



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

PREVALENCIA DE *Giardia intestinalis* Y *Cryptosporidium* SPP EN GRANJAS DE ANIMALES DOMÉSTICOS EN EL ESTADO DE MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICÁ VETERINARIA Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

LAURA ENEDINA SOTO SERNA

Asesor: DRA. MARTHA PONCE MACOTELA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron muchas personas leyendo, corrigiendo, opinando, teniéndome paciencia, dándome animo, acompañándome en los momentos de crisis y sobre todo de felicidad.

Agradezco a la Dra. Martha Ponce Macotela por haber depositado su confianza en mí, por la paciencia y la dirección de este trabajo. Sin sus consejos, sin su apoyo y dedicación no hubiera yo sido capaz de avanzar en la elaboración de este trabajo.

A Gustavo Peralta Abarca por todo su apoyo y conocimiento en la elaboración de las técnicas e identificación de estructuras parasitarias.

A Mario Martínez Gordillo por su apoyo en las técnicas de biología molecular.

A Leticia Riverón Negrete, Silvia Caballero Sánchez, Aarón Rodríguez Caballero y Yadira Rufino González por orientarme y aconsejarme en el laboratorio cada vez que tuve un tropiezo.

También debo reconocimiento a mis sinodales: M. en C. J. Pablo M. Labat, MVZ. Ana L. Reyes Sánchez, MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes, MVZ. Rubén A. Torres León por la atenta lectura y revisión a este trabajo, y sus muy acertadas observaciones.

A los encargados de las granjas, MVZ. Gustavo Díaz Manríquez, MVZ. Mario A. Velasco Jiménez, P.MVZ. Juan J. Almazán Aldana y a su tío, por permitirme muestrear a los animales, pues sin su ayuda este trabajo no se hubiera realizado.

Gracias también a mis queridos amigos y compañeros, que me apoyaron y permitieron entrar en su vida, durante casi siete años; y convivir con ellos dentro y fuera del salón de clases. Alma, Luis, Esteban, Katya, Diana, Raúl, Mauricio, Juan y a todos los que no menciono pero me han brindado su sincera amistad.

A todos muchas gracias.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Edith y Elías, por el gran apoyo que siempre me brindaron, por la paciencia que me han tenido, por los valores que me inculcaron, porque me enseñaron a afrontar las adversidades sin perder la dignidad ni la cordura, porque sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y, sabiendo que jamás existirá forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constantes, solo deseo que este logro lo sientan como suyo porque mi esfuerzo fue inspirado en ustedes y es la herencia más grande que pudiera recibir.

A mis hermanos, Mariana y Jesús, que me apoyaron, creyeron en mí, aun más que yo misma; y me acompañaron en esta aventura que significó la Licenciatura, y que de forma incondicional entendieron mis ausencias y malos momentos.

A mi abuelo Luis que siempre me dio palabras de aliento y cariño. Por fomentar en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A Diego, que desde un principio y hasta hoy sigue dándome ánimo y apoyándome para terminar este proyecto. Por el amor desinteresado que me ha demostrado durante estos ya, siete años, donde compartimos alegrías y tristezas.

Para ustedes, con todo mi amor.

**Prevalencia de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp en granjas de
animales domésticos en el estado de México**

Índice

	Página
1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
2.1 Giardiosis.....	4
2.1.1 Taxonomía.....	4
2.1.2 Historia.....	5
2.1.3 Morfología.....	5
2.1.4 Epidemiología.....	7
2.1.5 Importancia zoonótica.....	8
2.1.6 Mecanismos de infección.....	8
2.1.7 Ciclo biológico.....	9
2.1.8 Mecanismos patogénicos.....	10
2.1.9 Cuadro clínico.....	11
2.1.10 Diagnóstico.....	11
2.1.11 Tratamiento.....	12
2.1.12 Medidas preventivas.....	12
2.2 Criptosporidiosis.....	13
2.2.1 Taxonomía.....	13
2.2.2 Historia.....	14
2.2.3 Morfología.....	14
2.2.4 Epidemiología.....	16
2.2.5 Importancia zoonótica.....	17
2.2.6 Mecanismos de infección.....	18
2.2.7 Ciclo biológico.....	18
2.2.8 Mecanismos patogénicos.....	20
2.2.9 Cuadro clínico.....	21
2.2.10 Diagnóstico.....	22
2.2.11 Tratamiento.....	22
2.2.12 Medidas preventivas.....	23
3. Justificación.....	25
4. Objetivos.....	25
5. Hipótesis.....	25
6. Metodología.....	26
6.1 Estrategia.....	26

6.2	Diseño experimental.....	26
6.3	Carta de consentimiento autorizado.....	27
6.4	Obtención de material biológico.....	27
6.5	Características de las granjas.....	27
6.6	Técnicas de diagnóstico.....	30
6.6.1	Coproparasitoscópico (CPS) directo fresco.....	31
6.6.2	Coproparasitoscópico de concentración flotación (Faust).....	32
6.6.3	Tinción de Zielh-Neelsen.....	33
6.6.4	Técnica de concentración Sheather.....	34
6.6.5	Caracterización molecular: <i>Giardia intestinalis</i> (<i>G. lamblia</i> , <i>G. duodenalis</i>)...35	
7.	Resultados.....	37
8.	Discusión.....	43
9.	Conclusiones.....	45
10.	Referencias.....	46
11.	Anexos A (soluciones).....	51
12.	Anexo B (láminas a color).....	56

1. RESUMEN

Los protozoarios *Giardia intestinalis* (Sinónimos: *G. duodenalis* y *G. lamblia*) y *Cryptosporidium* spp se encuentran en una amplia gama de hospederos mamíferos, producen diarrea y mala absorción intestinal. A nivel mundial la prevalencia de la giardiosis en animales de granja es del 1.5 al 84% y de *Cryptosporidium* es del 1.0% hasta el 100%. En México hay escasos reportes de estas parasitosis en animales de granja, por tal motivo es necesario saber cómo está la prevalencia de estas parasitosis en explotaciones de nuestro país. El objetivo de este estudio fue identificar parásitos con potencial zoonótico (*Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp) en granjas del estado de México. Se realizó un muestreo representativo, para la toma de muestras de bovinos de Cuautitlán (39), porcinos de Xonacatlán y Coatlán (148) y ovinos de Magú (50) de cuatro granjas de animales domésticos ubicadas en el estado de México, las muestras de heces se obtuvieron del recto. Para el diagnóstico de *Giardia* se realizaron los coproparasitoscópicos (CPS) directo fresco y concentración flotación (Faust). Las muestras positivas se procesaron para la genotipificación de *Giardia* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el diagnóstico de *Cryptosporidium* se realizó la tinción de Zielh-Neelsen modificada. La prevalencia de *Giardia* en ovinos fue del 18%. Las dos muestras que se pudieron genotipificar correspondieron al ensamble “E” (característico de animales de granja). La prevalencia de *Cryptosporidium* en bovinos fue de 74.4%, porcinos 0.68% y ovinos 8.0%, con una prevalencia global de 14.3% (34/237). El resultado de este trabajo es interesante porque mostró que los bovinos, porcinos y ovinos son potencialmente portadores y diseminadores de la criptosporidiosis. Los ovinos son portadores de *Giardia*, ensamble “E”, y son potencialmente diseminadores de esta parasitosis en animales de granja. Es necesario hacer más estudios con un tamaño de muestra mayor y realizar la genotipificación para determinar el grado de zooantropozoonosis de estas parasitosis.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se sabe que hay más organismos parásitos que no parásitos, ya que esta modalidad de asociación en los seres vivos es una de las más exitosas. Es importante señalar que algunas parasitosis transmitidas por el suelo o fecalismo no solo se presentan en climas cálidos, sino también en zonas templadas y frías.

Generalmente en los países en desarrollo es en donde las parasitosis se presentan con mayor frecuencia, viéndose favorecidas por las malas condiciones socio-económicas y culturales de la población, además de malos hábitos higiénicos y alimenticios (Tay *et al.*, 2002).

La giardiosis es una parasitosis reemergente que ha existido desde hace siglos, pero, en últimas fechas se ha incrementado su incidencia y su rango de acción geográfica. La criptosporidiosis es una parasitosis emergente que inicialmente se documentó en animales y después del advenimiento del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) se incrementaron los casos en humanos.

2.1 GIARDIOSIS

2.1.1 Taxonomía

De acuerdo a la descripción de Cavalier-Smith, 1998, a *Giardia* se le ubica en el subreino Archeozoa, porque es un microorganismo eucarionte amitochondriado.

Imperio: Eucariota

Reino: Protozoa

Subreino: Archeozoa (Sarcomastigophora)

Phylum: Metamonada (Mastigophora)

Subphylum: Eopharyngia

Clase: Trepomonadea

Orden: Diplomonadida

Suborden: Diplomonadina

Género: *Giardia*

Especie: *G. intestinalis*

2.1.2 Historia

Anton van Leeuwenhoek, en 1681, fue el primero en observar con su microscopio, trofozoítos de *Giardia*, analizando sus propias heces diarreicas. Sus observaciones fueron recreadas por el microbiólogo británico Brian J. Ford, utilizando unos objetivos microscópicos semejantes a los de Leeuwenhoek y mostró así lo que Leeuwenhoek pudo ver en su momento “*Giardia* a través de un microscopio primitivo”. En 1859 fue descrito y nombrado *Cercomonas intestinalis* por Lambl P., investigador checo que redescubrió a *Giardia* 200 años después de Leewenhoek. Pero fue hasta 1882 que Kunster asignó la denominación de *Giardia* para este protozoo flagelado de hospederos humanos. Más tarde Alexeif señaló que la especie encontrada en el hombre pertenecía a este género. Blanchard, en 1888, sugirió el género *Lambliia* para honrar a Lambl. En 1915, el parásito fue finalmente denominado *Giardia* en honor al profesor A. Giard en París. Atendiendo al criterio de prioridad, en ese mismo año Stiles propuso la unificación de la terminología con designación binomial de *Giardia lamblia* (*G. duodenalis* o *G. intestinalis*) (Huang *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007).

2.1.3 Morfología

Filice desde 1952, basado en criterios morfológicos describió tres especies: *G. agilis* que se encuentra en los anfibios, es piriforme, más largo que ancho, mide de 20-30 μm por 4-5 μm , con dos cuerpos medios semejantes a gotas de agua. *G. muris* que se presenta en murinos y aves pequeñas, es casi redonda y mide de 9-12 μ por 5-7 μm , con dos cuerpos medios ovales y *G. duodenalis* que parasita humanos y otros mamíferos, es piriforme, mide 10-12 μm de largo por 5-7 μm de ancho y 1-2 μm de grosor y tiene un cuerpo medio en forma de uña de martillo. Posteriormente, se describieron dos especies en aves: *G. ardea* que presenta un solo flagelo caudal y una forma variable del cuerpo medio y *G. psitacci* la cual carece del flanco ventrolateral. También se describió a *G. microti* que se encuentra en roedores, los quistes presentan dos trofozoítos y la secuencia del RNA ribosomal es diferente al del grupo morfológico de *G. intestinalis*. Tabla 1 (Ponce *et al.*, 2008; Monis *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2008).

Tabla 1. Diferentes especies de *Giardia* y sus hospederos.

Género y especie	Hospedero
<i>G. intestinalis</i> (<i>G. lamblia</i> , <i>G. duodenalis</i>)	Mamíferos incluido el hombre
<i>G. muris</i>	Ratones
<i>G. agilis</i>	Ranas
<i>G. ardae</i>	Garzas e ibis
<i>G. psitacci</i>	Periquitos
<i>G. microti</i>	Ratón de campo y rata almizclera

En la naturaleza existen dos estadios: el trofozoíto que es la fase vegetativa o trófica y el quiste que es la fase de resistencia y transmisión (Appelbee *et al.*, 2003; Ibarra *et al.*, 2009; Jonhson *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004; Quiroz, 2002; Soulsby *et al.*, 1987; Taylor, 2007).

Los trofozoítos son piriformes o elipsoidales, tienen simetría bilateral, miden de 10-20µm de largo y de 5-15µm de ancho. La región dorsal es convexa y la ventral es cóncava, en ésta se encuentra el disco suctor, que funciona de manera semejante a una ventosa; poseen dos núcleos, nucléolo, un cuerpo medio y cuatro pares de flagelos. Figura 1 (Huang *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2008).

Los quistes son elipsoidales, miden de 8-12 µm de largo y 7-10 µm de ancho. El citoplasma es granular, fino, tienen de 2 a 4 núcleos y restos del disco suctor. La pared es transparente y su porción externa presenta una estructura fibrilar que contiene polisacáridos que recubren al quiste. Figura 1 (Huang *et al.*, 2006; Ortega *et al.*, 2008).



**Figura 1. Esquema de un trofozoíto y un quiste de *Giardia intestinalis*.
Modificado de Ortega *et al.*, 2008.**

2.1.4 Epidemiología

G. intestinalis coloniza el intestino delgado de una gran cantidad de mamíferos y clínicamente se caracteriza porque produce diarrea y síndrome de mala absorción.

Esta parasitosis se encuentra en el hombre, animales de compañía (caninos y felinos), animales de granja (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y equinos) y animales silvestres (roedores como los castores). Tabla 2 (Appelbee *et al.*, 2003; Geurden *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2009; Itagaki *et al.*, 2005; Jonhson *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2007; Monis *et al.*, 2003; Soulsby, 1987; Taylor, 2007).

Tabla 2. Prevalencia de *G. intestinalis* en bovinos, porcinos y ovinos.

País	Hospedero	Prevalencia (%)	N	Autor
Georgia	Bovinos	14-83		Feng <i>et al.</i> , 2008
Australia	Bovinos	8.7	39/445	McCarthy <i>et al.</i> , 2008
Dinamarca	Beceros	19-89	501/1150	Maddox <i>et al.</i> , 2006
Canadá	Bovinos	7-60	168/495	Appelbee <i>et al.</i> , 2003
Australia	Bovinos	58		O'Handley <i>et al.</i> , 2000
Noruega	Ovinos	23-31	126-170/550	Robertson <i>et al.</i> , 2010
Bélgica	Ovinos	25.5	35/137	Geurden <i>et al.</i> , 2008
Italia	Ovinos	17.6		Annunziata <i>et al.</i> , 2005
Australia	Ovinos	8.7		Ryan <i>et al.</i> , 2005
Noruega	Lechones	1.5	10/684	Sofie <i>et al.</i> , 2007
Dinamarca	Porcinos	18-84	215/1237	Maddox <i>et al.</i> , 2006

La giardiosis es muy importante en los animales de granja, ya que se ha documentado que en corderos y becerros reduce la tasa de ganancia de peso, afecta la conversión alimenticia y disminuye el peso en canal; produciendo pérdidas económicas para los productores (Bomfim *et al.*, 2005; Maddox *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2008).

Por otro lado, debido a que los trofozoítos y quistes del grupo morfológico *G. intestinalis* que se obtienen del hombre y del ganado tienen la misma morfología, se han utilizado técnicas de biología molecular para poder diferenciarlos. Mediante amplificación del gen de la glutamato deshidrogenasa (gdh) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) se han descrito siete genotipos o ensambles. Debido que los ensambles “A” y “B” se encuentran en el humanos y otros mamíferos se les considera potencialmente zoonóticos (Itagaki *et al.*, 2005; Ponce *et al.*, 2005). Los ensambles “C-G” son especie-específicos (Olson *et al.*, 2004; Read *et al.*, 2004).

Tabla 3. Genotipos de *Giardia intestinalis* en los diferentes hospederos.

Genotipos	Hospedero
Ensamble A (zoonótico)	Humanos, primates, caninos, felinos, ganado, roedores, mamíferos silvestres
Ensamble B (zoonótico)	Humanos, primates, caninos, equinos y ganado
Ensamble C	Caninos
Ensamble D	Caninos
Ensamble E	Ganado (artiodáctilos)
Ensamble F	Felinos
Ensamble G	Roedores

Tabla 4. Prevalencia de los ensambles de *Giardia intestinalis* en bovinos, porcinos y ovinos.

País	Especie	A N (%)	E N (%)	Autor
EU	Bovinos	2000 (2-7)	2000 (28-45)	Xiao <i>et al.</i> , 2008
Australia	Bovinos	12/36 (30.7)	24/36 (61)	McCarthy <i>et al.</i> , 2008
Canadá	Bovinos	1/42 (2.3)	41/42 (97.6)	Appelbee <i>et al.</i> , 2003
Noruega	Ovinos	1/550 (0.18)	41/550 (7.45)	Robertson <i>et al.</i> , 2010
Bélgica	Ovinos	2/137(1.46)	6/137 (4.38)	Geurden <i>et al.</i> , 2008
Maryland	Ovinos		4/31 (12.9)	Santín <i>et al.</i> , 2007
Italia	Ovinos	5/450 (1.11)		Annunziata <i>et al.</i> , 2005

2.1.5 Importancia zoonótica de la giardiosis

Actualmente se considera una antropozoonosis. La giardiosis es frecuente y está muy extendida en animales domésticos, por lo que la transmisión a partir de animales domésticos infectados puede ser de considerable importancia.

En México la giardiosis es una de las infecciones en humanos con la más alta prevalencia. Las tasas de morbilidad presentan un comportamiento homogéneo a través de los años, con tasa >200 casos/100,000 habitantes, con picos máximos en grupos menores de 5 años (García *et al.*, 2009; Ibarra *et al.*, 2009).

2.1.6 Mecanismos de infección

El mecanismo de infección es por fecalismo. Principalmente se transmite por vía hídrica, ingestión de alimentos contaminados, contacto directo y por transmisores mecánicos (*Musca domestica*, *Periplaneta americana*). La infección se puede adquirir con la ingestión de por lo menos 10 quistes (De la parte *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Keulen *et al.*, 2002).

2.1.7 Ciclo biológico

El periodo de prepatencia es de 7 a 14 días (Huang *et al.*, 2006). Después de la ingestión de los quistes, el pH ácido del estómago y el pH alcalino de duodeno inducen el

desenquistamiento, el trofozoíto inicia la salida e inmediatamente se divide asexualmente por fisión binaria longitudinal. Los trofozoítos colonizan el intestino delgado, fundamentalmente el duodeno y yeyuno, se adhieren a las microvellosidades por medio del disco ventral; las sales biliares y el colesterol favorecen su crecimiento. Cuando las condiciones son adversas, por ejemplo la disminución del colesterol, los trofozoítos se enquistan; pierden los flagelos y se rodean de una pared quística que protege al parásito para sobrevivir fuera del intestino del hospedero. Los quistes que salen con la materia fecal ya son infectantes. El ciclo de vida se completa cuando un nuevo hospedero los ingiere (Alonso *et al.*, 2009; Becerril *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006; Ibarra *et al.*, 2009). Figura 2.

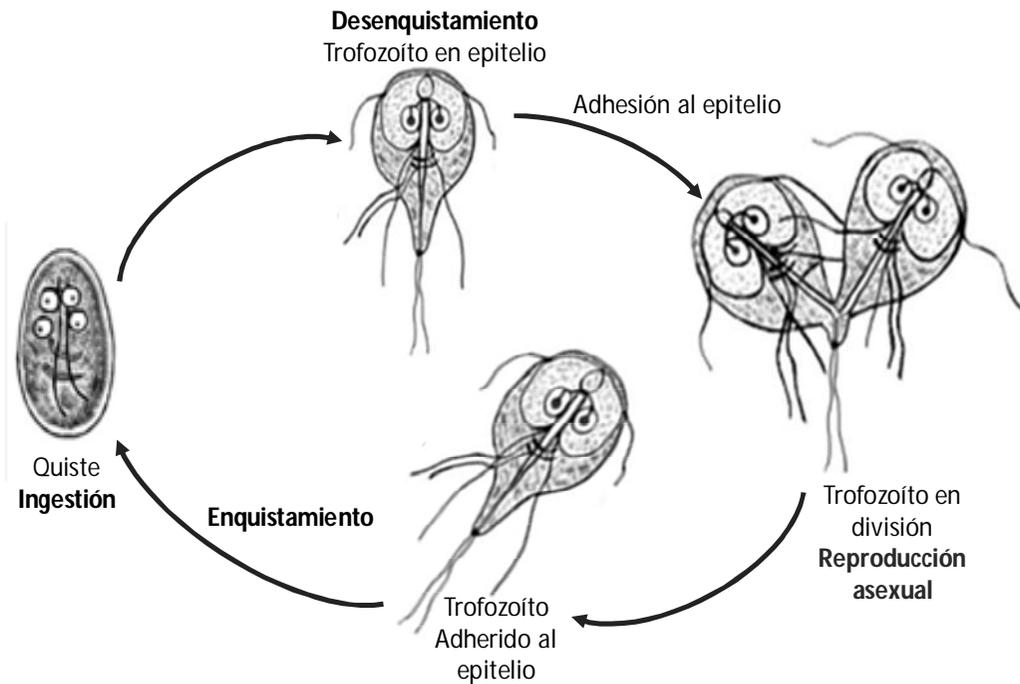


Figura 2. Esquema del ciclo biológico de *Giardia* (Ortega *et al.*, 2008).

2.1.8 Mecanismos patogénicos

Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales *Giardia* produce daño al hospedero. Los quistes al ser ingeridos liberan los trofozoítos, que se multiplican y colonizan el intestino delgado. Los trofozoítos se adhieren a los enterocitos mediante el disco suctor, por la presión negativa ejercida por los flagelos ventrales. En la adhesión también participan sus proteínas contráctiles: giardinas, actina, miosina, tropomiosina, vinculina y lectina; la interacción de la lectina con los receptores de manosa puede producir lisis celular, aumento del índice mitótico y aplanamiento de las microvellosidades (Farthing *et al.*, 1986; Feely *et al.*, 1982; Geurden *et al.*, 2010).

Algunas enzimas como las sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasas, cisteinproteínas atacan a las glucoproteínas de los enterocitos, con pérdida parcial de las microvellosidades. Los enterocitos inmaduros no producen enzimas o su actividad se reduce, entre estas encontramos: lipasa, proteasas y disacaridasas como la lactasa, maltasa y sucrasa (Geurden *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2009).

La atrofia de las vellosidades puede ser inducida por una toxina de *Giardia* (Ponce *et al.*, 2008; Farthing, 1997; Katelaris *et al.*, 1992; Parenti *et al.*, 1989).

Cuando las condiciones para el crecimiento de los trofozoítos son óptimas, se multiplican de forma acelerada. El daño epitelial produce cambios estructurales y funcionales, de tal forma que los enterocitos inmaduros reemplazan a los enterocitos dañados y su producción enzimática es defectuosa: la secreción de la ATP-asa, que sirve de apoyo para la bomba de sodio y potasio (Na^+/K^+) se encuentra disminuida, las enzimas celulares como la isocitrato deshidrogenasa produce una disminución en la producción de ATP. Como consecuencia existe malabsorción de glucosa, sodio y agua (Ortega *et al.*, 2009).

Giardia no produce de novo los nutrientes y los toma del medio. Compite con el hospedero por colesterol y sales biliares lo que afecta la emulsión de las grasas, altera la formación de micelas y produce mala absorción de las grasas con la consecuente diarrea. Todos los procesos anteriores contribuyen a la pérdida de epitelio superficial produciendo mala absorción y diarrea.

Compite por micronutrientes como el zinc y hierro y puede privar de estos micronutrientes al hospedero.

Consume aminoácidos como la arginina. Ésta es necesaria para la producción de óxido nítrico por el hospedero, ya que le sirve para atacar a los agentes patógenos (Eckmann *et al.*, 2000).

Las proteínas variables de superficie (VSP) de los trofozoítos son ricas en cisteína, la unión de dos moléculas de cisteína produce puentes disulfuro que le proporciona resistencia estructural a la membrana y de esta manera se protege de los radicales libres. Además, estas proteínas (VSP) le brindan protección contra la respuesta inmune del hospedero (Becerril *et al.*, 2004; Bruderer *et al.*, 1993; Buret *et al.*, 2002; Eckmann *et al.*, 2003; Narcisi *et al.*, 1994; Nash *et al.*, 1993; Radostits *et al.*, 2002).

2.1.9 Cuadro clínico

Esta parasitosis en los animales puede ser asintomática o sintomática. La mayoría de los animales infectados cursan asintomáticos (Ibarra *et al.*, 2009; Ponce *et al.*, 2005; Sofie *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008). Forma aguda: alrededor del 40% presenta diarrea aguda, vómito, dolor abdominal, alteración en la conversión alimenticia, disminución de peso en canal, con las consecuentes pérdidas económicas para los productores. Forma crónica: diarrea recurrente que puede ser de color gris y síndrome de mala absorción, los animales quedan como portadores. La condición inmune representa un factor de riesgo para adquirir la infección, es más frecuente en animales jóvenes (Geurden *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2009).

En el hombre y la población infantil presenta el síndrome de mala absorción, dolor abdominal transperidial, diarrea, esteatorrea, estreñimiento, pérdida de peso y déficit cognitivo (Huang *et al.*, 2006; Ponce *et al.*, 2005).

2.1.10 Diagnóstico

Para el diagnóstico etiológico se realizan: (Huang *et al.*, 2006; Ibarra *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008).

- Coproparasitoscópicos (CPS) en serie de tres. Cuando las heces son formadas se buscan los quistes en el CPS cualitativo de concentración flotación (Faust).

Cuando las evacuaciones son diarreicas se buscan los trofozoítos en el CPS directo en fresco.

- Prueba de la capsula de Beal (cápsula de gelatina con un hilo de 90 -140 cm). El fluido duodenal impregnado en la última porción del hilo se observa al microscopio para buscar trofozoítos.
- Aspirado y biopsia duodenal (endoscopia, intubación y aspiración de las vías digestivas altas) se lleva a cabo cuando en los CPS no se identifica al parásito.
- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) detecta coproantígenos, tiene una sensibilidad de 85-98% y especificidad de 90-100%.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de segmentos de genes específicos del parásito, fundamentalmente para la búsqueda de los ensambles.

2.1.11 Tratamiento

Se utilizan los derivados bencimidazólicos.

Albendazol 2.5-20 mg/kg de peso por 3 días, su actividad giardicida se debe a su interacción selectiva con la beta tubulina del parásito.

Fenbendazol 10 mg/kg de peso por 3 días, se reporta buena eficacia en becerros, ya que reduce la eliminación de quistes.

El Metronidazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la giardiasis en humanos y ha mostrado buenos resultados en caprinos 50-125 mg/kg/5 días, Furazolidona 10 mg/kg/7 días, es un nitrofurano muy utilizado en caso de diarreas, la sobredosificación puede producir signos nerviosos en todas la especies.

La Nitazoxanida se ha empleado en cerdos a dosis de 400 mg/3 días cada 12 horas. La actividad antiparasitaria de este grupo de compuestos se debe a la reducción del grupo nitro, por una vía metabólica presente en protozoarios anaerobios (Cordero *et al.*, 1999; Geurden *et al.*, 2009; Ibarra *et al.*, 2009; Ruíz *et al.*, 2005; Quiroz *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2008; O'Handley *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 1997).

2.1.12 Medidas preventivas

Se debe controlar a la población infectada, implementar medidas zoonositarias para asegurar la calidad del agua (tratamiento con ozono, radiación UV, filtración o cloración) y los alimentos y la inclusión de programas de educación para la salud e

higiene personal de los trabajadores de las granjas (Cordero *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2009).

En un estudio se obtuvo una vacuna que se aplicó por vía subcutánea a perros y gatos y se observó una reducción en la excreción de quistes en las heces, así como menor pérdida de peso que en el grupo control. Sin embargo, faltan más estudios para ver la funcionalidad de este tipo de vacunas (Thompson *et al.*, 2008).

2.2 CRIPTOSPORIDIOSIS

2.2.1 Taxonomía

Cryptosporidium es un microorganismo ubicado en el Phylum Apicomplexa, que se caracteriza por presentar un complejo apical constituido por roptrías y micronemas. Últimamente se ha documentado que está más emparentado a las especies de coccidias gregarinas. Es un parásito intracelular, extracitoplasmático, monóxeno, con fases de reproducción sexual y asexual, se localiza en el epitelio superficial de los aparatos digestivo y respiratorio de los mamíferos, incluido el humano. Es un parásito zoonótico de distribución mundial (Cavalier-Smith, 1998; Fayer, 2009; Taylor *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008).

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoasida

Orden: Eucoccidiorida

Familia: *Cryptosporidiae*

Género: *Cryptosporidium*

2.2.2 Historia

Ernest Edgard Tyzzer, 1907, describió el género *Cryptosporidium* spp y en 1910 propuso la especie *C. muris*. En 1912, presentó todos estadios de desarrollo de *Cryptosporidium* en el intestino delgado de ratones y le asignó la especie *C. parvum*. Slavin, en 1955, describió a *C. meleagridis* en pavos. Panciera, en 1971, hizo la asociación *Cryptosporidium* spp con diarrea en bovinos.

En 1976 casi simultáneamente Nime y Meisel reportan la criptosporidiosis en humanos. Brownstein, en 1977, encuentra a *Cryptosporidium* en reptiles. El Centro de control de enfermedades de Atlanta (CDC) USA, en 1982, reportó los primeros casos de humanos con criptosporidiosis y SIDA (De la parte *et al.*, 2005).

En México, en 1983, se documentó por primera vez la presencia de la enfermedad en el ganado lechero y desde entonces se describe la presencia de *Cryptosporidium*, principalmente en ganado vacuno lechero de la región central del país (García *et al.*, 2009), existe información limitada sobre la epidemiología de las enfermedades en el ganado lechero en sistema de cría intensiva.

2.2.3 Morfología

Existen varios estadios: el *esporozoíto* que posee un complejo apical con anillos polares, microtúbulos subpelliculares, micronemas y toxemas. El *trofozoíto* que contiene un núcleo prominente que al dividirse da lugar al *esquizonte*, dentro del esquizonte se forman los *merozoítos*, que son esféricos y también tienen un complejo apical. Los *microgametos* contienen hasta 16 núcleos, tienen forma de bala y miden 1.4 x 0.4 μm , tienen un núcleo compacto central y están rodeados por microtúbulos. Los *macrogametos* contienen un núcleo, gránulos de amilopectina y cuerpos formadores de pared. Existen dos tipos de ooquistes: *ooquistes de pared blanda* que son esféricos y contienen en su interior cuatro esporozoítos y los *ooquistes de pared gruesa* que miden de 4-6 μm de diámetro, son esféricos, traslúcidos y refringentes al microscopio óptico, son resistentes al medio externo y se excretan con las heces (Becerril *et al.*, 2008; Brogolia *et al.*, 2008; De la Parte *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). En relación al tamaño de los ooquistes, en varios casos las dimensiones se imbrican y por tal motivo es necesario realizar estudios moleculares para obtener el diagnóstico de la especie. Tabla 5 (Fayer, 2009; Xiao *et al.*, 2008).

Tabla 5. Especies de *Cryptosporidium* en diferentes hospederos.

Especie	Hospedero	Hábitat	Tamaño
<i>C. serpentis</i>	Serpiente del maíz	Gástrica	5.6-6.6 x 4.8-5.6
<i>C. varanii</i>	Varano esmeralda	Gástrica	
<i>C. fragile</i>	Sapo negro espinado	Gástrica	
<i>C. meleagridis</i>	Pavos, pollos, codorniz, perro, ratón, ciervo	Intestinal	4.5-6.0 x 4.2-5.3
<i>C. baileyi</i>	Pollo, pato y codorniz	Intestinal	5.6-6.3 x 4.5-4.8
Zoonótico			
<i>C. galli</i>	Pollo	Gástrica (proventrículo)	
<i>C. muris</i>	Ratón, hámster, ciervo, ratón, ardilla, camello, foca, coyote, monos	Gástrica	6.6-7.9 x 5.3-6.5
<i>C. parvum</i>	Ratón, bovino, ovino, equino, alpaca, ratón, ardilla	Intestinal	4.5-5.4 x 4.2-5.0
Zoonótico			
<i>C. wrairi</i>	Cerdo de guinea	Intestinal	4.8-5.6 x 4.0-5.0
<i>C. felis</i>	Felinos y bovinos	Intestinal	3.2-5.1 x 3.0-4.0
<i>C. andersoni</i>	Ganado, camello, jerbo, ratón	Gástrica (abomaso)	6.0-8.1 x 5.0-6.5
<i>C. canis</i>	Perro, fox y coyote	Intestinal	3.7-5.9 x 3.7-5.9
<i>C. hominis</i>	Humano, primates, ganado	Intestinal	4.4-5.9 x 4.4-5.4
<i>C. suis</i>	Porcinos, bovinos	Intestinal	
<i>C. bovis</i>	Bovinos, ovinos y caprinos	Desconocido	4.8-5.4 x 4.2-4.8
Zoonótico			
<i>C. fayeri</i>	Canguro	Desconocido	
<i>C. ryanae</i>	Ganado	Desconocido	
<i>C. macropodum</i>	Canguro	Desconocido	
<i>C. cervine</i>	Bovino, ovino, ardillas, castor, marmota, ciervo, ratón, lémur	Desconocido	
Zoonótico			

Tomado de Fayer, 2009; Xiao *et al.*, 2008 y modificado por el autor.

2.2.4 Epidemiología

La criptosporidiosis es una parasitosis de distribución mundial, que se adquiere fundamentalmente por vía hídrica y cuyo principal signo clínico en los animales domésticos es la diarrea. Actualmente se conocen aproximadamente 19 especies que afectan a mamíferos (incluido el hombre), aves, reptiles y peces. Tabla 5 (Fayer, 2009; Ballwebwer, 2001; Becerril *et al.*, 2004; Brogolia *et al.*, 2008; Cordero *et al.*, 1999; De la parte *et al.*, 2005; Geurden *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2008; Soulsby *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Produce pérdidas económicas por problemas de conversión alimenticia en los animales. Se ha encontrado en animales de granja neonatos o adultos asintomáticos. La falta de calostro y la afección por otros enteropatógenos contribuyen a que se presente la enfermedad clínica. Resultados de estudios epidemiológicos moleculares recientes sugieren que la transmisión zoonótica desempeña un papel importante en la epidemiología de la criptosporidiosis. En Alemania, la criptosporidiosis es de notificación obligatoria desde el 2001 (Alonso *et al.*, 2005; Brogolia *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008).

La prevalencia de este microorganismo es variable y depende de las características socioeconómicas de la población, se ha documentado que es más frecuente en las regiones con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable (Fayer, 2009; Geurden *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2008).

Se encuentra en el 1 al 3% de los habitantes (personas) de los países desarrollados (Europa y América del Norte), en el 5% de los de Asia y en el 10% de los de África. Es más frecuente en los menores de dos años. Mediante estudios serológicos se ha demostrado la presencia de anticuerpos en el 25-35% de los habitantes de los países desarrollados y en el 60-75% de los de países pobres (Becerril *et al.*, 2004; Fayer, 2009; Geurden *et al.*, 2008). En un estudio que se realizó en pacientes pediátricos mexicanos se encontró en el 41% (Sánchez *et al.*, 2006).

En animales de granja a nivel mundial la prevalencia es variable de 1-100%. Tabla 6.

Tabla 6. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en bovinos, porcinos y ovinos.

País	Hospedero	Prevalencia (%)	N	Autor
México	Bovinos	40	669/1658	García <i>et al.</i> , 2009
Australia	Bovinos	6.7	30/445	McCarthy <i>et al.</i> , 2008
Bélgica	Beceros	1-55		Geurden <i>et al.</i> , 2007
Dinamarca	Bovinos	14-84	17-61/1150	Maddox <i>et al.</i> , 2005
Estados Unidos	Beceros	1-59		Fayer <i>et al.</i> , 2005
México	Bovinos	25	128/512	Maldonado <i>et al.</i> , 1998
Noruega	Ovinos	15-24	82-132/550	Robertson <i>et al.</i> , 2010
Mundial	Pequeños rumiantes	5-77		Geurden <i>et al.</i> , 2008
Bélgica	Ovinos	13.1	18/137	Geurden <i>et al.</i> , 2008
Australia	Ovinos	77.4	24/31	Santín <i>et al.</i> , 2008
México	Ovinos	33-35.5	136-146/412	Alonso <i>et al.</i> , 2005
Noruega	Lechones	8.3-31	26-57/684	Sofie <i>et al.</i> , 2007
Dinamarca	Porcinos	16-100	10-356/1237	Maddox <i>et al.</i> , 2005
República checa	Porcinos	21.1	87/413	Kvác <i>et al.</i> , 2009
Australia	Porcinos	22.1	64/289	Johnson <i>et al.</i> , 2008

Infecciones concomitantes de *Giardia* y *Cryptosporidium* se han observado en becerros de 30 días (De la parte *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008). La caracterización molecular de las especies y genotipos de *Cryptosporidium* y *Giardia* es esencial para identificar con precisión a los portadores de estas parasitosis con potencial zoonótico. Existen diferentes marcadores moleculares para genotipificar a este parásito y además, se han podido identificar subtipos en varias especies de *Cryptosporidium*. Tabla 7 (Brogolia *et al.*, 2008).

Tabla 7. Subtipos de *Cryptosporidium* en las especies domésticas.

País	Hospedero	Especie de <i>Cryptosporidium</i>	Subtipos	Autor
Alemania	Bovinos	<i>C. parvum</i>	IlaA1418G2R1 IlaA21G0R1 IlaA22G1R1 IlaA22G1	Brogolia <i>et al.</i> , 2008
Bélgica	Pequeños rumiantes	<i>C. parvum</i>	IlaA15G2R1 IIdA22G1	Geurden <i>et al.</i> , 2008
República checa	Porcinos	<i>C. suis</i>	IIAF115377 IIAF108861 IIAY271721	Kvác <i>et al.</i> , 2009 Johnson <i>et al.</i> , 2009

2.2.5 Importancia zoonótica de la criptosporidiosis

De las diferentes especies de *Cryptosporidium* se sabe que por lo menos siete tienen potencial zoonótico. Las especies que afectan al hombre son *C. parvum* y en pacientes inmunocomprometidos también por *C. baileyi* (Becerril *et al.*, 2004; Brogolia *et al.*, 2008). El ganado se infecta con cuatro especies: *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni*, y *C. cervine* (zoonóticas). *C. meleagridis* que infecta a pavos, se ha detectado en las heces

de humanos inmunocomprometidos e inmunocompetentes y se ha transmitido de un paciente infectado con diarrea a pollos, ratones, terneros y lechones. Algunas especies de *Cryptosporidium* parecen limitarse a un solo hospedero, como es el caso de *C. wrairi* que infecta cuyos y cerdo de guinea. Sin embargo otras pueden parasitar diferentes hospederos incluido el hombre (Brogolia *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

En humanos se han descrito grandes brotes asociados generalmente a deficiencias en los sistemas de potabilización del agua; el mayor descrito hasta la fecha se produjo en Milwaukee (USA) y afectó a 403.000 personas. En el Reino Unido se describieron 18 brotes en el período de 1989 a 1999 asociados con el agua contaminada con ooquistes. (Geurden *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2006; Jonhson *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004).

2.2.6 Mecanismos de infección

El mecanismo de infección es por fecalismo, se puede adquirir por la ingestión de por lo menos 30 ooquistes (De la parte *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006). La infección se transmite fundamentalmente por vía hídrica, alimentos contaminados con aguas residuales, cuerpos de agua (ríos y lagos), fómites y artrópodos (Díaz *et al.*, 2003; Fayer, 2009; García *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2008).

2.2.7 Ciclo biológico

La fase infectante es el ooquiste y la dosis infectiva es desde 10 a 100 ooquistes (De la parte *et al.*, 2005; Fayer, 2009). El periodo de prepatencia varía de 2 a 14 días en la mayoría de los animales domésticos, mientras que el periodo de patencia es variable dentro de las diferentes especies de hospedadores y puede ser de varios días a meses. El periodo de incubación puede ser de 5 hasta 30 días. Los becerros son más susceptibles en los primeras semanas de vida (De la parte *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2004).

El ciclo es directo y se completa en un solo hospedero (Wang *et al.*, 2007). Después de la ingestión de los ooquistes, con agua o forraje contaminado, el pH ácido del estómago, pH alcalino del intestino delgado, enzimas, sales biliares, estrés osmótico y agentes oxidantes contribuyen en la ruptura de la pared de los ooquistes y salen cuatro esporozoítos. Éstos liberan el contenido de sus micronemas e invaden a los enterocitos, se forma una vacuola parasitófora que mantiene al parásito dentro de la célula, pero, fuera del citoplasma, esta unión origina lo que se conoce como organelo alimentador, el

cual mantiene unido al parásito con el enterocito y probablemente se encarga del intercambio de materiales entre ambas células para que sobreviva. El esporozoíto se convierte en trofozoíto y en 16 horas se transforma en esquizonte (célula octanucleada con reproducción asexual por fisión múltiple) que dará lugar a la merogonia (meronte tipo I). Se rompe el enterocito y libera a los ocho merozoítos, éstos vuelven a invadir a otros enterocitos y repiten la merogonia, cada uno forma otro meronte, llamado meronte tipo II en 24 horas (son ligeramente más esféricos). Comienza la gametogonia (fase de reproducción sexual), de esta segunda generación de merontes solo se producen cuatro merozoítos (que son más pequeños). Salen los merozoítos (tipo II) y se diferencian en macrogametocito o microgametocito (36 a 48 horas). Los microgametocitos contienen hasta 16 núcleos los cuales migran hacia la periferia, brotan y adquieren forma de bala y se convierten en nuevas formas llamadas microgametos que tienen un núcleo compacto y central rodeados de microtúbulos. Los macrogametocitos solo tienen un núcleo, se agrandan y sintetizan gránulos de amilopectina y cuerpos formadores de pared para transformarse en macrogametos. El microgameto fecunda al macrogameto y en aproximadamente 72 horas se forma el cigoto, dando paso a la formación del ooquiste inmaduro y éste al ooquiste maduro. Se ha observado la presencia de dos tipos de ooquistes: a) con pared delgada que tienen la capacidad de desenquistarse dentro del intestino e invadir nuevamente células epiteliales y así multiplicar la parasitosis principalmente en individuos inmunocomprometidos (autoinfección interna), b) con pared gruesa que salen con las heces y que son altamente resistentes (Becerril *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2009; Olson *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008). Figura 3.



Figura 3. Esquema de un ooquiste de pared delgada (a) y un ooquiste de pared gruesa (b). Modificado de Ortega *et al.*, 2008.

En los bovinos *C. parvum* y *C. andersoni* invaden las células superficiales de la mucosa del intestino y del abomaso respectivamente, este ultimo invade las glándulas peptídica y pilórica causando dilatación (Fayer, 2004; Hijjawi *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2008). Figura 4.

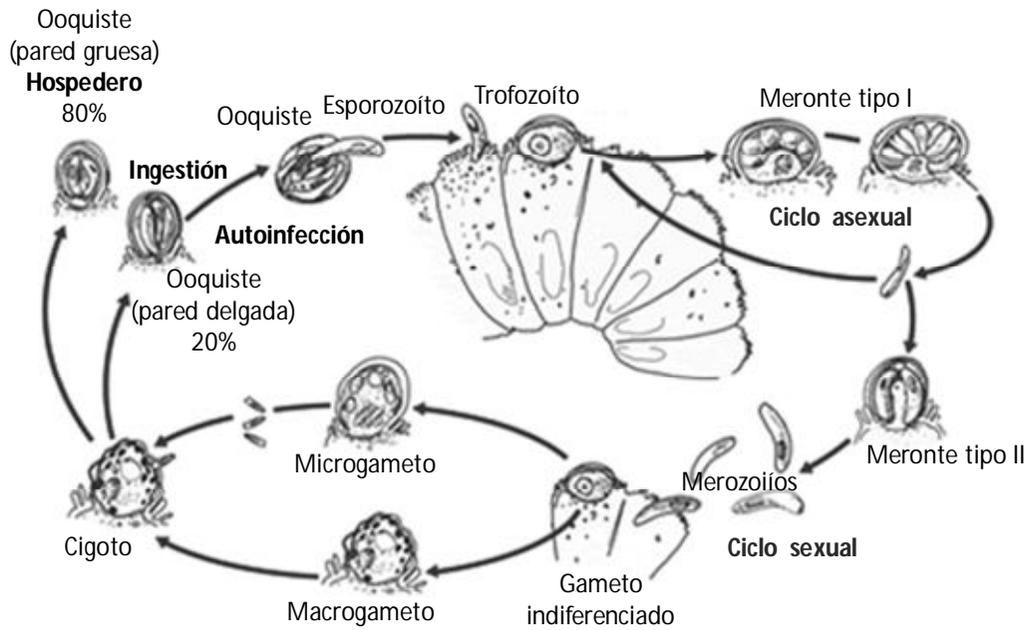


Figura 4. Esquema del ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp (Ortega *et al.*, 2008).

2.2.8 Mecanismos patogénicos

Se desconocen los mecanismos mediante los cuales *Cryptosporidium* produce diarrea, pero se han sugerido algunos:

- a) Adhesión del parásito a los enterocitos.
- b) Invasión celular: Después de la ingestión de los ooquistes, salen los esporozoítos que invaden y se multiplican en las células epiteliales (enterocitos), cuando se forman los esquizontes se rompen los enterocitos y de esta manera se destruye el epitelio.
- c) Producción de una enterotoxina: Esta colonización produce atrofia leve o moderada de las vellosidades y microvellosidades lo que ocasiona una enteritis con pérdida de la superficie de absorción y por lo tanto diarrea (Cordero *et al.*, 1999; De la parte *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2004; Radostits *et al.*, 2002). Existe disminución de enzimas unidas a la membrana como la lactasa, maltasa, etc.

El hospedero intenta reemplazar las células dañadas mediante hiperplasia de las criptas epiteliales e infiltrado inflamatorio de la lámina propia con polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas (Cordero *et al.*, 1999; De la parte *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2009). Las células dañadas, que son sustituidas por células nuevas cuya funcionalidad absorbente y enzimática es menor, son secretoras de iones de Cl⁻. Lo que rompe el balance absorción-secreción, entonces el equilibrio se inclina al lado secretor. El cuadro puede agravarse por el paso de fluidos de la vellosidad a la luz intestinal

debido al aumento en la presión osmótica por el acumulo de nutrientes en el epitelio intestinal.

Probablemente una toxina del parásito induce el reclutamiento de células inflamatorias y citoquinas que pueden producir un aumento en la respuesta secretora (De la parte *et al.*, 2005; Cordero *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2009; Radostits *et al.*, 2002). Se ha postulado que el factor de necrosis tumoral (α -FNT) podrían estimular a los fibroblastos y otras células del epitelio y producir prostaglandinas (PGE_2), lo que a su vez, estimularía la secreción de cloro e inhibiría la absorción de cloruro de sodio (Na^+Cl^-) (Cordero *et al.*, 1999; De la parte *et al.*, 2005; Ortega *et al.*, 2009). El exceso de secreción y la pérdida de la superficie de absorción produce deshidratación en el hospedero, ésta es ocasionada por la pérdida excesiva de agua y electrolitos, que juegan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis; y puede conducir a problemas cardiacos debido a que ocasiona aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria para compensar la disminución del volumen del plasma y de la presión sanguínea. La pérdida brusca de la circulación sanguínea eficaz ocasionada por la rápida disminución del tono de los vasos sanguíneos desencadena el colapso cardiovascular.

2.2.9 Cuadro clínico

En los animales los signos clínicos son diarrea de color amarillo pálido, acuosa y en ocasiones con moco, pérdida de peso que puede llevar a la muerte de los neonatos. También presentan letargia, anorexia, depresión, colapso cardiovascular y muerte por deshidratación. Los que se recuperan, pueden sufrir un impacto negativo inicial sobre la producción, debido a la pérdida de peso o al poco peso ganado. La infección es más grave en ganado productor de carne, produciendo una mortalidad de hasta 30% (De la parte *et al.*, 2005; Geurden *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2007).

En los humanos los signos clínicos son diarrea tipo coleriforme, puede haber presencia de moco, dolor abdominal, náuseas, fiebre y astenia. La diarrea varía de acuerdo al estado inmunológico del hospedador, en inmunocomprometidos la diarrea es aguda acuosa, fulminante y generalmente lleva a la muerte. En los casos de inmunosupresión grave, el microorganismo puede invadir conductos biliares y produce fiebre, ictericia, dolor en hipocondrio derecho y vómito. En los pacientes con SIDA también puede invadir pulmón, páncreas y conductos biliares y producir colecistis alitiásica

(inflamación aguda de la vesícula en ausencia de cálculos, sinonimia colecistis necrotizante) (De la Parte *et al.*, 2005).

2.2.10 Diagnóstico

Se cuenta con varias técnicas para la detección de esta parasitosis (De la parte *et al.*, 2005; Brogolia *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2009).

- Coproparasitoscópicos directo en fresco o concentración: por el tamaño de los ooquistes estas técnicas son poco confiables, excepto, cuando la muestra es muy acuosa y contiene poco detritus o cuando el laboratorista tiene la experiencia suficiente para poder discriminarlos de artefactos o estructuras vegetales.
- Tinción de Ziehl Neelsen modificado o Kinyoun: Facilita la identificación de los ooquistes, ya que se tiñen de color rojo intenso (ácido-alcohol resistente) en un fondo azul o verde
- ELISA: Detección de coproantígenos: se emplean regularmente los kits comerciales.
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Detección de coproantígenos, se emplean kits comerciales.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): para determinar la especie y genotipo involucrado en la criptosporidiosis.

2.2.11 Tratamiento

Se utilizan varios fármacos; sin embargo, en la actualidad no se dispone de un fármaco que sea realmente eficaz para el tratamiento de la criptosporidiosis en animales y humanos (De la parte *et al.*, 2005; Ortega *et al.*, 2009).

Paramomicina es un amoniglucosido que a dosis de 25-100 mg/kg ha mostrado disminución en la excreción de quistes y disminución de la severidad de la diarrea en becerros y cabritos.

Azitromicina es el más activo de los macrólidos, actúa en la fracción 50s de subunidad ribosomal e interviene con la síntesis de proteínas; se emplea a dosis de 30 mg/kg en caninos (Olson *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2009).

Nitazoxanida es un quimioterapéutico utilizado en el tratamiento de la criptosporidiosis intestinal, mostró eficacia en estudios realizados en pacientes con SIDA y recuentos de linfocitos CD⁴ mayores de 50/mm. La dosis recomendada es de 500 a 1000 mg dos veces al día durante 15 días.

Roxitromicina, se ha propuesto para el tratamiento para la criptosporidiosis, a dosis de 300 mg dos veces al día durante 4 semanas. En humanos se ha observado que elimina la diarrea después de 2-10 días de tratamiento y hay reducción en la excreción de ooquistes.

2.2.12 Medidas preventivas

El suministro de calostro es hasta hoy en día una medida profiláctica de elección pues contiene una alta concentración de inmunoglobulinas IgG. El calostro hiperinmune ha demostrado que reduce la diarrea y la excreción de ooquistes en becerros y corderos (Cordero *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2008).

Los becerros productores de carne que ingieren leche de la madre, son protegidos; siempre y cuando la madre haya tenido una exposición previa al parásito.

El problema se incrementa en el ganado productor de leche porque son alimentados con leche a granel con bajas concentraciones de anticuerpos. La dieta en sí podría tener un papel importante en evitar el establecimiento de la infección y reducir la gravedad de los signos clínicos, porque una dieta mal balanceada conllevaría a desnutrición y esto puede disminuir las defensas del hospedero y hacerlo más susceptible a la infección (Olson *et al.*, 2004).

Se ha mostrado que los ooquistes son extraordinariamente resistentes a las técnicas usuales de filtración y cloración del agua destinada para consumo humano. En un estudio en Sonora, México se encontró que los ooquistes son resistentes a los procedimientos comunes de potabilización y a concentraciones de hasta 80 mg/l de cloro.

Los filtros comunes no son de utilidad pues permiten el paso de este parásito, se deben emplear filtros especiales de 1 μm de diámetro. En la actualidad los métodos de desinfección más usuales son la filtración, cloración, el uso de ozono y rayos UV.

Es importante resaltar que los ooquistes en un ambiente húmedo pueden mantenerse viables hasta por seis meses e incluso años, pues resisten temperaturas bajo cero (De la parte *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2003; Fayer, 2004; Fayer, 2009; Huang *et al.*, 2006).

En humanos se debe fortalecer el hábito de lavado de las manos con agua y jabón antes de comer, preparar alimentos, atender niños o pacientes, al llegar al hogar procedente del trabajo o de cualquier otra actividad, después de la micción o defecación y de tocar animales; así como hervir o filtrar el agua de beber sirven para prevenir posibles infecciones (De la parte *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACION

En nuestro país existen enfermedades parasitarias zoonóticas de gran importancia para la salud pública y en los últimos años han aumentado su frecuencia. El incremento de las zoonosis tiene particular importancia debido a que el hombre ha modificado los ecosistemas naturales: invade hábitats, los contamina con materia orgánica, contamina los cuerpos de agua y puede ser diseminador de parasitosis que afectan a los animales de granja; aunque, también los animales de granja son portadores y diseminadores de parásitos que pueden infectar al hombre.

Los protozoarios *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp se han identificado en una amplia gama de hospederos mamíferos, incluido el hombre. Estas parasitosis producen diarrea y mala conversión alimenticia, con la consecuente baja en la ganancia en peso y pérdidas económicas para los productores. En países desarrollados existen reportes de la prevalencia de estos parásitos en animales de granja y es variable; en contraste, no hay reportes de la prevalencia de estas parasitosis en granjas del estado de México, por tal motivo, es necesario realizar estudios que permitan conocer la prevalencia de estas parasitosis en animales de granja.

4. OBJETIVOS

- Determinar la prevalencia de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp en animales de granja (bovinos, porcinos y ovinos).
- De las muestras positivas a *Giardia* identificar el genotipo.

5. HIPÓTESIS

- La prevalencia de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp en animales de granjas del estado de México será mayor a las registradas en granjas de países industrializados.

6. METODOLOGÍA

6.1 Para cumplir con los objetivos se diseñó la siguiente estrategia. Fig.5

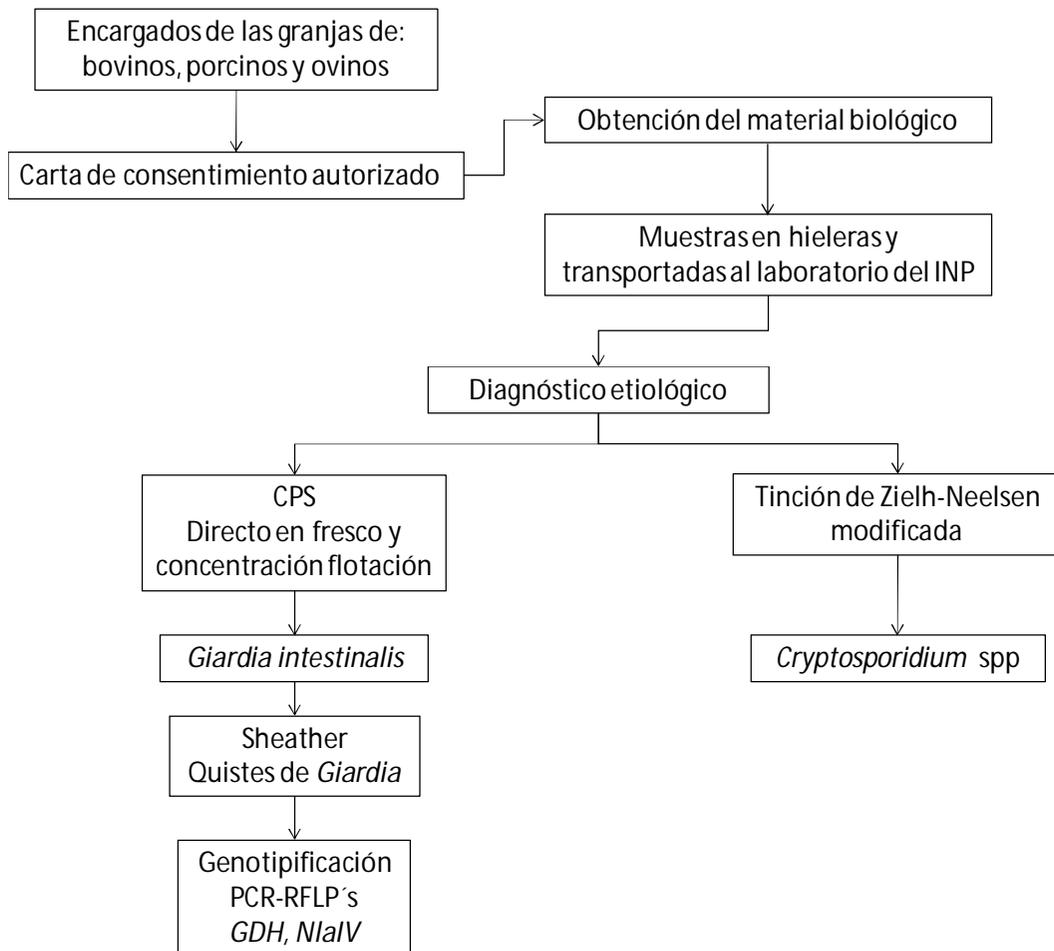


Figura 5. Esquema de la estrategia que se siguió para cumplir con los objetivos.

PCR= reacción en cadena de la polimerasa. RFLP'S= polimorfismos de los fragmentos de restricción. GDH= glutamato deshidrogenasa. *Nla IV*= enzima de restricción.

6.2 Diseño experimental

Se llevo a cabo un muestreo transversal (se tomó una sola muestra del recto de los animales en una sola visita a cada explotación) en cada una de las granjas.

6.3 Carta de consentimiento autorizado

Se obtuvo la carta de consentimiento autorizado de las personas encargadas de las granjas de bovinos, porcinos y ovinos.

6.4 Obtención de material biológico

El muestreo se realizó de septiembre del 2008 a febrero del 2009. Las muestras se obtuvieron directamente del recto con guantes de palpación, se colocaron en hieleras con refrigerante, se trasladaron al Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría y se mantuvieron a 4 °C hasta el momento que se procesaron. Figura 6.



Figura 6. Obtención de material biológico de ovinos.

6.5 Características de las granjas

Bovinos: La explotación de ganado lechero está ubicada en San Sebastián Xhala, municipio de Cuautitlán en la zona norte del estado de México. La explotación emplea un sistema semi-intensivo, piso de concreto e instalaciones semi-tecnificadas. Los becerros pre-destete se encontraban en jaulas de madera en un área cerrada y con poca ventilación, los bovinos adultos (hembras, machos y becerros menores de 6 meses) en corrales con piso de concreto, camas de tierra y cercos de metal, los bebederos y comederos son de concreto. En los corrales se separa el ganado de acuerdo a la etapa de producción: altas productoras, bajas productoras, vacas secas, becerros, pía de cría y reemplazos.

Los animales son de raza Holstein-Fresian alimentados con alfalfa achicalada, heno de avena complementado con sistema de pastoreo y agua a libre consumo. Figura 7. Se

tiene un buen manejo de esquemas de vacunación, se aplica vacunación contra leptospirosis y desparasitación con algunos bencimidazoles como albendazol, ivermectina y closantel. Los corrales se limpian a diario con un tractor y se depositan en el estercolero que se encuentra aproximadamente 4 m de distancia de los corrales. El estiércol se vende o se utiliza como abono para el campo.



Fig. 7. A) Instalaciones (granja de bovinos), B) Ganado lechero Holstein-Fresian y C) Instalaciones para becerros 1-6 semanas.

Porcinos: Se trabajó con dos explotaciones que se localizan en la zona centro del estado de México. 1) Granja en Xonacatlán y 2) Granja en Coatlán.

Son explotaciones intensivas de ciclo completo, piso de concreto e instalaciones semi-tecnificadas. Las instalaciones están divididas por diferentes áreas, en naves con cortinas laterales de lona, las instalaciones de maternidad tienen piso de concreto, calentadores y slatts, los cercos son de metal. Los cerdos destetados se encuentran en corrales con piso de concreto con comederos y bebederos de acero inoxidable y cuentan con capacidad para aproximadamente 20 animales. Las instalaciones de engorda tienen piso de concreto al igual que los comederos y bebederos, los animales en finalización se encuentran en jaulas individuales de metal. Los animales están divididos por atapa productiva: maternidad, destete, engorda (inicio, crecimiento y finalización), reproducción y pía de cría.

Son porcinos de la raza Yorkshire en diferentes etapas de su desarrollo, alimentados con concentrado y agua a libre consumo. Figura 8.

Las explotaciones tienen buen manejo de esquemas de vacunación: Parvovirus, Auyesky, Erisipela y *Leptospira* entre otras.

Para la desparasitación utilizan bencimidazoles y coccidiostatos que se van rotando. Cuentan con medidas de bioseguridad como tapetes sanitarios, área de cuarentena, restricción del acceso a visitantes y ropa exclusiva para la granja. Los corrales se limpian a diario, las excretas se depositan en el estercolero. El estiércol se vende o se utiliza como abono para el campo.



Fig. 8. A) Instalación de maternidad, B) Instalación de cerdos destetados y C) Instalación de cerdos de engorda.

Ovinos: La explotación se ubica en Magu, municipio de Tepozotlán al norte del estado de México.

Las instalaciones son rústicas, con piso de tierra y cuentan con un techo de lámina de aluminio al centro del corral.

Los ovinos son de diferentes razas, pero, predomina la Columbia. Los animales están distribuidos de forma mixta, en diferentes etapas de su desarrollo. Para la alimentación se utiliza el sistema de pastoreo, no se conocen las características del pasto debido a que no se cuenta con un área destinada para tal fin.

EL manejo de vacunación es deficiente (las vacunas no se almacenan a 4°C hasta el momento de su uso). La desparasitación es con ivermectina y closantel, sin rotación de principios activos. No se lleva a cabo un manejo sanitario de excretas. Figura 9.



Fig. 9. A) Instalaciones rusticas (granja de ovinos), B) Ovinos de zona norte del Estado de México.

Se realizó un muestreo representativo en las diferentes granjas para llevar a cabo un estudio transversal. Para el cálculo de la muestra se utilizó el paquete Epiinfo versión 2005. Se consideró un intervalo de confianza del 90%, margen de error del 10% y una frecuencia esperada del 35%

6.6 Técnicas para el diagnóstico de las parasitosis.

El material biológico se procesó mediante las técnicas coproparasitoscópicas (CPS) directo fresco y de concentración por flotación Faust para la búsqueda de *Giardia* y la tinción de Ziehl-Neelsen para *Cryptosporidium* (Manual del Laboratorio de Parasitología experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP)).

En el anexo A se describe el procedimiento que se llevó a cabo para la elaboración de las diferentes soluciones que se utilizaron en las técnicas.

6.6.1 CPS directo en fresco

OBJETIVO: Detectar trofozoítos de *Giardia*.

FUNDAMENTO: En una solución isotónica mantener a larvas de helmintos y trofozoítos y quistes de protozoarios para su observación microscópica.

MATERIAL:

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Aplicador de madera.
- Solución salina de fosfatos (PBS). Ver anexo A.
- Lugol parasitológico. Ver anexo A.
- Microscopio óptico.

DESARROLLO:

- a) En un extremo del portaobjetos se colocó una gota de PBS, en el otro extremo se colocó lugol parasitológico (con 2-4 mm de separación).
- b) Con un aplicador se tomó una pequeña cantidad de muestra (0.5g), (introduciendo el aplicador en la muestra en repetidas ocasiones).
- c) Se homogeneizó con una gota de PBS y después con una de lugol, sobre el portaobjetos.
- d) Se eliminaron las partículas de mayor tamaño del portaobjetos.
- e) Se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio.

6.6.2 CPS de concentración flotación Faust

OBJETIVO: Detección de quistes de *Giardia*.

FUNDAMENTO: Mediante un proceso de concentración flotación por diferencia de densidades, obtener quistes y ooquistes de protozoarios, y huevos de nematodos y cestodos.

MATERIAL:

- Copropacs (contenedor y colador comercial que se ensamblan)
- Centrífuga
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Asas bacteriológicas
- Solución saturada de sulfato de zinc (densidad de 1.80). Ver anexo A.
- Lugol parasitológico.
- Agua destilada.
- Abatelenguas.
- Microscopio óptico.

DESARROLLO:

- a) Se colocaron de 2 a 3 g de materia fecal en el copropac.
- b) Se añadieron 10 a 15 ml de agua destilada y se homogeneizó.
- c) Se vertió el contenido en tubos de 13 X 100.
- d) Se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto.
- e) Se decantó el sobrenadante y se añadieron 6 ml de agua en el tubo, se centrifugó a 1000 rpm por 1 minuto. (El procedimiento se repitió de dos a tres veces)
- f) El precipitado se resuspendió con sulfato de zinc y se centrifugó a 1500 rpm.
- g) Con el asa bacteriológica se tomó una muestra de la superficie del menisco y se colocó sobre el portaobjetos, se añadió una gota de lugol y se observó al microscopio.

6.6.3 Tinción de Zielh-Neelsen modificada

OBJETIVO: Identificar ooquistes de *Cryptosporidium*.

FUNDAMENTO: Los ooquistes de *Cryptosporidium* se tiñen de color cereza y contrastan con un fondo verde brillante.

MATERIAL:

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Solución estéril PBS
- Aplicadores de madera
- Fucsina saturada. Ver anexo A.
- Verde brillante (cambio de colorante azul de metileno por verde brillante). Ver anexo A.
- Alcohol ácido al 2%
- Metanol absoluto
- Horno Pasteur

DESARROLLO:

- a) En un portaobjeto se colocó una gota de PBS.
- b) Con el aplicador de madera se tomó una pequeña cantidad de muestra y se mezcló con el PBS del portaobjetos.
- c) La muestra se pre-fijó por calor (40°C) por 1 minuto.
- d) Se post-fijó con metanol.
- e) A la laminilla se le colocó papel filtro y la Fucsina saturada, se aplicó calor hasta la emisión e vapores (durante 20 minutos).
- f) Se decoloró con 2-5 gotas de alcohol ácido al 70:1. Posteriormente se lavó con agua de la llave.
- g) El portaobjetos se dejó escurrir por 1 minuto y se contrastó con el colorante verde brillante por 1-2 minutos.
- h) Se lavó a chorro de agua y se dejó secar.
- i) Posteriormente se observó al microscopio óptico a 100x.

6.6.4 Técnica de Sheather

OBJETIVO: Concentrar quistes de *Giardia*.

FUNDAMENTO: Mediante la utilización de gradientes se concentran los quistes de *Giardia* que se utilizaron para la genotipificación.

MATERIAL:

- Copropacs
- Soluciones de trabajo I y II. Ver anexo A.
- Centrifuga.
- Tubos cónicos de plástico de 15 ml.
- Portaobjetos, cubreobjetos y microscopio óptico.

DESARROLLO:

- a) La muestra con *Giardia* se homogeneizó en un copropac, con agua destilada. Se filtró y se vertió en un tubo de ensayo.
- b) Se centrifugó a 3500 rpm. El sobrenadante se decantó, al precipitado se le agregó más agua, se homogeneizó y se centrifugó. (El procedimiento se repitió dos veces).
- c) El precipitado se resuspendió en 3 ml de agua destilada.

Gradientes (ver anexo A):

A) Solución I

B) Solución II

1. En tubos cónicos de 15 ml, se colocaron 4.0 ml de la solución I.
2. Con una pipeta Pasteur se agregaron 5.0 ml de la solución II (deslizándola por las paredes del tubo).
3. Se añadieron 500 µl de la muestra de heces (deslizándola por las paredes del tubo).
4. Se centrifugó a 4000rpm, durante 30 min.
5. De cada uno de los tubos se aisló el anillo superior, se lavó con agua destilada, los quistes se concentraron, se monitorearon y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

6.6.5 Caracterización molecular: *Giardia intestinalis*

Lisis de quistes y obtención del DNA

Los quistes se lisaron por métodos físicos (tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido-descongelación en un baño a 37°C) y químicos (en solución de lisis con proteínasa K y amortiguador “Tissue lysis buffer” ATL) los tubos se incubaron toda la noche a 56°C.

Los ácidos nucleicos se obtuvieron con extracciones mediante el kit Qiagen (siguiendo las instrucciones del proveedor). Brevemente, para eliminar el RNA se añadieron 5.0 µl (50µg/mL) de RNA-sa y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Se añadieron 200µl del amortiguador “Lysis buffer” AL, se incubó a 70°C por 10 minutos, se añadieron 200 µl de etanol absoluto; esta solución se vertió en las columnas y tubos colectores y se añadieron 500 µl del amortiguador “Wash buffer 1” AW1 y se centrifugó a 6000 g por 1 minuto, inmediatamente después se añadieron 500 µl del amortiguador “Wash buffer 2” AW2 y se centrifugó a 20,000 g por 3 minutos. El DNA se eluyó con 50 µl de amortiguador “Elution buffer” AE y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el DNA de los quistes de *Giardia* de dos ovinos se amplificó un segmento de 430 pb del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (Read *et al.*, 2004).

El volumen final de la mezcla de la reacción contenía: MgCl₂, 1.5 µM; dNTP's, 200 µM; oligonucleótidos, 12.5 µM; DNA taq polimerasa (Roche), 0.625 unidades; y DNA de quistes de *Giardia*, 100 ng. El control negativo contenía toda la mezcla de la reacción, excepto el DNA de *Giardia*. El control positivo fue: DNA de *Giardia* de dos aislados obtenidos de pacientes pediátricos.

La primera amplificación fue con los oligonucleótidos: externo GDHef: TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT, reverso GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT CTC C. La segunda amplificación (anidada) fue con los oligonucleótidos: interno GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG y el reverso GDHiR.

Condiciones para la PCR: una etapa de desnaturalización a 94°C por 2 min, 2 ciclos a 56°C por 1 min, 72°C por 2 min y 72°C por 2 min; seguido de 55 ciclos a 94°C por 30 seg, 56°C por 20 seg y 72°C por 45 seg, y un ciclo de extensión a 72°C por 7 min.

El producto que se obtuvo se corrió en un gel de agarosa al 1%, con 0.750 µg/ml de bromuro de etidio, en amortiguador “Tris boratos” TBE a 30 milliamperes, 60 volts y 10 watts, durante 60 minutos.

Polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP)

Para la restricción, 10 microlitros de los productos amplificados mediante la PCR se incubaron toda la noche a 37°C, con 5 unidades de la enzima *Nla IV* (New England Biolabs) en el amortiguador correspondiente. Los productos generados se identificaron en geles de agarosa de alta resolución al 2%, en amortiguador de tris boratos EDTA (TBE) y teñidos con 0.5µg/ml de bromuro de etidio, a 50 milliamperes, 100 volts y 10 watts; las bandas se visualizaron en un sistema de registro “Biomaging systems Epichemi³ darkroom”.

7. RESULTADOS

El muestreo se realizó de septiembre de 2008 a febrero de 2009, se analizaron 237 muestras de heces de ovinos, bovinos y porcinos que se obtuvieron directamente del recto.

7.1. Prevalencia de *Giardia* en ovinos

Se obtuvieron 50 muestras de ovinos en sus diferentes etapas de desarrollo: destete, en crecimiento y adultos. La prevalencia de la giardiasis fue del 18%. Tabla 8. Considerando el muestreo general: ovinos, bovinos y porcinos, la prevalencia total fue del 3.8%. Tabla 9. Típico quiste de *Giardia* que se obtuvo de un ovino. Figura 20 y lámina 1.

Tabla 8. Prevalencia de *G. intestinalis* en las diferentes etapas de desarrollo de ovinos.

Etapas	Tamaño de la población	<i>Giardia</i> (%)
Destete	8	3 (37.5)
Crecimiento	16	2 (12.5)
Adultos	26	4 (15.3)
Total	50	9 (18)

Tabla 9. Prevalencia de *G. intestinalis* en las diferentes especies domésticas.

Especie	Tamaño de la población	Prevalencia (%)
Bovinos	39	0
Porcinos G1	72	0
Porcinos G2	76	0
Ovinos	50	9 (18)
Total	237	9 (3.8)

G1=granja Xonacatlán, G2=granja Coatlán.

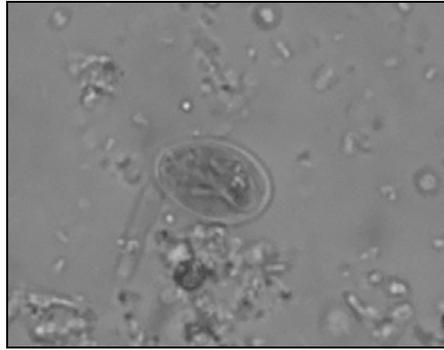


Figura 10. Microfotografía que muestra un quiste de *G. intestinalis* obtenido de un ovino.

7.2 Caracterización molecular de *G. intestinalis*

Se genotipificaron dos de las nueve muestras de ovinos con *Giardia*. En la amplificación del gen de la enzima glutamato deshidrogenasa (*gdh*) se obtuvo un producto de ≈ 430 pb. Fig. 11. La restricción con la enzima *Nla IV* generó las bandas de 80, 100 y 220 pb que son características del genotipo “E” específico de animales de granja. Fig. 12.

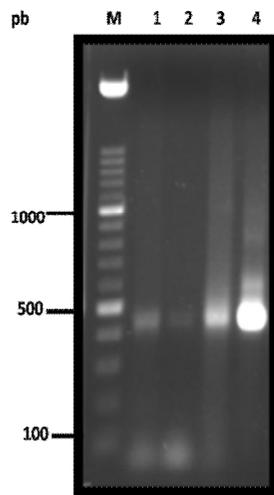


Fig. 11. Amplificación de un segmento de ≈ 430 pb del gen de la glutamato deshidrogenasa (*gdh*) de *G. intestinalis*. (M) Escalera de 100 pb, carriles 1 y 2 controles positivos, carriles 3 y 4 DNA de *Giardia* de dos ovinos.

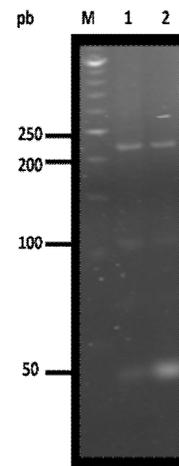


Fig. 12. Restricción del producto amplificado del gen de la *gdh* con *Nla IV*. (M) Escalera de 50 pb. Carriles 1 y 2 DNA de *Giardia* con bandas de 80, 100 y 220 pb características del Ensamble “E”.

7.3 Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en bovinos

Se obtuvieron 39 muestras de bovinos en sus diferentes etapas de desarrollo: becerros, hembras pre y postparto, y adultos. La prevalencia de *Cryptosporidium* fue del 74.4%. Tabla 15.

Con la tinción de Ziehl-Neelsen los ooquistes de *Cryptosporidium* se observan de color rojo intenso en un fondo verde. Figuras 13 y 14 y lámina 2.

Tabla 15. Prevalencia de *Cryptosporidium* en las diferentes etapas de desarrollo de bovinos.

Etapa	Tamaño de la población	<i>Cryptosporidium</i> (%)
Becerro	13	8 (61.5)
Hembras (pp)	11	9 (81.8)
Adultos	15	12 (80)
Total	39	29 (74.4)

(pp)= pre y post-parto

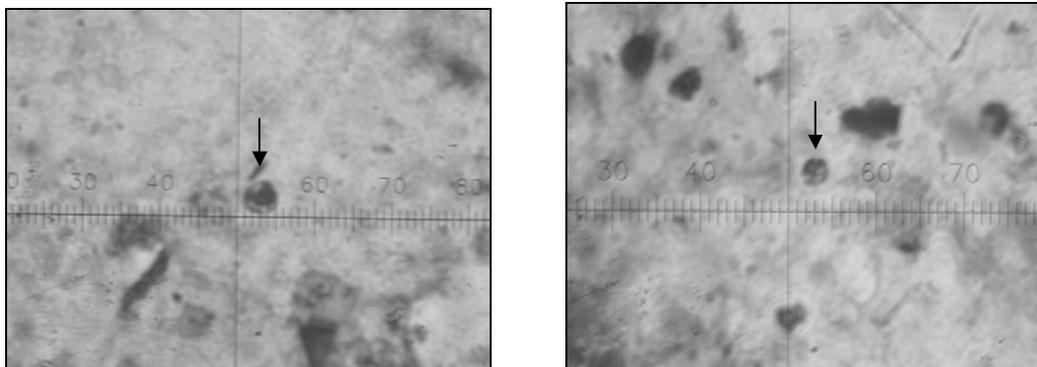


Fig. 13 y 14. Microfotografías que muestran ooquistes de *Cryptosporidium* que se obtuvieron de bovinos, teñidos con Zielh-Neelsen. $\approx 4 \mu\text{m}$ de diámetro. 100x. Cada línea corresponde a $1.0 \mu\text{m}$.

7.4 Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en porcinos

Se analizaron 148 muestras de porcinos de las dos granjas (Xonacatlán y Coatlán). Los porcinos fueron de maternidad, destete y engorda. En la granja Xonacatlán la prevalencia de *Cryptosporidium* fue del 1.3%, en la otra granja no se encontraron parásitos. Tabla 16, figura 15 y lámina 2.

Tabla 16. Prevalencia de *Cryptosporidium* en porcinos.

Granja	Xonacatlán	Coatlán	<i>Cryptosporidium</i> (%)
Etapa productiva	Maternidad	0/21	0
	Destete	0/24	0
	Engorda	1/27	0/26
Población total	1/72	0/76	1.3

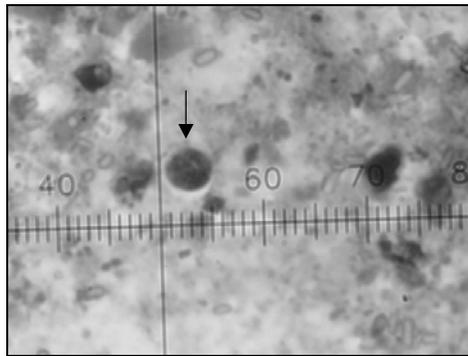


Fig. 15. Microfotografía que muestra un ooquiste de *Cryptosporidium* spp que se obtuvo de un porcino (100x). Cada línea corresponde a 1.0 μ m.

7.5 Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en ovinos

De los 52 ovinos (al destete, en crecimiento y adultos) se encontró una prevalencia de *Cryptosporidium* del 8%. Tabla 17. Ooquiste de *Cryptosporidium* que se obtuvo de un ovino. Figura 16 y lámina 2.

Tabla 17. Prevalencia de *Cryptosporidium* en ovinos.

Etapa	Tamaño de la población	<i>Cryptosporidium</i> (%)
Destete	8	0
Crecimiento	16	1 (6.2)
Adultos	26	3 (11.5)
Total	50	4 (8)

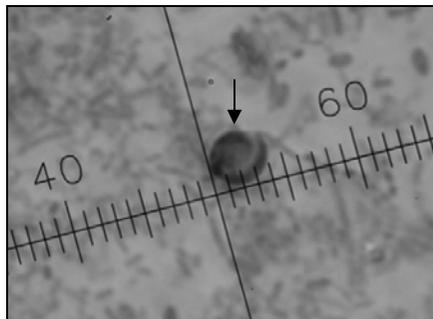


Fig. 16. Microfotografía que muestra un ooquiste de *Cryptosporidium* de un ovino. Cada línea de la regleta corresponde a 1.0 μm .

7.6 Prevalencia total de *Cryptosporidium* spp

La prevalencia total de *Cryptosporidium* en las tres especies de ganado (bovinos, porcinos y ovinos) fue del 14.3%. Tabla 18.

Tabla 18. Prevalencia de *Cryptosporidium* en todas las granjas.

Espece	Tamaño de la población	Prevalencia (%)
Bovinos	39	29 (74.4)
Porcinos G1	72	1 (1.3)
Porcinos G2	76	0
Ovinos	50	4 (8)
Total	237	34 (14.3)

G1=granja Xonacatlán, G2=granja Coatlán.

7.7 Prevalencia total de *Giardia* y *Cryptosporidium* spp

La prevalencia de las dos parasitosis en las 237 muestras analizadas se muestra en la figura 17.

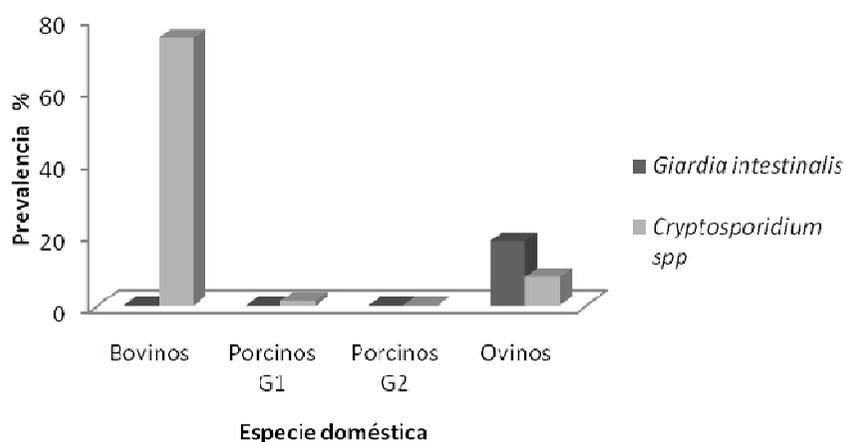


Figura 17. Prevalencia de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp en las diferentes granjas. G1=granja Xonacatlán, G2=granja Coatlán.

8. DISCUSIÓN

El resultado de este estudio es interesante porque se encontraron parásitos con potencial zoonótico (*Giardia intestinalis* o *Cryptosporidium* spp) en los animales de las granjas analizadas. La prevalencia de *Giardia* en ovinos fue del 18%, fue menor a la esperada (35%), y el análisis de la prevalencia de este parásito en las diferentes etapas de desarrollo fue mayor en los ovinos al destete (37.5%). El dato es importante porque estos ovinos son portadores y potentes diseminadores de esta parasitosis en la granja.

A nivel mundial la prevalencia de *Giardia* en ovinos oscila del 8.7 al 31%. La prevalencia que se encontró en este estudio fue mayor a la reportada en Australia 8.7% (Ryan *et al.*, 2005) y menor a la encontrada en Noruega (23-31%) y Bélgica (25.5%) (Robertson *et al.*, 2010; Geurden *et al.*, 2008). Es importante mencionar que fue semejante a la reportada en Italia 17.6% (Annunziata *et al.*, 2005). Hasta donde se sabe no hay reportes de la prevalencia de *G. intestinalis* en ovinos en México.

Las dos muestras genotipificadas correspondieron al genotipo/ensamble “E” que es característico de animales de granja (“Livestock”). Es significativo porque la genotipificación fue con el DNA obtenido directamente de los quistes de *Giardia*. A nivel mundial en muestras de animales de granja predomina el genotipo “E” que no es zoonótico, aunque, también se ha reportado el genotipo “A”, que es potencialmente zoonótico (Geurden *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2008; Santín *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2010). Debido a que únicamente se genotipificaron dos muestras de *Giardia*, no podemos afirmar que las muestras tuvieran genotipos/ensambles zoonóticos (“A” y “B”), pero tampoco podemos descartar que los tuvieran.

Aunque no se encontró *Giardia* en porcinos y bovinos de este estudio, es necesario considerar que los animales inmunocompetentes, aun cuando están infectados pueden no presentar manifestaciones importantes de la enfermedad; sin embargo, son portadores. La infección es clínicamente importante porque causa síndrome de mala absorción y por consecuencia podrían tener importancia económica ya que afecta el rendimiento y la conversión alimenticia. Se debe hacer un análisis económico del costo de esta infección en la producción de bovinos y porcinos de nuestro país y diferenciar el papel de los animales en la transmisión dentro de una explotación.

Fue significativo que los bovinos, porcinos y ovinos estuvieran infectados con *Cryptosporidium*, de tal forma que, las especies que se analizaron en este trabajo son potencialmente diseminadoras de esta parasitosis en las diferentes granjas.

La prevalencia de *Cryptosporidium* spp en bovinos fue de 74.4%, mayor a la esperada (35%) y mayor a la registrada por Maldonado *et al* (1998) en becerros de granjas del estado de México 20%, Hidalgo 28% y Jalisco 29%; y a la documentada en Aguascalientes que fue de 40% (García *et al.*, 2009). En otros países, la prevalencia es muy variada, por ejemplo, en Estados Unidos 1-59%, Dinamarca 14-84%, Bélgica 1-55% y Australia 6.7% (Fayer *et al.*, 2005; Maddox *et al.*, 2005; Geurden *et al.*, 2007; McCarthy *et al.*, 2008).

En este estudio, llama la atención que la prevalencia fue mayor (80%) en adultos que en becerros (61.5%). Nuestros resultados contrastan con otros reportes, en donde se encuentra mayor prevalencia en becerros menores de seis meses 96% y becerros mayores de seis meses 84%, que en hembras adultas 14% (Maddox *et al.*, 2005).

En relación a los ovinos la prevalencia de criptosporidiosis fue del 8%, menor a la esperada (35%). Con respecto a la etapa productiva, llama la atención que se haya encontrado mayor prevalencia en ovinos adultos 11.5%, que en ovinos en crecimiento 6.2% y que no se haya encontrado en ovinos al destete. Posiblemente la mayor prevalencia en ovinos adultos se debió al mayor número de muestras recolectadas en esta etapa, debido a que la distribución de la población no fue homogénea en esta explotación. En este trabajo se encontró una prevalencia muy baja, comparada al 34.3% que se reportó en otro estudio que se realizó en 37 granjas (ovinos) del estado de México, aunque ellos también encontraron una prevalencia ligeramente mayor en adultos (34%) que en corderos (33.5%) (Alonso *et al.*, 2005). Sin embargo, no está fuera del rango reportado a nivel mundial, donde se han registrado prevalencias que oscilan desde el 5 hasta el 77% en pequeños rumiantes. Por ejemplo, en Bélgica se reporta el 13.1% y en Noruega del 15-24% (Geurden *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2010).

De las dos granjas de cerdos analizadas, en la de Xonacatlán se encontró un 3.7% de *Cryptosporidium*, y en relación a las diferentes etapas de desarrollo de los porcinos, solamente se encontró en cerdos de engorda (1/27). También llama la atención que en la granja de Coatlán no se haya encontrado *Cryptosporidium*. Tabla 10.

La prevalencia que se encontró en porcinos de este trabajo fue muy baja (1.3%), por debajo de la esperada (35%); comparada con la reportada por Kvác *et al.* (2009) del 21.1%, por Johnson *et al.* (2008) que fue de 22.1% e incluso más baja que la reportada por etapa productiva, solo se encontró 1/27 de cerdos en engorda y de acuerdo a la etapa productiva se ha reportado una prevalencia de 8.3-31% en Noruega y de 10.6-32.7% en Dinamarca (Johnson *et al.*, 2008; Sofie *et al.*, 2007). Este trabajo es importante porque nos mostró la prevalencia de *Cryptosporidium* spp en dos zonas del estado de México, y cabe señalar que no existen informes que muestren la prevalencia de esta parasitosis en cerdos de México.

9. CONCLUSIONES

1.- En este estudio se mostró que los ovinos son portadores y diseminadores del genotipo “E” de *Giardia*, aunque no podemos descartar que también se encuentre el genotipo “A” y “B” (potencialmente zoonóticos) tampoco lo podemos afirmar, porque solamente se genotipificaron dos muestras.

2.- Es importante realizar estudios que hablen de prevalencia de *Giardia* en porcinos ya que en México no hay estudios.

3.-Las tres especies de animales domésticos, bovinos, porcinos y ovinos son portadoras y potencialmente diseminadoras de *Cryptosporidium* spp. Es importante señalar que a pesar de que la granja de bovinos es semi-tecnificada y con piso de concreto la prevalencia fue mayor que en las otras especies domésticas.

4.-Es necesario realizar más estudios, incrementar el tamaño de la muestra y genotipificar, para conocer los genotipos predominantes en este tipo de ganado y si es factible que se puedan correlacionar con el cuadro clínico.

10. REFERENCIAS

- Alonso MV, García AA, Salazar GF, Vazquez CJC, Pescador SN, Satijeral OJ. Prevalence of *Cryptosporidium spp* in asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. J Vet. Med. 2005;52:482-483.
- Alonso MU, Vazquez JC, Velazquez V, Pescador N, Saltijeral J. Sheep management and Cryptosporidiosis in central Mexico. Trop Anim Health Prod 2009;41:431-436.
- Annunziata G, Paoletti B, Iorio R, Traversa D. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* from sheep in central Italy. Parasitol Res 2005;96:32-37.
- Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. Vet Parasitol 2003; 112: 289-294.
- Ballwebwer LR. Veterinary parasitology. Publishing butrterworth-heinemann. EU 2001;208-217.
- Becerril FM. Parasitología Medica: de las moléculas a la enfermedad. Cap.2-3. Ed. McGraw-Hill, México D. F: 2004;37-96.
- Bomfim TCB, Huber F, Gomes RS, Alves LL. Natural infection by *Giardia sp.* and *Cryptosporidium sp.* in dairy goats, associated with possible risk factors of the studied properties. Vet Parasitol 2005:134;9-13.
- Brogolia A, Reckinger S, Cacció S, Nöckler K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany, Veterinary parasitology 2008:154;8-13
- Bruderer T, Papanastasiou P, Castro R, Köhler P. Variant cysteine-rich surface proteins of *Giardia* isolates from human and animal sources. Inf and immunity 1993:2937-2944.
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott GE. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. Parasitology. 2002;125:11-19.
- Cavalier-Smith TA. A revised six-kingdom system of life. Biol rev 1998;73:203-206.
- Cordero CMA. Parasitología veterinaria. McGraw-Hill, México D.F. 1999:982.
- De la parte MA, Bruzual E, Brito A, Hurtado MP. *Cryptosporidium spp* y Cryptosporidiosis. Rev Soc Ven Microbiol 2005:25:06-14.
- Díaz CME, Leyva MEE, Mata HV, Gonzalez RH. Incidencia y viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en el agua potable de Ciudad Obregón, Sonora, México. Rev. Int. Contam. Ambient. 2003;19(2);67-72.
- Eckmann L. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for Arginine as potential determinants of host defense against the lumen-welling pathogen *G. lamblia*. J immunol 2000;164(3):1478-1487.
- Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 2003;25:259-270.
- Farthing MJC, Pereira MEA, Keusch GT. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. Infec and immunity 1986:661-667.

- Farthing MJG. The molecular pathogenesis of Giardiasis. *J of pediatric gastroenterol and nutrition.* 1997;24:79-88.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126:37–56.
- Fayer R, Santín M, Trout JM, Greiner E. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2 year old dairy cattle in the eastern United States, *Vet parasitol* 2005;135:105-112.
- Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2009;03:005.
- Feng Y, Ortega Y, Cama V, Tenell J, Xiao L. High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol res* 2008;103:87-92.
- García MD, Cruz C, Quezada T, Silva E, Valdivia A, Vázquez S *et al.* Criptosporidiosis in dairy calves from Aguascalientes, Mexico: risk infection in relation with the season and months of sampling. *J Anim Vet Advan* 2009;8:1579-1583.
- Geurden TP, Berkvens D, Martens C, Casaert S, Vercruyse J. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology* 2007;134:1981-1987.
- Geurden TP, Casaert S, Vercruyse J, Claerebout E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium, *Vet Parasitol* 2008;155:142-145.
- Geurden TP. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp parasitol* 2010;124(1);98-106.
- Huang BD, MD, PhD, MPH, Clinton WA. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol clin* 2006;35;291-314.
- Ibarra VF, Vera MY, Alacalá CY. *Parasitología veterinaria: protozoarios*. Editorial Castel, México DF, 2009.
- Itagaki T, Kinoshita S, Aoki M, Itoh N, Saeki H, Sato N, Uetsuki J, Izumiyama S, Yagita K, Endo T. Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet parasitol* 2005;133;283-287.
- Jiménez GLF, Zavala G, Chávez MB, Ramos GMP, López VG, Segura VML, Montañez C, Hehl AB, Argüello GR, Ortega PG. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *Int jour parasitol* 2008;38;1297-1304.
- Jonhson J, Buddle R, Armson A, Ryan UM. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. *Exp parasite* 2008;119:418-421.
- Katellaris PH, Farting MJ. Diarrhoea and malabsorcion in giardiasis: A multifactorial process? *Gut* 1992;33:295-297.

- Keulen VH, Timothy MP, Wide S, Shaaf S, Wallis PM, Erlandsen SL. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet parasitol* 2002;108:97-107.
- Kvác M, Hanzlíková D, Sak B, Kvetonová D. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris*, and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic, *Vet parasitol*, 2009;160:319-322.
- Maddox HC, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs: occurrence and management associated risk factors, *Vet parasitol*, 2006;141:48-59.
- Maldonado CS, Atwill ER, Saltijeral OJA, Herrera ALC. Prevalence of and risk factors in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. *Preventive vet med* 1998;36:95-107.
- McCarthy S, Ng J, Gordon C, Miller R, Wyber A, Ryan UM. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in animals in irrigation catchments in the southwest of Australia, *Exp parasitol*, 2007: 118:596-599.
- Monis PT, Thompson RCA. *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonoses: fact or fiction? *Inf genetics and evol* 2003;3:233-244.
- Muller, D.D., Giles, M., Elwin, K., Smith, R.P., Clifton-Hadley, F.A., Chalmers, R.M. Distribution of *Cryptosporidium* species in cheep in the UK, *Vet parasitol*, 2008;154, 214-219.
- Narcisi EM, Paulin JJ, Fechheimer. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. *J. Parasitol* 1994;80(3):468-473.
- Nash ET, Mowatt RM. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5489-5493.
- O'Handley RM, Olson ME, Fraser D, Adams P, Thompson RCA. Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves from western Australia and Western Canada. *Vet parasitol* 2000;90:193-200.
- O'Handley RM, Buret AG, McAllister TA, Jelinski M, Olson ME. Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *Inter J parasitol* 2001;31:73-79.
- Olson ME, Guselle NJ, O'Handley RM, Swift ML, McAllister TA, Jelinski MD, Morck DW. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can vet j* 1997;38:703-706.
- Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parastol* 2004;20:185-191.
- Ortega YR, Eberhard ML. Protozoan diseases: Cryptosporidiosis, Giardiasis and other intestinal protozoan diseases. *Intern Encyclop Public Health* 2008:354-366.

- Ortega YR, Simone C, Fayer R, Mank TG, Smith HV, Thompson RCA. *Giardia* and *Cryptosporidium*: from molecules to disease. Ed CABI, London. 2009:483.
- Parenti MD. Characterization of Thiol Proteinase in *Giardia lamblia*. The J of infec diseases 1989;160(6):1076-1080.
- Ponce MM, Martínez GMN. 2008. Giardiosis en Becerril-Flores, M.A., y Romero-Cabello, R., Editores, Parasitología médica. Segunda Edición. Editorial, MacGraw-Hill, Interamericana, México. ISBN:970-10-4519-X; 49-57.
- Ponce MM, Peralta AG, Martínez GM. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico city. Vet parasitol 2005;131;1-4.
- Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa, España, 2002.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Medicina veterinaria: tratado de enfermedades del Ganado bovino, porcino, caprino y equino. 9ª ed. Ed. McGraw-Hill, México D.F. 2002;2.
- Read CM, Monis PT, Thompson A. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect, Gen and Evol 2004;4;125-130.
- Robertson LJ. *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in sheep and goats: a review of the potential for transmission to humans via environmental contamination. Epidemiol infect 2009;137;913-921.
- Robertson LJ, Gjerde BK, Furuseth HE. The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. Vet parasitol 2010;171(2);140-145.
- Ruiz CJG, Hernández ÁI. Farmacología para médicos veterinarios zootecnistas. 2ª ed. UNAM, FES-C. 2005.
- Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, Mcinnes L, Traub R, Besier B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. Applied and environmental microbial 2005;71;4992-4997.
- Sánchez VJ, Tay ZJ, Aguilar CA, Ruiz SD, Malagon F, Rodriguez CJ, Ordoñez MJ, Calderon RL. Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico city. Am. J. Trop. Med. Hyg 2006;(6):1095-1098.
- Santín M, Trout JM, Fayer R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. Vet parasitol 2007;146;17-24.
- Sofie HI, Kare GB, Forberg T; Jane RL. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. Vet parasitol 2007;144;222-233.
- Soulsby EJJ. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos, 7ª edición, ed. Interamericana, México D. F. 1987:586-621.

- Tay ZJ, Lara AR, Velasco CO, Gutiérrez QM. Parasitología medica. 7^a ed. Méndez Editores, México D. F, 2002.
- Taylor MA. Veterinary Parasitology. 3^a ed. publishing Blackwell. Oxford, 2007.
- Thompson RCA, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. The vet journal 2008:177;18-25.
- Wang R, Zhang L, Fena Y, Ning C, Jian F, Xiao L, Zhao J, Wang Y. Molecular characterization of a new genotype of *Cryptosporidium* from American minks (*Mustela vison*) in China, Vet parasitol, 2007:154:162-166.
- Xiao L, Fayer R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. Int J Parasitol 2008:38:1239-1255.

11. ANEXO A (Soluciones)

A) COPROPARASITOSCÓPICOS (CPS)

1.- EXAMEN DIRECTO EN FRESCO

Solución salina isotónica

Cloruro de sodio	8.5 g
H ₂ O	1000 ml

Lugol parasitológico

Yoduro de potasio	10 g
Yoduro cristaloides	5 g
H ₂ O	100 ml

a) Solución concentrada: se disolvieron 10 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua destilada y en se agregaron 5 g de yodo cristaloides, se agitó constantemente y posteriormente se almacenó en un frasco ámbar hasta su uso.

b) Solución de trabajo: se mezclaron volúmenes iguales 1:1 de la solución concentrada y agua destilada. (Nota, se sugiere evitar los frascos goteros por que el lugol los destruye, utilizar goteros especiales con tapón esmerilado).

2.- EXAMEN DE CONCENTRACIÓN FLOTACIÓN (FAUST)

Sulfato de zinc 1.180° Bé

Sulfato de Zinc	350 g
H ₂ O	500 ml

Se disolvió el sulfato de zinc en agua destilada, hasta ajustarla (con un densitómetro) a una densidad a 1.180° Bé y la solución se almacenó hasta su uso.

Lugol parasitológico (ver directo en fresco).

3.- TINCIÓN DE ZIELH-NEELSEN MODIFICADA

Colorante verde brillante al 0.5%

Verde brillante	0.5 g
Agua destilada	100 ml

El colorante verde brillante se colocó en un matraz de 250 ml, se agregó el agua, poco a poco mezclando constantemente, se filtró (con papel filtro), se colocó en un frasco gotero y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Colorante de carbol-fuscina

Pararosanilina	0.85 g
Fenol	2.5 g
Glicerol	5.0 ml
DMSO	5.0 ml
Etanol	5.0 ml
Agua destilada	75 ml

La pararosanilina se colocó en un matraz de 250 ml, se agregó el glicerol y se calentó (dos horas a 60°C), se dejó enfriar, posteriormente se adicionó el DMSO, etanol, agua destilada y se mezcló. Se almacenó a temperatura ambiente por 14 días para la estabilización del colorante. Posteriormente se filtró, se depositó en un frasco gotero y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Alcohol ácido

Etanol al 70%	98 ml
Ácido clorhídrico	2 ml

En un matraz de 250 ml se colocó el etanol al 70%, el ácido clorhídrico se agregó lentamente por las paredes del matraz y se mezcló. Se depositó en un frasco gotero y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

4.- TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN FLOTACIÓN (SHEATHER)

Solución concentrada de sacarosa

Sacarosa	500 g
Fenol	5 g
Agua destilada	320 ml

En un vaso de precipitados se colocó el agua, se adicionó la sacarosa lentamente y con agitación continua (agitador magnético). Al llegar al punto de saturación se agregó el fenol y el resto de la sacarosa. Se vació a un frasco de vidrio con tapón de rosca, se etiquetó y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Amortiguador de fosfatos (0.025M)

Fosfato de sodio monobásico	1.72 g
Fosfato de sodio dibásico	1.77 g
Agua destilada	500 ml

En un vaso de pp se colocaron 400 mL de agua, se adicionaron los fosfatos, se disolvieron con agitación continua y se ajustó a pH 7.0. Se aforó a 500 mL.

Amortiguador de fosfatos (0.025M) y Tween 80 (1%)

Amortiguador de fosfatos	99 ml
Tween 80	1 ml

Se mezclaron las soluciones (se agitó con cuidado, debido a que el Tween es un detergente). Se vació en un frasco de vidrio con tapón de rosca, se etiquetó y almaceno a 4°C hasta su uso.

5.- SOLUCIONES PARA LAS TÉCNCIAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

A) Amortiguador tris boratos con sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético (TBE 20x) 1000 ml

Tris base	121.0 g
Acido bórico	61.7 g
EDTA-Na ₂ *2H ₂ O (20.0 mM)	7.44 g
H ₂ O desionizada	1000.0 ml

Los reactivos se disolvieron en 800 ml de agua desionizada, se aforó a 1000 ml y se almacenó a temperatura ambiente.

B) Amortiguador TE (Tris/EDTA) 100 ml

EDTA-Na ₂ *2H ₂ O	93.05 g
H ₂ O desionizada	Aforar a 500ml

El EDTA se vació en un vaso de 600 ml, se agregaron 300 ml de agua, se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 M, se aforó a 500 ml y se esterilizó por autoclave.

C) RNAsa A

RNAsa A	10.0 mg
TE	1.0 ml

La RNAsa A se disolvió en 1.0 ml de TE, se alicuotó en 10 partes iguales (100.0 µl) y se almacenaron a -20° C hasta su uso.

D) Solución de Bromuro de Etidio (BrE) 10 mg/ml

Bromuro de etidio	50.0 mg
-------------------	---------

Agua desionizada esterilizada 5.0 ml

Se mezcló el bromuro con el agua, se depositó en un frasco de color ámbar y se almacenó a 4° C hasta su uso.

Este reactivo se utilizó para visualizar ácidos nucleícos (DNA y RNA) ya que emite fluorescencia cuando se excita con una longitud de onda de 250 a 310 nm. Se manejó con guantes y se evitó la inhalación, ya que es un reactivo altamente mutagénico y produce daño irreversible.

E) Gel de agarosa al 1%

Agarosa	300 mg
TBE	30.0 ml
BrE	0.5 µl

El molde para hacer el minigel se selló en los dos extremos laterales con cinta adhesiva (permacel) y se colocó el peine formador de pozos.

En un matraz de 100.0 ml se añadió la agarosa y el amortiguador TBE, se fundió la agarosa, se agregó el BrE, se mezcló evitando la formación de burbujas y se vació al molde en un ambiente de 4° C para que gelifique.

D) Proteínasa K

Proteínasa K.	10.0 mg
TE.	1.0 ml

La proteínasa K se disolvió en 1.0 ml de TE, se alicuotó en 10 partes (100.0 µl) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

E) Solución de lisis

Solución de lisis 5.0 ml.

Reactivo	Concentrada	Necesaria	Tomar
Tris pH 7.4	2.0 m	10.0 mm	25.0 µl
EDTA	0.5 m	10.0 mm	100.0 µl
NaCl	5.0 m	50.0 mm	150.0 µl
SDS	10.0%	0.4%	200.0 µl
H ₂ O			4525.0 µl
Proteinasa K	10.0 mg/ml	200.0 µg/ml	20.0 µl

En este orden se disolvieron los primeros cuatro reactivos, se aforó a 5.0 ml con agua desionizada y esterilizada. La proteínasa K se agregó en el momento de la lisis de los quistes.

12. ANEXO B (láminas en color)

Lamina 1. *Giardia intestinalis* en ovinos.

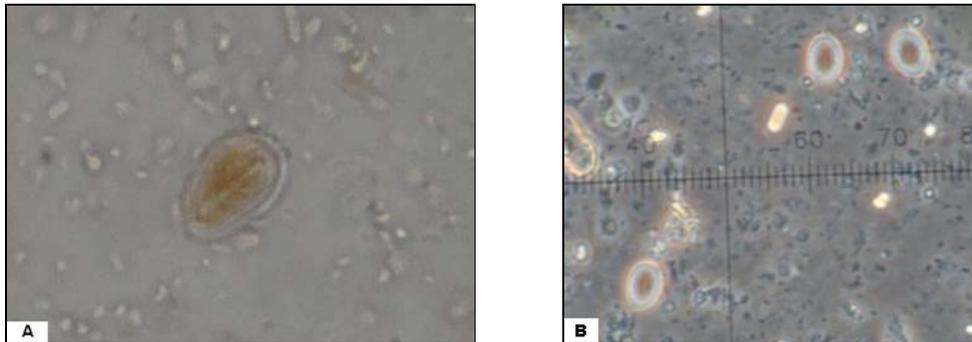


Fig. 18. A) Microfotografía que muestra un quiste de *G. intestinalis* teñido con lugol (40x). B) Quistes de *G. intestinalis* observados en contraste de fases (40x).

Lamina 2. *Cryptosporidium* spp en las diferentes especies domésticas (100x). Tinción de Zielh-Neelsen.

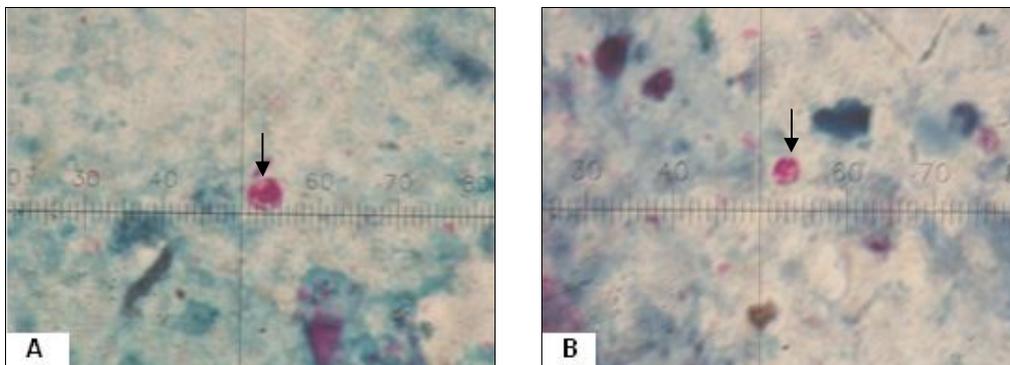


Fig. 19. Micrografías de ooquistes de *Cryptosporidium* obtenidos de bovinos, teñidos con Zielh-Neelsen. A) y B) Se observan estructuras esféricas (flechas), de color rojo, de $\approx 4 \mu\text{m}$ de diámetro (100x). Cada línea de la regleta es igual a $1.0 \mu\text{m}$.

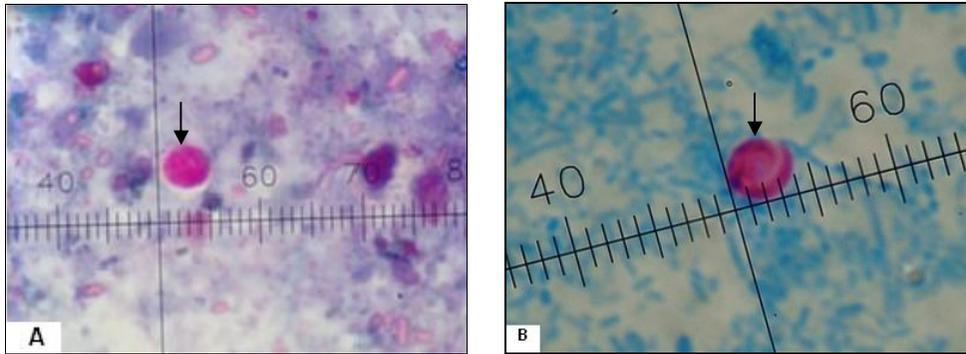


Fig. 20. Micrografías de ooquistes de *Cryptosporidium*. A) Ooquiste de *Cryptosporidium spp* obtenido de un porcino (flecha). B) Ooquiste de *Cryptosporidium spp* obtenido de un ovino (flecha). En ambos casos observados a 100X. Cada línea de la regleta es igual a 1.0 μ m.

Lamina 3. Fotografías de las granjas de las especies analizadas.



Fig. 21. a) Panorámica de la granja de bovinos. b) Ganado lechero Holstein-Fresian y c) Instalaciones para becerros 1-6 semanas.

Lamina 4. Granja e instalaciones de los porcinos.



Fig.22. A) Instalaciones de maternidad, B) Instalaciones de porcinos destetados y C) Instalaciones de porcinos de engorda.

Lamina 5. Granja e instalaciones de ovinos.



Fig. 23. A) Instalaciones rusticas y B) Ovinos de zona norte del Estado de México.