



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“ASOCIACIÓN ESPECIE/GENOTIPO DE *Cryptosporidium* Y
CUADRO CLINICO EN BECERROS MENORES DE TRES MESES
DE EDAD DE LA CUENCA LECHERA TIZAYUCA, HIDALGO”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
MVZ. LAURA ENEDINA SOTO SERNA**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. en C. MARTHA PONCE MACOTELA
(Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción
y de la Salud Animal, Instituto Nacional de Pediatría)**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. en C. PAZ MA. SILVIA SALAZAR SCHETTINO
(Facultad de Medicina, UNAM)**

**DR. en C. OSVALDO FROYLAN IBARRA VELARDE
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM)**

MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 2014

**"Cuando todo parezca estar en contra, recuerda:
los aviones despegan en contra
del viento y no a favor"**

Henry Ford

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a nuestra máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por darme el privilegio de realizar mis estudios dentro de sus programas e instalaciones.

A la Dra. Martha Ponce Macotela, mi directora de tesis, por la paciencia y atenta revisión de este trabajo, ya que sin su apoyo no hubiese sido posible llevarlo a cabo. Porque resolvió mis dudas y me apoyo cada vez que tuve un tropiezo. Me abrió las puertas del laboratorio de parasitología experimental del Instituto Nacional de Pediatría.

A el MVZ. Mario Santacruz, encargado de la unidad de diagnóstico de la Cuenca Lechera de Tizayuca quien me abrió las puertas, sin su ayuda no me hubiera sido posible muestrear a los becerros.

A mis amigos Esteban Cruz Gomes y Javier Ángeles Malagón, me acompañaron en los muestreos, y ayudaron en el proceso de recolección de muestras, no me dejaron sola y su ayuda siempre ha sido incondicional.

A Gustavo E. Peralta Abarca quien me ayudo en el diagnóstico e identificación morfológica de las muestras en fresco y en tinción.

A Aarón Rodríguez Caballero que siempre estuvo al pendiente de mí en el laboratorio, me apoyo, resolvió mis dudas, me ayudo en las técnicas de extracción de DNA y con los geles de poliacrilamida.

A Silvia Salazar Caballero que siempre tuvo la disposición de ayudarme, resolviendo mis dudas cuando las hubo, me enseñó la tinción de calcoflour y muchas otras técnicas para la preparación de mis reactivos.

A Yadira Rufino Gonzales que me siempre me dio ánimo para que terminará este trabajo.

A Mario N. Martínez Gordillo quien me dirigió en las técnicas de biología molecular.

A Carlos Alvares que siempre fue amable conmigo e incluso me ayudo muchas veces realizando mis obligaciones del laboratorio.

A mi comité tutorial: Dra. Paz Ma. Silvia Salazar Schettino y el Dr. Osvaldo Froylán Ibarra Velarde por sus observaciones y el tiempo que dedicaron en la revisión y evaluación de los tutorales.

A mis sinodales: Dra. Edda Scuitto Conde, Dr. Javier Ambrosio Hernández, Dr. Marco Muñoz Guzmán y al Dr. José Juan Martínez Maya por el tiempo que dedicaron en la revisión de este trabajo y las observaciones que me brindaron para enriquecerlo.

A los amigos que hice durante mi estancia en el laboratorio: Aarón Rodríguez, Berenice Gonzales, Diana Nolasco, Rocío Ruiz, Karina Clavijo, Ana Cruz, Candy Jiménez, Karina Nolasco, Cristian García, Uriel Martínez y todos los que no menciono pero tienen igual importancia, porque durante el desarrollo de la tesis me apoyaron de la forma en que pudieron.

A los amigos que hice mientras estudie la Maestría: Raquel Torres, Antonio Guzmán, Pedro Soria porque siempre estuvieron al pendiente de mí y me brindaron ayuda cuando fue necesario.

A mis amigos: Esteban Cruz, Javier Ángeles, Katy Tenorio, Luis Mendiola, Raúl Reynoso, Diana Montiel porque siempre me brindan su amistad sin esperar nada a cambio, me dan palabras de aliento, comparten su conocimiento y su apoyo.

A la beca que me otorgo el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Conacyt (no. 442888) durante mis estudios de Maestría.

A todos muchas gracias.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi esposo Diego J. Arreguín Díaz, porque siempre tuve su apoyo incondicional, comprensión en mis momentos difíciles, paciencia, palabras de aliento, noches en vela que paso a mi lado; porque incluso postergo sus anhelos para que yo terminara este proyecto. Quiero que sepas que este logro es también tuyo, porque tu apoyo fue un motor que me impulso día con día. Gracias a tu amor me siento feliz y dichosa.

A mis padres Edith Serna Mejía y Elías Soto Espino por el apoyo que me brindaron incluso ahora que ya no me encuentro dentro del seno familiar. Porque me enseñaron a ser perseverante y nunca dejarme caer aun ante momentos difíciles, ustedes hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños y no tengo forma de pagarles más que con amor y cariño. Esta tesis también es suya.

A mis amados hermanos, Mariana Soto Serna y Jesús Brandon Soto Serna, que son luchadores incansables y me dan fortaleza para seguir adelante cada que me siento abatida. Ellos creen que soy su ejemplo, sin embargo yo pienso que son el mío; porque siempre me alientan a seguir superándome y gracias a eso estoy terminando uno más de mis sueños.

A mis abuelos, que son el mayor tesoro de nuestra familia. A mi abuelo Luis Serna Rayo, quien deposita en mí sus esperanzas e ilusiones, y me brinda cariño. A mi abuela Guadalupe Espino Guzmán porque me ha motivado a ser día con día una mejor persona. Ustedes influyeron en mi madurez y sé que cada meta alcanzada por mí les causa alegría.

A todas las personas que quiero y que me quieren, que me han ayudado no sólo con este proyecto sino en todo momento, porque cuando las necesito siempre me han tendido la mano sobre todo cuando siento que el camino se termina.

Con todo mi cariño esta tesis es por ustedes.

Laura

Asociación entre especie/genotipo de *Cryptosporidium* y cuadro clínico en becerros menores de tres meses de edad, de la Cuenca Lechera Tizayuca, Hidalgo

1. Resumen

La criptosporidiosis es una parasitosis zoonótica que en bovinos produce diarrea acuosa, pérdida de peso, disminución de la producción láctea y afecta la conversión alimenticia con impacto negativo en la producción y pérdidas económicas para los productores. Debido a que los ooquistes de *Cryptosporidium* de diversos hospederos son morfológicamente semejantes es necesaria la caracterización molecular. En México hasta donde se conoce, existen pocos estudios, los cuales muestran una prevalencia de entre 3.19% y 75%; y solo se ha reportado la especie *C. parvum*. El objetivo es determinar la prevalencia de especies y/o genotipos de *Cryptosporidium* y signos clínicos en becerros menores de 3 meses. El tamaño de la muestra se determinó con un intervalo de confianza del 95%, margen de error del 5% y una frecuencia esperada del 10%. Se obtuvieron las muestras de materia fecal del recto de 212 becerros, menores de tres meses de edad, raza Holstein-Friesian, de 12 establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo. Se obtuvieron los datos clínicos de los becerros, se realizó por la tinción de Kinyou por duplicado para la identificación morfológica de ooquistes de *Cryptosporidium*. Se amplificó, mediante PCR, un segmento de ~826 pb del gen de la pequeña subunidad del RNA ribosomal (18 SSU rRNA), de 10 aislados de heces de becerros, el producto se restringió con las enzimas *SspI*, *VspI* y *MboII* y se secuenció. La prevalencia de *Cryptosporidium* por tinción fue del 30.19%. En todos los establos hubo becerros infectados y se encontró al parásito en todas las épocas del año, con predominio en primavera. Se encontraron las especies *C. parvum* (*a. bovis*) y *C. bovis*. De las variables analizadas, se encontró asociación de la presencia del parásito con diarrea y heces con moco con ($p < 0.05$). Se deben establecer medidas de control y prevención de la criptosporidiosis en esta zona para evitar la transmisión zoonótica y no zoonótica de la enfermedad.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, prevalencia, PCR, gen 18 SSU rRNA, secuenciación.

Association between *Cryptosporidium* species or genotypes and clinical condition in cattles under three months, of the Dairy Basin Tizayuca

1. Abstract

Cryptosporidiosis is a zoonotic parasitic disease that in cattles produce watery diarrhea, weight loss, decreased milk production and feed conversion affects with negative impact on production and economic losses for producers. Because *Cryptosporidium* oocysts of various hosts are morphologically similar and molecular characterization is necessary. In Mexico until known, there are few studies that showing a prevalence of between 3.19% to 75%; and only has been reported *C. parvum*. The aim of this study was to determine the prevalence of species or genotypes of *Cryptosporidium* and clinical signs in calves under three months. The sample size was determined with a confidence interval of 95%, margin of error of 5% and expected frequency of 10%. Samples were obtained from the rectum of 212 cattles under three months old, of the breed Holstein-Friesian, of 12 stables Dairy Basin of Tizayuca. Clinical data were obtained from cattles, were performed by staining duplicate Kinyou for morphological identification. *Cryptosporidium* species or genotypes of the 10 islotes from cattles were determined were restriction fragment length polymorphims (RFLP) and DNA sequencing analysis of the 18 SSU rRNA. The prevalence of *Cryptosporidium* by the staining was 30.19%. In all dairies were infected cattles and found the parasite in all seasons, predominantly in spring. We found species *C. parvum* (a. *bovis*) and *C. bovis*. Of the variables analyzed, association significatuve was found with the presence of the parasite with diarrhea and stool with mucus ($p < 0.05$). Measures should be established to control and prevention of cryptosporidiosis in this area to prevent transmission zoonotic and non-zoonotic disease.

Keywords: *Cryptosporidium*, prevalence, PCR, gene 18 SSU rRNA, sequencing.

Índice

I. Reflexión	I
II. Agradecimientos	II
III. Dedicatoria	IV
1. Resumen	V
1. Abstract.....	VI
VI. Índice.....	VII
VII. Índice de figuras	IX
VIII. Índice de cuadros	XI
IX. Abreviaturas y siglas usadas	XII
2. Introducción.....	1
2.1 Taxonomía.....	1
2.2 Historia.....	2
2.3 Especies o genotipos	2
2.4 Morfología	4
2.5 Ciclo biológico.....	5
2.6 Resistencia al ambiente	7
2.7 Mecanismos de infección.....	7
2.8 Patogenía	8
2.9 Manifestaciones clínicas	10
2.10 Epidemiología	10
2.10.1 Criptosporidiosis y el ambiente	11
2.10.2 Criptosporidiosis en bovinos.....	12
2.10.3 Criptosporidiosis en humanos.....	13
2.11 Caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	14
2.11.1 Genotipos	14
2.11.2 Utilidad de las técnicas moleculares.....	15
2.12 Diagnóstico.....	17
2.13 Tratamiento	18
2.14 Medidas de prevención y control	19
3. Justificación	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivos.....	20
6. Metodología.....	21
6.1 Localización de la explotación.....	23
6.2 Carta de consentimiento informado	24

6.3 Obtención de material biológico.....	24
7. Técnicas coproparasitoscópicas (CPS)	24
7.1 Directo en fresco.....	25
7.2 Tinción de Kinyou	25
7.3 Prevalencia de <i>Cryptodiporidium</i> spp.....	26
7.4 Técnica de Sheather (concentración/flotación).....	26
7.5 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).....	27
8. Técnicas moleculares.....	27
8.1 Lisis de ooquistes	27
8.2 Extracción de DNA	27
8.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
8.4 Electroforesis en gel de agarosa al 1% (amplificados).....	28
8.5 Polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP).....	29
8.6 Electroforesis en gel de agarosa al 2% (restricciones).....	31
9. Secuenciación de 10 aislados	31
10. Resultados	33
10.1 Diagnóstico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	36
10.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)	37
10.3 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> spp	38
10.4 Asociación de <i>Cryptosporidium</i> con el cuadro clínico.....	40
10.5 Identificación de factores de riesgo asociados a <i>Cryptosporidium</i> spp.....	42
10.6 Extracción de DNA.....	43
10.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada	44
10.8 Restricción del fragmento ~826 con <i>VspI</i>	45
10.9 Restricción del fragmento ~826 con <i>SspI</i>	46
10.10 Restricción del fragmento ~826 con <i>MboII</i>	47
10.11 Secuenciación de 10 aislados de muestras positivas.....	49
10.12 Análisis filogenético de 10 secuencias aisladas de becerros.....	51
11. Discusión.....	55
12. Conclusiones.....	60
13. Perspectivas.....	60
14. Referencias.....	61
15. Anexo A: Técnicas de laboratorio.....	69
15.1 Técnica de Sheather (concentración/flotación)	69
16. Anexo B: Caracterización molecular	70
16.1 Secuencia completa de <i>Cryptosporidium</i> spp (AF442484).....	70
16.2 Secuencias consenso de 10 aislados.....	72
17. Anexo C: Preparación de soluciones	82

Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Taxonomía de <i>Cryptosporium</i> spp.....	1
Figura 2. Esporozoíto de <i>Cryptosporium</i> spp.....	4
Figura 3. Microfotografía de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. en directo fresco dentro se observan los esporozoítos 100x	5
Figura 4. Diagrama del Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp	6
Figura 5. Mecanismos de infección de criptosporidiasis.	8
Figura 6. Patogenia de la criptosporidiosis.	9
Figura 7. Prevalencia registrada de <i>Cryptosporidium</i> spp en México	11
Figura 8. Genotipificación de <i>Cryptosporidium</i> de PCR-RFLP	16
Figura 9. Microfotografía de ooquistes, directo en fresco, 40x.....	17
Figura 10. Microfotografía de un ooquiste, tinción de Kinyou, 100x	18

Metodología

Figura 11. Estrategia del estudio.....	22
Figura 12. Dibujo que muestra la ubicación del Estado de Hidalgo y localización de Tizayuca.....	23
Figura 13. Vista satelital de los establos de la Cuenca Lechera.....	23
Figura 14. Esquema de la secuencia completa de <i>Cryptosporidium</i> spp. (No. Accesion AF442484 GenBank).	29
Figura 15. Edición de la secuencia consenso del aislado 7E172.....	31

Resultados

Figura 16. Distribución esquemática de los establos muestreados de la Cuenca Lechera. (No. 1-12 y color amarillo).....	33
Figura 17. Instalaciones de becerros en los diferentes establos.....	35
Figura 18. Microfotografías que muestran ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp, 100x. Cada línea corresponde a 1 µm. 1, 5, 9, 10, 12, 4: No. de establo	36
Figura 19. MET. <i>Cryptosporidium</i> spp	37
Figura 20. MET. Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp	37
Figura 21. Frecuencia de <i>Cryptosporidium</i> spp por muestreo	38
Figura 22. Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> spp por establo	39
Figura 23. Frecuencia de <i>Cryptosporidium</i> spp por estación del año.....	40
Figura 24. Amplificación de la banda de ~ 1700 pb en gel de agarosa al 1%.	44
Figura 25. Amplificación de la banda de ~ 826 pb en gel de agarosa al 1%	44
Figura 26. PCR-RFLPs en gel de agarosa al 2% (<i>VspI</i>)	45
Figura 27. PCR-RFLPs en gel de agarosa al 2% (<i>SspI</i>)	46
Figura 28. PCR-RFLPs en gel de agarosa al 2% (<i>MboII</i>)	47
Figura 29. Distribución esquemática de los establos muestreados.....	51

Figura 29. Árbol filogenético de aislados de becerros de la Cuenca.....	52
Figura 31. Filogenia de los aislados con genotipo <i>C.parvum</i>	53
Figura 32. Filogenia de los aislados con genotipo <i>C. bovis</i>	53

Anexos

Figura 33. Secuencia consenso Aislado 2E172.	72
Figura 34. Secuencia consenso Aislado 6E172.	73
Figura 35. Secuencia consenso Aislado 7E172.	74
Figura 36. Secuencia consenso Aislado 9E172.	75
Figura 37. Secuencia consenso Aislado 17E100.....	76
Figura 38. Secuencia consenso Aislado 19E100.....	77
Figura 39. Secuencia consenso Aislado 21E100.....	78
Figura 40. Secuencia consenso Aislado 13E121.....	79
Figura 41. Secuencia consenso Aislado 25E121.....	80
Figura 42. Secuencia consenso Aislado 10E116.....	81

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Especies de <i>Cryptosporidium</i> , dimensiones, No. acceso y hospederos.....	3
Cuadro 2. Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i> spp en bovinos en el mundo	13
Cuadro 3. Brotes de Criptosporidiosis en humanos	14
Cuadro 4. Pares de bases esperadas para cada especie.....	17
Cuadro 5. Criterios y variables del estudio.....	22
Cuadro 6. Características de las instalaciones de los becerros por establo.....	34
Cuadro 7. Características clínicas de los becerros en los doce establos.	41
Cuadro 8. Razón de momios o de oportunidad (RM) y P de las variables.....	43
Cuadro 9. Especies de <i>Cryptosporidium</i> con las enzimas de restricción.	48
Cuadro 10. Genotipos encontrados con la secuenciación de los aislados	49
Cuadro 11. Diferencias encontradas en los aislados & secuencias reportadas.....	50
Cuadro 12. Asociación especie/genotipo y cuadro clínico.....	54

Abreviaturas y siglas usadas

18 SSU rRNA: pequeña subunidad de ARN ribosomal.

COWP: (oocyst wall proteín) proteínas de pared interna del ooquiste

TRAP-C1, C2: proteínas del factor de adherencia trombospondina

ITS1, 2: espaciador transcrito interno

HSP70: proteínas de choque

β -tub: gen de beta-tubulina

GP60: glicoproteína de 60 kDa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: polimorfismos de los fragmentos de restricción.

VspI: enzima de restricción (secuencia *attaat*).

SspI: enzima de restricción (secuencia *aatatt*).

MboII: enzima de restricción (secuencia *gaaga(N)₈*).

RM: razón de momios o (OR) razón de oportunidad.

a.: aislado de (bovino, humano etc.)

2. Introducción

La criptosporidiosis es una protozoosis intestinal, con amplia distribución a nivel mundial. En becerros de 1-3 meses de edad está asociado con síndrome de diarrea neonatal y pérdidas económicas (Castillo *et al.*, 2009; Murakoshi *et al.*, 2012; Kvac *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Algunos estudios demuestran que los becerros se pueden infectar con 10 diferentes especies/genotipos de *Cryptosporidium* (Del coco *et al.*, 2009; Jex *et al.*, 2008).

2.1 Taxonomía

Cryptosporidium sp es un protozoario del Phylum Apicomplexa, de la familia *Cryptosporidiae*, género *Cryptosporidium* (figura 1), es un parásito intracelular extracitoplásmico que infecta el borde del epitelio intestinal. Tiene un complejo apical constituido por roptrías, micronemas, gránulos densos y microtubulos a los que se les atribuye la invasión celular (Cavalier-Smith, 1998; Fayer, 2009; Zanaro *et al.*, 2008). A pesar de las similitudes en su ciclo de vida, varias características distinguen a este género del resto de las coccidias: relativa especificidad de hospedero, capacidad de autoinfección endógena, localización intracelular pero extracitoplasmática y resistencia terapéutica a coccidiostatos. El descubrimiento del ciclo de vida extracelular y el análisis filogenético mediante la secuenciación de los genes de la pequeña subunidad del RNA ribosomal (18 SSU RNAr) y β -tubulina, sugiere que está más emparentado a las gregarinas; parásitos apicomplexos de invertebrados (Del coco *et al.*, 2009; Fayer *et al.*, 2004; Hijjawi *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2005; Toso *et al.*, 2007; Leander *et al.*, 2003; Carreno *et al.*, 1999).

Reino: Protista
Subreino: Biciliata
Phyllum: Apicomplexa
Clase: Sporozoea
Subclase: Gregarina
Familia: Cryptosporidiae
Género: *Cryptosporidium*
Especies: 23 descritas: *parvum, hominis, bovis,*
meleagridis, etc.
61 subtipos

Figura 1. Taxonomía de *Cryptosporidium* spp. Tomado de Cavalier-Smith, 1998.

2.2 Historia

Ernest Edward Tizzer (1907), lo encontró en las glándulas gástricas de ratones y lo nombró *Cryptosporidium muris*. En 1912, describió la especie *C. parvum* de especímenes que obtuvo del intestino delgado de ratones (Tizzer, 1910; Tizzer, 1912; Ren *et al.*, 2012). Se le reconoció como parásito hasta 1955; ese año Slavin describió la especie *C. meleagridis* en pavos (Carey *et al.*, 2004; Cavalier-Smith, 1998; Chalmers *et al.*, 2005; Fayer, 2010; Thompson *et al.*, 2008; Slavin *et al.*, 1955). En 1971 se le asoció a la diarrea crónica que presentaba un bovino de ocho meses y se le reconoció como un patógeno importante (Panciera *et al.*, 1971). Los primeros reportes de la criptosporidiosis en humanos fueron descritos en 1976 (Meisel *et al.*, 1976; Nime *et al.*, 1976); sin embargo, solo se le dio importancia a principios de los 80^s cuando se identificó en pacientes con VIH (Tzipori, 1983; Zanaro *et al.*, 2008).

En nuestro país se identificó en ganado lechero de la región central del país desde 1983 (Castillo *et al.*, 2009); pero, existen pocos estudios que demuestren la prevalencia de las especies/genotipos de *Cryptosporidium* en estos hospederos.

2.3 Especies

En la actualidad se conocen alrededor de 23 especies (cuadro 1), que infectan a mamíferos incluido el hombre, aves, reptiles y peces (Fayer, 2009; Brogolia *et al.*, 2008; Geurden *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2008; Plutzer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007). Hasta hace algunos años, la diferenciación entre especies se basaba en el tamaño de los ooquistes y el tipo de hospedero; sin embargo, el tamaño de los ooquistes de los diferentes hospederos se imbrican y morfológicamente es difícil diferenciarlos. Las técnicas moleculares permiten la identificación de las especies/genotipos. (Murakoshi *et al.*, 2012).

Las diferentes especies de *Cryptosporidium* tienen un gran variedad de hospederos y diferentes localizaciones en estos, por ejemplo *C. baileyi* (gallina) que se localiza en bolsa de Fabricio y cloaca y *C. varanii* (lagartos) que se localiza en estomago e intestino delgado; sin embargo de algunos aún no se conoce la localización exacta

como *C. ryanae* (bovino), *C. macropodum* (canguro gris), *C. xiaoi* (ovino) (Navarro *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Características de las especies/genotipos de *Cryptosporidium*.

Especies	Hospedero	Localización	Tamaño μm	No. de acceso a GenBank (18SrARN)	Referencia
<i>C. parvum</i>	Ganado, equino, ratón, alpaca, ardilla	Intestino delgado	4.9 (4.5x5.4) x 4.4 (4.2-5.2)	AF1112571	Tyzzler <i>et al.</i> , 1912
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, ovinos, caprinos, camello, jerbo, ratón	Abomaso	7.4 (6.0-8.1) x 5.5 (5.0-6.5)	AF093496	Lindsay <i>et al.</i> , 2000
<i>C. bovis</i>	Bovinos, ovinos, caprinos	Intestino delgado	4.9 (4.8-5.4) x 4.6	AY741305	Fayer <i>et al.</i> , 2005
<i>C. cervine</i>	Bovino, ovino, ardilla, castor, marmota, ciervo, ratón, lémur	Desconocido	-	-	-
<i>C. muris</i>	Ratón, hámster, ciervo, ardilla, camello, coyote, foca, mono	Estómago	6.1 (5.6-6.4) x 8.4 (8.0-9.0)	AB089284	Tyzzler, 1907
<i>C. ryanae</i>	Bovinos, ovinos y caprinos	Intestino delgado	3.6 (2.9-4.4) x 3.7 (2.9-3.7)	AY587166	Fayer <i>et al.</i> , 2008
<i>C. felis</i>	Felinos y bovinos	Intestino delgado	4.5 (5.0-4.5) x 5.0 (6.0-5.0)	AF108862	Iseki, 1979
<i>C. suis</i>	Porcinos y bovinos	Ambos intestinos	4.6 (4.9-4.4) x 4.2 (4.0-4.3)	AF115377	Ryan <i>et al.</i> , 2004
<i>C. hominis</i>	Humano, primates, bovino, ovino, caprino, porcino	Intestino delgado	4.8 (6.4-5.4) x 5.2 (4.4-5.9)	AF108865	Morgan-Ryan <i>et al.</i> , 2002
<i>C. meleagridis</i>	Pavos, pollos, codorniz, perro, ratón, ciervo	Intestino delgado	5.0 (4.5-6.0) x 4.4 (4.2-5.3)	AF112574	Slavin, 1955
<i>C. serpentis</i>	Serpiente del maíz	Estómago	6.2 (5.6-6.6) x 5.3 (4.8-5.6)	AF151376	Levine, 1980
<i>C. canis</i>	Perro, fox y coyote	Intestino delgado	4.95 x 4.75	AF112576	Fayer <i>et al.</i> , 2001
<i>C. fayeri</i>	Canguro	Intestino delgado	4.9 (4.5x5.1) x 4.3 (3.8-5.0)	AF159112	Ryan <i>et al.</i> , 2008
<i>C. varanii</i>	Varano esmeralda	Estómago e intestino delgado	4.7 (4.2-5.2) x 5 (4.4-5.6)	AF112573	Koudela-Modry, 1998
<i>C. wrairi</i>	Cerdo de guinea	Intestino delgado	4.6 (4.0-5.0) x 5.4 (4.8-5.6)	AF115378	Vetterling <i>et al.</i> , 1971
<i>C. molnari</i>	-	Estómago	4.7 (3.2-5.5) x 4.5 (3.0-5.0)	AY524773	Alvarez-P <i>et al.</i> , 2002
<i>C. macropodum</i>	Canguro	Intestino delgado	4.9 (4.5-6.0) x 5.4 (5.0-6.0)	AF513227	Power-Ryan, 2008
<i>C. baileyi</i>	Pollo, pato y codorniz	Cloaca, bursa, tráquea	4.8 (4.8-5.7) x 6.4 (5.6-7.5)	L19068	Current <i>et al.</i> , 1986
<i>C. fragile</i>	Sapo negro	Estómago	6.2 (5.5-7.0) x 5.5 (5.0-6.5)	EU162751-EU162754	Jirku <i>et al.</i> , 2008
<i>C. galli</i>	Gallinas	Proventrículo	8.25 (8.0-8.5) x 6.3 (6.2-6.4)	AF316624, AY168847	Pavlásek, 1999
<i>C. scophthalmi</i>	-	Estómago e intestino	4.4 (3.7-5.0) x 3.9 (3.0-4.7)	No disponible	Álvarez-P <i>et al.</i> , 2004

Fayer *et al.*, 2009; Plutzer *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2008.

2.4 Morfología

Cryptosporidium spp tiene varios estadios: el *esporozoíto* (figura 2), es alargado y tiene forma de coma, el extremo apical afilado y el posterior redondeado. Tiene un complejo apical con anillos polares, microtúbulos subpeliculares, micronemas y roptrías.

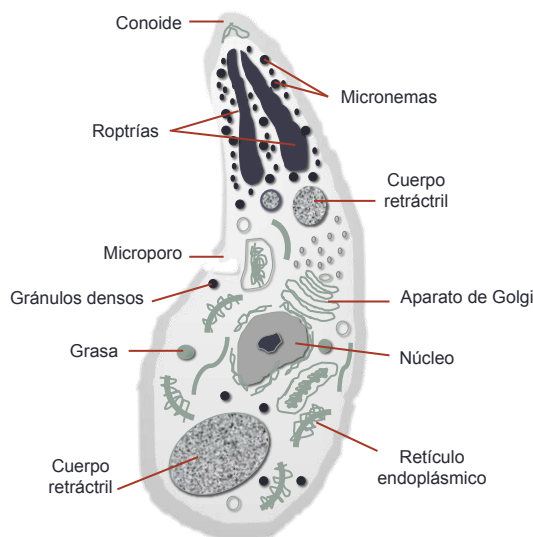


Figura 2. Esquema de un esporozoíto de *Cryptosporium* spp. Tiene forma de coma, dentro se observan los orgánulos, núcleo prominente, roptrías y el conoide.

El *trofozoíto*, contiene un núcleo prominente que al dividirse da lugar al *esquizonte o meronte*, dentro del esquizonte se forman los *merozoítos*, que tienen forma esférica y un complejo apical. Los *microgametos*, contienen hasta 16 núcleos, tienen forma de bala y están rodeados por microtúbulos. Los *macrogametos*, contienen un núcleo, gránulos de amilopectina y cuerpos formadores de pared.

Existen dos tipos de ooquistes: los *ooquistes de pared delgada*, son esféricos y contienen en su interior cuatro esporozoítos y los *ooquistes de pared gruesa*, miden de 4-6 μm de diámetro, también contienen cuatro esporozoítos periféricos y un cuerpo residual central; son esféricos, traslúcidos y refringentes al microscopio óptico (figura 3), son resistentes al medio externo y se excretan con las heces de los animales parasitados (Brogolia *et al.*, 2008; Del coco *et al.*, 2009; De la Parte *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007).

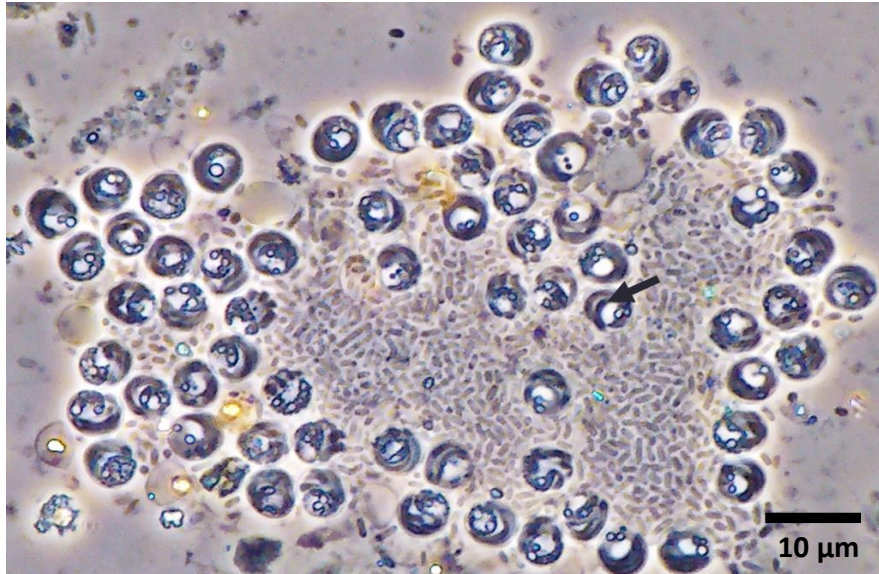


Figura. 3. Microfotografía de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. CPS directo fresco teñido con lugol parasitológico. Iluminación en contraste de fases. Dentro de los ooquistes se observan los esporozoítos, tienen forma de coma (flecha). 100x

2.5. Ciclo biológico

El ciclo biológico es monoxeno (figura 4), con fases de merogonia, gametogonia y esporogonia (Wang *et al.*, 2007). El sitio primario de infección es el intestino delgado. Algunas especies tienen diferentes localizaciones en su hospedero, por ejemplo: *C. andersoni* se localiza en abomaso de rumiantes y *C. galli* se localiza en el proventrículo de las gallinas. La dosis infectiva es de 10 a 100 ooquistes (De la parte *et al.*, 2005; Fayer, 2009; Miller *et al.*, 2005). Después de que los ooquistes son ingeridos se produce el desenquistamiento mediado por cambios en la temperatura, pH, sales biliares y acción de las proteasas. Salen cuatro esporozoítos móviles y el extremo anterior se adhiere a un receptor presente en las microvellosidades intestinales. Del extremo anterior surge una vacuola que se fusiona con la membrana de la célula para formar la unión parásito-hospedero y es en esta unión donde se desarrolla el orgánulo de alimentación.

El esporozoíto se transforma en trofozoíto y después a merogonia, en esta fase se inicia la reproducción asexual (fisión múltiple) y da origen al meronte tipo I con 8

merozoítos en su interior. Cuando el meronte se rompe los merozoítos son liberados e invaden una nueva célula y comienzan a desarrollar el meronte tipo II (4 merozoítos). Los merozoítos liberados parasitan nuevas células y se diferencian en macrogametocito (femenino) y microgametocito (masculino); éste se multiplica por fisión múltiple y origina 16 microgametos móviles que van en busca del macrogameto. Lo fecundan y se forma el huevo o cigoto (estado diploide) que al adquirir la pared quística se convierte en ooquiste. Se produce la esporogonia, en la cual el núcleo diploide sufre una meiosis reduccional y se forman cuatro células haploides (esporozoítos) dentro del ooquiste. El 20% de ooquistes son de pared delgada y liberan a los esporozoítos en la luz intestinal y pueden invadir a nuevos enterocitos y el 80% son de pared gruesa y salen con las heces al medio externo (Olson *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008; Zanaro *et al.*, 2008).

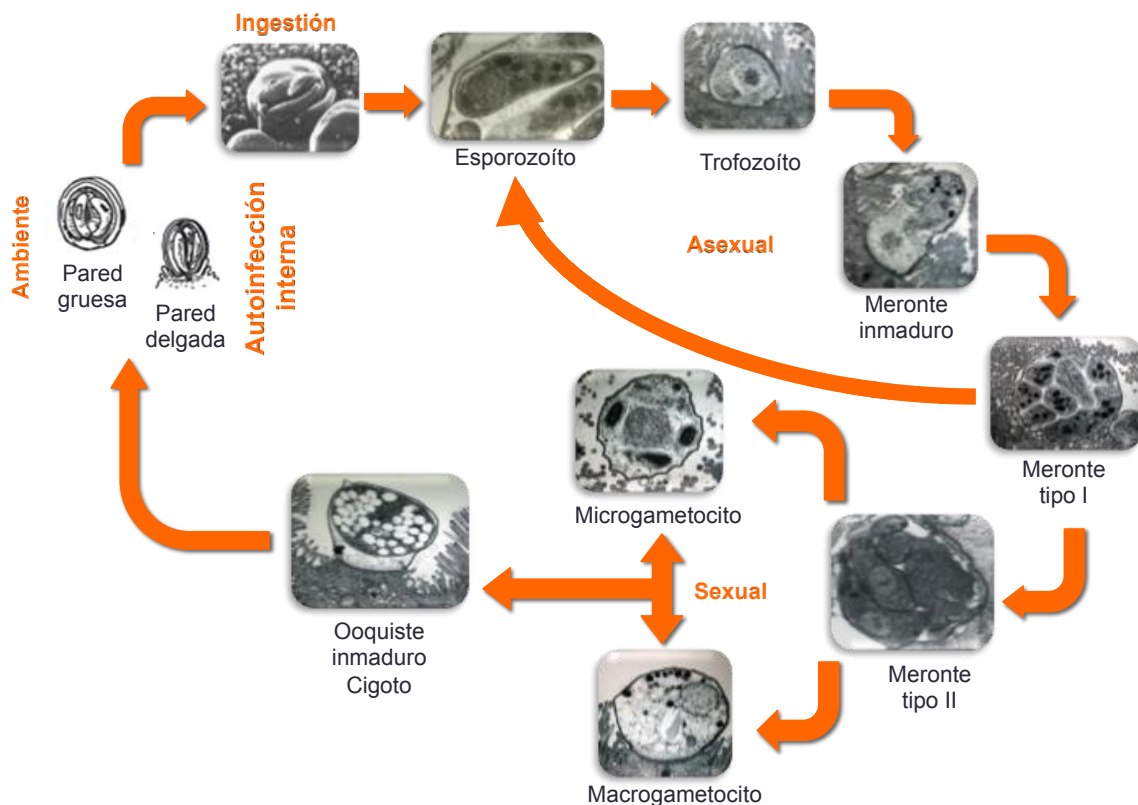


Figura 4. Diagrama del Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. Imágenes tomadas y modificadas, disponibles online. Jae Ran Yu, 2003:

http://atlas.or.kr/atlas/alphabet_view.php?my_codeName=Cryptosporidium%20parvum

2.6. Resistencia al ambiente

Los ooquistes de *Cryptosporidium* son muy resistentes al ambiente, permanecen viables por 2 a 3 semanas (Muñoz *et al.*, 2011), sobreviven en agua dulce y agua de mar a 4-22°C. Sobreviven a la congelación, si el proceso es rápido los ooquistes se destruyen sin embargo si se someten a un proceso de congelación lento pueden sobrevivir por más de 50 días a -10°C (Kato *et al.*, 2002). La infectividad decrece cuando se someten a 65°C por 5-10 minutos. Se ha mostrado que los ooquistes son extraordinariamente resistentes a las técnicas usuales de filtración y cloración del agua destinada para consumo humano, se requieren 80 mg/L de cloro para destruir los ooquistes, esto es 400 veces más lo permitido para consumo humano (0.2-1.5 mg/L) (Carey *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que los ooquistes de *C. parvum* se fijan fuertemente a las hojas y raíces de espinaca, se infiltran por los estomas, logrando de esta manera una mayor protección al ambiente, resistencia al lavado y desinfectado, tratamientos con ultrasonidos y posibles tratamientos químicos post-cosecha (Macarisin *et al.*, 2010).

2.7 Mecanismos de infección

La forma infectante es el ooquiste esporulado y el mecanismo de infección es por contaminación del agua con materia fecal (aguas residuales, cuerpos de agua como ríos y lagos), por contacto directo (oro-fecal), por fómites y artrópodos (figura 5). Los mamíferos pueden ser reservorios y diseminadores de ooquistes de *Cryptosporidium* con potencial zoonótico (Castillo *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2003; Fayer, 2009; Ortega *et al.*, 2008).

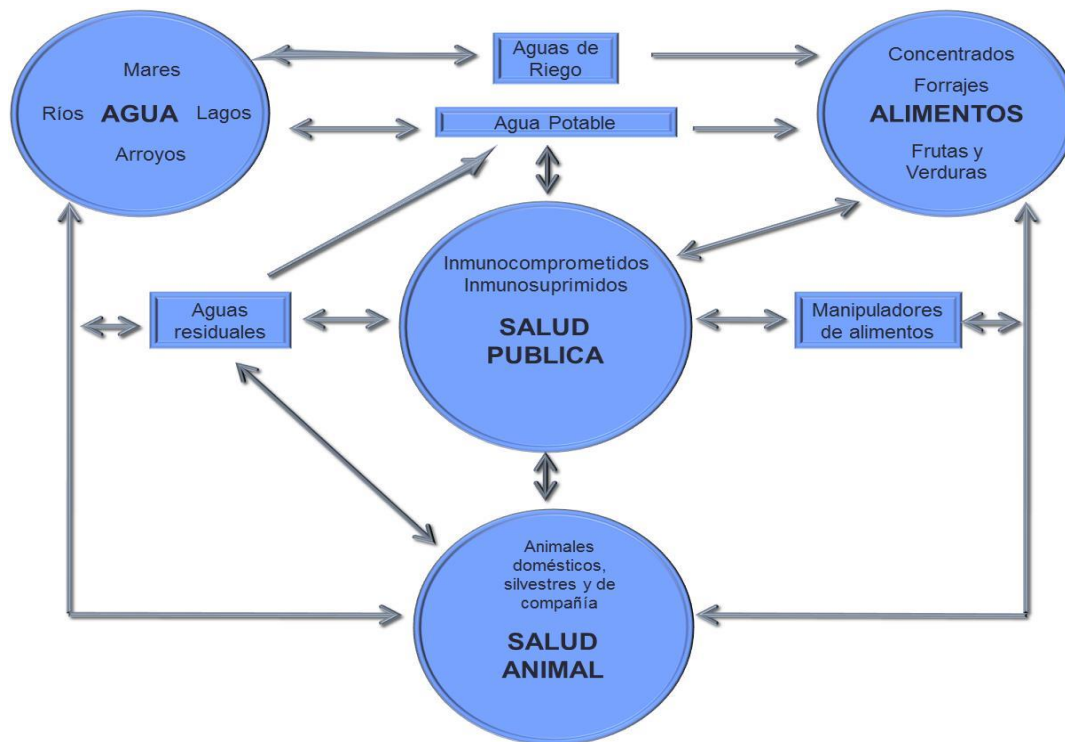


Figura 5. Mecanismos de infección de la criptosporidiosis. El principal mecanismo de infección es por el agua contaminada con ooquistes y esta se puede diseminar de diferentes formas.

2.8 Patogenía

Los ooquistes ingeridos por el hospedero eclosionan en sus sitios blanco ayudados por factores físicos y químicos, se liberan los esporozoítos, las proteínas secretadas por las especializadas del complejo apical facilitan la adhesión e invasión en las vellosidades intestinales, se estimula la polimerización y acumulo de actina en la interface parásito-citoplasma para que protruya la membrana plasmática y se forme la vacuola parasitófora. Las células de la mucosa del epitelio secretan citosinas, histamina, serotonina, adenosina, prostaglandinas que actúan en los enterocitos, cambia la actividad eléctrica del intestino generando alteración en el equilibrio osmótico, se recluta un cotransportador de Na^+ /glucosa y hay aumento en la secreción de Cl^- , lo que facilita la entrada de agua y glucosa a la célula (Carey *et al.*, 2004; Del coco *et al.*, 2009). La invasión y multiplicación del protozooario producen pérdida de la continuidad de la membrana epitelial e inflamación mediada por linfocitos T que producen atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas (figura 6). Se conoce

que *Cryptosporidium* tiene la capacidad de inhibir la apoptosis lo que permite que el protozoo complete su ciclo de vida de (24-48 hrs.) antes de que la célula hospedera entre en apoptosis. Los enterocitos dañados son reemplazados por células inmaduras funcionalmente, lo que disminuye la absorción de fluidos, electrolitos y nutriente, hay perdida de enzimas digestivas y se genera el síndrome de mala absorción y desnutrición. Existe aumento de sacaridasa y disminución de lactasa y maltasa, lo que altera la digestión, produce aumento de la microflora, cambios en la presión osmótica y líquido hacia la luz intestinal. La rapidez del ciclo y la presencia del ciclo endógeno favorecen la colonización de grandes cantidades de ooquistes (Carey *et al.*, 2004; De la parte *et al.*, 2005; Del coco *et al.*, 2009; Malik *et al.*, 1996). Se sugiere la presencia de una enterotoxina por la diarrea persistente aunque se haya dado tratamiento (De la parte *et al.*, 2005).

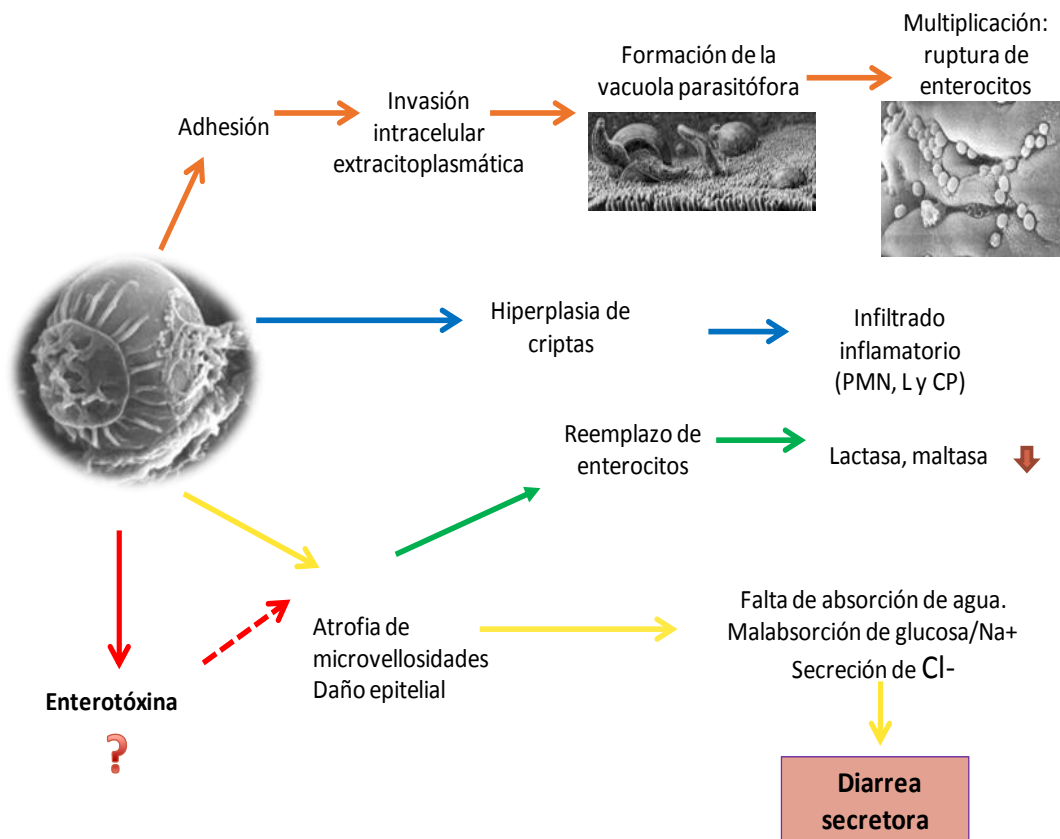


Figura 6. Mecanismos patogénicos de la criptosporidiosis. Flechas naranjas muestran la adhesión del esporozoito, flechas azules la hiperplasia de criptas, flechas amarillas atrofia de microvellosidades, flecha verde reemplazo de enterocitos y flechas rojas posible acción de una enterotoxina.

2.9 Manifestaciones clínicas

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).

En los animales la criptosporidiosis puede cursar asintomática o sintomática aguda o crónica (Sofie *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008). En la fase aguda pueden presentar decaimiento, anorexia, diarrea, dolor abdominal, alteración en la conversión alimenticia, disminución de peso en canal, con las consecuentes pérdidas económicas para los productores por retraso en el crecimiento y por los costos que implica el tratamiento inespecífico e ineficaz. En la fase crónica la diarrea (puede ser de color gris) es recurrente, se produce el síndrome de mala absorción y los animales quedan como portadores. La infección, es más frecuente en animales jóvenes y puede causar la muerte durante las primeras semanas de vida (Carey *et al.*, 2004; Díaz *et al.* 2011; Geurden *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011). La falta de calostro y la afección por otros enteropatógenos contribuyen a que se presente la enfermedad clínica (Xiao *et al.*, 2008).

2.10 Epidemiología

Cryptosporidium tiene distribución mundial, que incluye al continente Antártico (Díaz *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011). En Alemania, la criptosporidiosis es de notificación obligatoria desde el 2001 (Brogolia *et al.*, 2008).

En México se ha reportado prevalencias (figura 7), en unidades de producción de bovinos en Guerrero de 3.19%, en Veracruz del 12 a 35.7% y en Aguascalientes de 75% y solo se identificó a *C. parvum* (Cano *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2009; Fitz *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2012).

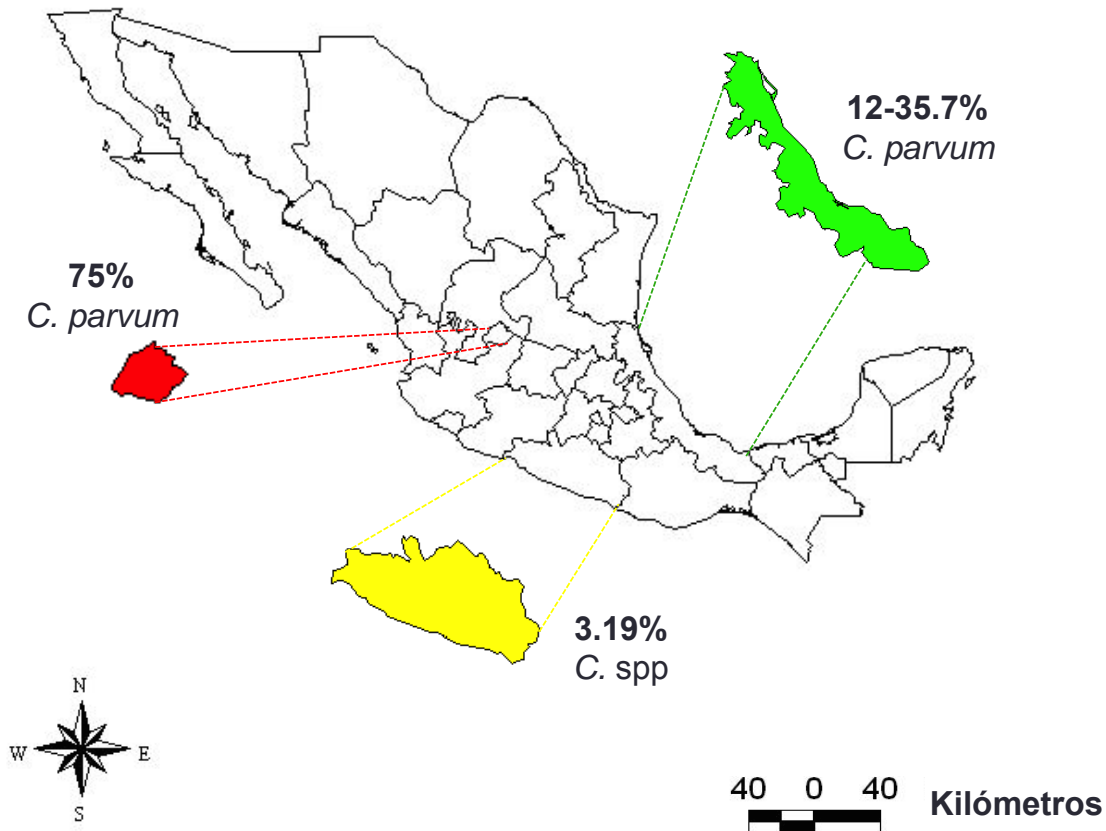


Figura 7. Prevalencia registrada de *Cryptosporidium* spp en bovinos de México. Diseño del mapa con el programa ArcView 3.2. Los valores fueron obtenidos de 4 estudios previos.

2.10.1 Criptosporidiosis y el ambiente

La contaminación ambiental con ooquistes de *Cryptosporidium* es un riesgo latente para animales silvestres, domésticos e incluso para el hombre. Por décadas se ha utilizado a los bivalvos (ostra, almeja, mejillón) como bioindicadores de contaminación acuática con bacterias, virus y parásitos. La viabilidad de los ooquistes se ha demostrado en ensayos con ratones (Miller *et al.*, 2005).

Los gasterópodos (caracoles y babosas) se utilizan como bioindicadores de contaminación en ecosistemas terrestres. *C. parvum* se encontró en 4/10 grupos de caracoles y en 1/6 grupos de babosas en Chile (Neira *et al.*, 2010).

En peces de aguas saladas y dulces se han identificado genotipos zoonóticos de *Cryptosporidium* 0.8% (6/709) (Reid *et al.*, 2010), dato importante porque los animales beben agua de lagos y arroyos, los humanos que visitan zonas recreativas también pueden infectarse.

Los animales de compañía, como las aves, representan un factor de riesgo para adquirir la criptosporidiosis. En un estudio se identificaron cuatro especies (*C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. galli* y *C. avian*) que infectan a aves de compañía, con una prevalencia global de 8.1% (35/434); lo que sugiere un riesgo potencial de transmisión zoonótica (Qi *et al.*, 2011). Las lluvias juegan un papel importante en la propagación de los ooquistes de *Cryptosporidium* que eliminan los animales que pastan en las praderas (McEvoy *et al.*, 2005). También se han encontrado ooquistes de *Cryptosporidium* en aguas residuales que se emplean en el riego de frutas y verduras (McEvoy *et al.*, 2005).

2.10.2 Criptosporidiosis en bovinos

La infección en becerros se ha observado desde 1976, y puede producir alta morbilidad y mortalidad. La falta de calostro y la afección por otros enteropatógenos contribuyen a que se presente la enfermedad (Brogolia *et al.*, 2008; Carey *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2007; Jex *et al.*, 2011). La prevalencia mundial de criptosporidiosis en bovinos en el mundo (cuadro 2), tiene un rango de 1-84%. (Fayer *et al.*, 2005; Geurden *et al.*, 2007; Maddox *et al.*, 2005; McCarthy *et al.*, 2008). En nuestro país tiene un rango de 12-75% (Castillo *et al.*, 2009; Maldonado *et al.*, 1998).

C. parvum, *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. ryanae* son comúnmente detectados en becerros. *C. parvum* prevalece en becerros predestete (menores a 2 meses) y produce hasta el 85% de las infecciones; mientras que *C. andersoni*, *C. cervine*, *C. bovis* y *C. ryanae* predominan en becerros postdestete de 2 meses hasta 2 años de edad (Feng *et al.*, 2007; Kvác *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp en bovinos en el mundo.

Especie	País	Prevalencia %	N	Método diagnóstico	Genotipo	Referencia
Becerras	India	39.65	459	PCR-RFLP	<i>C.a, C.r, C.b, C.p</i>	Venu <i>et al.</i> , 2012
Becerras	Malasia	27.1	240	PCR	<i>C.p, C.b, C.a, C.r</i>	Muhid <i>et al.</i> , 2011
Becerras	Australia	22.3	634	PCR	<i>C.p, C.b, C.r</i>	Ng <i>et al.</i> , 2011
Becerras	México	75	126	Tinción Kinyou PCR	<i>C.parvum</i>	García <i>et al.</i> , 2009
Becerras	Irán	18.75	272	PCR	<i>C.p, C.a, C.b</i>	Keshavarz <i>et al.</i> , 2009
Becerras	India	12.85	350	PCR-RFLP	<i>C.a</i>	Paul <i>et al.</i> , 2009
Becerras	República Checa	4.42	995	PCR-RFLP	<i>C.a, C.b, C.p</i>	Ondrácková <i>et al.</i> , 2009
Becerras	Inglaterra	28	215	PCR	<i>C.p, C.b, C.c</i>	Brook <i>et al.</i> , 2008
Becerras	Canadá	27.3	143	PCR	<i>C.p</i>	Coklin <i>et al.</i> , 2007
Becerras y adultos	Vietnam	35.7	266	Tinción ZNm PCR	<i>C.p, C.a</i>	Nguyen <i>et al.</i> , 2007
Becerras	Zambia	19.2	744	ELISA	<i>C. p, C.b, C.s</i>	Geurden <i>et al.</i> , 2006
Becerras	Canadá	3.1	605	IFA	<i>C. spp</i>	Waldner <i>et al.</i> , 2006
Bovinos	Canadá	1.1	560	IFA	<i>C. spp</i>	Gow <i>et al.</i> , 2006
Becerras	Zambia	19.2	744	ELISA	<i>C. p, C.b, C.s</i>	Geurden <i>et al.</i> , 2006
Becerras	Nueva Zelanda	5.31	658	PCR	<i>C.p</i>	Learmonth <i>et al.</i> , 2003
Becerras	Francia	43.4	440	ELISA	<i>C. spp</i>	Lefay <i>et al.</i> , 2000
Bovinos	Canadá	73	386	IFA	<i>C. parvum, C.m</i>	Olson <i>et al.</i> , 1997
Bovinos	Tazania	16.3	486	Tinción ZNm ELISA	<i>C. spp</i>	Mtambo <i>et al.</i> , 1997

C. spp: *Cryptosporidium* spp, *C.p*: *C.parvum*, *C.c*: *C. cervine*, *C.m*: *C. muris*, *C.a*: *C. andersoni*; *C. r*: *C. ryanae*; *C. b*: *C. bovis*.

2.10.3 Criptosporidiosis en humanos

Se ha documentado que los brotes epidémicos de la criptosporidiosis en humanos fueron por la ingestión de agua contaminada con ooquistes (Feng *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; Gobet *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006; Jonhson *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2000). La prevalencia de este microorganismo es variable (cuadro 3) y depende de las características socioeconómicas de la población. Es más frecuente en las regiones que carecen de agua potable (Fayer, 2009; Geurden *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2008). Existe el riesgo de que el ganado sea diseminador de esta parasitosis, ya que sus heces pueden contaminar los diferentes ambientes (McEvoy *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Brotes epidémicos de criptosporidiosis en humanos.

Año	Ciudad o Estado	Transmitido por	Especie responsable
1993	Milwaukee, EEUU	Agua	<i>C. hominis</i>
1993	Maine, EEUU	Alimentos	<i>C. parvum</i>
1996	British Columbia, Canadá	Agua	<i>C. parvum</i> (Cranbrook) <i>C. hominis</i> (Kelowna)
1997	Pennsylvania, EEUU	Contacto con animales	<i>C. parvum</i>
1998	Washington, EEUU	Alimentos	<i>C. hominis</i>
2000	Irlanda del Norte, Reino Unido	Agua	<i>C. parvum</i> y <i>C. hominis</i>
2002	Queensland, Australia	Alimentos	<i>C. parvum</i>

Tomado de Thompson *et al.*, 2003a-b y Xiao *et al.*, 2001.

2.11 Caracterización molecular de *Cryptosporidium* spp

Desde hace 20 años se describieron dos genotipos de *C. parvum*: “genotipo humano o antropozoonótico” que infecta humanos y el “genotipo bovino o zoonótico” que infecta animales de granja (bovinos, ovinos, caprinos, etc.), humanos y animales de laboratorio (Gobet *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2010).

2.11.1 Genotipos

Los bovinos también se pueden infectar con *C. muris*, esta especie puede reducir hasta el 13% la producción láctea en el ganado lechero y afectar el crecimiento de los becerros (Kvác *et al.*, 2008). Además, existe evidencia de la variación biológica y molecular de *C. muris*; los ooquistes de *C. muris* obtenidos de roedores afectan a roedores y a bovinos, pero los ooquistes de *C. muris* obtenidos de bovinos no afectan a roedores. *C. muris* infecta a: roedores, artiodáctilos, primates incluido el hombre, perros, gatos y conejos (Morgan *et al.*, 1999; Kvác *et al.*, 2008). *C. andersoni* se encuentra en becerros, pero puede infectar a otros artiodáctilos, roedores y posiblemente a humanos (Kvác *et al.*, 2008).

2.11.2 Utilidad de las Técnicas moleculares para identificación de especie/genotipo

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sirve para amplificar un fragmento específico de DNA. Actualmente se ha generalizado el uso del gen conservado de la pequeña subunidad de RNAr (18 SSU rRNA) debido a su naturaleza multicopia y a la presencia de regiones semiconservadas e hipervariables, que facilitan el diseño de cebadores y es de gran utilidad para estudios filogenéticos (Xiao *et al.*, 2010). Se ha utilizado el gen de las proteínas de pared interna del ooquiste (COWP) generalmente para identificar a *C. parvum* y se realizan ensayos de PCR y polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando la enzima *RsaI*, sin embargo tiene utilidad limitada en la genotipificación proveniente de animales o muestras ambientales debido a su estrecha especificidad. Los genes del espaciador transcrito interno (ITS1 y ITS2) solo identifican el género (Cai *et al.*, 1992; Spano *et al.*, 1997, 1998; Navarro *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2010). La β -tubulina RNAm, las proteínas de choque (HSP70), las proteínas relacionadas con el factor de adherencia (TRAP-C1 y TRAP-C2), entre otras, se ha utilizado como marcadores de la viabilidad de ooquistes en cultivos de *Cryptosporidium* (Gobet *et al.*, 2001; Spano *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2011).

Una de las herramientas más populares es a glicoproteína de 60 kDa (Gp60 o Gp40/15), se encuentra en la región apical de los estadios invasivos del protozoario, este gen es similar a los microsatélites porque tiene secuencias repetidas en tándem del triplete de nucleótidos que codifica para serina (TCA, TCG, TCT). Es una herramienta en la subtipificación de *C. hominis* en humanos, *C. parvum* en humanos y rumiantes; identifica subtipos de *C. parvum* y su transmisión, así como su potencial zoonótico (Plutzer *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2010). Utilizando la PCR, los RFLP, la secuenciación de los genes de la pequeña subunidad del RNA ribosomal (18 SSUrRNA) y glicoproteína 60 (gp60) se han descrito aproximadamente 61 subtipos de *Cryptosporidium* (Navarro *et al.*, 2011; Plutzer *et al.*, 2009). Con el gen gp60 se han identificado algunos subtipos en: *C. hominis* 7 subtipos (Ia-Ig), solo en Ic es zoonótico, en *C. parvum* 2 zoonóticos (IIa-IId) y 10 no zoonóticos (IIb, IIc, IIe, IIf, IIg, IIh, IIi, IIj, IIk, IIl) (Plutzer *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2010).

Con la amplificación del gen 18 SSUrRNA de *Cryptosporidium* y la restricción con las enzimas *SspI* y *VspI* se pueden diferenciar las diferentes especies y en particular los genotipos de *C. parvum* de muestras fecales y agua (Hijjawi *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 1999, 2000, 2001). La enzima *MboII* sirve para diferenciar entre *C. parvum*, *C. andersoni* y *C. bovis* comúnmente descritas en bovinos (Feng *et al.*, 2007).

Se ha documentado que con la ayuda de diferentes enzimas de restricción se puede diferenciar las especies/genotipos de *Cryptosporidium*. El patrón electroforético observado en la genotipificación para algunas especies se observa en la figura 8. Los productos esperados para cada enzima de restricción se muestran en el cuadro 4.

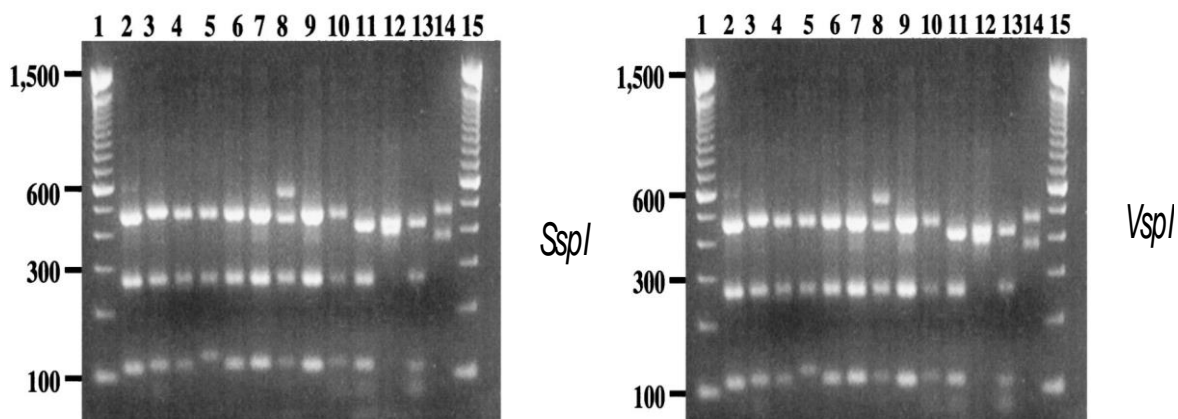


Figura 8. Genotipificación de *Cryptosporidium* mediante la amplificación del gen SSU rRNA por PCR-RFLP. Los carriles 1 y 15, Mpb; carril 2, *C. parvum* genotipo humano; carril 3, *C. parvum* mono genotipo; carril 4, *C. parvum* genotipo bovino, gen A; carril 5, *C. parvum* bovino genotipo, gen B; carril 6, *C. wrairi*; carril 7, *C. parvum* hurón genotipo; carril 8, *C. parvum* genotipo canguro, carril 9, *C. meleagridis*, carril 10, *C. parvum* ratón genotipo; carril 11, *Cryptosporidium* sp; carril 12, *C. felis*; carril 13, *C. parvum* genotipo perro, carril 14, *C. parvum* genotipo porcino. (Xiao *et al.*, 1999, 2000, 2001).

Cuadro 4. Pares de bases (pb) esperadas para cada especie.

Especie	Procedencia	Fragmento de PCR	Sspl	Vspl	MbolI
<i>C. muris</i>	Bovinos, camello, lyrax	833	385, 448	102, 731	-
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, camello, jerbo, ratón	833	385, 448	102, 731	76, 769
<i>C. bovis</i>	Bovinos	835	33, 103, 267, 432	104, 115, 616	76, 162, 185, 412
<i>C. serpentis</i>	Serpiente	831	14, 33, 370, 414	102, 729	-
<i>C. baileyi</i>	Gallina	826	254, 572	102, 104, 620	-
<i>C. felis</i>	Gato	864	15, 33, 390, 426	102, 104, 182, 476	-
<i>C. meleagridis</i>	Pavo	833	11, 108, 254, 449	102, 104, 171, 456	-
<i>C. wrairi</i>	Cerdo de guinea	834	11, 109, 254, 449	102, 104, 171, 456	-
<i>Cryptosporidium sp</i>	Monitor	834	19, 33, 109, 255, 418	102, 104, 628	-
<i>C. parvum</i>	Humano	837	11, 12, 111, 254, 449	70, 102, 104, 561	-
<i>C. parvum</i>	Bovino gen A	834	11, 12, 108, 254, 449	102, 104, 628	-
<i>C. parvum</i>	Bovino gen B	831	9, 119, 254, 449	102, 104, 625	76, 771
<i>C. parvum</i>	Ratón	838	11, 12, 112, 254, 449	102, 104, 175, 457	-
<i>C. parvum</i>	Perro	829	20, 33, 105, 254, 417	94, 102, 633	-
<i>C. parvum</i>	Cerdo	838	9, 11, 365, 453	102, 104, 632	-

Xiao *et al.*, 1999. GenBank: AF093489 a AF093499, AF112569 a AF112576, AF115377, y AF115378.

2.12 Diagnóstico

Se cuenta con varias técnicas para la detección de esta parasitosis:

1.- Los Coproparasitoscópicos (CPS) no son de utilidad por el tamaño de los ooquistes que es de 4-6 μm (figura 9).

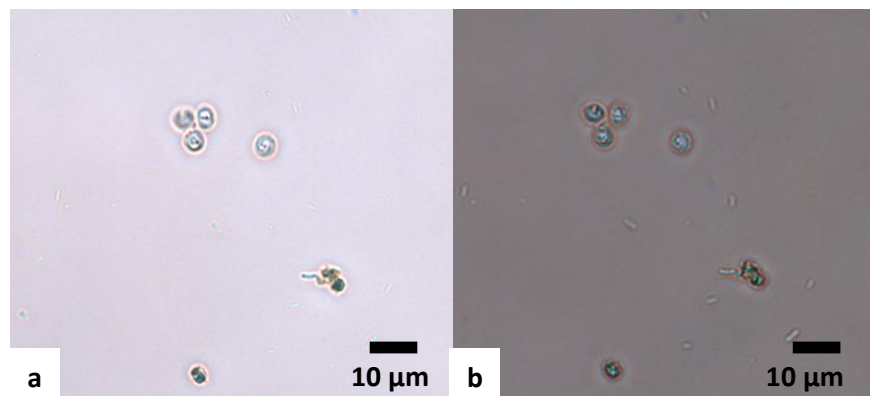


Figura. 9. Microfotografía de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* 40x
a) directo fresco, iluminación campo claro, b) iluminación en contraste de fases.

2.- Tinción de Ziehl-Neelsen modificado o Kinyou: Facilita la identificación de los ooquistes, ya que se tiñen de color rojo intenso (ácido-alcohol resistente), en un fondo azul o verde (figura 10).

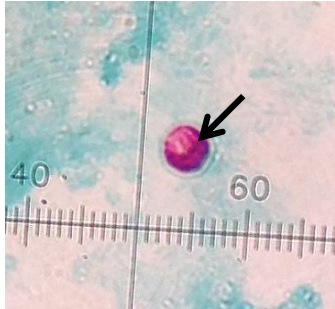


Figura 10. Microfotografía de un ooquiste de *Cryptosporidium* spp. 100x. Tinción de Kinyou, dentro del ooquiste esférico teñido de color cereza se observan los esporozoítos. Cada línea de la regleta corresponde a 1µm.

3.- Inmunológicos: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta, para la detección de coproantígenos con kits comerciales.

4.- Técnicas moleculares PCR, RFLPs y secuenciación para determinar la especie, genotipos y subtipos (De la parte *et al.*, 2005; Brogolia *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 1999).

2.13 Tratamiento

Hasta el momento no existe tratamiento totalmente eficaz contra este parásito (Del coco *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2009). Se emplean comúnmente:

La Paramomicina que es un antibiótico aminoglucósido que actúa en la síntesis de proteínas uniéndose al ribosoma bacteriano en el sitio A, se utiliza en animales y humanos con esta parasitosis; ha mostrado eficacia cuando el parásito se mantiene en cultivos celulares. En humanos con VIH hubo una reducción de episodios diarreicos y excreción de ooquistes.

La nitazoxanida es el único fármaco que ha sido objeto de un programa de desarrollo completo y bien diseñado para la criptosporidiosis en virtud de una solicitud de nuevo fármaco en investigación (IND) con la United States Food & Drug Administration. Los resultados de estudios realizados en pacientes severamente inmunocomprometidos

que tienen criptosporidiosis relacionado con el SIDA ($CD4 < 50$) fueron algo decepcionantes, mientras que la droga fue bastante eficaz en los pacientes con algún grado de inmunidad (recuento de $CD4 > 50$). En algunos animales tuvo menos eficacia en comparación con la paramomicina. Sin embargo, existe la necesidad de un tratamiento altamente eficaz contra la criptosporidiosis especialmente para pacientes inmunodeficientes y en el caso de animales para evitar pérdidas en la producción (Olson *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 2009; Rossignol *et al.*, 2010).

2.14 Medidas de prevención y control

Las medidas de manejo sugeridas para la prevención de la criptosporidiosis en becerros son: a) destrucción de ooquistes mediante aplicación de desinfectantes eficaces en las zonas que habitan los animales, b) separación de animales enfermos de sanos, c) bebederos y comederos altos para evitar la contaminación con heces, d) remoción diaria de las heces, e) controlar la entrada de animales portadores de otras especies (perros, ratones, etc.), f) mantener las maternidades limpias y desinfectadas, g) controlar la temperatura y humedad de estos lugares, h) ingestión de calostro y leche (Fayer, 2004; Muñoz *et al.*, 2011; Ortega *et al.*, 1999).

El suministro de calostro es una medida profiláctica, contiene una alta concentración de inmunoglobulinas IgG. La alimentación con calostro hiperinmune ha demostrado que reduce la diarrea y la excreción de ooquistes en becerros y corderos (Thompson *et al.*, 2008).

3. Justificación

La criptosporidiosis es una protozoosis zoonótica que produce cuadros diarreicos que afectan el crecimiento de los becerros y producen pérdidas económicas a los productores. Se han descrito varias especies: *C. parvum* a. *hominis* y *C. parvum* a. *bovis*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. muris* y *C. andersoni*, y debido a que los ooquistes son morfológicamente semejantes e incluso en algunos casos sus dimensiones se imbrican, es necesario realizar técnicas moleculares para diferenciar e identificar a los que tienen potencial zoonótico. Hasta donde sabemos en nuestro país no hay reportes que muestren los genotipos predominantes de *Cryptosporidium* en becerros. Por lo que es necesario determinar la prevalencia y genotipos predominantes de este parásito en becerros.

4. Hipótesis

Las especies o genotipos de *Cryptosporidium* asociadas al cuadro clínico en becerros menores de tres meses de la raza Holstein-Fresian y la contaminación ambiental con heces que provengan de estos animales son un riesgo zoonótico para la Cuenca Lechera de Tizayuca.

5. Objetivos

General:

- Identificar especies o genotipos de *Cryptosporidium* en becerros de la raza Holstein-Friesian de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo.

Particulares:

- Determinar la prevalencia de la criptosporidiosis en becerros de la Cuenca Lechera.
- Asociar la presencia de *Cryptosporidium* spp con el cuadro clínico presente en los becerros.
- Identificar el genotipo de *Cryptosporidium* que predomina en los establos de la Cuenca Lechera.

- Identificar a las especies con potencial zoonótico en la Cuenca Lechera.

6. Metodología

En este estudio el material biológico se obtuvo de becerros menores de tres meses de edad de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo previa carta de consentimiento informado del encargado del centro de diagnóstico de la Cuenca. El material biológico se procesó en el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría. El tamaño de la muestra se determinó mediante el programa estadístico Epiinfo V. 6 con un intervalo de confianza del 95%, un margen de error del 5% y una frecuencia esperada del 10%.

Se hicieron dos muestreos transversales, el primero fue mensual, de enero a diciembre de 2012 y se analizaron muestras de heces de bovinos de 12 establos, con un tamaño de muestra de 162. En el segundo muestreo se analizaron becerros de cuatro establos previamente muestreados con un tamaño de muestra de 50. Todas las muestras se obtuvieron directamente del recto de los becerros. El tamaño de muestra final fue de 212. Los criterios y variables del estudio se observan en el cuadro 5. La estrategia para cumplir con los objetivos de este estudio se muestra en la figura 11.

Clasificación de la investigación

Se realizó un estudio:

- Prospectivo, transversal y observacional.

Cuadro 5. Criterios y variables del estudio.

Criterios de Inclusión	Variables del estudio
1. Becerros menores de 3 meses de edad	1. Presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp
2. Animales con o sin diarrea	2. Edad de los becerros
	3. Diarrea
	4. Condición corporal del becerro (1, 2 y 3).
	5. Moco en heces
	6. Neumonía
	7. Tipo de alimentación
	8. Presencia de otros parásitos
	9. Estación del año

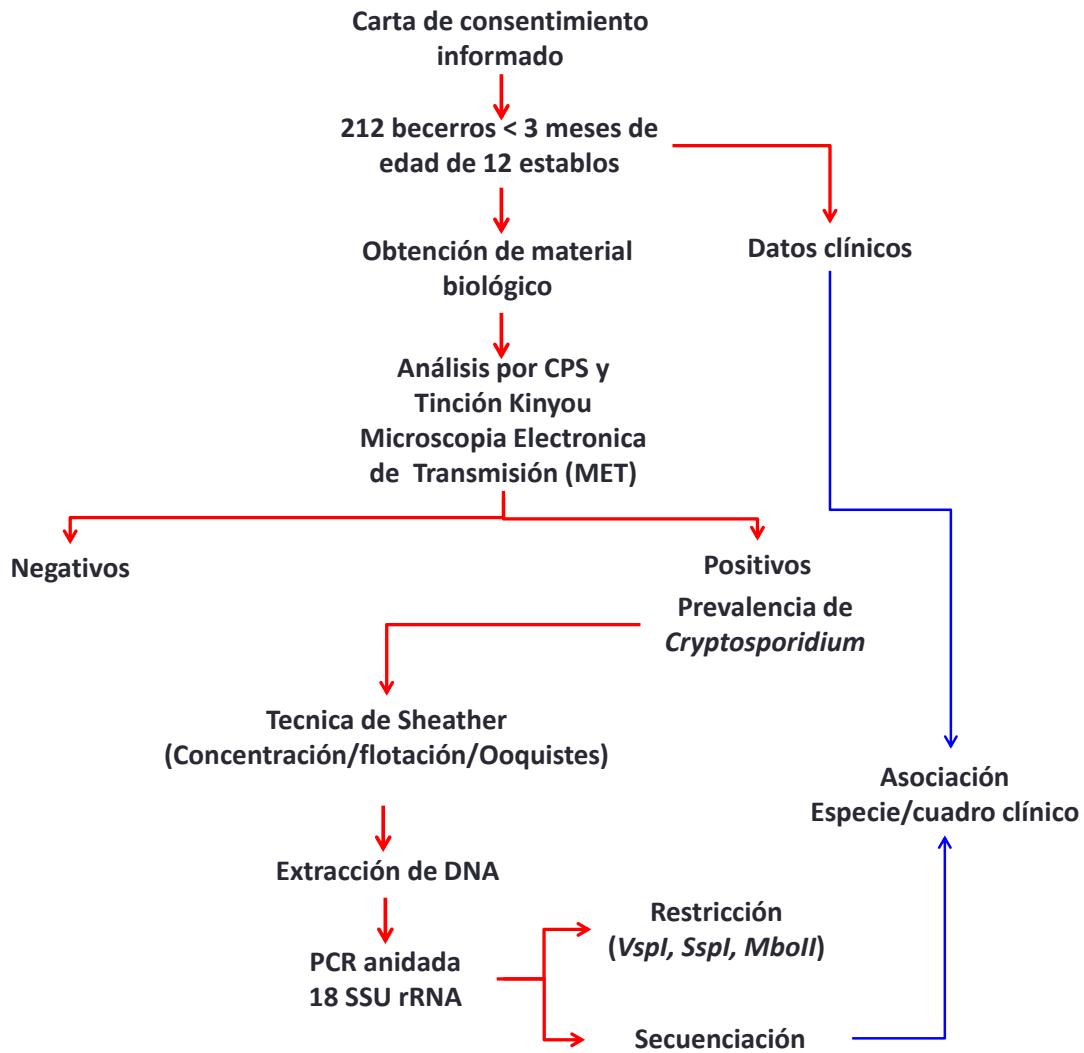


Figura 11. Estrategia del estudio.

6.1 Localización de la explotación

La Cuenca Lechera está ubicada a 2,260 m sobre el nivel del mar, 19° 50' latitud norte y 98° 57' longitud oeste del meridiano de Greenwich (figura 12). Colinda al norte con Tolcayuca, Estado de Hidalgo y al suroeste con el Estado de México. La Cuenca Lechera cuenta con un total de 223 establos (figura 13), que se distribuyen dentro del Complejo Agrónomo Industrial de Tizayuca (CAIT).

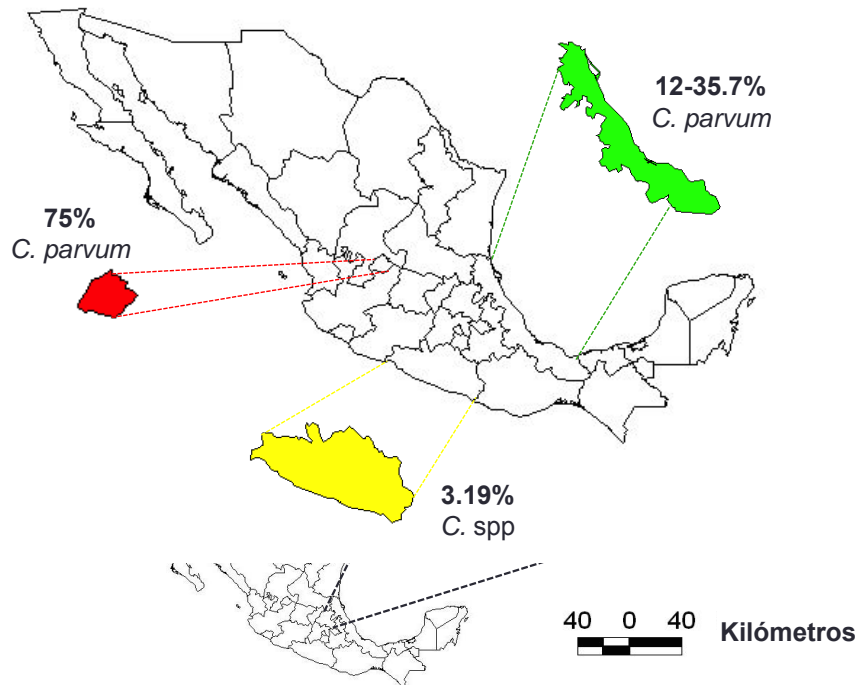


Figura 12. Dibujo que muestra la ubicación del Estado de Hidalgo y localización de Tizayuca (color rojo). Programa ArcView 3.2.



Figura 13. Vista satelital que muestra la distribución de los establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca dentro del CAIT, Hidalgo. Programa Epiinfo v. 6.0.

6.2 Carta de consentimiento informado

Se visitó la Cuenca Lechera Tizayuca, Hidalgo, se habló con médicos veterinarios y encargados de los diferentes establos, se les planteó el proyecto y se les invitó a participar en este estudio. A los encargados de los establos se les entregó mediante oficio impreso los resultados de los coproparasitoscópicos y las tinciones de cada una de las muestras analizadas.

6.3 Obtención de Material biológico

Se realizaron dos muestreos: solamente se obtuvo una muestra de heces por becerro, éstas se tomaron directamente del recto utilizando guantes de palpación. Las muestras se almacenaron en hieleras con refrigerante y se transportaron al Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto nacional de Pediatría para su análisis.

Se registraron los datos clínicos de los animales: constantes fisiológicas, edad, presencia de diarrea, otras enfermedades, tipo de alimentación, tipo de instalaciones, estado nutricional evaluando la condición corporal donde se asignaron tres categorías: 1) condición severa, 2) estructura obvia y 3) estado ideal (Edmonton *et al*, 1989).

7. Técnicas coproparasitoscópicas (CPS)

Se realizaron coproparasitoscópicos directo en fresco y de concentración flotación para identificar otros parásitos. Las técnicas se realizaron según lo descrito en el Manual del Laboratorio de Parasitología Experimental, INP.

7.1 CPS directo en fresco

En un extremo del portaobjetos se colocó una gota de PBS, y en el lado contrario una de lugol parasitológico (con 2-4 mm de separación), con un aplicador se homogeneizó la muestra de heces (0.2-0.5g de muestra), se colocó en el extremo de la gota de PBS y posteriormente en la gota de lugol y se homogeneizaron, se colocaron los cubreobjetos y finalmente se observaron al microscopio 20X y 40X.

7.2 Tinción de Kinyou

Se realizó la tinción de Kinyou para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

En un portaobjeto se colocó una gota de PBS, con el aplicador de madera se tomó una pequeña cantidad de muestra y se mezcló con el PBS del portaobjetos. La muestra se pre-fijó por calor a 38°C por 1 minuto, se post-fijó con metanol de 2-3 veces. Se le colocó la fucsina saturada con fenol, se dejó a temperatura ambiente por 30-40 minutos y posteriormente se decoloró con 1-2 gotas de alcohol ácido al 1% (70:1). Posteriormente se lavó con agua de la llave y se dejó escurrir por 1 minuto, se contrastó con el colorante azul de metileno por 1 minuto. Se lavó a chorro de agua y se dejó secar, finalmente se observó al microscopio óptico (100x).

7.3 Prevalencia de *Cryptosporidium* spp

La prevalencia indica el número de casos de enfermedad que existe en una población, generalmente se calcula considerando un momento dado, conocido como prevalencia puntual o tasa de prevalencia, la prevalencia de la Cuenca se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$TP = \frac{\text{Total de casos en una población en un lugar y momento dados}}{\text{Total de la población en ese lugar en ese momento dado}}$$

(Jaramillo-Martínez *et al.*, 2010)

Se utilizó el programa Epiinfo V. 6 para el análisis epidemiológico de la enfermedad y con la información obtenida se identificaron los posibles factores de riesgo (edad, condición corporal, diarrea, moco en heces, neumonía, alimentación y presencia de otros parásitos). Se utilizó la Razón de Momios por que se emplea en estudios epidemiológicos transversales y se asociaron los factores de riesgo con la presencia de *Cryptosporidium*.

7.4 Técnica de Sheather (Concentración/Flotación)

Se realizó esta técnica para concentrar ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Para la obtención de ácidos nucleicos.

La muestra con ooquistes se lavó seis veces con agua destilada y una con PBS, se centrifugó a 3500 rpm (Eppendorf centrifuge 5804), se decantó y al precipitado se agregó agua, se homogeneizó. En los tubos cónicos de 15 ml, se colocaron 4.0 ml de la solución I (anexo A), se agregaron 2.0 ml de la solución II (Anexo A), deslizándola por las paredes del tubo con cuidado para evitar mezclar y destruir los gradientes. Se añadieron 500 µl de la muestra con heces lentamente por la pared del tubo evitando destruir los gradientes, se centrifugó a 3500 rpm, durante 20 min. De cada uno de los tubos se aislaron los anillos superior e inferior y se colocaron en tubos que contenían 10 ml de agua destilada, se homogeneizaron para romper el gradiente y para quitarles el exceso de sacarosa. Se centrifugaron a 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804) durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y el precipitado se concentró en un tubo de 15 ml con agua destilada. Se observaron al microscopio a 40x y se almacenaron a 4°C.

7.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Se concentraron tres tubos de 500 µl de ooquistes de *Cryptosporidium* del aislado 2E172, se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, disuelto en buffer de cacodilatos con un pH de 7.2/1 hr. Posteriormente cada una de las muestras se les colocó tetraóxido de osmio al 1% disuelto en buffer de cacodilatos, las muestras fueron lavadas tres veces con buffer de cacodilatos para retirar el exceso de fijador. Se deshidrataron en concentraciones ascendentes de acetona 70%, 80%, 90% y 100% por 10 minutos. La infiltración se realizó con una mezcla de resina epóxica (Epon 812) más acetona pura en una proporción 2:1 y luego 1:1. El botón se colocó en moldes con resina epóxica pura y se dejó polimerizar a una temperatura de 60°C/48 hrs. Se realizó el retallado y se comenzó a hacer los cortes semifinos de menos de 200-250 nm con ultramicrotomo (Leica), con cuchillas de vidrio y barquilla de cinta adhesiva. Se montaron en portaobjetos y se fijaron con calor, se contrastaron con azul de toluidina. Se retallo

nuevamente y se hicieron cortes de menos de 50 nm, se montaron en rejillas de cobre de 200 Mesh, previamente cubiertos con una membrana Formvar. Antes de la observación se realizó un contraste para MET utilizando acetato de uranilo al 4% por 20 minutos, citrato de plomo de Reynolds al 0.4% por 10 minutos y se lavaron con agua destilada. Se observaron las rejillas en microscopio electrónico de transmisión (modelo M900 Carl Zeiss) a 50 kv. Las imágenes fueron tomadas en negativo, la impresión se realizó en papel fotográfico (F3 Kodac) en ampliadora (modelo Beseler 45V-XL).

8. Técnicas Moleculares

Para la genotipificación de especies/genotipos de *Cryptosporidium* en la Cuenca Lechera.

8.1 Lisis de ooquistes:

Las muestras se sometieron a un proceso de lisis física mediante cuatro ciclos de congelación (nitrógeno líquido) y descongelación (50°C), durante 1 minuto respectivamente. Posteriormente se utilizó el kit Qiagen miniStol, en un tubo Eppendorf se colocaron 400 µl de muestra y se adicionaron 1000 µl de buffer ASL, se homogeneizó durante 1 minuto. Se calentó a 70°C/5 minutos, se homogeneizó suavemente durante 15 segundos y se procedió a centrifugar a 14000 g/1 minuto. Posteriormente se pipetearon 900 µl de sobrenadante y se colocaron en otro tubo Eppendorf, se colocó la pastilla Inhibidorex y se homogeneizó durante 1 minuto, se dejó incubar temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 14000g/3 minutos. El sobrenadante, 400 µl se puso en un tubo Eppendorf y se añadieron 15 µl de proteínasa K y 200 µl de buffer AL, se homogeneizó e incubó a 50°C toda la noche.

8.2 Extracción de ADN

El DNA se extrajo por medio del kit comercial QIAamp DNA (Qiagen). El ADN se almacenó a -20°C hasta su uso. Preparación de soluciones en anexo B.

Se añadieron 400 µl de etanol absoluto y se homogeneizó, se dejó incubando durante 1 minuto y se repitió el procedimiento. Se tomó el sobrenadante sin botón y se colocó en columnas previamente identificadas, se centrifugó a 14000g/4 minutos.

Se cambiaron los tubos colectores y añadió a las columnas 500 µl de buffer AW1, se centrifugó a 14000g/2 minutos a temperatura de 25°C. Se cambiaron los tubos colectores y se repitió el proceso utilizando buffer AW2. Nuevamente se cambió el tubo colector y se centrifugó a 14000g/6 minutos, se colocaron las columnas en tubos Eppendorf etiquetados y se añadieron 50 µl de buffer AE en las membranas, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000g/3 minutos y almacenó a -20°C hasta su uso.

8.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó un producto de ~ 1700 pb del gen 18 SSU rRNA (figura 25), con los oligonucleótidos: Forward: 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' y Reverse: 5'CCCATTTCTTCGAAACAGGA-3'. Con el programa: ciclo inicial de 94°C/3 min. 35 ciclos de 94°C/45s, 55°C/ 45s y 72°C/7 min. Una extensión final de 72°C/ 7 min (Termociclador Applied Biosistem).

Con el producto amplificado se realizó una PCR anidada y se obtuvo un producto de ~ 826-864 pb (figura 26). Se utilizaron los oligonucleótidos: Forward: 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3' y Reverse: 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'. Las condiciones del ciclo fueron idénticas a las utilizadas en la primera PCR (Termociclador Applied Biosistem).

8.4 Electroforesis en del agarosa al 1%

Se pesaron 300 mg de agarosa, 35 ml de TBE 1x se mezclaron en un matraz de 250 ml, se calentó hasta que se dejaron de observar cristales de agarosa y se agregaron 0.5 µl (0.500 mg) de BrE, se vertió el contenido en la cámara de electroforesis y se dejó solidificar. Se corrió el gel en la cámara con las siguientes condiciones: 100V, 50W, 10 mA por 1 hr. Las bandas se observaron en transiluminador de UV (BioEpichemic₃

Darkroom) y se guardó la foto digital en formato Tiff. Preparación de soluciones en anexo C.

8.5 Polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP)

Para identificar las especies/genotipos se realizó la restricción de las muestras. Del producto de ~ 826-864 pb se tomaron 8 µl, la mezcla mix se realizó con 1 µl de la enzima (*VspI*, *SspI*), 0.2 µl de BSA, 1 de buffer 10x (Promega) y 8 µl del producto de ~ 826-864 pb, 1 µl de la enzima fastDigest (*MboII*) y 2 µl de Buffer Green fastDigest 10x (Thermo scientific), para un volumen final de 20 µl. Se homogeneizó y dejó incubando a 37°C por 2 horas y 37°C por 5 minutos respectivamente, en incubadora con agitación constante. En la figura 14 se muestran los sitios de corte de cada enzima utilizada.

Cryptosporidium sp. 18 SSU rRNA gene, secuencia completa

ORIGIN

```

1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct
61 aagtataagc ttttatacgg ttaaactgcg aatggctcat tataacagtt atagtttact
121 tgataatcct ttacttacat ggataaccgt ggtaattota gagctaatac atgoggaaag
181 accyaacttt acggaagggt tgtatttatt agataaagaa ccaatttaat ttggtgattc
241 ataataactt tacggatcac atttatatgt gacatatcat tcaagttct gacctatcag
301 ctttagacgg tagggtattg gcctaccgtg gcaatgacgg gtaacgggga attagggttc
361 gattccggag agggagcctg agaaacggct accacatcta aggaaggcag caggcgcgca
421 aattacccaa toctaataca gggaggtagt gacaagaaat aacaatacag gactttaaat
481 agttttgtaa ttggaatgag ttaagtataa acccctttac aagtatcaat tggagggcaa
541 gtctgggtgcc agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatattaaa gttggtgcag
601 ttaaaaagct cgtagttgga tttctgttaa taatttatat ataatatttt attaatattt
661 atatagtatt aacataattc atattactat attttatagt atatgaaatt ttactttgag
721 aaaattagag tgcttaaagc aggcattagc cttgaatact ccagcatgga ataataataa
781 agatTTTTTat cTTTTTtatt ggttctaaga taaaaataat gattaatagg gacagttggg
841 ggcatttgta tttaacagtc agaggtgaaa ttcttagatt tgttaaagac aaactagtgc
901 gaaagcattt gccaaaggatg ttttcattaa tcaagaacga aagttagggg atcgaagacg
961 atcagatacc gtctgtagtct taaccataaa ctatgccaac tagagattgg aggttgttcc
1021 ttactccttc agcaccttat gagaaatcaa agtttttggg ttctggggggg agtatggctg
1081 caaggctgaa acttaaagga attgacggaa gggcaccacc aggagtggag cctgcggtt
1141 aatttgactc aacacgggaa aactcaccag gtccagacat aggaaggatt gacagattga
1201 tagctctttc ttgattctat ggggtgggtgt gcatggcctt tcttagttgg tggagtgtt
1261 tgtctgggta attcogttaa cgaacgagac cttaacctgc taaatagaca taagaaatat
1321 taatTTTTTTa tttgtcttct tagagggact ttgtatgttt aatacagggg agtttttaggc
1381 aataacaggc ctgtgatgcc cttagatgtc ctgggcccgcg cgcgcgctac actgatgcat
1441 ccatcaagta tatattcctg tttogaagga aatgggtaat cttttgaata tgcatcgtga
1501 tggggataga tcattgcaat tattgatcct gaacgaggaa ttocagtaa gcgcaagtca
1561 tcagcttgcg ctgattacgt ccctgccctt tgtacacacc gcccgctcgt cctaccgatt
1621 gaatgatccg gtgaattatt cggaccatac tttgtagcaa tacatgtaag gaaagtttctg
1681 taaaccttat catttagagg aaggagaagt cgtaacaagg tttccgtagg tgaacctgca
1741 gaaggatcaa gc

```






-  **Secuencia ~1700 pb**
-  **Secuencia ~826 pb**
-  **Enzima *SspI* (aatatt)**
-  **Enzima *Vspl* (attaat)**
-  **Enzima *MbolI* (gaaga(N)₈)**

Figura 14. Esquema de la secuencia completa de *Cryptosporidium* spp. (No. Acceso AF442484 GenBank). En rojo se marca el sitio de corte del cebador de ~1700 pb, en azul el sitio de corte del cebador de ~826, en verde el sitio de corte de *SspI*, en amarillo el sitio de corte de *Vspl*, en naranja el sitio de corte de la enzima *MbolI*.

8.6 Electroforesis en gel de agarosa al 2% (restricción)

Las restricciones de ~826 pb se corrieron en geles de agarosa al 2% (600 mg de agarosa, 35 ml de TBE 1x y 0.5 µl de BE), con las siguientes condiciones: 70V, 30W, 10mA por 1:30 hrs, se observó en transiluminador UV (BioEpichemic₃ Darkroom) y se guardó la foto digital en formato Tiff.

9. Secuenciación de 10 aislados

El producto de ~826 pb de 10 aislados (2E172, 6E172, 9E172, 17E100, 19E100, 21E100, 7E172, 10E116, 13E121, 25E121) de becerros positivos a *Cryptosporidium* se purificó mediante el Kit de purificación de PCR Microcon de DNA (Merk millipore) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

Se requirió de 10ng por cada 100pb de ADN, con una pureza de 1.7-2 (absorbancia 260/280). Los productos fueron secuenciados en el Instituto de Biología de la UNAM. Los cromatogramas fueron editados con el programa Secuencer V.5.2, (figura 15), se obtuvo la calidad de las secuencias y las secuencias consenso, posteriormente los 10 aislados fueron alineados con el programa Clustal W (Bioedit, Mega V.6), mediante BLAST (NCBI) se obtuvo la homología de secuencias previamente reportadas en el GenBank con número de acceso (AF442484, AF108864, AF093496, AF093499, U11440, AB210854, AF112575, L19068, EF514234, AY954488, KF128755, AB513881, KM067090, JX515546, EF514234). Finalmente se obtuvo la filogenia utilizando el programa Mega V. 6, por el método de máxima similitud basado en el modelo Tamura-Nei. El árbol se dibujó a escala, las longitudes de rama fueron medidas por el número de sustituciones por sitio.

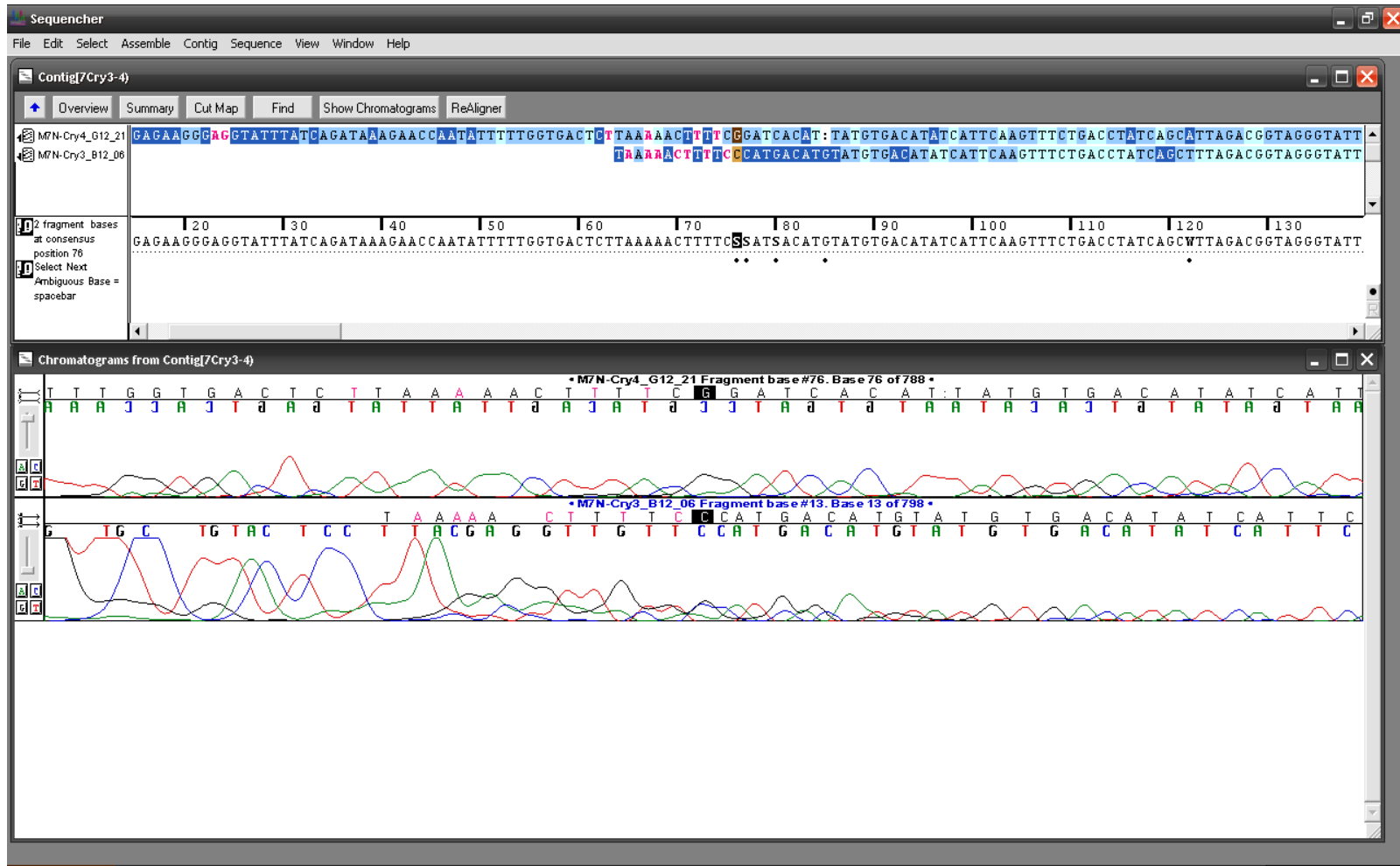


Figura 15. Edición de la secuencia consenso del aislado 7E172. En la parte superior se muestra una parte de las secuencias F y R de la secuenciación (se observan en diferentes tonos de azul), a continuación se observa una parte de 20-130 pb de la secuencia consenso generada utilizando las secuencias anteriores (en negro) y en la parte inferior se observan los cromatogramas de las primeras secuencias (curvas), que sirven para comparar los nucleótidos.

10. Resultados

Se obtuvieron muestras de heces de 212 becerros, menores de 3 meses de edad. Las muestras de heces se procesaron para CPS directo en fresco y tinciones de Kinyou. La distribución de los 12 establos muestreados de la Cuenca Lechera se observa en la figura 16.



Figura 16. Distribución esquemática de los establos muestreados de la Cuenca Lechera. (1-12 amarillo: primer muestreo, estrella roja: segundo muestreo).

Las instalaciones de los establos son comúnmente con piso de tierra y casetas individuales, se manejan dos tipos de alimentación: a) tipo americana, consiste en leche dos o tres veces al día y b) tipo europea, que es alimento concentrado, alfalfa achicalada o heno de avena y agua a libre consumo. En la cuadro 6, se muestran estas características de las instalaciones, (figura 17).

Cuadro 6. Características de las instalaciones de los becerros por establo.

Establo	No. de muestras	Edad de los becerros	Observaciones
1	15	<3 meses	Casetas individuales, piso de tierra. Sin desparasitar.
2	15	<1 mes y de 2-3 meses	<1 corrales compartidos techados, piso de concreto y cama de paja. 2-3 meses corral con piso de tierra. Comederos compartidos con vacas adultas. Sin desparasitar. Becerros que murieron de diarrea (tx antibióticos)
3	26	<3 meses	Corrales compartidos, techados y piso de tierra. Sin desparasitar. Infestación por garrapatas.
4	23	<3 meses	Casetas individuales, piso de concreto, techadas. Sin desparasitar.
5	30	<3 meses	Casetas individuales o dos becerros, piso de tierra. Sin desparasitar.
6	11	<3 meses	Casetas individuales, piso de tierra. Sin desparasitar.
7	11	<2 meses	Casetas individuales, piso de tierra. Sin desparasitar.
8	29	<3 meses	Casetas individuales, piso de tierra. Sin desparasitar.
9	16	<3 meses	Casetas individuales y piso de tierra. Sin desparasitar.
10	6	<3 meses	Casetas individuales y piso de tierra. Sin desparasitar.
11	15	<3 meses	Casetas individuales y piso de tierra. Sin desparasitar.
12	15	<3 meses	Casetas individuales y piso de tierra. Sin desparasitar
Total	212		



Figura 17. Instalaciones de becerros en los diferentes establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo, 2012-2013. E: establo. 1-9: No. De establo. Podemos observar las diferentes condiciones de los becerros de acuerdo al establo, algunos tienen cama de paja, en algunos el piso es de tierra, otros becerros comparten corrales y algunos tienen casetas individuales.

10.1. Diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.

Se encontró al parásito en todos los establos muestreados. En la figura 18, se observan ooquistes de *Cryptosporidium* de becerros obtenidos de diferentes establos.

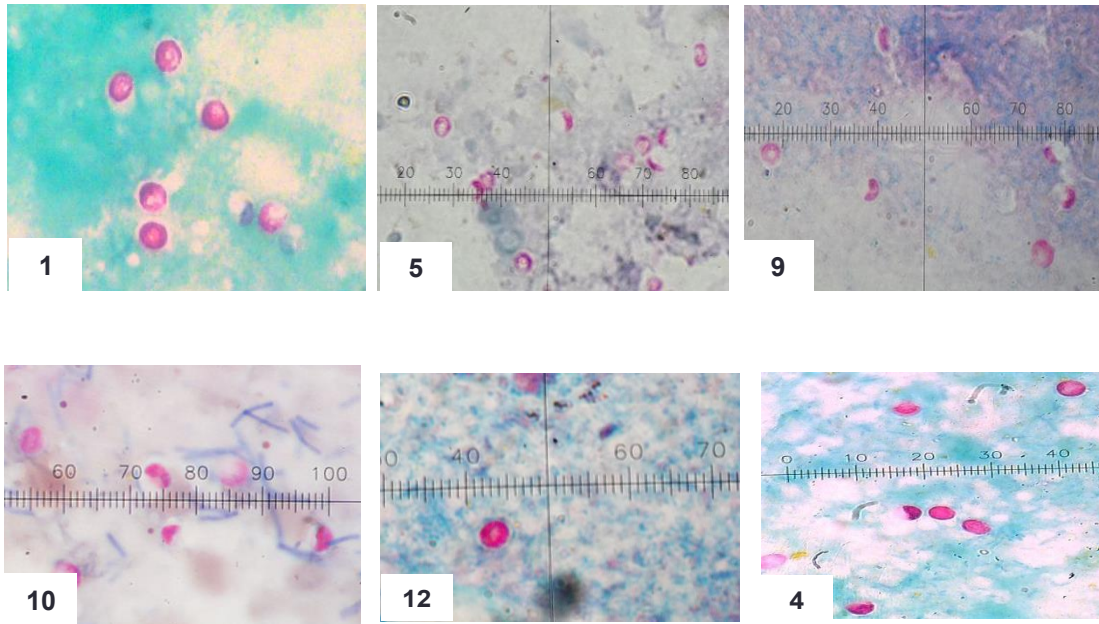


Figura 18. Microfotografías que muestran ooquistes de *Cryptosporidium* spp de entre 4-6 μm . Microscopio óptico 100x. Cada línea de la regleta corresponde a 1 μm . 1, 5, 9, 10, 12, 4: No. de establo.

10.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Adicionalmente se realizó la identificación del protozooario por MET (figuras 19 y 20), de un concentrado de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. de una muestra positiva y el botón se fijó con glutaraldehído al 2.5%.

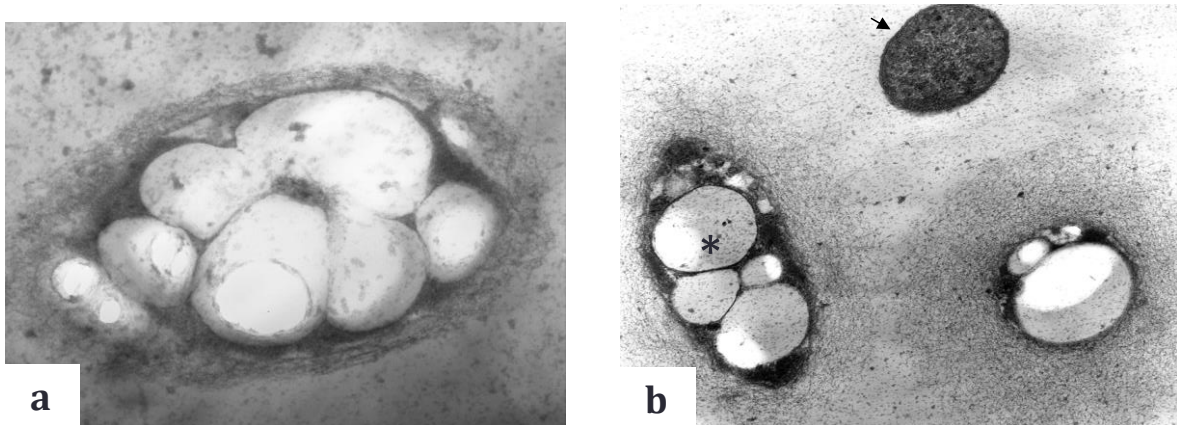


Figura 19. Fotografía electrónica de transmisión. a) Estructura parasitaria cuyo interior contiene grandes gránulos electrodensos (compatible con gránulos de polisacáridos), estructuras en forma de coma (esporozoítos). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento, 50 000x. Estructuras parasitarias de diversos tamaños, algunas contienen gránulos electrodensos (compatibles con gránulos de polisacáridos) (*). Estructura esférica electrodensa, con doble capa electrodensa y delgada, cuyo interior exhibe material granular electrodenso (ooquiste) (flecha). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 30, 000x.

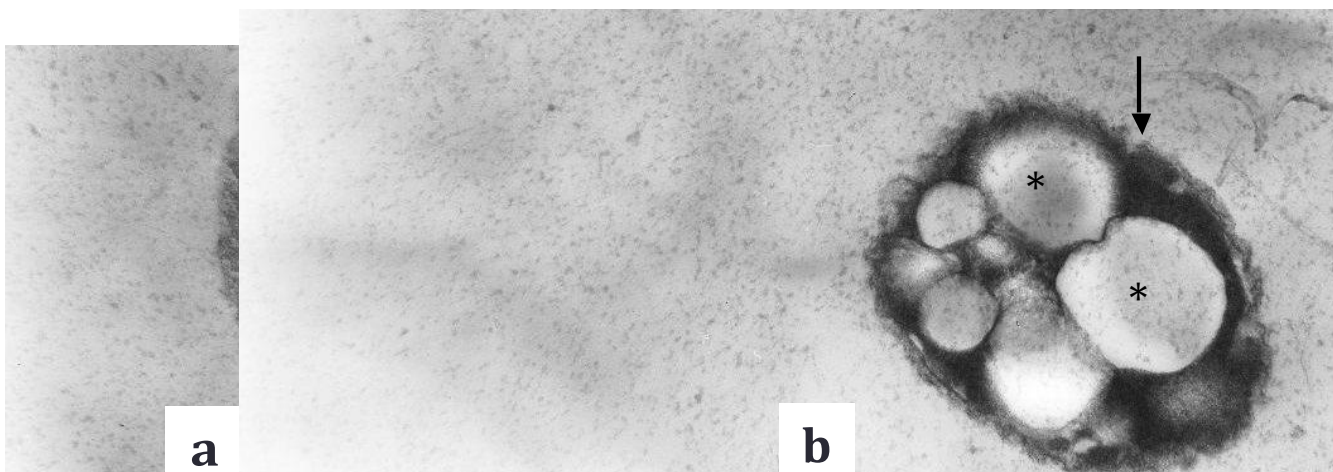


Figura 20. Fotografía electrónica de transmisión. a-b) Estructuras parasitarias redondas y ligeramente alargadas, exhiben una fina membrana electrodensa e irregular (flecha). Al centro muestran grandes espacios electrolúcidos (compatibles con gránulos de polisacáridos) (*). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 30, 000x.

10.3 Prevalencia de *Cryptosporidium* spp.

La frecuencia por muestreo de los establos muestreados se observa en la figura 21, el primer muestreo tuvo una N= 162 becerros y el segundo muestreo N= 50, los muestreos fueron significativos con (p=00195).

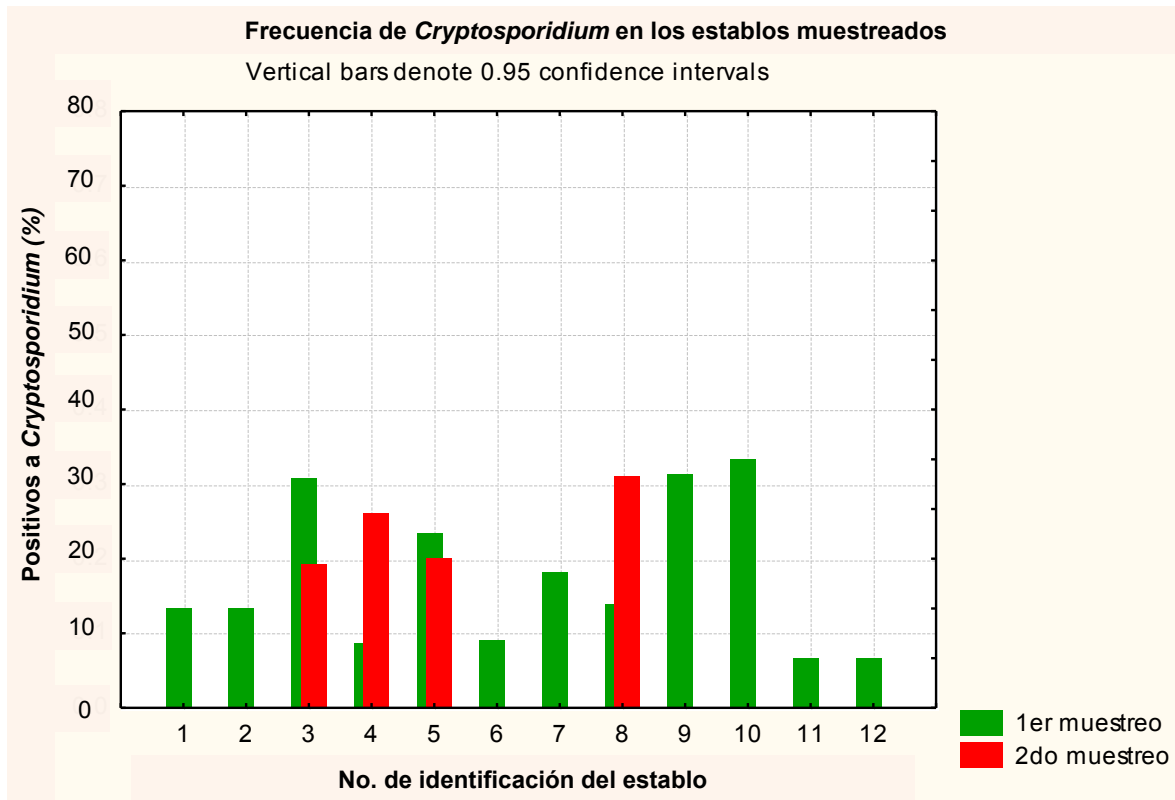


Figura 21. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp por muestreo. Programa Statsoft V. 8. En color verde se muestra la frecuencia en los 12 establos muestreados durante el primer muestreo, donde se aprecia que los establos 3, 9 y 10 fueron los que tuvieron las frecuencias mas altas; en color rojo se muestra la frecuencia de los 4 establos nuevamente muestreados en el segundo muestreo, donde se aprecia que el establo 8 fue el que tuvo la frecuencia mas alta.

La prevalencia puntual o tasa de prevalencia fue: TP= 64 becerros positivos/212 becerros muestreados = 0.30188, el factor de multiplicación es 10^2 por lo tanto la prevalencia es igual a 30.19 casos de Criptosporidiosis por cada 100 becerros. La prevalencia general de ambos muestreos fue de 30.19%.

Se encontró a *Cryptosporidium* en todos los establos (figura 22), con una prevalencia de general de 30.19% en los dos muestreos. Se observó que la prevalencia por establo fue significativa con ($p=0.0027$).

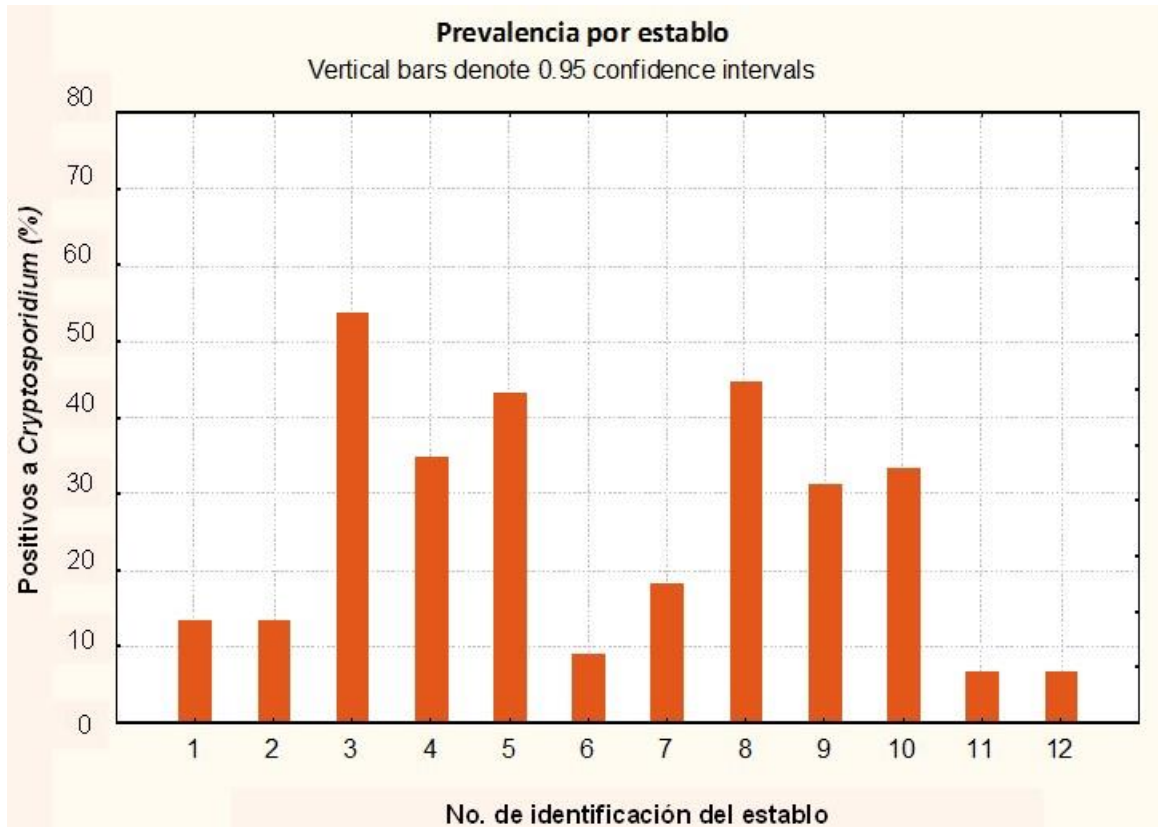


Figura 22. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp por establo. La mayor prevalencia fue 54.3% del establo 3 y la menor de 6.7% en los establos 11 y 12. Programa Statsoft V. 8.

Ademas el total de muestras de becerros se agruparon en las cuatro estaciones del año, primavera, n= 79; verano, n= 51; otoño, n= 37; invierno, n= 44, (figura 23). Se observo que la frecuencia por estación fue significativa con (p=0.0007).

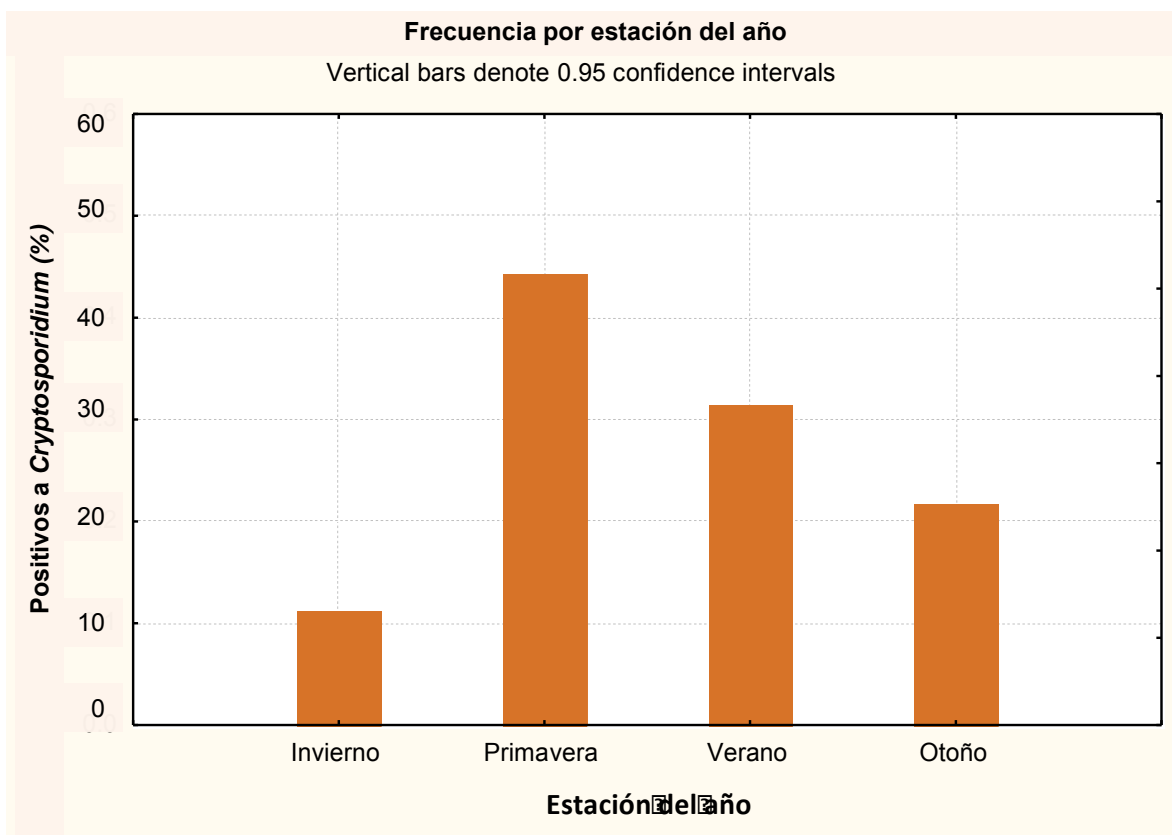


Figura 23. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp por estación del año. Se observo la mayor frecuencia en primavera con 44.3%.

10.4 Asociación de *Cryptosporidium* spp con cuadro clínico en becerros

Se encontraron 64/212 becerros positivos a *Cryptosporidium*, los animales muestreados fueron menores de tres meses de edad, en el cuadro 7, se resumen las características de los becerros positivos.. La mayoría de los becerros positivos a *Cryptosporidium* tenían entre 30-90 días y se encontró un becerro tres días de edad infectado. . Hubo 30/64 becerros con diarrea y *Cryptosporidium*, en promedio los

animales tenían condición corporal de 2 (estructura obvia), 42/64. Los becerros también tenían otros parásitos 22/64.

Cuadro 7. Características clínicas de los becerros y prevalencia de criptosporidiosis por establo.

Establo	N	Becerros (+)	%	Edad (días)	Diarrea	Cond.Corp.	Otras afecciones	Otros parásitos	Alimentación
1	15	2	13.33	60	-	2	-	G	E
				60	-	2	Mh	-	E
2	15	2	13.33	5	-	2	-	G	E
				12	Si (c/s)	2	Mh	-	E
3	26	14	53.85	90	Si	3	-	Ep	E
				90	Si	3	-	-	E
				90	-	2	-	-	E
				90	Si	3	-	-	E
				90	-	3	-	Ei, T, Ep	E
				90	-	3	-	-	E
				90	-	3	-	-	E
				90	Si	3	-	Ep	E
				60	-	2	-	-	E
				60	-	2	-	-	E
				60	Si	2	-	-	E
				60	Si	1	-	Ei, Bh, Ep, G, Ch	E
				60	-	2	-	-	E
				60	-	2	-	-	E
4	23	8	34.78	30	-	2	-	G	E
				30	-	2	-	-	E
				90	Si	1	-	G	E
				90	Si	1	-	G	E
				60	-	2	-	-	E
				90	-	2	-	G, Bh	E
				60	-	2	-	Bh	E
				30	-	2	-	Bh	E
				30	Si	2	-	Ep	A
				30	-	2	-	-	A
5	30	13	43.33	30	Si	2	-	Ep	A
				30	-	2	-	-	A
				30	-	2	-	Ep	A
				30	Si	2	-	G	A
				30	-	2	Mh	-	A
				30	-	2	N	Ep	A
				30	-	2	-	-	A
				30	Si	2	N	-	A
				20	-	1	-	-	A
				15	Si	2	-	-	A
				60	-	3	-	-	A
				60	Si	2	-	-	A
				30	Si	1	-	Ei	A
				90	-	1	N	-	A
6	11	1	9.09	60	-	2	N	-	A
				22	-	2	-	E	E
7	11	2	18.18	22	-	1	-	-	E
				60	-	3	-	-	E
				38	-	2	-	-	E
				38	-	3	-	-	E
				60	-	3	-	E	E
				3	Si	2	Mh	-	E
				8	-	2	-	-	E
				30	Si	1	-	-	E
				15	Si	2	-	-	E
				30	Si	1	-	-	E
				60	Si	2	Mh	-	E
8	29	13	44.83	60	-	2	-	-	E
				60	-	2	-	-	E
				38	-	3	-	-	E
				60	-	3	-	E	E
				3	Si	2	Mh	-	E
				8	-	2	-	-	E
				30	Si	1	-	-	E
				15	Si	2	-	-	E
				30	Si	1	-	-	E
				60	Si	2	Mh	-	E
9	16	5	31.25	60	-	2	-	-	E
				30	-	2	N	-	E
				38	Si	2	-	-	A
				15	Si	2	-	E	A
				8	Si	2	Mh	G, E	A
				8	Si (c/s)	2	-	E	A
				22	Si (c/s)	1	Mh	E	A
10	6	2	33.33	21	Si	1	-	Ei	E
				90	Si	2	Mh	-	E
11	15	1	6.67	90	-	2	-	-	E
12	15	1	6.67	60	-	2	-	-	E
Total	212	64	30.19	3-90	30				

D: diarrea, D/S: diarrea con sangre, G: *Giardia*, Ei: *Eimeria*, A: americana, E: Europea, Mh: moco en heces, N: neumonía, 1: condición severa, 2: estructura obvia, 3: estado ideal.

10.5 Identificación de factores de riesgo asociados a la presencia de *Cryptosporidium* spp

Se analizaron algunos factores de riesgo (edad, condición corporal, diarrea, moco en heces, neumonía, tipo de alimentación y presencia de otros parásitos) con la presencia de *Cryptosporidium* (cuadro 8), para buscar la asociación causal de la enfermedad en la Cuenca Lechera de Tizayuca.

Se observó una presencia igual de *Cryptosporidium* en becerros de ≤ 1.5 meses o $> 1.6 \leq 3$ meses, sin embargo no se encontró asociación significativa con RM 0.97 (IC 95%, $p=0.52$). Se formaron 3 grupos para evaluar la condición corporal: 1 (condición severa), 2 (estructura obvia) y 3 (estado ideal); condición de 1 fueron 17 con RM 1.09 (IC95%, $p=0.81$), condición de 2 fueron 45 con RM 1.03 (IC95%, $p=0.91$) y de condición 3 fueron 2 con RM 0.78 (IC95%, $p=0.75$), las poblaciones no fueron homogéneas, siendo la de condición corporal 2 diferente a las otras, no se encontró asociación significativa para ningún grupo.

Para diarrea, encontramos 30 (46.9%) becerros presentaron diarrea, y 34 (53.1%) becerros no presentaron diarrea del total de becerros con *Cryptosporidium*, una RM de 2.84 (IC95%, $p=0.0007$), se encontró asociación altamente significativa. Se observó también la presencia de moco en heces con RM 2.53 (IC95%, $p=0.05$), lo que es indica asociación significativa.

Para el caso de Neumonía una RM de 0.86 (IC95%, $p=0.82$), no se observó asociación significativa. Se observó que los becerros fueron en su mayoría alimentados con una dieta tipo europea 45 (70.3%) y tipo americana 19 (28.7%), la RM fue 0.81 (IC95%, $p=0.54$), no se encontró asociación significativa y finalmente se observó la influencia de otros parásitos donde encontramos 22 (34.4%) becerros positivos a otros parásitos, con una RM 1.09 (IC95%, $p=0.78$) no encontramos asociación significativa.

Cuadro 8. Razón de momios o de oportunidad (RM) y probabilidad de las variables.

Factor de Riesgo	Número	Positivos	RM (IC 95%)	P
Edad (meses)				
(≤1.5)	105	32 (50.0%)	0.97 (0.54-1.74)	0.9280
(>1.6 ≤3)	107	32 (50.0%)		
Condición corporal				
1	54	17 (26.6%)	1.09 (0.53-2.22)	0.8105
2	148	45 (21.22%)	1.03 (0.52-2.07)	0.9167
3	10	2 (0.94%)	0.78 (0.11-4.13)	0.7594
Diarrea				
Con	65	30 (46.9%)	2.84 (1.53-5.29)	0.0007
Sin	147	34 (53.1%)		
Moco en heces				
Con	18	9 (14.1%)	2.53 (0.86-7.40)	0.0556
Sin	194	9 (85.9%)		
Neumonía				
Con	11	3 (4.7%)	0.86 (0.17-3.73)	0.8287
Sin	201	8 (95.3%)		
Alimentación				
Americana	57	19 (29.7%)	0.81 (0.42-1.56)	0.5452
Europea	155	45 (70.3%)		
Otros parásitos				
Con	70	22 (34.4%)	1.09 (0.56-2.12)	0.7824
Sin	142	42 (65.6%)		

10.6 Extracción de DNA

Se obtuvieron los ácidos nucleicos de 50/64 muestras que tenían ooquistes de *Cryptosporidium*, se determinó la concentración ng/μl así como la pureza (Absorbancia 260/280= RAT de 1.7-2) mediante espectroscopía y se conservaron a -20°C.

10.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada.

En la primera PCR se amplificó un producto de ~ 1700 pb del gen que codifica al 18 SSU rRNA de 11 muestras, (figura 24). En la segunda PCR se amplificó un producto de ~ 824-864 pb de 18 muestras, (figura 25).

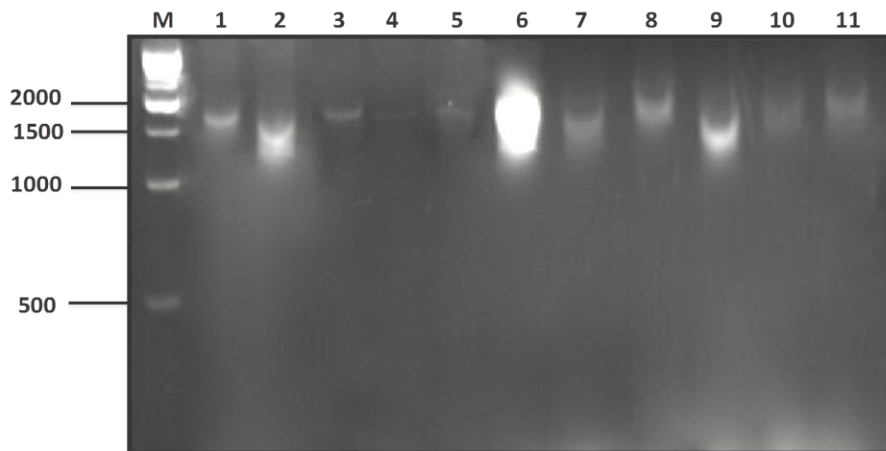


Figura 24. Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con BrE, que muestra la amplificación de un producto de ~ 1700 pb del gen que codifica al 18 SSU rRNA de 11 muestras. M: marcador de 500 pares de bases. Carril 1: muestra H; carril 2: muestra B; carril 3: muestra 25E121; carril 4: muestra 6E172; carril 5: muestra 24E121; carril 6: muestra 9E172; carril 7: muestra 17E100; carril 8: muestra 2E172; carril 9: muestra 24E121; carril 10: muestra 19E100; carril 11: muestra 19E100.

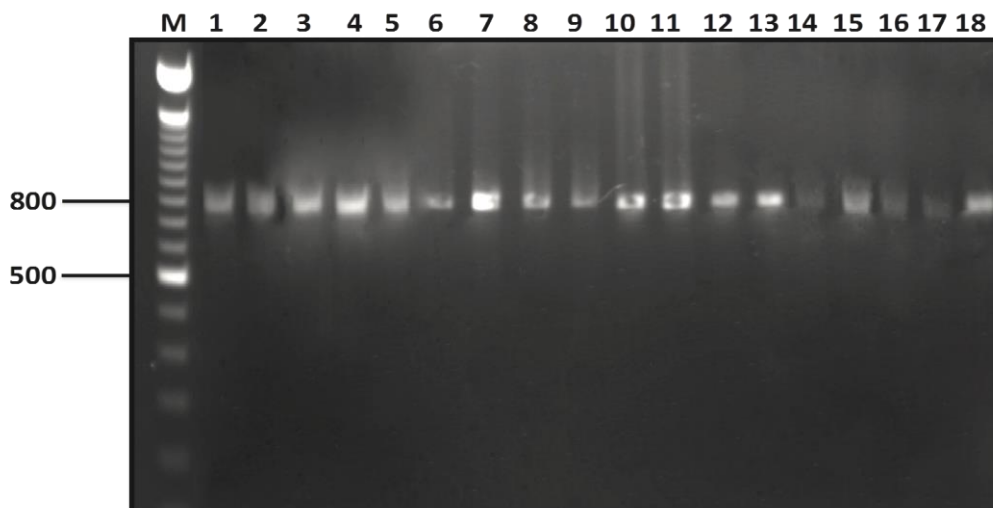


Figura 25. Fotografía de un gel de agarosa al 1%, teñido con BrE, que muestra la amplificación de un producto de ~ 826 pb del gen que codifica al 18 SSU rRNA de 18 muestras. M: marcador de 500 pares de bases. Carril 1: muestra 17E100; carril 2: muestra 6E172; carril 3: muestra 19E100; carril 4: muestra 2E172; carril 5: muestra 25E121; carril 6: muestra 9E116; carril 7: muestra 10E116; carril 8: muestra 7E172; carril 9: muestra 13E121; carril 10: muestra 24E100; carril 11: muestra 21E100; carril 12: muestra 24E121; carril 13: muestra 9E172; carril 14: muestra 1E196; carril 15: muestra 2E196; carril 16: muestra 5E196; carril 17: muestra 7E196; carril 18: muestra 8E196.

10.8 Restricción del fragmento de ~ 826 pb con *VspI*

El producto de ~ 826 pb de 11 muestras (2E172, 6E172, 9E172, 17E172, 19E100, 21E100, 7E172, 10E116, 13E121 y 1E196) se restringió con la enzima *VspI* y se visualizó en gel de agarosa al 2%, (figura 26). En todas las muestras el patrón electroforético mostró bandas de ~ 100 y ~ 630 pb., que pueden corresponder a: *C. bovis*, *C. baileyi*, *Cryptosporidium sp*, *C. parvum* (bovino A y B), *C. parvum*, (perro y cerdo) (Feng *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 1999, 2000, 2001).

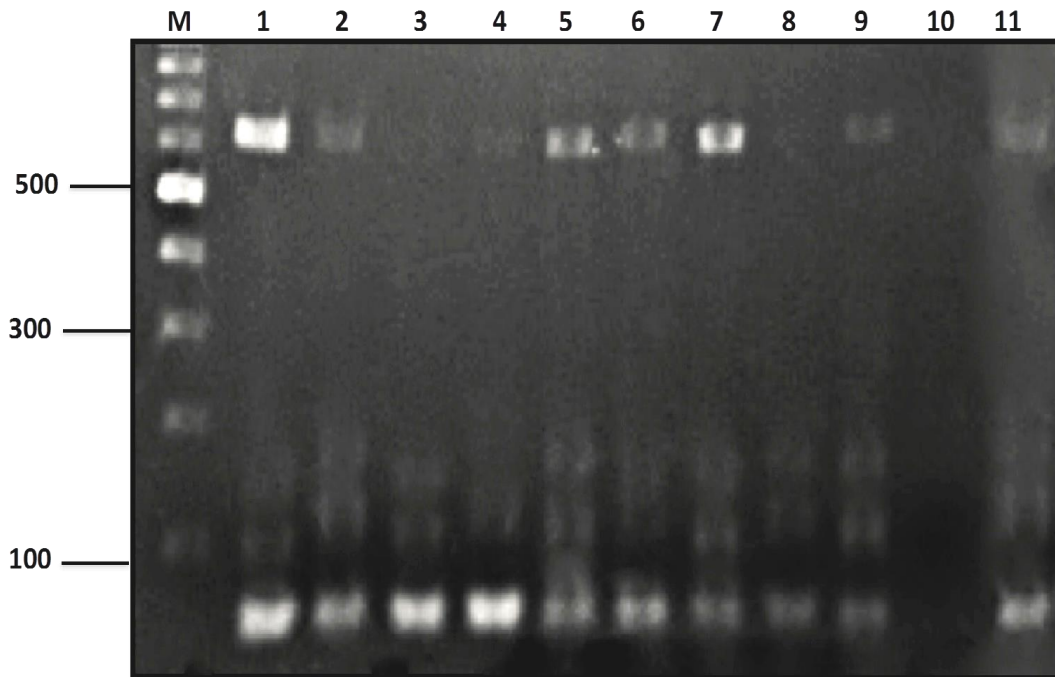


Figura 26. Fotografía de un gel de agarosa al 2%, teñido con BrE, que muestra el patrón electroforético (RFLP) de 11 muestras restringidas con la enzima *VspI*. M: marcador de 100 pares de bases. Carril 1: 2E172; carril 2: 6E172; carril 3: 9E172; carril 4: 17E100; carril 5: 19E100; carril 6: 21E100; carril 7: 7E172; carril 8: 10E116; carril 9: 13E121; carril 10: 25E121; carril 11: 1E196. Las bandas de ~ 70 y ~ 150 no son características de especie.

10.9 Restricción del fragmento de ~ 826 pb con *SspI*

El producto de ~ 826 pb de 11 muestras (2E172, 6E172, 9E172, 17E172, 19E100, 21E100, 7E172, 10E116, 13E121 y 1E196) se restringió con la enzima *SspI* y se visualizó en gel de agarosa al 2%, (figura 27). En la mayoría de las muestras el patrón electroforético mostró bandas de ~ 110, ~254 y ~ 449 pb, que pueden corresponder a *C. bovis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, *C. parvum* (humano, bovino A, bovino B y perro). (Feng *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 1999, 2000, 2001).

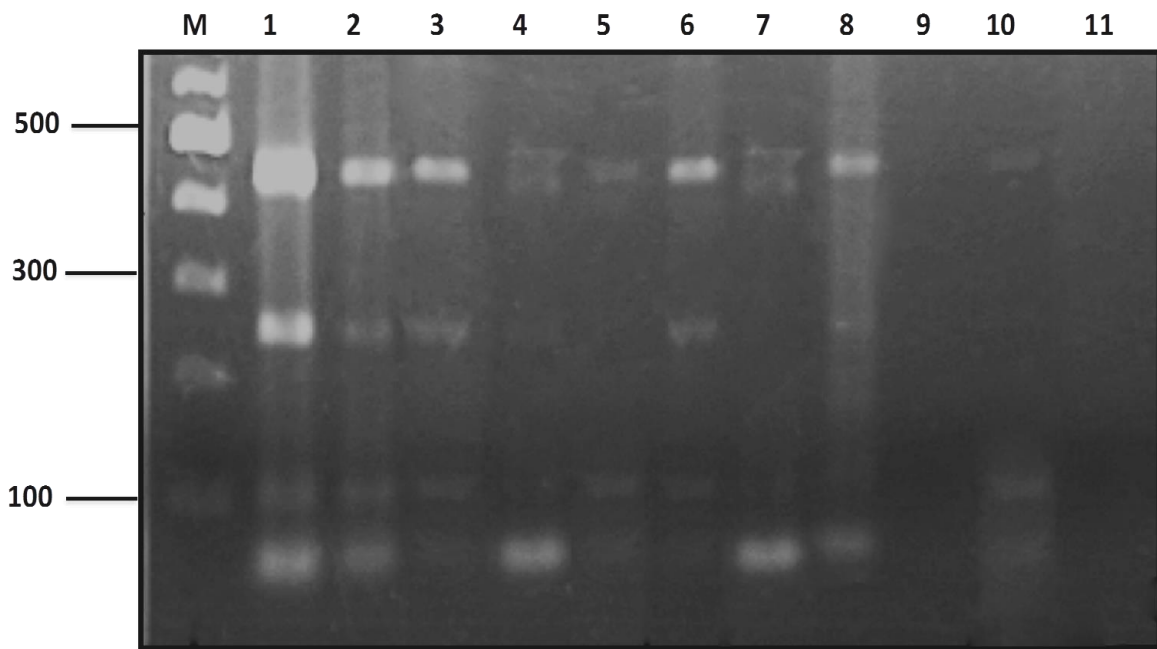


Figura 27. Fotografía de un gel de agarosa al 2%, teñido con BrE, que muestra el patrón electroforético (RFLP) de 11 muestras restringidas con la enzima *SspI*. M: marcador de 100 pares de bases. Carril 1: 2E172; carril 2: 6E172; carril 3: 9E172; carril 4: 17E100; carril 5: 19E100; carril 6: 21E100; carril 7: 7E172; carril 8: 10E116; carril 9: 13E121; carril 10: 25E121; carril 11: 1E196.

10.10 Restricción del fragmento de ~ 826 pb con *MbolI*

El producto de ~ 826 pb de 11 muestras (2E172, 6E172, 9E172, 17E172, 19E100, 21E100, 7E172, 10E116, 13E121 y 1E196) se restringió con la enzima *MbolI* y se visualizó en gel de agarosa al 2%, (figura 28). En todas las muestras el patrón electroforético mostró bandas de ~ 76, ~162 y 412 pb, que pueden corresponder a *C. bovis*. Las muestras 1, 2, 6 y 10 mostraron bandas de atípicas de ~ 800-900 pb (Feng *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 1999, 2000, 2001).

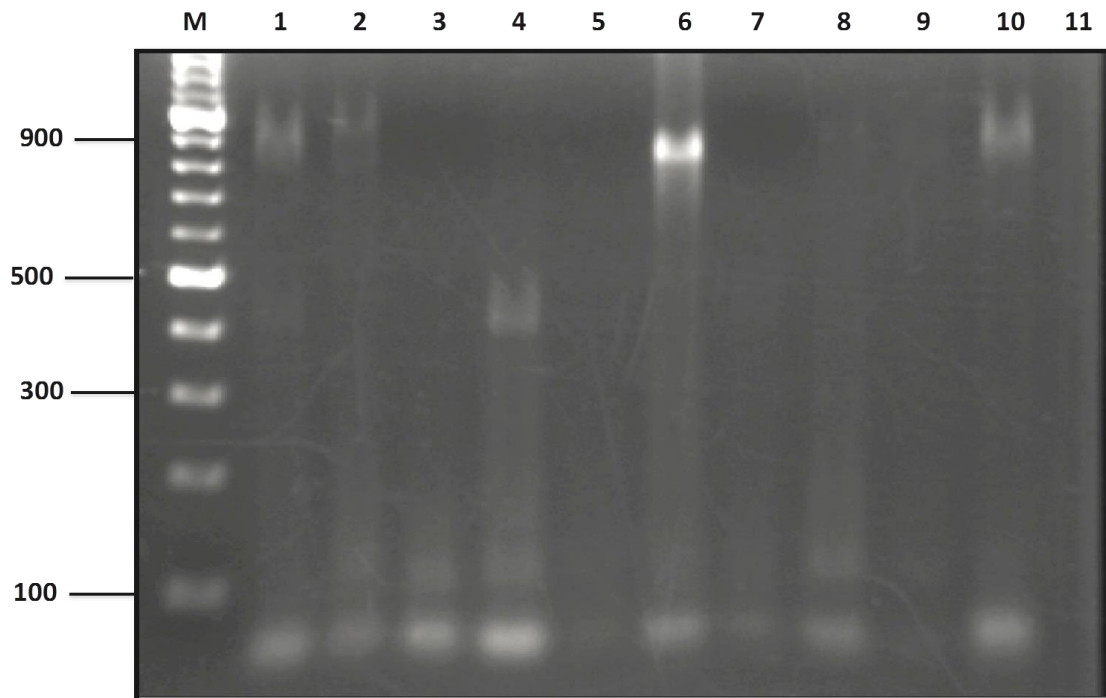


Figura 28. Fotografía de un gel de agarosa al 2%, teñido con BrE, que muestra el patrón electroforético (RFLP) de 11 muestras restringidas con la enzima *SspI*. M: marcador de 100 pares de bases. . Carril 1: 2E172; carril 2: 6E172; carril 3: 9E172; carril 4: 17E100; carril 5: 19E100; carril 6: 21E100; carril 7: 7E172; carril 8: 10E116; carril 9: 13E121; carril 10: 25E121; carril 11: 1E196.

En el cuadro 9 se observan en resumen las especies encontradas de acuerdo a la restricción del producto de ~ 826 pb con las enzimas *Vspl*, *Sspl* y *MbolI*.

Cuadro 9. Especies de *Cryptosporidium* encontradas por RFLP.

Aislado	<i>Vspl</i>	<i>Sspl</i>	<i>MbolI</i>	Especies encontradas
2E172	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	~30, ~100, ~254, ~449 (A)	~76, ~130, ~412, ~900 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
6E172	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	~30, ~100, ~254, ~449 (A)	~76, ~130, ~900 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
9E172	~70, ~100, ~175 (A)	~30, ~100, ~254, ~449 (A)	~76, ~130, ~412 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
17E100	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	~30, ~100 (A)	~76, ~130 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
19E100	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	~100, ~449 (A)	~76, ~850 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
21E100	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	~100, ~254, ~449 (A)	~76, ~130, ~412, ~900 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
7E172	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	~30, ~100, ~449 (A)	~76, ~130 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
10E116	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	~30, ~100, ~254, ~449 (A)	~76, ~130 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
13E121	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	SR	~76, ~130 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
25E121	SR	~30, ~100, ~449 (A)	~76, ~130 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
1E196	~70, ~100, ~175, ~625-630 (A)	SR	76, ~130, ~900 (A)	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>
Especies sugeridas	<i>Cryptosporidium</i> spp <i>C. parvum</i> (bovino A, B; perro y cerdo) <i>C. bovis</i> <i>C. baileyi</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp <i>C. parvum</i> (humano, bovino A, B; ratón, perro y cerdo) <i>C. bovis</i> <i>C. meleagridis</i> <i>C. wrairi</i>	<i>C. parvum</i> <i>C. bovis</i>	

A: gel de agarosa; SR: sin restricción.

10.11 Secuenciación de 10 muestras positivas a *Cryptosporidium* spp

Para la identificación específica de las especies/genotipos, 10 muestras se secuenciaron, se obtuvo la secuencia consenso con el programa Secuencer V.5.2. Se realizó la alineación con el programa Clustal W y se utilizó el BLAST (NCBI) para buscar la homología con especies/genotipos de *Cryptosporidium* registrados en el GenBank. Las secuencias de nuestras muestras se compararon con: (AF442484, JX237827, KM225725, HQ179571, KM067090) encontrando una identidad de 98-100%, (cuadro10), obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 10. Genotipos encontrados con la secuenciación de los aislados.

Aislado	Max score	Total score	pb	Query cover	E value	Identity	Especie o genotipo	No. acceso GenBank	Especie/Aislado
2E172	1454	1454	840	98	0.0	98%	<i>C. parvum</i> islote ZD-11	JX237827.1	<i>C. parvum</i>
6E172	1526	1526	890	93	0.0	99%	<i>C. parvum</i> islote jammu	KM225725.1	<i>C. parvum</i>
7E172	1452	1452	856	95	0.0	99%	<i>C. bovis</i> islote I	HQ179571.1	<i>C. bovis</i>
9E172	1506	1506	839	99	0.0	99%	<i>C. parvum</i> islote jammu	KM225725.1	<i>C. parvum</i>
10E116	1454	1454	857	99	0.0	99%	<i>C. parvum</i> islote jammu	KM225725.1	<i>C. parvum</i>
13E121	1513	1513	869	96	0.0	99%	<i>C. parvum</i> islote jammu	KM225725.1	<i>C. parvum</i>
25E121	1507	1507	838	98	0.0	99%	<i>C. parvum</i> islote jammu	KM225725.1	<i>C. parvum</i>
17E100	1445	1445	803	100	0.0	99%	<i>C. bovis</i> islote 55	KM067090.1	<i>C. bovis</i>
19E100	1496	1496	843	96	0.0	100%	<i>C. bovis</i> islote I	HQ179571.1	<i>C. bovis</i>
21E100	1491	1491	851	96	0.0	99%	<i>C. parvum</i> islote jammu	KM225725.1	<i>C. parvum</i>

Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

Con el programa Bioedit se alinearon nuestras secuencias (cuadro 11), para buscar cambios en los nucleótidos con relación a las secuencias reportadas.

Cuadro 11. Diferencias encontradas en los aislados & secuencias reportadas.

Aislados o genotipos (GenBank)	Localización de los cambios 18 SSU rRNA					
	205-226 pb	300-320 pb	505-526 pb	669-680 pb	1045-1067 pb	1110-1132 pb
10E116	GGGAAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATTTCAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	AGATTACCGTCGTAGTCCCTTTT	TTCCTTTACTTCCTAT-AG---
13E121	TGGGATAGGGTCGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTTTACTCCCTATA-CAGGC
25E121	GGGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTTTACTCC--
21E100	GGGAGGGGGTTGTATCTCTC	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTTACTTTCTTAT-ACAAA
2E172	AGGGGGTTTGTATTTATT	CTATCATTTCAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCATTTACTCCCGAG-GGG-
6E172	GGAGGGTTTGTATTTATT	ATAACATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTC-CTTACTCCCATC-GAAGA
9E172	GAAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC-TTA	GTCCCTTACTCCCTTA----
7E172	GTGAGAGGGAGGTATTTATC	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACCCCTTA-AAAAC
17E100	-----TATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TCCCCTTACT
19E100	TGGAAAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTTTACTCCACTA-TCAAC
AF442484.1	TACGGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTAAATA	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACTCCCTCA-GCACC
KF626381.1	AAAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTC-TTTACTC-----
HQ179571.1	GGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACTCCTT-----
HQ179575.1	GGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACTCCTT-----
EF514234.1	CTTGGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACTCCCTCA-GCACC
JX515546.1	GGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACTCCCTCA-GCACC
KM067090.1	-----GTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGAACTTA-CG	CTGTTA-ATT-T	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACTCCCTCA-----
KM225275.1	TGGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTC-CTTACTCCTT-----
HQ009805.1	-----TTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTCCTT-ACTCCCTCA-----
AF108864.1	TATGGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTC-CTTACTCCCTCA-GCACC
AF093491.1	TATGGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTC-CTTACTCCCTCA-GCACC
AB513881.1	TATGGAGGGTTTGTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTC-CTTACTCCCTCA-GCACC
KF128755.1	GGAGGGTT-GTATTTATT	ATATCATT-CAAGTTTC-TG	ATAACAATACAGGACTTTT-TG	CTGTTA-ATAAT	GAT-ACCGTCGTAGTC--TT	TTC-CTTACTCCTT-----

Encontramos los siguientes genotipos (figura 29) por establo genotipificado: en los establos 3 y 4 genotipo *C. parvum*, en los establos 5 y 8 genotipos *C. parvum* y *C. bovis*.



Figura 29. Esquema que muestra la distribución de los establos muestreados. (Estrella roja, establos genotipificados y genotipos encontrados)

10.12 Análisis filogenético de las 10 secuencias aisladas de becerros

Se realizó el análisis filogenético de las secuencias problema (aislados) con las secuencias reportadas, utilizando el programa Mega V. 6, se observó una homología de 98-100% dependiendo del aislado (figura 30), con 0.2 sustituciones por sitio. Se realizó un acercamiento a las ramas filogenéticas, donde se observaron dos nubes (figuras 31 y 32): una para secuencias parciales de *C. parvum* y otra para *C. bovis*.

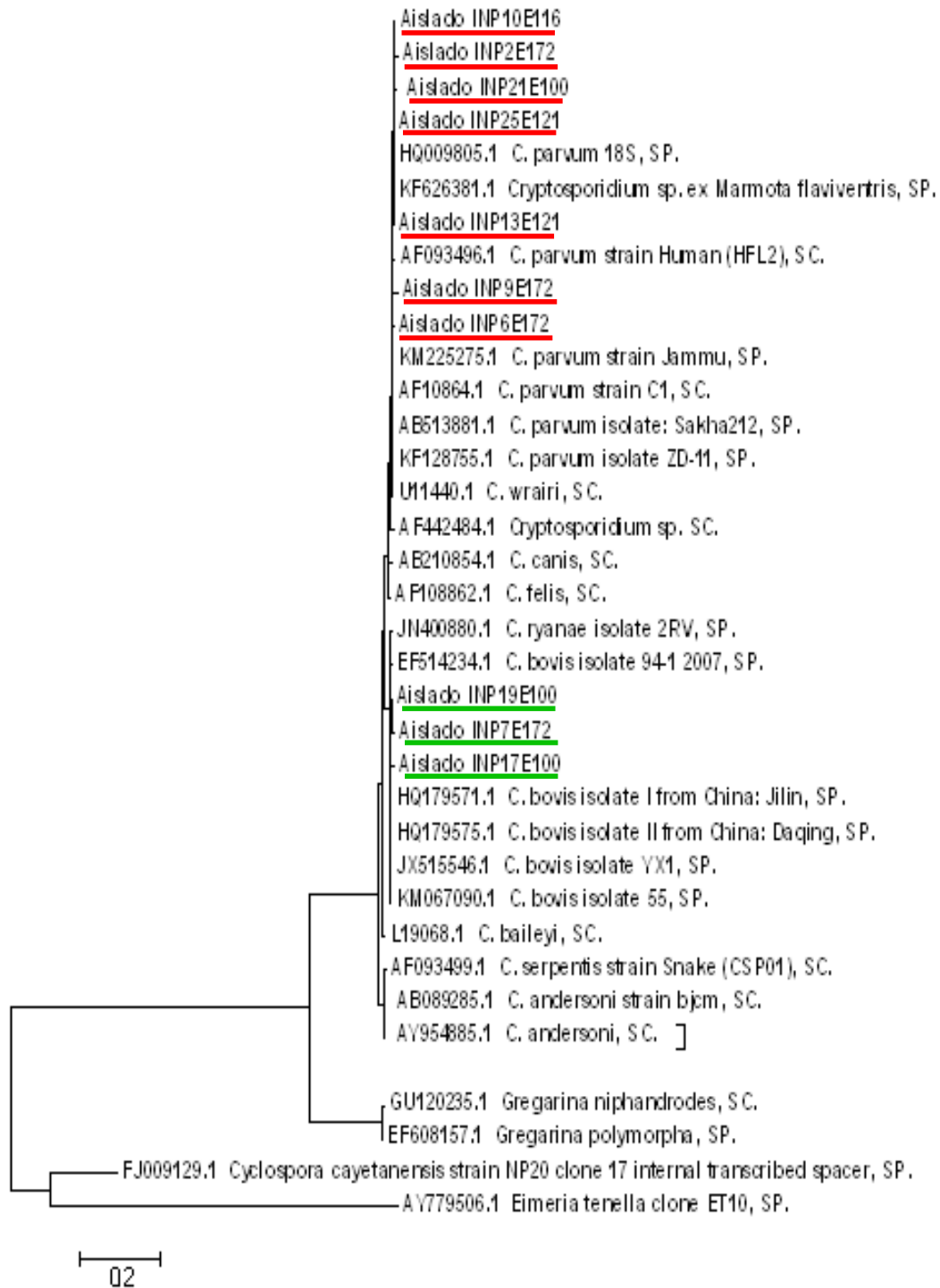


Figura 30. Árbol filogenético de aislados de becerros de la Cuenca Lechera de Tizayuca, en rojo los aislados que corresponden a la especie/genotipo *C. parvum* y en verde los aislados que corresponden a la especie/genotipo *C. bovis*, se observa una distancia de 0.2 sustituciones por sitio. SP: secuencias parciales, SC: secuencias completas.

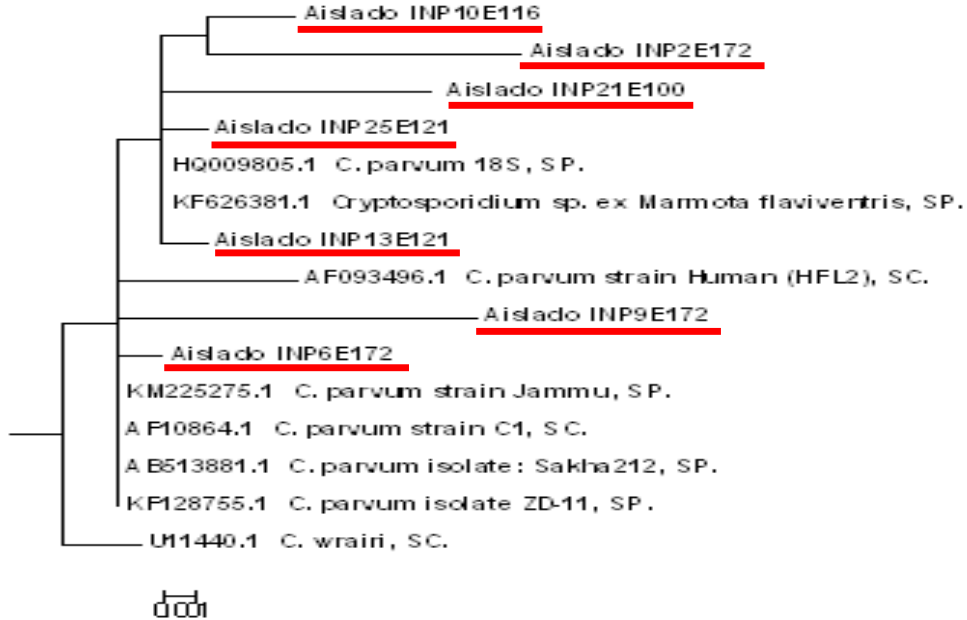


Figura 31. Filogenia de los aislados con genotipo *C. parvum*. Se puede observar que los aislados INP10E116, INP2E172, INP21E100 y INP25E121 (línea roja) son más cercanos a las secuencias HQ009805 y KF626381, mientras que los aislados INP13E121, INP9E172 y INP6E172 (línea roja) son más cercanos a las secuencias AF093496 Y KM225275, se observa una distancia de 0.001 sustituciones por sitio. SP: secuencias parciales, SC: secuencias completas.

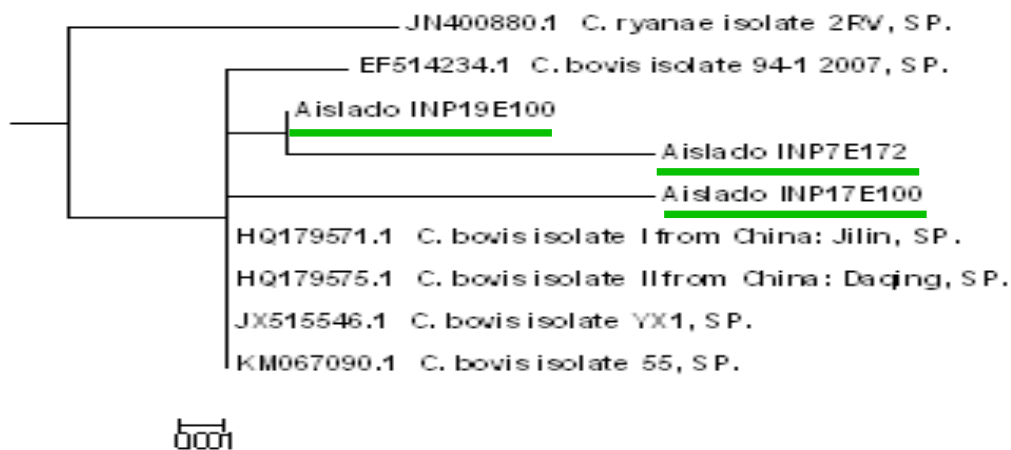


Figura 32. Filogenia de los aislados con genotipo *C. bovis*. Se puede observar que los aislados INP19E100, INP7E172, INP17E100 (línea verde) son más cercanos a las secuencias EF514234 Y HQ179571, se observa una distancia de 0.001 sustituciones por sitio. SP: secuencias parciales, SC: secuencias completas.

En resumen, se secuenciaron 10 muestras de 4 establos y se encontraron las especies *C. parvum* y *C. bovis*. Los signos clínicos encontrados en los becerros de cada establo genotificado se muestran en el cuadro 12. Todos los aislados del establo 8 presentaron diarrea, un becerro tenía 3 días de edad, tenían una condición corporal de 1 y 2, el becerro del aislado 7E172 que presentó moco en heces fue genotipo *C. bovis*, los demás fueron *C. parvum*. El aislado 10E116 de un becerro del establo 4 presentó diarrea, condición corporal de 1 y otros parásitos, su genotipo fue *C. parvum*. En el establo 5 se encontró en los aislados 17E100 y 19E100 el genotipo *C. bovis* y el 21E100 fue *C. parvum*, todos fueron menores de tres meses y condición corporal de 2. Finalmente en el establo 3 se encontró el genotipo *C. parvum* en los aislados 13E121 y 25E121, todos menores de tres meses y condición corporal 2.

Cuadro 12. Asociación especie/genotipo y cuadro clínico.

Aislados	Establo	Genotipo	Cuadro clínico
2E172	8	<i>C. parvum</i>	Becerro de 3 días, con diarrea y condición corporal 2
6E172		<i>C. parvum</i>	Becerro menor de 30 días, con diarrea y condición corporal 1
7E172		<i>C. bovis</i>	Becerro menor de 60 días, con diarrea, moco en heces y condición corporal de 2
9E172		<i>C. parvum</i>	Becerro menor de 60 días, con diarrea y condición corporal 2
10E116	4	<i>C. parvum</i>	Becerro menor de 90 días, con diarrea, condición corporal 1 y otros parásitos
17E100	5	<i>C. bovis</i>	Becerro menor de 30 días y condición corporal 2
19E100		<i>C. bovis</i>	Becerro menor de 30 días y condición corporal 2
21E100		<i>C. parvum</i>	Becerro menor de 30 días y condición corporal 2
13E121	3	<i>C. parvum</i>	Becerro menor de 90 días y condición corporal 2
25E121		<i>C. parvum</i>	Becerro menor de 90 días y condición corporal 2
10 aislados	4 establos	<i>C. parvum</i>, <i>C. bovis</i>	

11. DISCUSION

Se analizaron 212 muestras de heces de becerros menores de tres meses de edad, de 12 establos de la Cuenca Lechera de Tizayuca, encontrando el 30.19% (64/212) de prevalencia de *Cryptosporidium spp*, (figura 22). Es un resultado importante ya que en nuestro país solamente existen cuatro reportes relacionados con la prevalencia de este parásito en bovinos; particularmente en becerros, en donde se reporta una prevalencia de 3.7%-12.5%, 37.7% y 75% en los Estados de Veracruz, Guerrero y Aguascalientes respectivamente, donde se diagnosticó a *Cryptosporidium spp* y se buscaron factores de riesgo asociados, solo en un estudio se identificó el genotipo *C. parvum* (Cano *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2009; Fitz *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012).

A nivel mundial la prevalencia de esta parasitosis tiene un rango variable del 3.1-75%, (cuadro 2). Este amplio rango puede deberse a que los estudios publicados que se realizaron en diferentes zonas geográficas, con historias clínicas de los hatos y sistemas de explotación diferentes, también pudo influir el tipo de manejo y la edad de los animales (Castillo *et al.*, 2009; Muhind *et al.*, 2011; Waldner *et al.*, 2006).

Debido a que por la morfología de los ooquistes de *Cryptosporidium* no se puede identificar las especies, es necesario recurrir a técnicas moleculares. Con la amplificación de secuencias de genes por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación de fragmentos se han podido discriminar a las especies y subtipos (Fayer *et al.*, 2009; Murakoshi *et al.*, 2012; Plutzer *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 1999).

Nosotros amplificamos una secuencia de ~826 pb el gen 18 SSU rRNA de 10 muestras y se restringió con las enzimas *VspI*, *SspI*, *MboII*, siguiendo los métodos descritos (Feng *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 1999, 2000 y 2001): sin embargo, los patrones electroforéticos mostraron bandas que podrían corresponder a diferentes especies (cuadro 9), por tal motivo las muestras se secuenciaron. Los ensamblados obtenidos se analizaron y encontramos siete muestras con *C. parvum* (a. bovino) y tres muestras con *C. bovis* (cuadro 10). En la literatura que realizamos solamente existe un reporte de genotipificación de muestras de becerros en México, con predominio de *C. parvum*,

sin embargo, los autores no describieron a qué variedad correspondían (bovino o humano)(Castillo *et al.*, 2009). Es muy importante señalar que además encontramos el genotipo *C. bovis* y este trabajo es el primer reporte en México de este genotipo en becerros menores de tres meses. A nivel mundial se ha documentado que los becerros son comúnmente infectados con *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae* (Xiao *et al.*, 2010). En nuestro caso prevalecieron las especies propias de bovinos.

Encontramos algunos cambios en los nucleótidos de las secuencias parciales obtenidas (cuadro 11), suponemos que pueden deberse a las variaciones en los subtipos, pues se ha demostrado que existen diferencias en regiones repetidas y en regiones no repetidas y estas diferencias categorizan a una secuencia determinada dentro de un subtipo específico de *cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 2010), estos cambios pudieran deberse a mutaciones puntuales en dichas secuencias que bien podrían no estar afectando el mensaje (Spano *et al.*, 1998). Para entender más a detalle estas diferencias son necesarias otras técnicas moleculares: el uso de la glicoproteína gp60 o la tipificación de multilocus (MLT), tipificación de secuencias de multilocus (MTSL) y polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (Plutzer *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2010).

Para esclarecer el potencial zoonótico de *Cryptosporidium parvum* es necesario realizar la secuenciación de los aislados positivos utilizando el gen Gp60 que identifica los subtipos de *C. parvum*, se ha reportado que en zonas con presencia de subtipos Ila y IId, como en España, el subtipo Ila infecta preferentemente a becerros y el IId a corderos y cabritos; o el subtipo Ilc que solo infecta humanos (e Silva *et al.*, 2013; Plutzer *et al.*, 2009; Silveras *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010), está documentado que *C. parvum* tiene importancia en salud pública, sin embargo no todos los genotipos/subgenotipos resultan en infecciones zoonóticas (Xiao *et al.*, 2010), por lo que podemos suponer que la presencia de esta especie/genotipo en la Cuenca es un riesgo potencial para los becerros y el humano.

A nivel mundial se ha documentado que los becerros son comúnmente infectados con *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* y *C. ryanae* (Xiao *et al.*, 2010). Algunos estudios reportan que *C. parvum* prevalece en becerros predestete (menores a 2 meses), y

produce hasta el 85% de las infecciones, además es el genotipo con mayor potencial zoonótico (Del coco *et al.*, 2009; Maikai *et al.*, 2011; Silveras *et al.*, 2010); mientras que *C. bovis* predomina en becerros postdestete (2 meses hasta 2 años) (e Silva *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2007; Kvác *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2010). En la Cuenca Lechera de Tizayuca comúnmente el destete es a los tres meses de edad, por tal motivo, en nuestro estudio todos los becerros eran predestete. Los tres becerros con ooquistes de *Cryptosporidium bovis* eran de menos de 60 días de edad. Nosotros no encontramos las especies/genotipos *C. ryanae* y *C. andersoni*, probablemente porque se ha sugerido que estos genotipos se encuentran en becerros postdestete (e Silva *et al.*, 2013).

Algunos estudios reportan la presencia de estas especies en becerros *C. parvum* 18.3% (137/750) y *C. bovis* 0.4% (3/750), semejante a lo encontrado en este estudio, donde se encontró más a *C. parvum* que a *C. bovis*. Se ha documentado que *C. parvum* prevalece en becerros predestete (menores a 2 meses), y produce hasta el 85% de las infecciones, además es el genotipo con mayor potencial zoonótico (Del coco *et al.*, 2009; Maikai *et al.*, 2011; Silveras *et al.*, 2010); mientras que *C. bovis* predomina en becerros postdestete (2 meses hasta 2 años) (e Silva *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2007; Kvác *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2010). En la Cuenca comúnmente se lleva a cabo el destete hasta los 3 meses; los becerros con genotipo *C. bovis* son menores de dos meses (1-90 días), lo que coincide con otros reportes donde encontraron becerros con *C. bovis* desde los siete días de vida (Kvác *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). No se encontraron las especies/genotipos *C. ryanae* y *C. andersoni*, algunos estudios sugieren que estos genotipos se encuentran en becerros postdestete (e Silva *et al.*, 2013).

Por otro lado, se asociaron los signos clínicos de los becerros con el genotipo encontrado (cuadro 12). En todos los establos genotipificados se encontró el genotipo *C. parvum* 100% (4/4) y solo en dos se encontró el genotipo *C. bovis* 50% (2/4). Algunos estudios refieren que los becerros infectados con genotipo *C. parvum* presentan signos clínicos, mientras que los infectados con *C. bovis* son generalmente asintomáticos (Kvác *et al.*, 2011). Además, se ha documentado que los becerros

neonatos son más susceptibles a la infección y que la presencia de otras afecciones (metabólicas o infecciosas) pueden favorecer la presencia del protozooario. (Maikai *et al.*, 2011; Muhid *et al.*, 2011).

Nosotros encontramos (4/7) becerros con genotipo *C. parvum* que presentaron diarrea, uno de ellos tenía tan solo tres días de edad. A *C. bovis* lo encontramos en (1/3) becerro con diarrea y moco; este hallazgo puede deberse a que el periodo prepatente para el genotipo *C. bovis* es de 7-12 días y este aislado fue de un becerro menor de 60 días (Silveras *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Además se ha observado en becerros infectados experimentalmente que el periodo patente va de 2-7 días y en becerros infectados de forma natural va de 3-12 días (Díaz *et al.*, 2007). Algunos estudios indican que los becerros infectados con genotipo *C. parvum* presentan signos clínicos, mientras que los infectados con *C. bovis* son generalmente son asintomáticos (Kvác *et al.*, 2011).

Se analizaron los datos clínicos (diarrea, edad, moco en heces, neumonía, alimentación, otros parásitos) que presentaron los becerros al momento de tomar la muestra, y se evaluaron como factores de riesgo (RM). Se encontró el 30.66% (65/212) becerros con diarrea al momento de tomar la muestra, de éstos, hubo relación de *Cryptosporidium* spp y diarrea en el 46.9% (30/64), resultados obtenidos en establos de Brasil encontraron a *Cryptosporidium* spp en muestras diarreicas 23.5% (4/17) (e Silva *et al.*, 2013). El análisis mostró asociación significativa con RM 2.84 (IC 95%, p=0.0007), lo que concuerda a lo reportado en becerras de Veracruz donde encontraron una de RM 7.33 (IC 95%, p=0.05) (Romero *et al.*, 2012), en otro estudio en Venezuela en becerras de doble propósito realizaron el análisis de la relación entre diarrea e infección por *Cryptosporidium* y este reveló un riesgo relativo de 2,51 (IC 95%) con un valor de asociación de (P<0,001) (Díaz *et al.*, 2007), lo cual indica una alta asociación significativa entre infección por *Cryptosporidium* y la ocurrencia de diarrea. También hubo asociación significativa con la variable moco en heces, con RM de 2.53 (IC 95%, p=0.05). Se ha reportado que la producción de

moléculas proinflamatorias (PGE₂) estimula la producción de mucina, por lo que acompañado del cuadro de diarrea se puede encontrar moco (Del coco *et al.*, 2009).

Los becerros de 0-≤1.5 meses de edad fueron 32 (50.0%) y becerros de >1.6 ≤3 meses de edad fueron 32 (50.0%), pero no hubo asociación significativa, con RM 0.97 (IC 95%, p=0.92). Silva *et al.*, (2013) reportaron el 23.8% en becerros de 0-2 meses de edad y el 26.5% entre 2-6 meses de edad. En cuanto a las otras variables analizadas no se encontró asociación significativa. Los resultados son importantes porque existen pocos estudios que combinan la caracterización molecular con los factores de riesgo.

Se identificó a *Cryptosporidium* en los doce establos muestreados (figura 23), la mayor frecuencia fue en el establo 3 con una frecuencia de 53.8% y la menor fue en los establos 11 y 12 con el 6.7% (p=0.0027). El resultado es importante porque en La Cuenca Lechera los becerros desde temprana edad se están infectando con este parásito y puede repercutir en su estado general de los animales. Es necesario identificar las posibles causas por las que prevalece *Cryptosporidium*, probablemente la falta de higiene y el mal manejo. Otro factor que puede favorecer la presencia de *Cryptosporidium* spp en becerros de 2 días en adelante es la contaminación de la ubre de la madre o por contaminación por otras especies ya sea especies domésticas (gatos, perros, gallinas, conejos) o bien fauna nociva (roedores, palomas, moscas) (Fitz *et al.*, 2013). Es importante mencionar que en otros países como Brasil, Malasia, Australia e India también encuentran altos porcentajes de infección en los establos (e Silva *et al.*, 2012; Muhid *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2011; Venu *et al.*, 2012).

Por estación del año, se encontró una mayor frecuencia en primavera 45% (p=0.0007), seguido de verano 30%, otoño 25% e invierno 10%, (figura 23). Wang *et al.* (2011), realizaron un estudio en establos de becerros para conocer la prevalencia de *Cryptosporidium* spp. por época del año en Henan, China donde encontraron que la época donde más prevalece el protozooario fue primavera con un 50% y la más baja en invierno 17.3% con (p>0.05). Este mismo grupo, en 2013, reportó una prevalencia de *Cryptosporidium* spp en aves (gallinas) del 21.8% en otoño y del 6.3%, en invierno (Wang *et al.*, 2012).

Finalmente, se proponen varias medidas de control y prevención de esta parasitosis en la Cuenca Lechera: alertar a los médicos y encargados de los establos de la prevalencia de la criptosporidiosis desde temprana edad de los becerros, manejo adecuado de los animales, cuarentena de animales de nuevo ingreso, tratamientos antiparasitarios después de la detección de la infección, tapetes sanitarios, uso de desinfectantes, limpieza adecuada de los establos y control de fauna nociva.

12. Conclusiones

- Se encontraron las especies *C. parvum* (a. bovino) y *C. bovis*. La especie predominante fue *C. parvum* (a. bovino).
- La prevalencia general de *Cryptosporidium* fue del 30.19%, (64/212).
- El 100% de los establos muestreados tenían becerros con *Cryptosporidium*.
- En todas las estaciones del año se encontraron becerros con ooquistes de *Cryptosporidium*, con un predominio en primavera (45%).
- Encontramos un becerro infectado a los 3 días de edad, lo que sugiere que el periodo de pre-patencia (infección-eliminación de ooquistes) es corto.
- Se encontró asociación significativa de la presencia de *Cryptosporidium* y diarrea, RM de 2.84 (IC 95%, p=0.0007); de la presencia de *Cryptosporidium* y moco en heces, RM de 2.52 (IC 95%, p=0.05).
- La presencia de *C. parvum* en la Cuenca es un riesgo zoonótico potencial.

13. Perspectivas

- Incrementar el número de muestras analizadas por métodos moleculares.
- Determinar los subtipos de *Cryptosporidium parvum* utilizando el gen Gp60.
- Identificar la incidencia de criptosporidiosis en toda la Cuenca Lechera.
- Realizar un muestreo a la población de seres humanos que trabajan en la Cuenca Lechera para identificación y genotipificación del parásito.
- Seguir concientizando a los propietarios y encargados de los establos de la presencia del parásito.

14. Referencias

A

Amer S, Honma H, Ikarashi M, Tada C, Fukuda Y, Suyama Y, Nakai Y. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Vet Parasitol* 2010;169:382-386.

B

Becher, K.A., Robertson, I.D., Fraser, D.M., Palmer, D.G., Thompson, R.C.A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol* 2004;123:1-9.

Brogolia A, Reckinger S, Cacciò S, Nöckler K. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet Parasitol* 2008;154:8-13.

C

Cai X, Lancto CA, Abrahamsen MS, Zhu G. Intron-containing b-tubulin transcripts in *Cryptosporidium parvum* cultured in vitro. *Microbiology* 2004;150:1191-1195.

Cano RP, Alonso DMA, Figueroa CJA, Trigo TJF. Prevalence and incidence of *Cryptosporidium* spp. in calves from the central region of Veracruz, Mexico. *Tropical and subtropical agrosystem* 2011;13: 567 – 571.

Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water research* 2004;38;818-862.

Cavalier STA. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* 1998;73;203-206.

Castillo, GC, Vázquez, C.C., Revilla, L.R., Garza, S.M., Cruz, R.R., Mendoza, V.I., Esparza, M.L. Frecuencia e identificación molecular de *Cryptosporidium* spp en becerras lactantes mantenidas en confinamiento en Aguascalientes, México. *Ent Bec Pecuaria Rural* 2009;47:425-434.

Chalmers RM, Ferguson C, Cacciò S, Gasser RB, EL-Osta YGA, Heijnen L, Xiao L, Elwin K, Hadfield S, Sinclair M, Stevens M. Direct comparison of selected methods for genetic categorization of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *Int J parasitol* 2005;35:397-410.

Coklin, T., Farber, J., Parrington, L., Dixon, B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 2007;150:297-305.

D

Del coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev Arg Microbiol* 2009;41:185-196.

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.

Díaz RA, Ramírez ILN, Morillo LJG, Barreto BA. Infección con *Cryptosporidium sp.* y su asociación con diarrea becerros de ganadería de doble propósito. Zootecnia trop 2007: 25(1): 29-36.

Díaz, LA., Mercado, R., Onuoha, EO., Ozaki, LS., Munoz, P., Munoz, V., Martínez, F. J., Fredes, F. *Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy. Vet Parasitol 2011: 176:139-144.

E

Edmonton AJ, Lean IJ, Weaver CO, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart of Holstein dairy Cows. J Dairy Sci 1989:72:68-78.

e Silva PFM, Souza LR, Araujo JJP. Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy cattle in Brazil. Rev. Bras. Parasitol 2013:22(1):22-28.

F

Fayer R. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol 2004:126:37-56.

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. y Santín, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (Ovisaries). Vet Parasitol 2009:164:192-200.

Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp Parasitol 2010:124:90-97.

Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Faer R, Gatei W, Cama V, Xiao L. Wide Geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. Vet Parasitol 2007:144:1-9.

Fitz SE, Rosario CR, Hernández OR, Hernández CE, Rodríguez BE, García VZ. *Cryptosporidium parvum*: prevalencia y factores de riesgo en becerros del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Veterinaria y zootecnia 2013:7(1):49-61.

G

Geurden TP, Berkvens D, Martens C, Casaert S, Vercruyssen J. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology* 2007;134:1981-1987.

Geurden TP, Casaert S, Vercruyssen J, Claerebout E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium, *Vet Parasitol* 2008;155:142-145.

Gobet P, Toze S. Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *FEMS Microbiol Lett* 2001;200:37-41.

Gow, S., Waldner, Ch. An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow-calf herds. *Vet Parasitol* 2006;137:161-167.

H

Hijjawi NS, Meloni BP, Ryan UM, Olson ME, Thompson RCA. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol* 2002;32:1719-1726.

Huang BD, MD, PhD, MPH, Clinton WA. An update review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol Clin* 2006;35:291-314.

J

Jaramillo ACJ, Martinez MJJ. *Epidemiologia Veterinaria. Manual moderno* 2010:198.

Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium*: Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotech Adv* 2008;26:304-317.

Jae Ran Yu. The Korean Society for parasitology. Technical support by MedRic 2003: http://atlas.or.kr/atlas/alphabet_view.php?my_codeName=Cryptosporidium%20parvum

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.

K

Kato, S., Jenkins, M., Fogarty, E.A., Bowman, D.D. Effects of freeze-thaw events on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in soil. *J of Parasitol* 2002;88(4):718-722.

Kvác M, Sak B, Kvetonová D, Ditrich O, Hofmannová L, Modry', Vítovec J, Xiao L. Infectivity, pathogenicity and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. Indomestic ruminants. *Vet Parasitol* 2008;153:363-3676.

Kvác M, Hromadová N, Kvétonová D, Rost M, Sak B. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: Absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Vet parasitol* 2011: 177, 378–382.

M

Macarisin, D., Bauchan, G., Fayer, R. *Spinacia oleracea* L. Leaf Stomata Harboring *Cryptosporidium parvum*: a Potential Threat to Food Safety. *Applied and Environmental Microbiology* 2010;76: 555-559.

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*, 2005;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.

Maikai VB, Umoh JU, Kwaga KPJ, Lawal IA, Victor A. Maikai VA, Cama V, Xiao L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native breeds of cattle in Kaduna State, Nigeria. *Vet parasitol* 2011: 178, 241–245.

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* 2008: 118:596-599.

McEvoy, J.M., Duffy, G., Moriarty, E.M., Lowery, C.J., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. The prevalence and characterisation of *Cryptosporidium* spp. In beef abattoir water supplies. *Water Research* 2005;(39):3697–3703.

Miller, W.A., Atwill, E.R., Gardner, I.A., Miller, M.A., Fritz, H.M., Hedrick, R.P., Melli, A.C., Barnes, N.M., Conrad, P.A. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *Int J Parasitol* 2005;(35):673–684.

Meireles MV, Soares RM, Bonello F, Gennari. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in *Capybara* (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil. *Vet Parasitol* 2007(147)166-170.

Meisel, L., Perera, D.R., Meligro, C., Rubin, C.E. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70(6):1156-60.

Morgan UM, Xiao L, Fayer R, Lal AA, Thompson RCA. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *Int J parasitol* 1999;29:1733-1751.

Mtambo MM, Sebatwale JB, Kambarage DM, Muhairwa AP, Maeda GE, Kusiluka LJ, Kazwala RR. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in cattle and wildlife in Morogoro region, Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine* 1997;(31):185-190.

Muhin A, Robertson I, Ng J, Ryan U. Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia. *Exp Parasitol* 2011;127:534- 538.

Muller DD, Giles M, Elwin K, Smith RP, Clifton-Hadley FA, Chalmers RM. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. *Vet Parasitol* 2008;154:214-219.

Murakoshi F, Xiao L, Matsubara R, Sato R, Kato Y, Sasaki T, Fukuda Y, Tada C, Nakai Y. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp in grazing beef cattle in Japan. *Vet Parasitol* 2012. doi:10.1016/j.vetpar.2011.12.011

Muñoz, P., Fredes, F., Díaz-Lee, A., Mercado, M., Ozaki, L.S. Detection of *Cryptosporidium* spp. in calves by using a acid fast method and confirmed by immunochromatographic and molecular assays. *Archives Medicine Veterinary* 2011;43:111-116.

N

Ng J, Yang R, McCarthy S, Gordon C, Hijjawi N, Ryan U. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Vet Parasitol* 2011(176):145-150.

Nguyen ST, Nguyen DT, Le DQ, Le Hua LH, Nguyen TV, Honma H, Nakai Y. Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium* spp. in cattle in central Vietnam. *Vet Parasitol* 2007(150)357-361.

Navarro, ML., Aguilar, C., Bornay, LFJ. *Cryptosporidium*: un género en revisión: Situación en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2011;29:135-143.

Neira, OP., Muñoz, SN., Stanley, BV., Gosh, CM., Rosales, LMJ. *Cryptosporidium parvum* en gastrópodos silvestres como bioindicadores de contaminación fecal en ecosistemas terrestres. *Revista Chilena de Infectología* 2010;27(3): 211-218.

Nime, FA.,Burek JD., Page DL., Holscher MA., Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the Protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 1976;70:592-598.

O

Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitol* 2004;20:185-191.

Olson ME, Guselle NJ, O'Handley RM, Swift ML, McAllister TA, Jelinski MD, Morck DW. *Giardia* and *Cryptosporidium* in in British Columbia dairy. *Can Vet J* 1997; 38: 703-706.

Ortega YR, Eberhard ML. Protozoan diseases: Cryptosporidiosis, *Giardia* is and other intestinal protozoan diseases. *Int Enc 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.

P

Pancieri RRJ, Thomas SW, Garner FM. Cryptosporidial Infection in a Calf. *Veterinary Pathol* 1971;8: 479-484.

Plutzer J, Karanis P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. *Vet Parasitol* 2009;165:187-199.

Q

Qi M, Wang R, Ning C, Li X, Zhang L, Jian F, Sun Y. *Cryptosporidium* spp. in pet birds: Genetic diversity and potential public health significance. *Exp Parasitol* 2011(128):336-340.

R

Reid A, Lymbery A, Ng J, Tweedle S, Ryan U. Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Vet Parasitol* 2010(168):190-195.

Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, J., Xiao, L. *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitology* 2012; 130(3):274-81.

Romero SD, Godoy SO, García VZ, Montiel PF, Chavarría MB. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and associated risk factors in female calves in the central region of Veracruz, Mexico. *Trop and subtrop agrosystems* 2012;15(2):89-94.

Rossignol, JF. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for news drugs. *Exp Parasitol* 2010;124:45-53.

S

Santín M, Trout MJ, Fayer R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. *Vet Parasitol* 2007(146):17-24.

Silveras C, Näslund K, Björkman C, Mattsson JG. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea and region. *Vet parasitol* 2010: 169, 289–295

Sofie HI, Kare GB, Forberg T; Jane RL. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet parasitol* 2007:144:222-233.

Slavin, D. *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Comparative Pathology* 1955:65: 262-266.

Spano F, Putignani L, McLauchlin J, Casemore DP, Crisnati A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) genes discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiology Letters* 1997:150:209-217.

Spano F, Putignani L, Crisnati A, Sallicandro P, Morgan UM, Le BSM, Tchack L, Tzipori S, Widmer G. Multilocus Genotypic Analysis of *Cryptosporidium parvum* Isolates from Different Hosts and Geographical Origins. *Journal of clinical microbiology* 1998:36(11): 3255–3259.

T

Tyzzler, EE. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen Et sp Nov), of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research* 1910:33: 487-511.

Tyzzler, EE. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archive FürProtistenkunde* 1912:26:394-412.

Thompson, RCA., Olson, ME., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, MS., Hijjawi, NS. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology* 2005:59: 77-162.

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.

Toso M, Omoto C. Gregarina niphandrodes may lack both plastid genome and organelle. *J Eukaryot Microbiol* 2007:54(1):66-72.

V

Venu R, Latha BR, Basith SA, Dhinakar RG, Sreekumar C, Raman M. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves in Southern states of India. *Vet Parasitol* 2012(188):19-24.

W

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.

Wang R, Zhang L, Ma G, Zhao J, Lu Q, Wang H, Zhang L, Jian F, Ning C, Xiao L. *Cryptosporidium andersoni* is the predominant species in post-weaned and adult Dairy cattle in China. *Parasitol inter* 2011;60:1-4.

Wang R, Wang H, Sun Y, Zhang L, Jian F, Qi M, Ning C, Xiao L. Characteristics of *Cryptosporidium* Transmission in Preweaned Dairy Cattle in Henan, China. *Journal Clinical microbiology* 2011;49(3) 1077-1082.

Wang R, Wang F, Zhao J, Qi M, Ning C, Zhang L, Xiao L. *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: Molecular characterization and public health significance. *Vet parasitol* 2012: doi:10.1016/j.vetpar.2012.02.002.

X

Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante A, Montali R, Fayer R, Lal A. Phylogenetic Analysis of *Cryptosporidium* Parasites Based on the Small-Subunit rRNA Gene Locus. *App Env Mirobiol* 1999;45(2):1578-1583.

Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm Waters with small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *App and Env Microbiol* 2000;5492-5498.

Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *App Env Mirobiol* 2001;67(3):1097-1101.

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.

Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental parasitol* 2010: 124:80-89.

Z

Zanaro LN, Garbossa G. *Cryptosporidium*: cien años después. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2008;42(2):195-201.

15. ANEXO A. TÉCNICAS DEL LABORATORIO

15.1 Técnica de Sheather (Concentración/Flotación)

Objetivo: Concentrar ooquistes de *Cryptosporidium*.

Fundamento: Mediante un proceso de diferencia de densidades, los ooquistes flotan en la solución II, los desechos se precipita en la solución I.

Gradientes: Solución I y Solución II

- a) En los tubos cónicos de 15 ml, se colocaron 4.0 ml de la solución I.
- b) Con una pipeta Pasteur de cuello largo se agregan 2.0 ml de la solución II (deslizándola por las paredes del tubo con cuidado para evitar mezclar y destruir los gradientes).
- c) Se añadieron 500 µl de la muestra con heces y lentamente se deslizó por la pared del tubo evitando destruir los gradientes.
- d) Se centrifugó a 3500 rpm (Eppendorf centrifuge 5804), durante 20 min.
- e) De cada uno de los tubos se aislaron los anillos superior e inferior y se colocaron en tubos que contenían agua destilada, se homogeneizaron para romper el gradiente y para quitarles el exceso de sacarosa. Se centrifugaron a 3000 rpm (Eppendorf centrifuge 5804) durante 5 minutos.
- f) Posteriormente, el sobrenadante se decantó y el precipitado con los ooquistes se concentró en un tubo de 15 ml con agua destilada.
- g) Se observaron al microscopio a 40x y se almacenaron a 4°C.

16. ANEXO B: Caracterización molecular

16.1 Secuencia completa del gen 18S SU rRNA

Cryptosporidium sp. small subunit ribosomal RNA gene, complete sequence

LOCUS AF442484 1752 bp DNA linear INV 05-FEB-2003
DEFINITION *Cryptosporidium* sp. small subunit ribosomal RNA gene, complete sequence.
ACCESSION AF442484
VERSION AF442484.1 GI:16945958
KEYWORDS .
SOURCE *Cryptosporidium* sp.
ORGANISM [Cryptosporidium sp.](#)
Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Conoidasida; Coccidia; Eucoccidiorida; Eimeriorina; Cryptosporidiidae; *Cryptosporidium*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1752)
AUTHORS da Silva,A.J., Caccio,S., Williams,C., Won,K.Y., Nace,E.K., Whittier,C., Pieniazek,N.J. and Eberhard,M.L.
TITLE Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs
JOURNAL Vet. Parasitol. 111 (4), 297-307 (2003)
PUBMED [12559709](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1752)
AUTHORS da Silva,A.J., Caccio,S.M., Williams,C., Won,K.Y., Nace,E.K., Whittier,C., Pieniazek,N.J. and Eberhard,M.L.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (01-NOV-2001) Division of Parasitic Diseases, CDC, 4700 Buford Highway NE, Atlanta, GA 30341-3724, USA
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1752
/organism="Cryptosporidium sp."
/mol_type="genomic DNA"
/host="Propithecus verreauxi coquereli"
/db_xref="taxon:[90962](#)"
[rRNA](#) [1..1752](#)
/product="small subunit ribosomal RNA"
[primer_bind](#) [1..21](#)
/note="CryptoF"
[misc_difference](#) [184](#)
/note="unresolved C/T with 4 sequenced isolates"
[primer_bind](#) [complement\(1726..1752\)](#)
/note="CryptoR"

ORIGIN

1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct
 61 aagtataagc ttttatacgg ttaaactgcg aatggctcat tataacagtt atagtttact
 121 tgataatcct ttacttacat ggataaccgt ggtaat **t t c t a** **gagct aat ac** **at gcg**gaaag
 181 accyaacttt ac**ggaagggg** **t gt at t t at t** **agat aaag**aa ccaatttaat ttggtgattc
 241 ataataactt tacggatcac atttatatgt gacatatcat tcaagtttct gacctatcag
 301 ctttagacgg tagggattg gcctaccgtg gcaatgacgg gtaacgggga attagggttc
 361 gattccggag agggagcctg agaaacggct accacatcta aggaaggcag caggcgcgca
 421 aattaccaa tcctaataca gggaggtagt gacaagaaat aacaatacag gactttaaat
 481 agttttgtaa ttggaatgag ttaagtataa acccctttac aagtatcaat tggagggcaa
 541 gtctggtgcc agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatattaaa gttggtgcag
 601 ttaaaaagct cgtagttgga tttctgttaa taatttatat ataatatatt **at t aat** attt
 661 atatagtatt aacataattc atattactat attttatagt atatgaaatt ttactttgag
 721 aaaattagag tgcttaaagc aggcattagc cttgaatact ccagcatgga ataataataa
 781 agatTTTTat cTTTTtatt gtttctaaga taaaaataat **gat t aat** agg gacagttggg
 841 ggcatTTgta tTTaacagtc agaggtgaaa ttcttagatt tgTTaaagac aaactagTgc
 901 gaaagcattt gccaaaggatg ttttcattaa tcaagaacga aagttagggg atc**gaaga**cg
 961 atcagatacc gtogtagtct taaccataaa ctatgccaac tagagatt**gg** **aggt t gt t cc**
 1021 **t fact cct t c** agcaccttat gagaaatcaa agTTTTtggg ttctgggggg agtatggTcg
 1081 caaggctgaa acttaaagga attgacggaa gggcaccacc aggagtggag cctgCGgctt
 1141 aatttgactc aacacgggaa aactcaccag gtccagacat aggaaggatt gacagattga
 1201 tagctctttc ttgattctat gggTggTggt gcatggccgt tcttagttgg tggagtgatt
 1261 tgtctggTta attccgTtaa cgaacgagac cTtaacctgc taaatagaca taagaaat**at**
 1321 **t aat** ttttta tttgtcttct tagagggact ttgtatgTtt aatacagggg agttttaggc
 1381 aataacaggt ctgtgatgcc cttagatgtc ctgggCCgcg cgcgcgctac actgatgcat
 1441 ccatcaagta tatat**t cct g** **t t t cgaagga** **aat ggg**taat cttttgaaata tgcacTgtga
 1501 tggggataga tcattgcaat tattgatcTt gaacgaggaa ttCctagtaa gcgcaagtca
 1561 tcagcttgcg ctgattacgt cCctgCctt tgtacacacc gCCcgTcgct cctaccgatt
 1621 gaatgatccg gtgaattatt cggaccatac tttgtagcaa tacatgtaag gaaagtttCg
 1681 taaaccttat catttagagg aaggagaagt cgtaacaagg tttccgtagg tgaacctgca
 1741 gaaggatcaa gc

16.2 Secuencias consenso de los aislados

AISLADO 2E172

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 37.

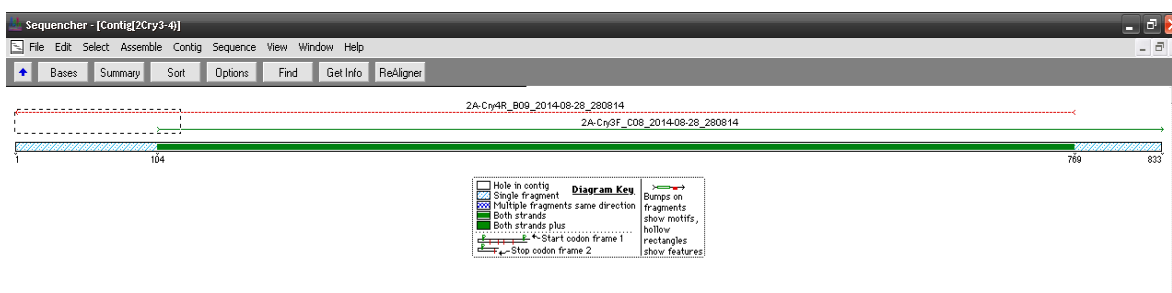


Figura 33. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Contig 2E172

```
TTTGTATTTTATTAGATAAAGAACCAATATAATTGGTGAGTCATAATAACT
TTACGGATCACATTAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCA
GCTTTTAAACGGGGGTATGGGCCAACCGTGGCAATGCCGGGTAACG
GGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGACGAACCGGCTACCCACAT
CTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGA
GGTAGTGACAAGAAATAAAAATCAGGACCTTTTTGTTTTTTAAATTGGA
ATAATTTAAATATAACCCCTTTTCAAGTTATAAATGGAGGGGAATGCTG
GGGGCCGGAGGCCGCGGAATTCCAGGTCCAATTGGCTATAATAAAGT
TTTTGGAAGTTAAACGTTGAAAATGGAATTCGTTTAATTATTTTTTATA
AAATATTTAATAATATTTTATTTATATTAACATAATTTATATTACTATATATT
TTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGC
ATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGATTTTATCTTT
CTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGC
AATTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAA
ACTAATGCGAAAGCATTGCCCAGGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACG
AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTCGTCTTAACCAT
AACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTTCAATTTACTCCC
```

AISLADO 6E172

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 38.

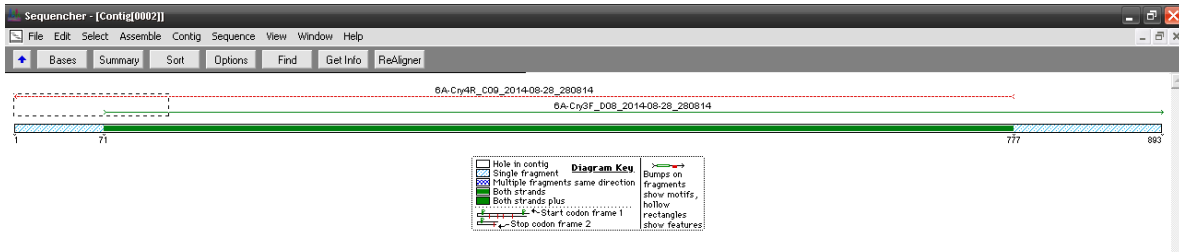


Figura 34. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Conting 6E172

```
GGAAGGGTTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATATAATTGGTGACTCATAATAA  
CTTTACGGATCACATTAATGTGACATAACATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTT  
TAGACGGTAGGGTATTGGCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTAG  
GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCATCTAAGGAAG  
GCAGCAGGCGCGCAAATTACCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA  
ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCC  
TTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTC  
CAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGAT  
TTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAATT  
CATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTA  
AAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGATTTTTATC  
TTTCTTATTGTTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATT  
TGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTAATGC  
GAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATC  
GAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGAT  
TGGAGGTTGTTCTTACTCCCATCGAAGATTGGGGGAGGGGAGGTGTTTTCC  
TTTTTAAAAAGAGAGTCGCCCT
```

AISLADO 7E172

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 39.

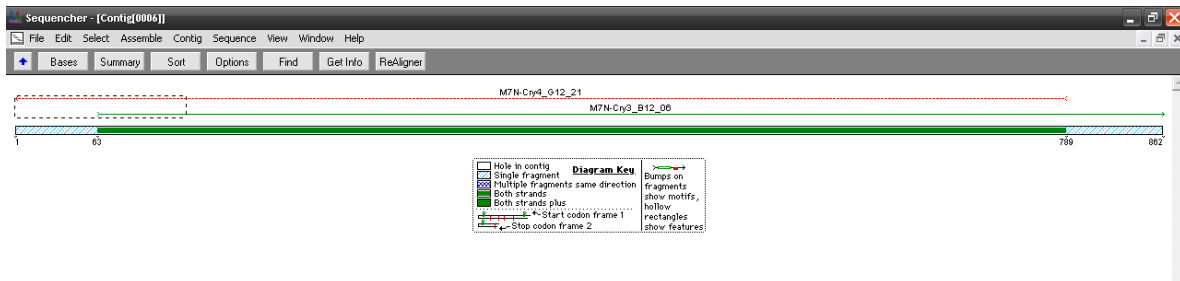


Figura 35. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Conting 7E172

```
CTCTGTGGTGGTGTGAGAAGGGAGGTATTTATCAGATAAAGAACCAATATTTTT  
GGTGACTCTTAAAACTTTTCCCATGACATTATGTGACATATCATTCAAGTTTCT  
GACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGGGTA  
ACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA  
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGG  
TAGTGACAAGAAATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTT  
AAGTATAAACCCCTTAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGC  
TCGTAGTTAATCTTCTGTTAATTTTTATATATAATATCACGATATTTATATAATATA  
CATAATTCATATACTTTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGC  
TTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTT  
ATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATGATGATTAATAGGGACAGTTGGGGG  
CATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAC  
TGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGG  
ATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGA  
GATTGGAGGTTGTTCTTTACCCCTAAAACCCGCAAGGAGGG
```

AISLADO 9E172

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 40.

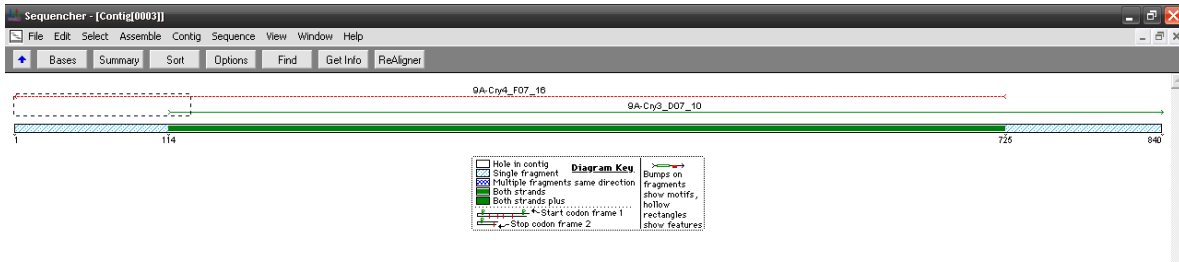


Figura 36. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Conting 9E172

```
GAAAGGGTTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATATAATTGGTGACTCATAATAA  
CTTTACGGATCACATTAAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTT  
TAGAGGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGAGAATTAG  
GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCATCTAAGGAAG  
GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAA  
ATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCC  
TTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTC  
CAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGAT  
TTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATATAATTAACATAATT  
CATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTA  
AAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGATTTTTATC  
TTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATT  
TGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAAACTAATGC  
GAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATC  
GAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAAACCATAAACTATGCCAACTAGAGA  
TTGGGAGGTTGTCCCTTACTCCTTTA
```


AISLADO 17E100

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 41.

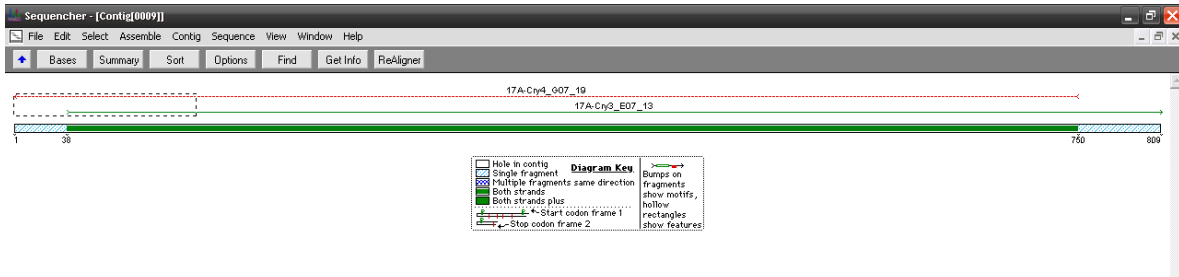


Figura 37. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Conting 17E100

```
TATTAGATAAAGAACCAATATTTTTGGTGACTCATAATAATTTCCGGACAATTAT
GTCACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGC
CTACCGTGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTAC
CCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGAACCTTACG
GTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACCCCTTAACAAGTATCAATTGGAG
GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTA
AAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTAATCTTCTGTTAATTTTATATATAAT
ATCACGATATTTATATAATATTAACATAATTCATATTACTTTTTAGTATATGAACTT
TACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTATTGCCTTGAATACTCCAGC
ATGGAATAATATTAAGGATTTTTATTCTTCTTATTGGTTCTAGAATAAAAATGATG
ATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTT
AGATTTGTTAAAGACAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTA
ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
ACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTCCCCTTACT
```

AISLADO 19E100

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 42.

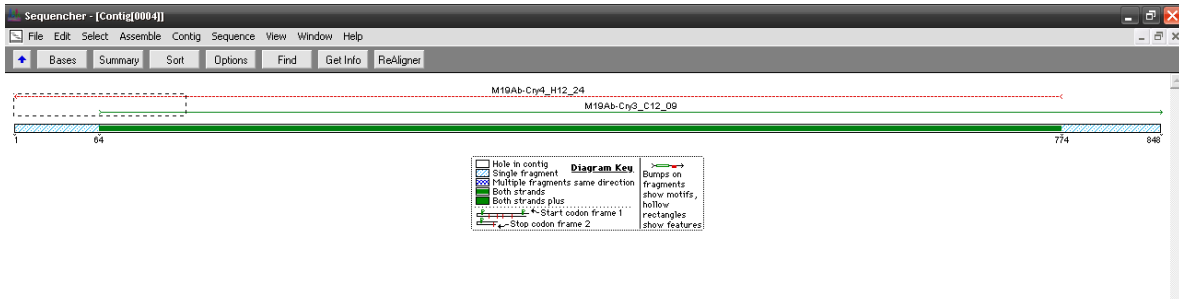


Figura 38. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Contig 19E100

```
GCCCTTGGAAAGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATATTTTTGGTGACTC
ATAATAACTTTACGGATCACATTATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCA
GCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCTATGACGGGTAACGGGGAA
TTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCATCTAAGG
AAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAA
GAAATAACAATACAGAACCTTACGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAAC
CCCTTAACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTA
ATCTTCTGTTAATTTTTATATATAATATCACGATATTTATATAATATTAACATAATTCA
TATTACTTTTTAGTATATGAAACTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCA
GGCTATTGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGGATTTTTATTCTTCT
TATTGGTTCTAGAATAAAAATGATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTGTAT
TTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTACTGCGAAAG
CATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGA
CGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAGATTGGAG
GTTGTTCTTTTACCTCACTATCAACCCAGGG
```

AISLADO 21E100

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 43.

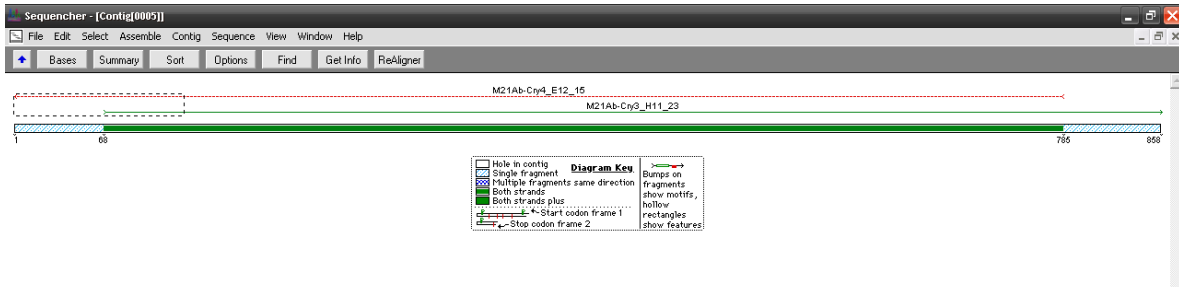


Figura 39. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Contig 21E100

```
TGTTGTGGGAGGGGGTGTATCTCTCAGATAAAGAACCTATATAATTGGTGA
CTCATAAACTGTACGGATCACATTAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGAC
CTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACG
GGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACACATC
TAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGT
GACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGT
ATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCG
TAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATATAAT
TAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTACTTTGAGAAAATTA
GAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTTAAA
GATTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTT
GGGGGCATTTGATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACA
AACTAATGCGAAAGCATTGCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTT
AGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCA
ACTAGAGATTGGAGGTTGTTCTTACTTTCTTTATACAAA
```

AISLADO 13E121

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 44.

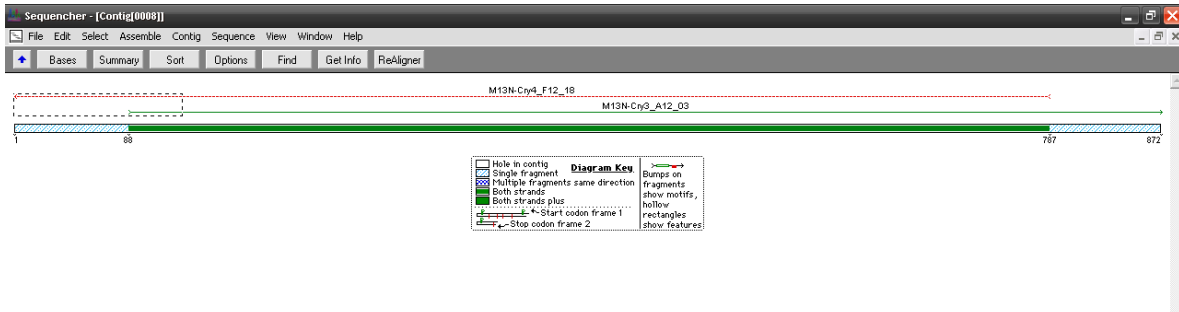


Figura 40. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Conting 13E100

```
CCAGCCCCTCTCCGTGGGATAGGGTCGTATTTATTAGATAAAGAACCCAATATA
ATTGGTGACTCATAATAACTTTACGGATCACATAAAATGTGACATATCATTCAAG
TTTCTGACCTATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGAC
GGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGC
TACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGG
GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATG
AGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA
AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTA
TATAATATTAACATAATTCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAG
AAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAA
TATTAAGATTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGG
ACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTA
AAGACAAACTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACG
AAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACT
ATGCCAACTAGAGATTGGAGGTTGTTCTTTACTCCTATACAGGCGGGGGCG
GG
```

AISLADO 25E121

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 45.

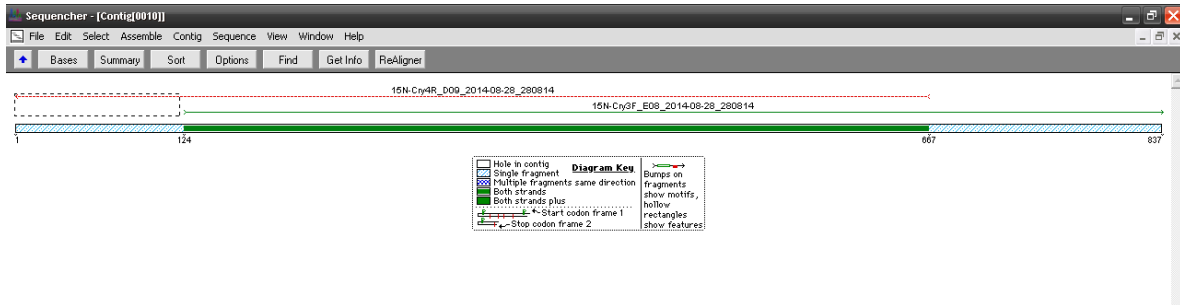


Figura 41. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Conting 25E121

```
GGGAGGGGTTTGTATTTATTAGATAAAGAACCAATATAATTGGTGACTCATAATA
ACTTTACGGATCACATTAATGTGACATATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCT
TTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGGGGAATTA
GGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAA
GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTGACAAGA
AATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTATAAACC
CTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATT
CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGA
TTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTGATGAATATTTATATAATATTAACATAAT
TCATATTACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTT
AAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGATTTTAT
CTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCA
TTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTAATG
CGAAAGCATTGCGCAAGGATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGGA
TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCAACTAGAG
ATTGGAGGTTGTTCTTTTACCTCC
```

AISLADO 10E116

Se alinearon las secuencias forward y reverse del aislado para obtener la secuencia consenso, la línea verde indica el lugar donde se alinean, figuras 46.

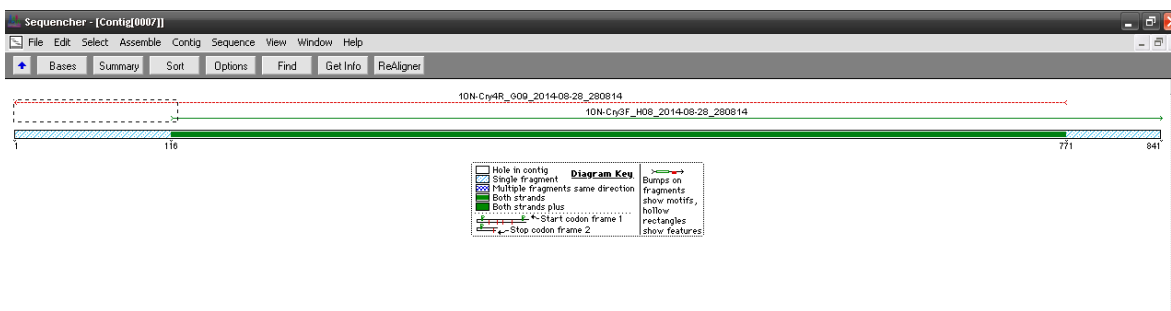


Figura 42. Alineación de las secuencias.

A continuación se muestran los nucleótidos que contiene la secuencia consenso del aislado:

>Conting 10E116

```
TGTGGGAAGGGGTTTGTATTTATTTAGATAAAGAACCAATATAATTTGGTGACTC
ATAATAACTTTACGGATCACATTAAATGTGACATATCATTTTCATGTTTCTGACCTA
ATCAGCTTTAGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGTGGCAATGACGGGTAACGG
GGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCATCT
AAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATACAGGGAGGTAGTG
ACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTTGGTTTTGTAATTGGAATGAGTTAAGTAT
AAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA
GTTGGATTTCTGTTAATAATTTATATAAAATATTTTGATGAATATTTATATAATTA
ACATAATTCATATACTATATATTTTAGTATATGAAATTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGCTTAAAGCAGGCATATGCCTTGAATACTCCAGCATGGAATAATATTAAGA
TTTTTATCTTTCTTATTGGTTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGGACAGTTGG
GGGCATTTGTATTTAACAGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACAAA
CTAATGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAG
GGGATCGAAGACGATCAAGATTACCCGTCGTAGTCCTTTTAACCATAAACTAC
GCCGCAACTAGAGATTGGAGGTTGTTCTTTACTTCCTATAG
```

17. ANEXO C: Preparación de soluciones

1. Solución salina fosfatos (PBS) 200ml

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	16
KCl	0.4
Na ₂ HPO ₄	1.2
KH ₂ PO ₄	0.38

Se mezclaron las sales en una vaso de precipitado y se aforaron a 200 ml.

3. Solución salina isotónica

Reactivo	Cantidad (g)
Cloruro de sodio	8.5
H ₂ O	1000 ml

4. Lugol parasitológico

Reactivo	Cantidad (g)
Yoduro de potasio	10
Yoduro cristaloides	5
H ₂ O	90 ml

a) Solución concentrada: se disolvieron 10 g de yoduro de potasio y 5 g de yodo cristaloides por agitación constante en 90 ml de agua destilada, posteriormente se aforaron a 100 ml y 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).

6. Solución Concentrada de Sacarosa (Sheather)

Reactivo	Cantidad (g)
Sacarosa	500
Fenol	5
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.

7. Amortiguador de fosfatos (0.025M)

Reactivo	Cantidad (g)
Fosfato de sodio monobásico	1.72
Fosfato de sodio dibásico	1.77
Agua destilada	400 ml

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

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

Reactivo	Cantidad (ml)
Tween 80%	1
Amortiguador de fosfatos	99

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 almacenó a 4°C hasta su uso.

9. Solución I de Sheather (Más densa)

Sol. A 50 ml.

Solución C 100 ml.

Solución II de Sheather

Sol A 50 ml.

Sol C 200 ml.

10. Amortiguador tris boratos con sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético (TBE) 20X. 1000 ml

Reactivos	Cantidad (g)
Tris base	121.0
Ácido bórico	61.7
EDTA-Na ₂ *2H ₂ O(20.0 mM)	7.44
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.

11. Amortiguador TE (Tris/EDTA) 100 ml

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

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.

12. RNAsa A

Reactivo	Cantidad
RNAsa A	10.0 mg
TE	1.0 ml

La RNAsa A se disolvió en 1.0 ml de TE, se aclicuotó en 10 partes iguales (100.0 μ l) y se almacenó a -20° C hasta su uso.

13. Solución de Bromuro de Etidio (BrE) 10 mg/ml.

Reactivo	Cantidad
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 nucleicos (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.

14. Gel de agarosa al 1%

Reactivo	Cantidad
Agarosa	300 mg
TBE	30.0 ml
BrE	0.5 μ l

El molde para hacer el mini gel 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.

15. Proteinasa K

Reactivo	Cantidad
Proteinasa K	10.0 mg
TE	1.0 ml

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