrantes de acetato de celulosa o policarbonato como del interior de los cartuchos filtrantes de polipropileno. En este último caso, el cartucho debe destruirse para extraer y desmenuzar el material filtrante. También se emplean técnicas de centrifugación de flujo continuo o de floculación con carbonato de calcio. El material resultante contiene los ooquistes que deben ser purificados mediante centrifugación en gradientes de densidad o separación inmunomagnética. Esta última usa anticuerpos contra antígenos de superficie parasitarios unidos a partículas magnéticas para capturar y remover los parásitos de la muestra con ayuda de un magneto. La tasa de recuperación depende de muchos factores que incluyen turbidez y otras propiedades físico-químicas del agua, remoción desde los filtros, pérdidas durante la centrifugación, etc. Finalmente, se efectúa la identificación microscópica.

Ninguno de estos métodos permite distinguir especies de *Cryptosporidium* con importancia sanitaria ni diferenciar ooquistes vivos de muertos. Para ello, es

necesario contar con un indicador capaz de diferenciar ooquistes potencialmente infecciosos de no infecciosos. El método apropiado para determinar en forma conjunta viabilidad e infectividad es la inoculación en ratones ya que proporciona evidencia parasitológica e histológica de la enfermedad. Pero el bioensayo tiende a ser reemplazado por métodos alternativos. Un buen indicador de viabilidad es la exclusión o inclusión de los colorantes fluorogénicos vitales ioduro de propidio (PI) y 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las paredes de los ooquistes viables son permeables al DAPI, que tiñe el núcleo de los esporozoítos, pero no al PI, resultados que muestran alta correlación con los ensayos de desenquistamiento *in vitro*. Un ensayo de infectividad mide la capacidad de los ooquistes para completar el ciclo de vida mientras que un ensayo de inclusión o exclusión de colorantes estima la actividad metabólica, así como un ensayo de desenquistamiento considera la respuesta de los esporozoítos a la estimulación físico-química. Es posible que, aún manteniendo cierto potencial metabólico, algunos ooquistes fueran incapaces de producir infección. Por el contrario, tampoco existe certeza de similitud en la respuesta a la infección de ratones y humanos. Por lo tanto, las conclusiones sobre infectividad de ooquistes aislados de distintas matrices ambientales deben tomarse con cautela (**Díaz de Ramírez et al., 2002; Chacín-Bonila y Cheng-Ng, 2008; Luján y Garbossa, 2008; Muñiz-Salazar et al., 2009**).

En los casos de *Cryptosporidiosis* clínica, es difícil establecer el diagnóstico a través del cuadro sintomatológico, ya que el síndrome diarreico puede estar presente en otras entidades nosológicas que afectan a los becerros. Por lo tanto, se requiere de pruebas de laboratorio que permiten detectar el parásito o antígenos específicos en las heces o tejidos del hospedador. Los métodos convencionales a través del examen microscópico, continúan siendo usados en el procesamiento de rutina de las muestras. Sin embargo, las técnicas inmunológicas, representan una herramienta de gran valor para la detección de ooquistes o antígenos de criptosporidios. *Cryptosporidium* reside en el borde del cepillo, dentro de la membrana exterior limitante de las células epiteliales de la mucosa del aparato digestivo, en especial en la superficie de las vellosidades del intestino delgado

inferior, siendo el epitelio del íleon en donde se puede asilar con mayor frecuencia. Aunque, esta metodología puede ser adecuada para detectar casos de cryptosporidiosis con alto número de ooquistes excretados en las heces, en infecciones leves, cuando los animales eliminan escaso número, son necesarias técnicas más sensibles, tales como PCR, inmunofluorescencia o métodos de concentración.

Las muestras de heces se pueden procesar frescas o preservadas en soluciones de formol al 10% u otras sustancias fijadoras, resultan de gran importancia en infecciones asintomáticas o en estudios epidemiológicos. También, pueden ser suspendida en una solución de bicromato de potasio al 2.5%. En esta, los ooquistes se conservan viables, permaneciendo infectivos por prolongado periodo de tiempo. En la actualidad, existen métodos sencillos y de bajo costo para la identificación del parásito. La tinción alcohol-ácido resistente modificada de kinyoun, tinción de Giemsa, safranina, auramina, permite con una sola muestra examinar la mayor parte del tracto intestinal del paciente **(Fernandez, 2000; Díaz de Ramírez, 2002)**.

2.11. Prevención y tratamiento

Considerando que las infecciones por criptosporidiosis son indicadas por la ingestión o inhalación de los ooquistes, las medidas para prevenir o limitar la propagación de la infección deben ser dirigidas a eliminar o reducir el número de dichos estadios en el ambiente. El control constituye un desafío y su principal problema radica en la ausencia de medios efectivos para la prevención o tratamiento específico de la enfermedad. En la actualidad, no se dispone de fármacos satisfactorios capaces de prevenir o interrumpir el desarrollo del parásito. Aunque se han realizado investigaciones para evaluar la actividad de un gran número de agentes, ninguno ha sido consistentemente efectivo en ensayos controlados. En becerros experimentalmente infectados bajo condiciones controladas, productos tales como lasalocid, lactato de halofuginone, decoquinato y paromicina, lograron reducir la severidad y la duración de la diarrea asociada

con la infección por *C. parvum*. Sin embargo, la efectividad de estos fármacos aun no ha sido confirmada en ensayos clínicos de campo **(Díaz de Ramírez, 2002)**.

A pesar de décadas de investigación y uso de distintos agentes inmuno y quimioterápicos, *in vitro* e *in vivo*, en modelos animales y en ensayos clínicos, aún no se cuenta con un tratamiento paliativo o curativo confiable para la criptosporidiosis. Es probable que la localización intracelular del parásito y la naturaleza dual de la separación del lumen intestinal y del citoplasma celular fueran la causa de la resistencia a diferentes farmacos. Las drogas antiparasitarias comúnmente usadas son paromomicina, azitromicina y nitazoxanida, solas o en diferentes combinaciones, las cuales resultan moderadamente efectivas. La interpretación contrapuesta de los resultados de ensayos clínicos para probar la efectividad de drogas antiparasitarias puede ser atribuida, al menos parcialmente, al uso de diferentes genotipos de *Cryptosporidium* por diferentes grupos de investigación. Convendría emplear especies genéticamente bien definidas en futuros estudios aunque el mayor obstáculo es el mantenimiento y propagación del parásito en cultivos de tejidos o modelos animales **(Luján y Garbossa, 2008)**.

En rumiantes la paromomicina, el lactato de halofuginona y el lasolocid sódico han demostrado una eficacia parcial. En el campo la inmunidad pasiva no protege a los terneros ni corderitos contrala infestación natural. Para controlar la enfermedad son importantes las medidas de higiene preventiva con el objeto de destruir las formas externas del parásito y prevenir la transmisión entre animales y desde el medio al hospedado **(Valenzuela, 1997)**.

Los ooquistes de *C. parvum* debido a su tamaño pequeño, evaden los tratamiento de agua y así permanecen en el agua. Hasta la fecha, no se han comercializado vacunas que demuestren su competencia previniendo la criptosporidiosis. El ciclo de vida de *C. parvum* es tal que los ooquistes son inmediatamente infectivos en la excreción y se transmite vía la ruta fecal-oral. Hay múltiples razones para prevenir esta enfermedad, sin embargo, no hay ninguna forma terapéutica eficaz y

aceptada para el ganado o humanos. Además, la concentraciones recomendadas de la mayoría de los desinfectantes comerciales no son eficaces en la desinfección de *Cryptosporidium* **(Nydam y Mohammed, 2005)**.

III. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a los antecedentes descritos y tomando en cuenta que la criptosporidiosis es una enfermedad zoonótica y no hay estudios de su presencia en becerros de rastro, la finalidad de la presente investigación es caracterizar lesiones de enteritis producidas por este agente en becerros sacrificados en el rastro municipal de Torreón, Coahuila, utilizando muestras de intestinos y analizadas por medio de estudios histopatológicos.

IV. OBJETIVOS

Caracterizar las lesiones producidas por *Cryptosporidium* spp en intestinos de becerros Holstein sacrificados en el rastro municipal de Torreón, Coahuila.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación comprendió dos fases una de campo y otra de laboratorio. En la fase de campo, se tomaron muestras de intestino delgado (duodeno, yeyuno e ileon) de 42 becerros Holstein de 1 día a 3 meses de edad, del rastro municipal de Torreón, Coahuila durante el mes de mayo, se transportaron en bolsas de plástico estériles hasta su procesamiento en el laboratorio de patología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna.

En la fase de laboratorio, las muestras se fijaron en formol al 10% amortiguado con fosfatos a un pH de 7.2 a 7.4 en una relación de una parte de tejido por 10 partes de formol (1:10), después de un mínimo de fijación de 48 hrs se prepararon en un procesador de tejidos por 12 horas y se incluyeron en parafina a una temperatura de 54 °C, para posteriormente realizar cortes de 5 µm de grosor y se tiñeron con la tinción de rutina para tejidos histológicos de hematoxilina y eosina.

La interpretación se llevó al cabo por observación directa en el microscopio de luz visible, realizando una descripción de las alteraciones observadas y se relacionaron en porcentaje de acuerdo a las manifestaciones microscópicas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 42 casos analizados, 17 (40.5%) no presentaron alteraciones histológicas significativas, en 11 (26.2%) casos se encontraron infiltración de neutrófilos en vellosidades, hiperemia y dilatación quística de criptas con detritos celulares (criptitis), característicos de infección por *Cryptosporidium* spp, en 7 (16.7%) casos se observaron necrosis, hemorragias, fusión y atrofia de vellosidades, compatibles con infección viral, tales como *Rotavirus* y/o *Coronavirus*, y otros 7 (16.6%) casos mostraron hiperplasia de células caliciformes con infiltración de neutrófilos sugestivos a infección bacteriana debido a *Escherichia coli*.

En el caso de infección por *Cryptosporidium* spp (Figuras 3, 4), la destrucción de las células epiteliales, dependiendo de la extensión del daño, producirá disminución del mecanismo enzimático de un grupo mayor o menor de células lo cual traerá como consecuencia la mala absorción de los nutrientes e hipersecreción de las células de las criptas. Se ha señalado que el parásito produce toxinas capaces de producir por si solas enteritis leve o moderada e hipersecreción **(Chamizo, 1995)**.

En las lesiones bacterianas debido a *Escherichia coli* (Figura 7), la lamina propia esta generalmente infiltrada, de polimorfonucleares y mononucleares (macrófagos y linfocitos) y los estudios ultraestructurales ponen de manifiesto degeneraciones en las células caliciformes que incluyen vacuolización y se pueden encontrar acúmulos de cuerpos esféricos en la parte apical del citoplasma en caso de infecciones mixtas con criptosporidias **(Martínez et al., 1999)**.

Las lesiones macroscópicas observadas en casos de enteritis catarral, se aprecia distensión intestinal con gas y heces líquidas amarillentas, hiperemia y congestión de la mucosa, dilatación del ciego con gas y fluido color amarillento y linfadenitis mesentérica.

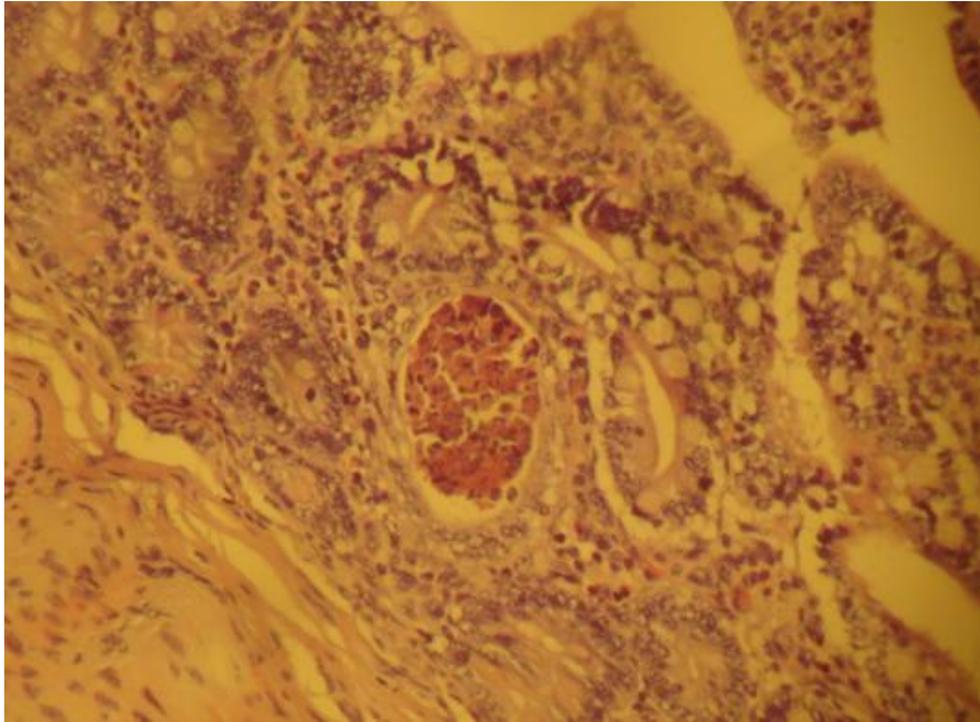


Figura 3. Enteritis catarral con criptitis

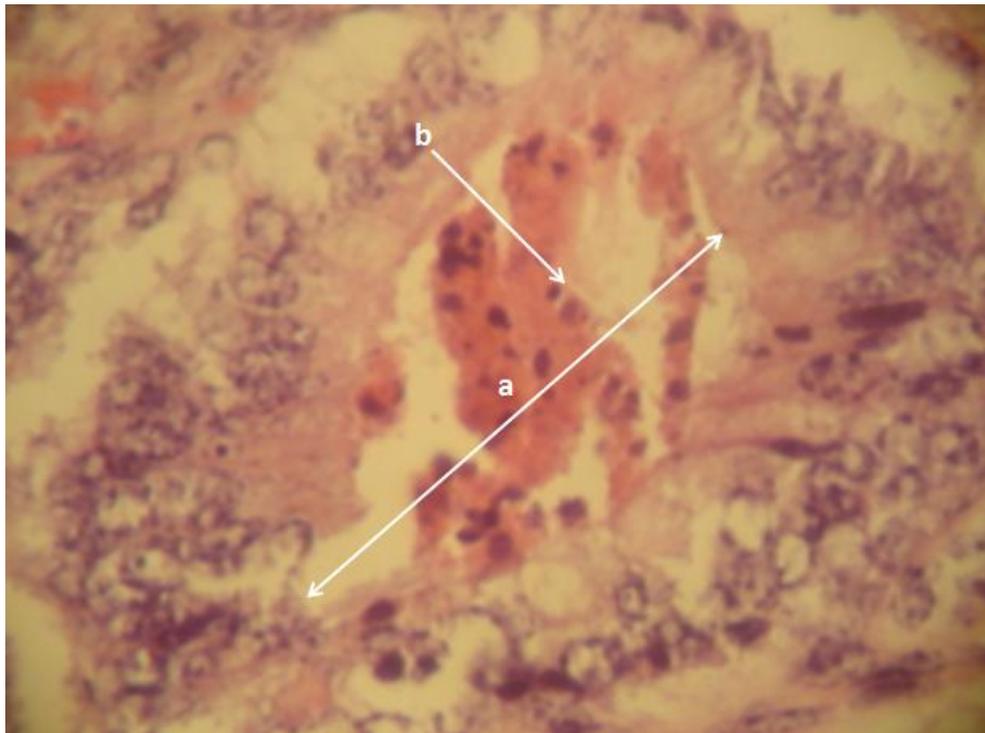


Figura 4. Criptitis, a) Dilatación quística, b) Detritos celulares

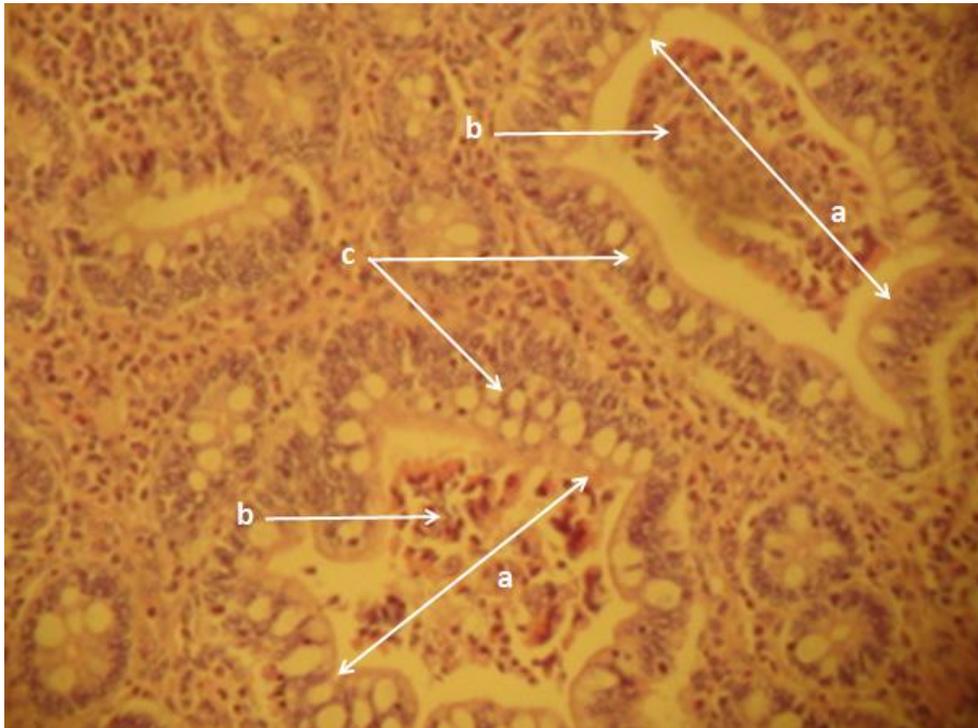


Figura 5. Enteritis catarral, a) Dilatación de criptas, b) Detritos celulares, c) Células caliciformes

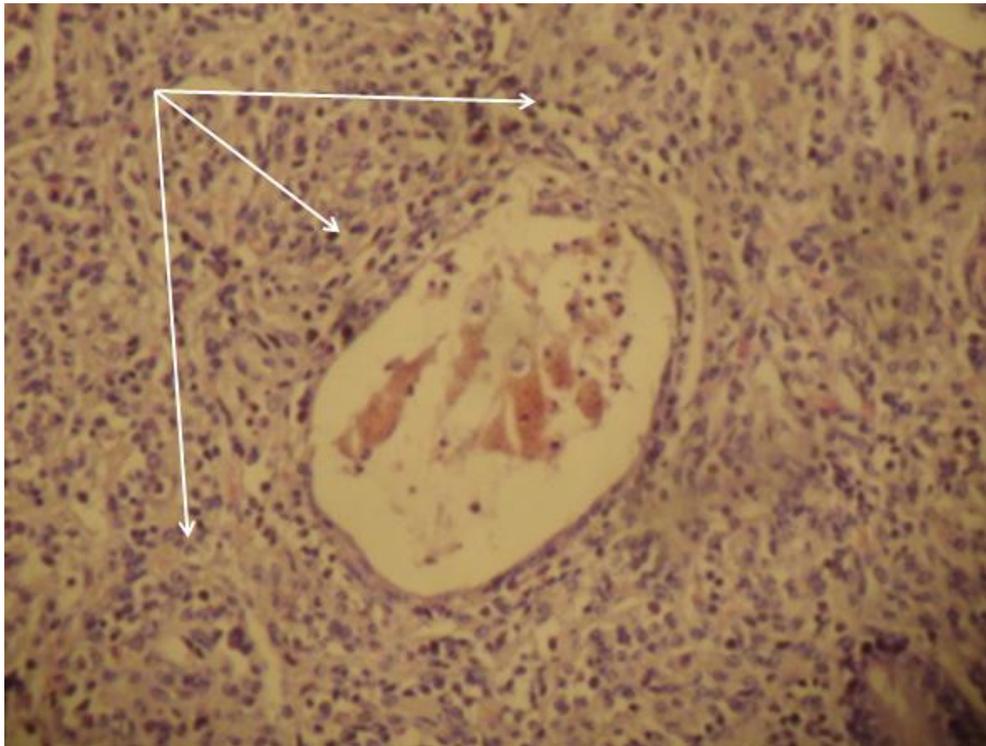


Figura 6. Enteritis catarral con criptitis, crónica. Obsérvese la fibroplasia alrededor de la cripta dilatada

Microscópicamente se observa que las criptosporidias afectan con mayor intensidad las células epiteliales en la porción distal del intestino delgado produciendo acortamiento de vellosidades, tumefacción y grado variable de fusión de las vellosidades, infiltración por abundantes macrófagos y polimorfonucleares neutrofilos y la presencia de células epiteliales cuboidales en los segmentos afectados (**Chamizo, 1995**), estas lesiones acompañadas con criptitis son un diagnóstico claro de criptosporidiosis (Figuras 5 y 6), sin embargo, observándose solo una enteritis catarral con hiperplasia y tumefacción de células caliciformes, se puede sospechar de infección bacteriana (Figura 7) y cuando hay necrosis y atrofia de vellosidades y hemorragias el diagnóstico es infección viral (Figuras 8 y 9).

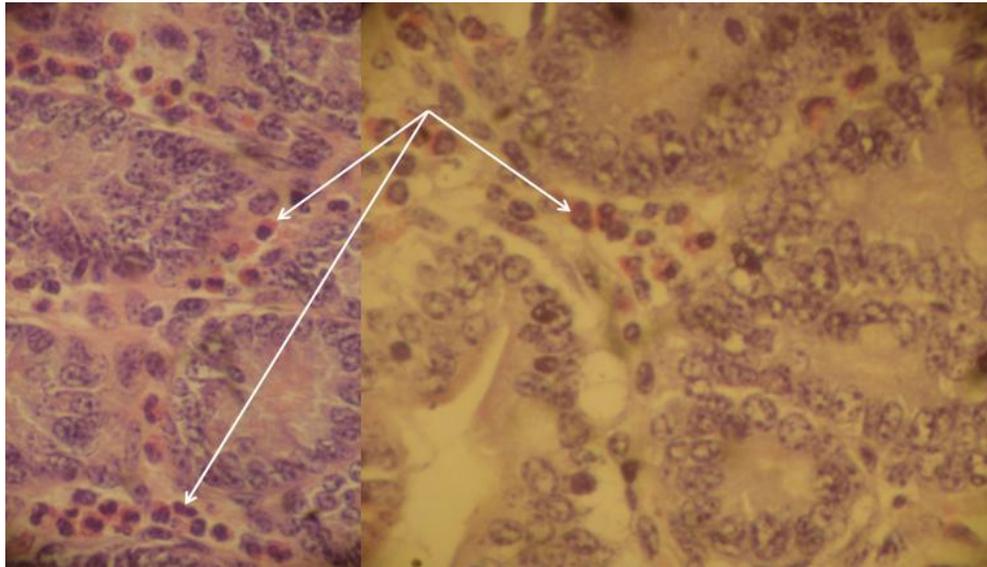


Figura 7. Enteritis catarral. Obsérvense los neutrófilos (flechas)

Las manifestaciones patológicas de criptosporidiosis son más frecuentes en animales lactantes, aunque eventualmente los animales afectados se encuentran entre las 6 y 12 semanas de edad (**Magdalena et al., 1997**).

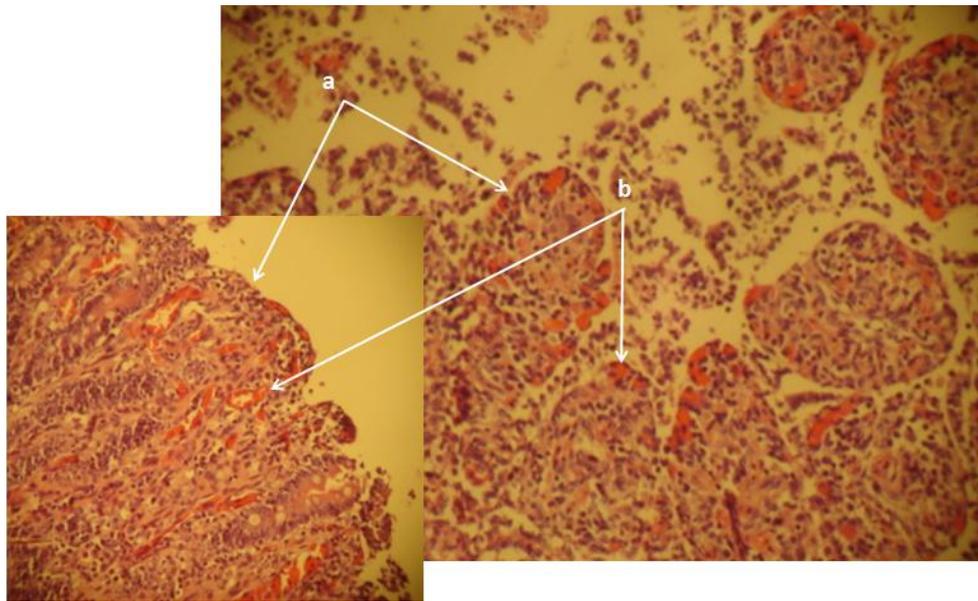


Figura 8. Enteritis necrótica, a) Necrosis de vellosidades, b) hemorragias

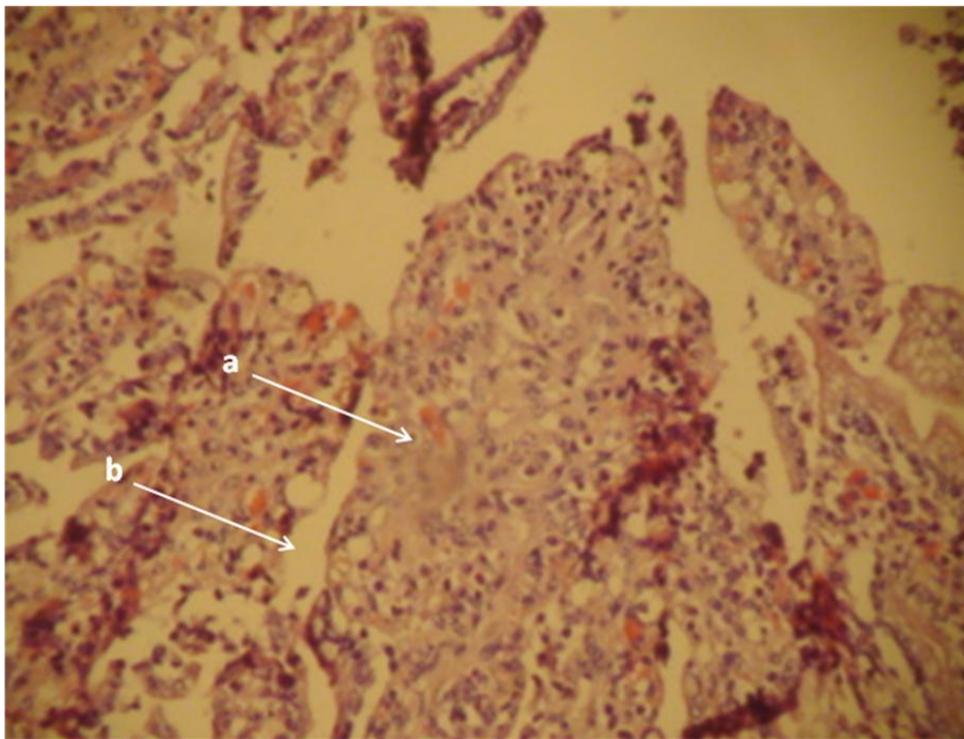


Figura 9. Enteritis necrótica, a) Necrosis de vellosidades b) Hemorragias

Los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando la histopatología de muestras de intestinos de animales sacrificados en rastro, y de acuerdo a las referencias de otros investigadores se concluye que la criptosporidiosis se caracteriza por destrucción de células epiteliales superficiales de las vellosidades, enteritis necrótica, hemorragias, criptitis y enteritis catarral, coincidencias que se muestran en las figuras presentadas.

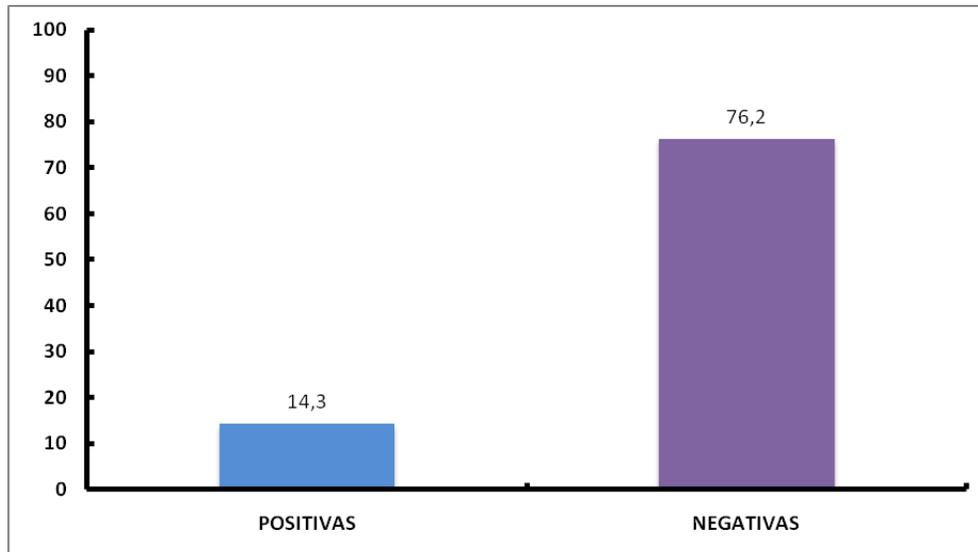


Figura 10. Porcentaje 11 (26.2%) de muestras compatibles con criptosporidiosis

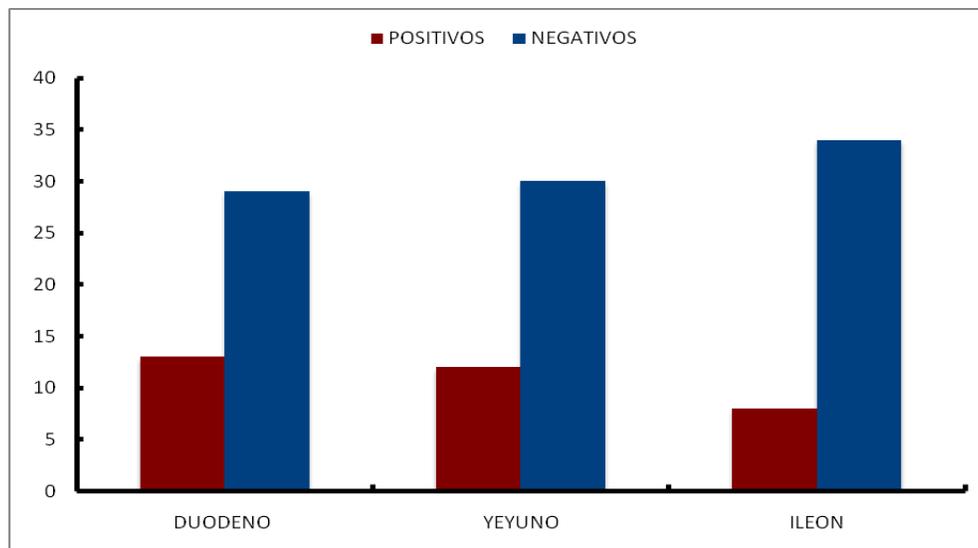


Figura 9. Lesiones en intestino, en el duodeno se observaron 13 muestras con alteraciones, en el yeyuno 12, y en el íleon 8

VII. LITERATURA CITADA

- Barboni, G., M. Candi, M. I. Villace, A. Leonardelli, J. Balbaryski, and E. Gaddi. 2008. Criptosporidiosis Intestinal En Niños Con Hiv/Sida. *Medicina (Buenos Aires)* 68: 213-218.
- Barco, C., G. Llopis, and M. M. M. Suárez-Varela. 1991. Consideraciones epidemiológicas sobre Criptosporidiosis. *San Hig Púb* 65: 363-370
- Barwick, R. S., H. O. Mohammed, M. E. White, and R. B. Bryant. 2003. Factors Associated with the Likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. In Soil from Dairy Farms¹ *J. Dairy Sci* 86: 784-791.
- Butler, J. B., and I. C. Mayfield. 1996. *Cryptosporidium* spp. - A Review of the Organism, the Disease, and Implications for Managing Water Resources 1-80.
- Cox, F. E. G. 2002. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 595-612.
- Current, L. W., and S. I. Garcia. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology* 4: 325-358.
- Chacín-Bonila, L., and R. Cheng-Ng. 2008. Criptosporidiosis en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Interciencia* 33: 708-716.
- Chen, X.-M., S. J. Keithly, V. C. Paya, and F. N. LaRusso. 2002. Cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 346.
- Dalle, F., P. Roz, G. Dautin, M. Di-Palma, E. Kohli, C. Sire-Bidault, M. G. Fleischmann, A. Gallay, S. Carbonel, F. Bon, C. Tillier, P. Beaudeau, and A. Bonnin. 2003. Molecular Characterization of Isolates of Waterborne *Cryptosporidium* spp. Collected during an Outbreak of Gastroenteritis in South Burgundy, France. *Journal Of Clinical Microbiology* 41: 2690-2693.
- De Arango, M., D. A. Rodríguez, and N. E. Prada. 2006. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp en materia fecal de niños entre un mes y trece años en un hospital local colombiano. *Colombia Médica* 37: 121-125.
- De la Ossa, M. N., A. Falconar, S. H. J. Llinás, and V. C. M. Romero. 2007. Manifestaciones clínicas y factores de riesgo asociados a la infección por *Cryptosporidium* en pacientes de Barranquilla y tres municipios del Atlántico (Colombia). *Salud Uninorte. Barranquilla* 23: 19-31.
- Díaz, C. M. E., M. E. E. Leyva, H. V. Mata, and R. H. González. 2003. Incidencia y viabilidad de *cryptosporidium parvum* en el agua Potable de ciudad

- obregón, Sonora, México Rev. Int. Contam. Ambient. 19 (2) 67-72, 2003 19: 67-72.
- Díaz de Ramírez, A. 2002. Criptosporidiosis en el ganado bovino. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal.
- Díaz de Ramírez, A., L. N. Ramírez-Iglesia, R. M. Godoy de Plaza, and R. Rafael. 2002. Excreción de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Durante el postparto, en vacas mestizas de doble propósito. Revista Científica Vol. XII-Suplemento 2, Octubre, 614-616, 2002 12: 614-616.
- Eisenberg, N. S. J., X. Lei, H. A. Hubbard, A. M. Brookhart, and J. J. M. Colford. 2004. The Role of Disease Transmission and Conferred Immunity in Outbreaks: Analysis of the 1993 *Cryptosporidium* Outbreak in Milwaukee, Wisconsin. Am J Epidemiol 2005;161:62-72 161: 62-72.
- Fayer, R., and B. L. P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Microbiological 50: 458-483.
- Fayer, R., M. Santín, M. J. Trout, and E. Greiner. 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. Veterinary Parasitology 135: 105-112.
- Fernandez, M. K. S. 2000. Prevalencia de *Cryptosporidium* y otros parásitos intestinales en niños menores de 60 meses que asisten a guarderías. 1-104.
- Giacometti, A., O. Cirioni, F. Barchiesi, F. Ancarani, and G. Scalise. 2000. Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45: 453-456.
- Gómez, M. S., M. A. Álvarez-Sánchez, and F. A. Rojo-Vázquez. 2006. Obtaining hyperimmune anti-*Cryptosporidium parvum* ovine colostrum. A study of the humoral immune response in immunized sheep. Parasitol Res 98: 119-129.
- Hashim, A., M. Clyne, G. Mulcahy, D. Akiyoshi, R. Chalmers, and B. Bourke. 2004. Host Cell Tropism Underlies Species Restriction of Human and Bovine *Cryptosporidium parvum* Genotypes. Infection And Immunity 72: 6125-6131.
- Jellison, L. K., L. D. Distel, F. H. Hemond, and B. D. Schauer. 2004. Phylogenetic Analysis of the Hypervariable Region of the 18S rRNA Gene of *Cryptosporidium* Oocysts in Feces of Canada Geese (*Branta canadensis*): Evidence for Five Novel Genotypes. Applied And Environmental Microbiology 70: 452-458.

- Johnson, M. A., K. Linden, M. K. Ciociola, R. De Leon, G. Widmer, and A. P. Rochelle. 2005. UV Inactivation of *Cryptosporidium hominis* as Measured in Cell Culture. *Applied And Environmental Microbiology* 71: 2800-2802.
- Klein, P., T. Kleinova, Z. Volek, and J. Simunek. 2008. Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. *Veterinary Parasitology* 152 (2008) 53-59 152: 53-59
- Kuhn, C. R., M. C. Rock, and H. K. Oshima. 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Wild Ducks along the Rio Grande River Valley in Southern New Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 161-165.
- Lacroix-Lamandé, S., R. Mancassola, M. Naciri, and F. Laurent. 2002. Role of Gamma Interferon in Chemokine Expression in the Ileum of Mice and in a Murine Intestinal Epithelial Cell Line after *Cryptosporidium parvum* Infection. *Infection And Immunity* 70: 2090-2099.
- Lippi, O. E., and S. P. Castro. 2003. Aspectos epidemiológicos de la criptosporidiosis en becerros de rebaños lecheros. *Parasitol Latinoam* 58: 122 - 127,.
- Luján, Z. N., and G. Garbossa. 2008. *Cryptosporidium*: after a hundred years. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 42: 195-201.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega, and R. C. Sterling. 1997. Waterborne Protozoan Pathogens. *Clinical Microbiology* 10: 67-85.
- Masuno, K., T. Yanai, A. Hirata, K. Yonemaru, H. Sakai, M. Satoh, T. Masegi, and Y. Nakai. 2006. Morphological and Immunohistochemical Features of *Cryptosporidium andersoni* in Cattle *Vet Pathol* 43: 202-207.
- Muñiz-Salazar, R., Baptista-Rosas, Sánchez-Brambila, Salas-Vargas, P. Radilla-Chávez, and A. Arreola-Cruz. 2009. Extracción de ADN e identificación molecular de protozoarios patógenos en muestras de agua. *Medigraphic* 34.
- Nydam, D. V., and H. O. Mohammed. 2005. Quantitative Risk Assessment of *Cryptosporidium* Species Infection in Dairy Calves. *J. Dairy Sci* 88: 3932-3943.
- Quílez, J., C. Sánchez-Acedo, and E. Del Cacho. 2003. Criptosporidiosis de los pequeños rumiantes. *Sanidad animal* 4: 1-7.
- Romero, M. R. D., P. R. H. Pedrozo, and E. Vera. 2001. La cryptosporidiosis en los terneros recién nacidos. Su etiología, patogenia, síntomas, tratamiento y profilaxis. *Ciencia y Tecnología* 1: 1-10.

- Ruecker, J. N., N. Bounsombath, P. Wallis, S. L. C. Ong, J. L. Isaac-Renton, and F. N. Neumann. 2005. Molecular Forensic Profiling of *Cryptosporidium* Species and Genotypes in Raw Water. *Applied And Environmental Microbiology* 71: 8991-8994.
- Ryan, U. M., C. Bath, I. Robertson, C. Read, A. Elliot, L. Mcinnes, R. Traub, and B. Besier. 2005. Sheep May Not Be an Important Zoonotic Reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* Parasites. *Applied And Environmental Microbiology* 71: 4992-4997.
- Santín, M., M. J. Trout, and R. Fayer. 2008. A longitudinal study of Cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology* 155 (2008) 15–23 155: 15–23
- Servinc, F., K. Irmak, and M. Servinc. 2003. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoeic and non- diarrhoeic calves. *Revue Méd. Vét.* 154: 357-361.
- Sevinc, F., U. Uslu, and Z. Derinbay. 2005. The Prevalence of *Cryptosporidium parvum* in Lambs around Konya. *Turk J Vét Anim Sci* 29: 1191-1194.
- Slapeta, J., and S. J. Keithly. 2004. *Cryptosporidium parvum* Mitochondrial-Type HSP70 Targets Homologous and Heterologous Mitochondria. *Eukaryotic Cell* 3: 483-494.
- Sunnotel, O., W. J. Snelling, L. Xiao, K. Moule, J. E. Moore, C. B. Millar, J. S. G. Dooley, and C. J. Lowery. 2006. Rapid and Sensitive Detection of Single *Cryptosporidium* Oocysts from Archived Glass Slides. *Journal Of Clinical Microbiology* 44: 3285-3291.
- Valenzuela, A. C. 1997. Criptosporidiosis, una enfermedad diarreica aguda en terneros.
- Vergara, C., and J. Quílez. 2004. Criptosporidiosis: Una Zoonosis Parasitaria. *MVZ-Córdoba* 9: 363-372.
- Xiao, L., R. Fayer, U. Ryan, and U. J. Steve. 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72-97.
- Zhou, L., H. Kassa, L. M. Tischler, and L. Xiao. 2004. Host-Adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada Geese (*Branta canadensis*). *Applied And Environmental Microbiology* 70: 4211-4215.