



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* EN
OVINOS MENORES DE UN AÑO DE EDAD EN CUATRO PLAZAS
COMERCIALES DEL ESTADO DE MÉXICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:

MARÍA DE LOURDES ORDOÑES SÁNCHEZ

ASESORES:

Dra. MARÍA UXÚA ALONSO FRESÁN

Dr. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

Dr. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN



El Cerrillo Piedras Blancas, México Mayo, 2017

DEDICATORIA

A mis padres:

Claudia y Sergio

Por sus consejos, por su esfuerzo para que yo concluya mi licenciatura, por ser mi guía y mi apoyo pero sobre todo por su gran amor y comprensión, A mi mamá por esperarme todas las noches y a mi papá por ser mi mejor amigo.

A mi esposo

Juven

Por su inmenso amor, apoyo y por siempre creer en mí, porque ha sido mi compañero de alegrías y tristezas.

A mis hijos

Damián

Porque eres el motivo de mi superación, por su tiempo y cariño.

Bebe

Porque aunque aún vienes en camino te espero y quiero que estés orgulloso de mí.

Gracias por ayudarme a cumplir mi sueño.

AGRADECIMIENTOS

Primero a mi Ángel, José Giovanni, porque sé que desde donde este me cuida y aunque me abandono a mitad de la licenciatura siempre está a mi lado.

A mis suegros: Tomasa y Antonio por su apoyo en todos los sentidos.

A mis hermanos: Juan, Jorge, Eduardo, Rufi y Anita por todos los momentos compartidos, sus regaños en ocasiones y sus consejos los quiero mucho.

A mis amigas: Kary (China) y Eli por ser mis compañeras de clase y de vida en la licenciatura.

A todos mis maestros por todo lo que aprendí de ellos y que me ha servido en la vida.

A mis asesores Dra. María Uxúa Alonso Fresan, Dr. Alberto Barbabosa Pliego y Dr. Chagoyan por su paciencia y dedicación para la realización de este trabajo.

A mis revisores M. en C. Trinidad Beltrán y Dra. Soledad Díaz por la dedicación en la revisión del presente trabajo.

A Dios por permitirme lograr este sueño y cuidar siempre de mí.

INDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPOTESIS.....	21
V. OBJETIVOS.....	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
VII. MÉTODOS.....	24
VIII. LÍMITE DE ESPACIO.....	27
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
X. CONCLUSIONES:.....	34
XI. SUGERENCIAS.....	35
XII. BIBLIOGRAFIA.....	36
XIII. ANEXOS.....	44

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>cryptosporidium</i>	6
Tabla 1. Prevalencias de <i>cryptosporidium spp.</i> , reportadas en el mundo.	16
Tabla 2. Prevalencias de <i>cryptosporidium spp.</i> En américa, México y estado de méxico.	18
Tabla 3. Prevalencia de <i>cryptosporidium spp.</i> En ovinos menores de un año de acuerdo con el estado fisiológico en cada plaza comercial del estado de México.	30
Tabla 4. Prevalencia de <i>cryptosporidium spp.</i> En heces de ovinos mediante la técnica de ziehl neelsen por plaza comercial.	31
Tabla 5. Prevalencia de <i>cryptosporidium spp.</i> Por grupo etéreo detectado en heces de corderos y borregas mediante la técnica de ziehl neelsen.	32

I. INTRODUCCION

Cryptosporidium es un protozoo intracelular descrito en 1907 por Tyzzer. Taxonómicamente, se encuentra dentro del Phylum Apicomplexa, clase Sporozoasida, subclase Coccidiasina, orden Eucoccidiorida, suborden Eimeriorina (se desarrollan macro y microgametos de forma independiente, y el cigoto es inmóvil) y familia Cryptosporidiae (ciclo vital monoxeno, es decir, con un solo hospedador) (Atias, 1998; Cordero *et al.*, 1999).

Los parásitos son esféricos o elípticos. En las células epiteliales del intestino presentan un tamaño entre 2 y 6 μm y se encuentran localizados en vacuolas parasitóforas. Los oocistos presentan cuatro esporozoitos, sin esporocistos, son ovoides y pueden medir entre 3 y 9 μm según la especie, tipo y cepa que se trate (Egyed, *et al.*, 2003).

La criptosporidiosis es una enfermedad cosmopolita, con mayor incidencia en zonas con clima tropical o templado sobre todo en verano y meses lluviosos. En países en desarrollo, en los que prevalece una sanidad deficiente y hacinamiento, constituye una zoonosis de mayor importancia. La mayor parte de los estudios epidemiológicos indican que *Cryptosporidium* es una causa común de diarrea en todo el mundo, infectando casi al 7% en niños en países desarrollados (Romero, 1993).

Cryptosporidium causa una parasitosis que infecta las células epiteliales del tracto digestivo, puede llegar a causar la muerte en pacientes inmunosuprimidos. La criptosporidiosis origina diarreas en el ganado joven de granja no destetado que incluye terneros, corderos, cabritos; también se puede presentar en niños menores de 10 años que conviven con estos animales (Cordero *et al.*, 1999, Helmy *et al.*, 2013).

Las diarreas neonatales causan pérdidas económicas importantes en las que se encuentran involucrados una serie de agentes, tales como Rotavirus, *Escherichia coli*, y *Cryptosporidium spp.* Estos agentes pueden llegar a ocasionar la muerte de los corderos, y en el mejor de los casos un retraso en el crecimiento. Hasta los años setenta se identificaba al parásito *Cryptosporidium* como agente causal de diarrea, anteriormente confundidas con las producidas por *E. coli*. *Cryptosporidium spp.*, es un protozoario que

parasita una amplia gama de vertebrados, y produce diarreas, anorexia y pérdida de peso. Además es un agente zoonótico con diversos ciclos de infección, tanto especie-específicos como interespecie. Se ha encontrado asociado a enfermos de SIDA siendo una de las tres primeras causas de muerte, por lo que ya se conoce su secuencia genómica completa (Abrahamsen *et al.*, 2004).

La transmisión es fecal-oral, por contacto directo de hospedador-hospedador y a través de alimentos o agua contaminados con oocistos, infectantes en el momento de ser eliminados con la materia fecal del hospedero. Cabe mencionar que la criptosporidiosis se ha identificado en brotes epidémicos debidos a fuentes de agua contaminada, de redes de agua potable, de superficie o recreativas (Cordero *et al.*, 1999).

El estudio de los genes de la subunidad pequeña del rRNA divide a las especies del género *Cryptosporidium* en dos grupos; uno formado por *C. muris* y *C. serpentis*, y otro formado por *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, y *C. parvum*. Tiene ocho cromosomas de tamaños moleculares semejantes y presenta uno de los genomas más pequeños de los organismos unicelulares eucarióticos (Egyed *et al.*, 2003).

La prevalencia de *Cryptosporidium* en rumiantes es de 32.2% de acuerdo con la técnica de PCR, sin diferencias significativas entre especies animales. Por PCR se identificó 65.7% *Cryptosporidium parvum*, 11.8% *Cryptosporidium ryanae*, 4.1 % *Cryptosporidium bovis*, y combinaciones de *C. parvum* con *C. ryanae* 11.2%. *C. parvum* con *C. bovis* 5.3% y *C. parvum* con *Cryptosporidium andersoni* 1.8%. Esto de acuerdo a un estudio realizado al gen 18 s RNA (Helmy *et al.*, 2013).

Gracias a su gruesa pared, los oocistos de *Cryptosporidium* resisten los tratamientos químicos usuales: no sufren alteración después de ser expuestos a 80 ppm de cloro/30 min, e incluso pueden tolerar 24 h en el cloro utilizado para blanqueado de ropa. A concentraciones de 10 ppm, los oocistos pueden permanecer infectantes durante 48 horas (Dillingham *et al.*, 2002).

El empleo de ozono (1 ppm x 5 min), la congelación o calentamiento (>72° C durante 1 min o 45 °C por 10 - 20 min) son métodos más efectivos. Permanecen viables al cabo de una semana en la mayoría de los congeladores caseros. Debido a su tamaño, únicamente los filtros capaces de remover partículas de 1 µm resultan confiables (Dillingham *et al.*, 2002).

Este organismo presenta interés en salud pública debido a su carácter zoonótico y ha sido identificado con frecuencia en bovinos y ovinos (Becher *et al.*, 2004; Santín *et al.*, 2004), en los cuales constituye uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal (De La Fuente *et al.*, 1999; Moore y Zeman, 1991; Naciri *et al.*, 1999; Uga *et al.*, 2000). Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo establecer la prevalencia del parásito *Cryptosporidium spp.* Mediante la técnica de Ziehl-Neelsen y RT-PCR en ovinos menores de un año de cuatro plazas comerciales del Estado de México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

ETIOLOGÍA

Taxonomía

Cryptosporidium es un protozoo intracelular descrito en 1907 por Ernest Edward Tyzer. Considerado un parásito de carácter zoonótico. (Fayer 2004, Fayer y Xiao, 2008).

La morfología de los oocistos es importante para determinar la taxonomía de *Cryptosporidium* pero no es de gran relevancia para la diferenciación entre especie. Se han definido gran variedad de especies del género, de las cuales *Cryptosporidium parvum* es la especie que más afecta a los animales incluido el hombre (Plutzer *et al.*, 2009).

Los oocistos de *Cryptosporidium bovis* son morfológicamente indistinguibles de los de *C. parvum*, estos oocistos no son infecciosos en ratones ni en corderos de menos de una semana de edad (Fayer *et al.*, 2005) la infección natural con esta especie ha sido detectado no solo en terneros también en corderos (Plutzer *et al.*, 2009).

Los oocistos de *Cryptosporidium ryanae* identificado como *Cryptosporidium* de los ciervos como genotipo son similares a los de *C. parvum* y *C. bovis* pero de menor tamaño. El ganado es el único hospedero conocido de esta especie. Sus oocistos no son infecciosos en ratones y corderos. Análisis multi-locus demostró que *C. ryanae* es distinta de todas las otras especies y también demostró la falta de recombinación (Fayer *et al.*, 2008).

Los oocistos de *Cryptosporidium suis* son estructuralmente indistinguibles de *C. parvum*, pero genéticamente distintos de todas las especies y genotipos conocidos, *C. suis* no es transmisible a ratones y poco contagioso para el ganado, infecta principalmente a cerdos pero también se ha diagnosticado en pacientes humanos y terneros (Ryan *et al.*, 2004, Caccio *et al.*, 2005).

La infección con *Cryptosporidium* se ha encontrado en una gran variedad de aves, pero solo tres especies de *Cryptosporidium* aviares han sido nombrados: *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi* y *Cryptosporidium galli*. Estas especies de *Cryptosporidium* difieren en sus sitios predilectos. A pesar de que tanto *C. meleagridis* y *C. baileyi* se encuentran en el intestino delgado y grueso y la bursa, difieren

significativamente en tamaño de oocistos y solo *C. baileyi* también se encuentra en los tejidos respiratorios tales como la conjuntiva, los senos paranasales y la tráquea. Por el contrario, *C. galli* infecta solo el proventrículo (Xiao *et al.*, 2004).

El género *Cryptosporidium* comprende protozoos que se desarrollan y multiplican en las células epiteliales del tracto digestivo, puede infectar otros epitelios como el respiratorio y renal, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. (Cordero *et al.*, 1999). Tiene una ubicación particular dentro de la célula ya que se sitúa en el borde luminal de los enterocitos, localización que se ha definido como intracelular pero extracitoplasmática (Cordero *et al.*, 1999; Fayer, 2004).

Epidemiología

La prevalencia de este parásito es variable en función de la especie en la que se encuentre, por PCR en rumiantes es del 32.2%, se ha identificado un 65.7% de *C. parvum*, 11.8% de *C. Ryanae*, 4.1% de *C. bovis* y un 11.2% de combinaciones entre *C. parvum* y *C. ryanae*, 5.3% de *C. parvum* y *bovis*, 1.8% de *C. parvum* con *C. Andersoni*. En humanos la prevalencia es de 49.1% PCR identificó el 60.5% de *Cryptosporidium Hominis*, 38.2% de *Cryptosporidium parvum* y 1.2% de *Cryptosporidium parvum* en combinación con *Cryptosporidium bovis* (Helmy *et al.*, 2013).

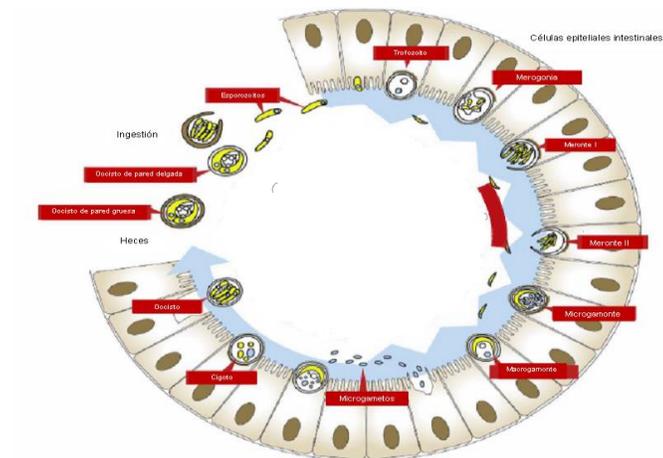
Ciclo biológico

Cryptosporidium spp. Es un parásito monógeno debido a que todos los estadios de desarrollo ocurren en un mismo hospedador, aunque tiene fases de reproducción asexual y sexual (Atías, 1998; Cordero *et al.*, 1999).

El ciclo se completa en un solo hospedador en dos días, y comienza con la ingestión de oocistos esporulados (eliminados por las heces de un individuo infectado), seguida por el desenquistamiento en el tracto gastrointestinal del hospedador, liberándose los cuatro esporozoitos con forma de plátano que invaden la pared del epitelio intestinal (se produce por contacto con agentes reductores, generalmente sales biliares o enzimas digestivas, aunque puede producirse de forma espontánea) (Atías, 1998; Cordero *et al.*, 1999).

Los esporozoitos liberados son móviles e invaden activamente la célula hospedadora, mediante movimientos de deslizamiento y flexión, penetrando la zona apical de las microvellosidades (Atías, 1998; Cordero *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Thompson *et al.*, 2005). El extremo anterior de cada esporozoito se adhiere a través del antígeno tipo circumesporozoito (CSL) a un receptor presente en las microvellosidades intestinales (Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009). Del extremo anterior del parásito surge una vacuola que se fusiona con la membrana de la célula para formar una interfase hospedador-parásito. El parásito queda contenido en una vacuola denominada parasitófora, de ubicación intracelular, pero extracitoplasmáticamente (Cordero *et al.*, 1999; Fayer, 2004; Del Coco *et al.*, 2009).

FIGURA 1.- Ciclo de vida de *Cryptosporidium spp.*



(Barta *et al.*, 2006).

El ciclo comienza con el ingreso de oocistos esporulados vía oral al tracto digestivo (eliminados por las heces de un individuo infectado), en donde, los esporozoitos son liberados 4 a 6 μ m 16 por cambios en la temperatura y el pH, y acción de las sales biliares y proteasas. Éstos alcanzan los enterocitos mediante movimientos de deslizamiento y flexión y se multiplican en la zona apical de las microvellosidades, dentro de una vacuola parasitófora intracelular, extracitoplasmática.

Las dos primeras etapas de multiplicación son asexuadas. A partir de un esporozoito se forma el meronte I que contiene ocho merozoitos en su interior, los que se liberan y pueden volver a formar nuevos merontes I o ingresar a nuevas células y constituir el meronte II, que contiene cuatro merozoitos. Estos se liberan al lumen e ingresan a nuevas células para iniciar la fase sexuada del ciclo, algunos se diferencian en gametos masculinos o microgamontes (catorce o dieciséis por cada merozoito), y otros en gametos femeninos o macrogamontes (uno por cada merozoito). Los microgamontes son liberados y cada uno va a fecundar a un macrogamonte formando así un cigoto, el cual luego de producida la esporulación, va a dar origen a un oocisto con cuatro esporozoitos en su interior. Este es finalmente excretado con las heces, como oocisto inmediatamente infectante.

Las etapas de reproducción incluyen dos fases de esquizogonia (multiplicación asexuada), la de gametogonía (multiplicación sexuada), así como la fase de esporogonia (esporulación) la cual tiene lugar dentro del hospedador (Cordero *et al.*, 1999).

Los oocistos están recubiertos de una pared gruesa que les confiere protección en el medio ambiente, pero un 20% de estos presentan una pared fina y, por lo tanto, desenquistan endógenamente, originando un fenómeno de autoinfección. En el medio ambiente se mantienen infecciosos por meses en un intervalo amplio de temperaturas. La autoinfección es importante clínicamente, ya que la ingestión de pocos oocistos puede originar procesos clínicos graves. La desenquistación espontánea, en ausencia de sustancias reductoras, explica las infecciones pulmonares por este microorganismo (Fayer, 2008).

Transmisión

La transmisión de este parásito es directa, vía fecal-oral, siendo la principal fuente de infección en rumiantes domésticos, las heces excretadas por terneros neonatos diarreicos infectados con el agente, aunque también se debe considerar la eliminación de oocistos por los animales adultos que actúan como portadores asintomáticos. En estos animales neonatos infectados, se describe que durante el periodo de máxima eliminación, pueden excretar entre 10^6 - 10^7 oocistos por gramo de heces (Cordero *et al.*, 1999).

También se ha descrito la transmisión indirecta de esta parasitosis, ya sea a través de los alimentos o por ingesta de aguas contaminadas con este agente protozoario (Cordero *et al.*, 1999). Siendo la vía indirecta la más significativa desde el punto de vista epidemiológico, en cuanto a su diseminación dada las características del parásito, ya que, posee oocistos de pequeño tamaño, con una gruesa pared quística, resistencia al tratamiento con cloro y ácidos, viabilidad prolongada de hasta varios meses en el ambiente, excreción de estadios inmediatamente infectivos, baja dosis infectante para infectar otros organismos y considerable potencial zoonótico (García 1999; Zanaro *et al.*, 2008; Yoder *et al.*, 2010). La contaminación de aguas de consumo con material fecal de ganado bovino o humano, se ha asociado con brotes de diarrea causada por este parásito. Esto debe ser considerado desde el punto de vista de la salud pública, ya que los métodos usuales de tratamiento de aguas potables (filtración floculación, sedimentación y desinfección) no son completamente eficaces en la remoción o inactivación de los oocistos de *Cryptosporidium spp.*, (Cordero *et al.*, 1999; Fayer, 2004). Aunque 17 especies del parásito se han denominado, varios estudios de transmisión cruzada han demostrado que el organismo no tiene especificidad de hospedero (Romero, 1993).

Patogenia

La invasión que produce este protozoo en los enterocitos provoca una alteración de las células digestivas, reduciendo el borde de las microvellosidades, lo que causa una atrofia parcial de las vellosidades intestinales y fusión de estas, quedando la superficie de absorción disminuida (Atias 1998; Cordero *et al.*, 1999; Del Coco *et al.*, 2009). El organismo intenta remplazar las células dañadas por otras nuevas, cuya capacidad enzimática y de absorción es menor, lo que se traduce en un paso de fluidos desde la vellosidad a la luz intestinal, debido al aumento de la presión osmótica por el acumulo de nutrientes en el lumen (Cordero *et al.*, 1999; Del Coco *et al.*, 2009). La combinación de pérdidas del tamaño de las vellosidades y del borde microvellositario disminuye la absorción de fluidos, electrolitos y nutrientes, y conduce a la pérdida de enzimas digestivas de membrana, lo cual contribuye a la mala absorción y a la desnutrición. La mala absorción y la alteración de la digestión producen un sobre-crecimiento de la flora intestinal, cambios en la presión osmótica e influjo de líquido hacia la luz intestinal (Del

Coco *et al.*, 2009). Paralelamente, puede existir una alteración en la permeabilidad del epitelio intestinal por modificación de las uniones celulares (Cordero *et al.*, 1999).

Cuadro clínico en animales

La criptosporidiosis origina diarreas en el ganado joven de granja no destetado, los animales adultos también pueden excretar oocistos que pueden transmitirse a otros hospedadores susceptibles. Las infecciones del ganado ovino por *Cryptosporidium parvum* pueden producir diversos grados de deshidratación, inactivación del intestino, anorexia, fiebre y deterioro del estado físico, las fases endógenas infectan a los enterocitos de la porción distal del intestino delgado, el ciego y el colon. La mortalidad es baja excepto si ocurre una infección asociada con otros patógenos entéricos, tales como *rotavirus*, *E. coli*, (Del Coco *et al.*, 2009; Cordero *et al.*, 1999; Fayer, 2008).

Se pueden detectar oocistos en hospedadores clínicamente normales y en enfermos. Los terneros y los corderos con diarrea pueden excretar entre 10^6 y 10^8 oocistos por g de heces (Koinari *et al.*, 2014).

No existen signos patognomónicos que diferencien a la criptosporidiosis de procesos patológicos causados por otros enteropatógenos el principal signo clínico es la diarrea, de consistencia variable, entre heces aparentemente formadas y acuosas, color amarillento, sin sangre, asociada a la excreción de un gran número de oocistos y puede ir acompañada de anorexia, dolor abdominal, pérdida de peso, postración y fiebre. Su duración es variable, oscilando entre 3-5 días en los casos leves y 1-2 semanas en los más graves. Así por ejemplo, causa diarrea autolimitada en hospederos inmunocompetentes y diarrea crónica en individuos inmunocomprometidos. El síndrome de mala absorción que se produce, además lleva a un sobre crecimiento bacteriano que agrava aún más el cuadro (Atias, 1998; Cordero *et al.*, 1999).

Las alteraciones encontradas a la necropsia de un rumiante neonato son la caquexia y la deshidratación. En la cavidad abdominal puede existir atrofia de la grasa mesentérica e infarto en los linfonodos regionales. El intestino delgado podría presentar una enteritis congestiva con la mucosa hiperémica, pero no hemorrágica y al observar las vellosidades

estas se pueden presentar atrofiadas y con el epitelio columnar sustituido por células inmaduras (Cordero *et al.*, 1999).

Diagnóstico

La criptosporidiosis no puede ser diagnosticada solo por los síntomas, debido a que la sintomatología es similar a la presentada en otras enfermedades intestinales causadas por diferentes tipos de bacterias, virus o parásitos. Los métodos de detección e identificación para el género *Cryptosporidium* pueden agruparse en tres categorías: (Ocampo *et al.*, 2011).

Métodos clásicos. Normalmente, el diagnóstico se establece por métodos microscópicos convencionales, y se utilizan con frecuencia el método modificado de Ziehl-Neelsen (Z-N) y el de auramina-fenol en frotis fecales sin concentrar. Cuando en las muestras se espera un número bajo de oocistos, la concentración de los oocistos de las muestras fecales puede aumentar la sensibilidad de la detección (Ocampo *et al.*, 2011).

La principal ventaja de la técnica de tinción de Z-N es su bajo costo, esto sumado a que los extendidos una vez teñidos, pueden ser conservados de forma permanente. Así mismo, con Z-N como metodología diagnóstica, la principal desventaja que existe es el consumo de tiempo que requiere (Abe *et al.*, 2002). Por lo anterior, es necesario tener en cuenta el tiempo necesario de preparación previa al estudio, para la visualización de los oocistos de *Cryptosporidium*.

Métodos inmunológicos. Han resultado útiles dos sistemas de detección inmunológica de oocistos de *Cryptosporidium* los cuales se basan en la detección de antígenos (inmunofluorescencia directa y ELISA), para lo cual se han comercializado varios kits. Cada uno tiene un nivel similar de sensibilidad y puede emplearse tanto en muestras fecales concentradas como no concentradas, dependiendo del número probable de oocistos en la muestra. Comparados con las tinciones convencionales, los kits son costosos, considerando que parecen tener un umbral similar de detección (Ocampo *et al.*, 2011).

Métodos moleculares. Como alternativa al diagnóstico convencional se ha desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de ácidos nucleicos de *Cryptosporidium spp.* (Ocampo *et al.*, 2011).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR RT-PCR

TÉCNICA DE RT-PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis en 1985 (Press Release, 1993).

Actualmente sabemos que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines (Stock, 2006).

FUNDAMENTOS

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc (Tamay *et al.*, 2013).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+2}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se

compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplifica la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa. A continuación se explicarán cada uno de los puntos mencionados (Tamay *et al.*, 2013).

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena de tal forma, que el ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la DNA polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable. También se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg^{+2} , buffer y H_2O (Stock, 2006).

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño

oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia (Stock, 2006).

Por su parte, los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X. También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado. El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (Tamay *et al.*, 2013).

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión.

Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

Hibridación. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el

complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) (Tamay *et al.*, 2013).

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado este compuesto porque se sabe que es mutagénico y teratógeno (Tamay *et al.*, 2013).

Se seleccionaron los tipos de *Cryptosporidium* a utilizar del gen 18s rDNA que son *C. parvum*, *C. hominis*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. meleagridis* y *C. ryanae*. De los cuales se

bajaron los pares de bases depositados en el gene bank con los códigos JX237825-JX237828, JX237830- JX237833 y JX298596-JX298604. Posteriormente se depositan en el programa mega 6 donde se alinean y donde no hay mayor mutación se selecciona el número de pares de bases a utilizar que van de 130 a 411 para establecer las enzimas de restricción que se utilizaran para la determinación de cada tipo de *Cryptosporidium* mediante el programa neb cutter que de acuerdo a su análisis las enzimas a utilizar son: Sspl, MbolI y Apol (Helmy *et al.*, 2013).

Control y tratamiento

Tres hechos biológicos tendrían importancia epidemiológica en contribuir a la sobrevivencia y diseminación de este parásito en el ambiente. Estos son: primero, los oocistos son inmediatamente infectantes al salir con las heces del hospedero; segundo, estos oocistos tienen una elevada resistencia a las condiciones medio ambientales lo que les permite, por ejemplo, permanecer infectivos por 2 a 3 semanas y sobrevivir en el suelo por más de 50 días a temperaturas inferiores a los -10°C y por último, los oocistos al ser muy pequeños y resistir la acción de desinfectantes convencionales, como la cloración, pueden pasar a través de los procesos físicos y químicos de tratamientos de aguas y por tanto sobrevivir en agua potable por varios meses (Muñoz *et al.*, 2011).

En animales domésticos el control de esta parasitosis es difícil, debido a que prevenir la exposición de los terneros a la contaminación se hace muy complicado. Se sugiere, poner los bebederos y comederos a una altura adecuada, para de esta forma evitar la contaminación con heces. Así también, se recomienda remover las deposiciones diariamente, para impedir la diseminación de los oocistos (Barriga, 2002). Otras medidas que pueden disminuir el riesgo de infección son aquellas que permitan controlar la temperatura y humedad de las zonas de pariciones, así como mantener la limpieza mediante la desinfección de estas áreas a través de la aplicación de desinfectantes eficaces. Asimismo, se deben considerar medidas básicas como separar a los animales enfermos de los sanos y procurar que la ingestión de calostro y leche sea la adecuada.

Se han estudiado diversos fármacos para el tratamiento de la criptosporidiosis, entre ellos se incluyen antibióticos de amplio espectro, antihelmínticos, anticoccidiales, etc. Sin

embargo, ninguno ha resultado ser completamente eficaz en el tratamiento de esta parasitosis. La escasa respuesta a muchos agentes quimioterapéuticos se ha explicado por la ubicación única intracelular del parásito, que puede servir como un "mecanismo de escape" para proteger a los parásitos de las drogas anticriptosporidiales. Entre los productos que han mostrado alguna actividad parcial en rumiantes neonatos, se mencionan al amprolio, la salinomicina y la sulfaquinoxalina, las que reducen el número de oocistos excretados. El tratamiento sintomático puede prevenir elevadas tasas de mortalidad en rebaños y disminuir las pérdidas por morbilidad; sin embargo, la primera medida a realizar es la reposición de fluidos y electrolitos mediante la administración oral o parenteral de soluciones hidratantes. Además, se debe restringir el consumo de leche durante un período, para evitar que llegue sin digerir al intestino grueso, donde se produciría una diarrea de tipo fermentativo (Thompson *et al.*, 2005, Ortega *et al.*, 1999). El ozono y la luz ultravioleta han demostrado ser eficaces en la desinfección de oocistos en las plantas de tratamiento de agua (Fayer, 2004; Yoder *et al.*, 2010).

Los controles para reducir el impacto de la transmisión zoonótica y la contaminación del medio ambiente deberían incluir la adecuada gestión para la eliminación o disposición de los desechos animales (Zanaro *et al.*, 2008).

Tabla 1. PREVALENCIAS DE *Cryptosporidium spp.*, REPORTADAS EN EL MUNDO.

Autor	Lugar	Población estudiada	Técnica de detección	Prevalencia (%)
Fatimah (1995)	Oeste de Malasia	25 corderos	-	36.0
Kambarage (1996)	Morogoro, Tanzania	121 borregos	-	97.5
Agunyole, Cadmus y Sansi (2001)	Ibadán, Nigeria		Z-N	43.3
Ohaeri e Iwu (2003)	Aba, Nigeria	29 borregos	Z-N	2.1
Abou-Eisha (1994)	Giza, Egipto	100 corderos	-	24
El-Hohary y Abdel-Latif (1998)	Gharbia, Egipto	52 borregos	Z-N	7.69
Dezfouli y Meshgi (2002)	Teherán, Irán	87 ovinos	-	Corderos de menos de un

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* EN OVINOS MENORES DE UN AÑO DE EDAD EN CUATRO PLAZAS COMERCIALES DEL ESTADO DE MÉXICO

				mes: 14.28 Borregos de más de 3 años: 17.69
Mahdi y Ali (2002)	Basrah, Iraq	45 borregos	Z-N	13.3
Nassif. Amer y Osman (2002)	Egipto	200 corderos	Z-N	13.3
Eisa y Mohammed (2004)	Giza, Egipto	470 corderos y cabritos (310 diarreicos y 160 no diarreicos)	-	16.8 en diarreicos
Özer (1990)	Eilazig, Turquía	267 corderos	-	12
Nouri y Karami (1991)	Lorestan, Iran	215 borregos no diarreicos	Z-N	17.2
Villacorta <i>et al.</i> , (1991).	Galicia, España	69 ovinos Corderos sacrificados en rastro con edades de 6 días a 6 meses	Tinción de Heine	1.44
Minas, Koutsoukou-Hartona y Papasavvas (1994).	Larissa, Grecia	65 corderos diarreicos	Z-N	4.61
Muñoz <i>et al.</i> , (1996).	España	183 corderos diarreicos	Z-N	45
Jian Min <i>et al.</i> , (1999).	China	3250 corderos	-	23.08
Causapé <i>et al.</i> , (2002).	Zaragoza, España	344 corderos	Z-N	59
Ulutaş y Voyvoda (2004).	Aydin, Turquía	67 corderos diarreicos 77 corderos no diarreicos	Heine	79.1 18.2
Zhuang <i>et al.</i> , (2004).	Guangdong, China	Ovinos	Fenol auramina y Z-N	21.7
Sevinç, Uslu y Derinbay (2005).	Konya, Turquía	471 muestras de corderos de 1-60 días	Z-N	2.97
Craig <i>et al.</i> , (2006).	Hirta, St. Kilda, Escocia	Corderos y adultos	Z-N	2001-28.6 2002-9.0 2003-11.9

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* EN OVINOS MENORES DE UN AÑO DE EDAD EN CUATRO PLAZAS COMERCIALES DEL ESTADO DE MÉXICO

Zorana, Sofija y Kulišić (2006).	Serbia	126 corderos de 1 a 90 días de edad	Z-N y Kinyoun	42.1
Nagy (1995).	Hungría	53 corderos	Z-N	22.64
Majewska <i>et al.</i> , (2000).	Polonia	205 borregos	Z-N	10.1

*Z-N: Ziehl Neelsen, I-F: Inmunofluorescencia

Tabla 2. PREVALENCIAS DE *Cryptosporidium spp.* EN AMÉRICA, MÉXICO Y ESTADO DE MÉXICO.

Autor	Lugar	Población estudiada	Técnica de detección	Prevalencia (%)
Santos Da Silva <i>et al.</i> , (1990).	Distrito de Guaiba, Brasil	10 corderos	Z-N	20
Kaminjolo (1993).	Trinidad y Tobago	683 cerditos, becerros, corderos y cabritos diarreicos y no diarreicos	-	20
Valenzuela <i>et al.</i> , (1991).	Valdivia, Chile	196 corderos muertos (de 0 a 28 días de edad)	Z-N	7.7
Green <i>et al.</i> , (2004)	São Paulo, Brasil	184 corderos en época de lluvias 179 corderos en época seca	Auramina y Z-N	55.4 17.3
Green, Amarante y Mascarini (2005).	São Paulo, Brasil	20 corderos 20 borregas	Auramina y Z-N	26.7 31.9
Alonso <i>et al.</i> , (2005).	Toluca, México	1200 (559 corderos y 641 ovejas)	Z-N	General: 34.3 Corderos: 32.5 Ovejas: 35.9
Xiao, Herd y	Ohio,	9 corderos diarreicos recién	Z-N	100

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* EN OVINOS MENORES DE UN AÑO DE EDAD EN CUATRO PLAZAS COMERCIALES DEL ESTADO DE MÉXICO

Rings (1993).	E.U.A.	nacidos (5-10 días de edad) 23 corderos de 2 a 3 semanas de edad 23 ovejas clínicamente sanas	IF	78.3 17.4
Olson (1997).	Canadá	89 borregos de granjas privadas, universitarias y otras	IF	24
Martínez <i>et al.</i> , (2007).		40 borregas en un hato	Kinyoun	100
Sischo <i>et al.</i> , (2000).	Estados Unidos	198 becerros de tres semanas de edad de 11 hatos.	---	15%
Fayer <i>et al.</i> , (2006)	Estados Unidos	571 novillas con una edad de uno a dos años provenientes de 14 hatos lecheros.	PCR	11.90%
Santín <i>et al.</i> , (2008).	Estados Unidos	30 animales con una edad desde el nacimiento hasta los 24 meses	IF y PCR.	19 al 20 % De los 30 animales 29 fueron positivos.
Coklin <i>et al.</i> , (2008).	Canadá	183 muestras de animales de menos de 6 meses de edad provenientes de 11 hatos.	IF microscópica y PCR.	6.2% 4 de los 11 hatos salieron positivos con una prevalencia de 36.4%
Trotz-Williams (2008).	Sur de Ontario	1089 becerros con una edad de 7 a 28 días	Método de sucrosa y por PCR - RFLP	30 % por medio de microscopia y la prevalencia entre hatos de 77 %.

*Z-N: Ziehl Neelsen, I-F: Inmunofluorescencia

III. JUSTIFICACIÓN

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, la microbiología clínica necesita optimizar a nivel de especificidad y sensibilidad, las mejores técnicas diagnósticas tendientes a ejecutar los programas más adecuados en materia de prevención, control y tratamiento.

Cryptosporidium es un parásito zoonótico por lo que tiene importancia en Salud Pública, causante de náuseas, vómito, dolor abdominal, fiebre de baja intensidad, anorexia, pérdida de peso, deshidratación severa y desequilibrio hidroelectrolítico; ocasionalmente los pacientes presentan tenesmo, cefalea intermitente, sangre oculta en heces, linfadenopatía y desnutrición severa, ocasiona pérdidas en el rebaño sobre todo si actúa en combinación con otros agentes como *E. coli* y *parvovirus*, este es el principal motivo por el cual se debe determinar un método eficaz para identificar el tipo de *Cryptosporidium spp.* que se encuentra en las poblaciones animales.

La técnica de Z-N se sigue ocupando en el mundo debido a su confiabilidad y bajo costo, y debido a que en las plazas comerciales existe un alto riesgo de diseminación del parásito, es necesario conocer la prevalencia existente.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad.

Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo establecer la prevalencia de *Cryptosporidium spp.* Mediante la técnica de Ziehl Neelsen y corroborar por RT-PCR en ovinos menores de un año en cuatro plazas comerciales del Estado de México.

IV. HIPOTESIS

Existe una prevalencia del 30% de *Cryptosporidium spp.*, en ovinos de menos de un año de edad.

V. OBJETIVOS

General

Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium spp.*, en ovinos de menores de un año de edad.

Específicos

Identificar a *Cryptosporidium spp.*, mediante la técnica de Ziehl Neelsen en corderos y ovejas (gestantes, lactando y vacías) menores de un año de edad.

Corroborar mediante la técnica de RT-PCR la presencia de *Cryptosporidium ssp.*

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

- Heces de ovinos menores de un año de edad, de cuatro diferentes plazas comerciales de animales del Estado de México.
- Guantes de látex
- Tubos
- Centrifuga.
- Frascos de Coplin
- Portaobjetos
- Microscopio
- Tamiz de diferentes tamaños
- Vasos
- Agua
- Gasas
- Embudos
- Papel filtro.
- Toallas sanitas
- Termociclador
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Microtubos para PCR, estériles
- Puntas estériles
- Agua destilada, desionizada y estéril
- Primer forward y reverse
- DNTP's
- Buffer para PCR (Solución amortiguadora para PCR).
- Polimerasa Taq.

VII. MÉTODOS

Existen diferentes técnicas de tinción que se realizan sobre extendidos de heces, y en algunos casos con el material previamente concentrado, con el propósito de aumentar la sensibilidad (Cordero *et al.*, 1999). Los protocolos de laboratorio de rutina para la detección de oocistos de *Cryptosporidium spp.*, tanto en heces como en muestras de medio ambiente (ej. agua), incluyen el examen microscópico de estos extendidos, previa concentración de la muestra, los que son teñidos ya sea con Giemsa, Heine o Ziehl Neelsen (Z-N) (Atías, 1998; Cordero *et al.*, 1999; Fayer, 2004). Dentro de estas, la técnica más difundida para la detección de oocistos en heces, es la de Z-N modificada ya que se basa en la propiedad de ácido-resistencia del parásito, cuando es sometido a estos procedimientos de coloración (Georgi y Georgi, 1990; Atías, 1998; Barriga, 2002).

Las muestras de heces se recolectaron en guantes de látex en rebaños de ovinos de cuatro plazas comerciales (Puente de San Bernabé, plaza de Ixtlahuaca, plaza de Texcaltitlan y plaza de Cieneguillas de Guadalupe).

La detección de *Cryptosporidium spp.*, en muestras fecales se realizó mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (Aguedo, *et al.*, 2005).

PROCEDIMIENTO

1. Teñir con carbolfucsina durante una hora en frascos de Coplin
2. Enjuagar con agua corriente en frascos de Coplin dejando correr el agua suavemente sobre el frasco durante dos o tres minutos
3. Decolorar con alcohol acido hasta que las laminillas hayan tomado un color rosa pálido y haya dejado de correr el color rosa
4. Enjuagar nuevamente
5. Contra teñir con azul de metileno durante 30 segundos.
6. Enjuagar con agua corriente durante 2 o 3 minutos
7. Secar las laminillas al aire.

Las muestras se dividieron en dos:

1.- Fueron conservadas en dicromato de potasio para su posterior análisis mediante PCR.

2.- Se purificaron para realizar la prueba de PCR mediante el siguiente procedimiento:

1. Se tamizó la muestra utilizando mallas de diferente tamaño (número 50 apertura en mm 0.297, área abierta de 30.3%, número 100 apertura en mm 0.149, área abierta 36% y 200, apertura en mm 0.074, área abierta de 33%) previamente diluida en agua.
2. Se centrifugaron las muestras en gradiente de sucrosa para obtener los oocistos y conservarlos con glicerol aproximadamente en proporción 1:4.

RT-PCR

La identificación de *Cryptosporidium* en muestras de heces se realizó mediante la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de regiones del ADN ribosomal, del gen 18S r DNA (Helmy *et al.*, 2013).

Los primers utilizados en el trabajo para la primera amplificación de 1325 pares de bases del fragmento 18S de una subunidad ribosomal de ADN fue, 5_TTCTAGAGCTAATACATGCG-3_ y 5_-CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3 posteriormente para la amplificación de 830 pares de bases y realizar el siguiente PCR, se utilizaron 5_-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3 y 5_AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3 (Helmy, 2013).

La técnica de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 98° C por 30 s, seguido de 40 ciclos a 98° C por 10 s, alineación a 55° C por 30 s y finalmente la extensión a 72°C por 10 minutos.

La siguiente PCR a una temperatura inicial de desnaturalización de 98°C por 30s y 45 ciclos con 98°C por 10 s y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

CÁLCULO DEL NÚMERO DE MUESTRAS

El tamaño de muestra se obtuvo con la tabla para el cálculo del tamaño de muestra al 95% de confiabilidad descrita por Thrusfield (1990). Tomando en cuenta una prevalencia de **32.2%** y un tamaño de población infinita.

$$n = \frac{Z^2 \times P(1-P)}{d^2}$$

Substitución de la formula

n= Es el valor a obtener y representara el tamaño de muestra.

Z²= Valor teórico y representa el nivel de confianza. Si el nivel de confianza es del 95.5%

Z² = 4.

d²= constituye el error de estimación, normalmente oscila entre más o menos 5% y 10%.

P y (1-P) = valores de 50 y 50.

Se analizaron 200 muestras de las cuatro plazas comerciales donde: en San Bernabé se obtuvieron 80 muestras individuales, la plaza de Ixtlahuaca 60 muestras, plaza de Texcaltitlan 30 muestras, plaza de Cieneguillas 30 muestras individuales de ovinos menores de un año, a todas ellas se les aplicó la técnica de Ziehl-Neelsen (Z-N), (Georgi & Georgi 1990).

VIII. LÍMITE DE ESPACIO

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal CIESA ubicado en KM. 15.5 Carretera Toluca-Atlacomulco, CP 50200.

Las muestras se recolectaron de animales ovinos de menos de un año de edad en las plazas de Ixtlahuaca, puente de San Bernabé, plaza de Texcaltitlan y plaza de Cieneguillas de Guadalupe en el municipio de Almoloya de Juárez.

Plaza de Ixtlahuaca

Ixtlahuaca, es uno de los 125 municipios del estado de México. Limita al norte con el municipio de Jocotitlán, al sur con el municipio de Almoloya de Juárez, al noreste con el municipio de Jiquipilco y al poniente con el municipio de San Felipe del Progreso.

Se venden alrededor de 3600 animales según el registro de boletos vendidos los días lunes. (Comunicación personal, 2015). Sus coordenadas son: 19°28'06" al 19°44'03" latitud norte y 99°40'43" al 99°54'59" longitud oeste.

Plaza de Texcaltitlan

Texcaltitlan municipio que conforman al Estado de México limita al norte con Temascaltepec y con San Simón de Guerrero al este con Coatepec Harinas, al sur con Almoloya de Alquisiras y Sultepec, al oeste con Tejupilco, se venden alrededor de 2000 animales los días martes. Se localiza entre las coordenadas geográficas 18° 51' 4" y 19° 01' 02" latitud norte y entre 99° 51' 26" y 100° 00' 51" longitud oeste.

Plaza de Cieneguillas de Guadalupe

Se localiza en el Municipio de Almoloya de Juárez en el Estado de México.

Se venden alrededor de 2500 animales según el registro de boletos vendidos los días jueves (Comunicación personal, 2015). Se encuentra en las coordenadas GPS: Longitud (dec): -99.859167 Latitud (dec): 19.404722.

Plaza puente de San Bernabé

El puente de San Bernabé, ubicado en la localidad de Mayorazgo de León, se ha convertido desde hace más de sesenta años en la plaza ganadera más grande del centro del país debido a las ocho hectáreas de extensión que ocupa. Bartolo López Romero, quien lleva dos años en la administración e inspección del lugar, afirma que cada lunes se concentran en la plaza de San Bernabé para su comercialización más de diez mil cabezas

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* EN OVINOS MENORES DE UN AÑO DE EDAD EN CUATRO PLAZAS COMERCIALES DEL ESTADO DE MÉXICO

de ganado equino, ovino, bovino y porcino, así también como perros, aves y conejos. (Comunicación personal, 2015).

Se localiza entre las siguientes coordenadas geográficas:

	Mínima	Máxima
Longitud oeste	99°42'07"	99°56'13"
Latitud norte	19°14'20"	19°33'01"

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia general del presente trabajo fue de 62.8%, de un total de 200 muestras.

Uribarren, (2010) menciona que la prevalencia de la enfermedad en países industrializados oscila entre 0,1 y 27,1%, con una media de 4,9%, mientras que en países en desarrollo los resultados varían entre 0,1 a 31,5%, con una media de 7,9%. Aun cuando los estudios epidemiológicos han demostrado que la parasitosis está más difundida de lo que anteriormente se pensaba, es difícil determinar la extensión del problema, tanto a nivel médico veterinario como humano.

Dentro de las plazas muestreadas tenemos animales que provienen de unidades de traspatio donde los animales solo son alimentados a base de pastoreo y de explotaciones intensivas donde los animales son alimentados solo a base de alimentos concentrados.

En el presente estudio, se recolectaron y analizaron 200 muestras de heces en 4 plazas comerciales de ganado ubicadas en el Estado de México, en las que se tomaron muestras de ovinos, gestantes, lactantes, vacías y corderos de menos de un año de edad, el porcentaje de muestras por plaza fue: San Bernabé 40%, Ixtlahuaca 30% Cieneguillas 15% y Texcaltitlan 15%.

El presente trabajo representa un reporte de criptosporidiosis en ovinos menores de un año de edad en el Estado de México, en donde encontramos una prevalencia general de 62.8% con una prevalencia del 63% en hembras y 55% en corderos (tabla 3), al igual que en otras partes del Continente donde se encontraron prevalencias desde 7.7 Valenzuela *et al.*, (1991), hasta el 100% Xiao, Herd y Rings en USA (1993).

Tabla 3.- PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* EN OVINOS MENORES DE UN AÑO DE ACUERDO CON EL ESTADO FISIOLÓGICO EN CADA PLAZA COMERCIAL DEL ESTADO DE MÉXICO.

PLAZA	CATEGORIA			Número de positivos Z-N	Prevalencia
PUENTE DE SAN BERNABE n=80 muestras	HEMBRAS	GESTANTES	22	11 /22	50%
		LACTANTES	25	20/25	80%
		VACIAS	11	8/11	72%
	CORDEROS	DE 0 A 6 MESES	22	14/22	63%
IXTLAHUCA n=60 muestras	HEMBRAS	GESTANTES	16	8/16	50%
		LACTANTES	27	16/27	59%
		VACIAS	5	4/5	80%
	CORDEROS	DE 0 A 6 MESES DE EDAD	12	7/12	58%
TEXCALITLAN n=30 muestras	HEMBRAS	GESTANTES	7	7/7	100%
		LACTANTES	7	4/7	57%
		VACIAS	2	1 / 2	50%
	CORDEROS	DE 0 A 6 MESES	14	5/14	35%
CIENEGUILLAS DE GUADALUPE n=30 muestras	HEMBRAS	GESTANTES	6	3/6	50%
		LACTANTES	8	5/8	62%
		VACIAS	3	1/3	33%
	CORDEROS	DE 0 A 6 MESES	13	8/13	61%
Total			n=200	126/ 200	62.8%
		HEMBRAS	139	88 POSITIVAS	PREVALENCIA 63%
		CORDEROS	61	34 POSITIVAS	PREVALENCIA 55%

Alonso *et al.*, (2005), en el Estado de México encontraron una prevalencia del 34.3% con una mayor infección en borregas adultas que en corderos lactantes. Aunque las borregas pueden actuar como reservorios en la infección subclínica por *Cryptosporidium spp.*

(Ortega- Mora *et al.*, 1999). Parece ser que los corderos aparentemente sanos pueden ser la fuente de infección para los demás (Nassif *et al.*, 2002). No hay que olvidar que *Cryptosporidium spp.* Puede convertirse en un agente oportunista secundario o complicante (De la Fuente *et al.*, 1999).

En la prevalencia obtenida por plazas se observa una mayor frecuencia en la plaza de Texcaltitlan con un 70% aunque la prevalencia fue mayor en el puente de San Bernabé como lo muestra la tabla 4.

Tabla 4.- PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* EN HECES DE OVINOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN POR PLAZA COMERCIAL.

Plaza	Muestras Positivas/plaza	Prevalencia por Plaza	Prevalencia del total de muestras/plazas
Puente de San Bernabé	53/80	66.25%	53/200= 26.5%
Ixtlahuaca	35/60	58.33%	35/200= 17.5%
Texcaltitlan	21/30	70.00%	21/200= 10.5%
Cieneguillas de Guadalupe	17/30	56.66%	17/200= 8.5%
Total	126/200	62.81%	63%

De acuerdo con el grupo etáreo, encontramos una mayor prevalencia en las hembras (63%) que en corderos (55%), de las hembras muestreadas la mayor prevalencia se observó en las hembras lactantes (48%) (Tabla 5).

Tabla 5.- PREVALENCIA DE *Cryptosporidium spp.* POR GRUPO ETÁREO DETECTADO EN HECES DE CORDEROS Y BORREGAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN.

Categoría/subcategoría		Prevalencia por subcategoría	Prevalencia por categoría
Hembras 139	Gestantes 50	29/50= 58%	29/139=20.86%
	Lactantes 67	45/67= 67%	45/139=32.37%
	Vacías 22	14/22= 63%	14/139=10.07%
Corderos 61	De 0 a 6 meses 61	34/61= 55%	34/200=17.00%

Alonso *et al.*, en 2005 encontraron una mayor prevalencia en el municipio de Toluca con 52.8%, seguido de Xalatlaco 43.4% y Jiquipilco 30.6%, con una prevalencia general de 34.3%, en corderos 32.5% y en ovejas 35.9%.

Ocaña (2015) en Tlalpujahu de Rayon, Michoacán de Ocampo, encontró una prevalencia en corderos menores de 60 días entre el 90 y 100%.

Xiao *et al.*, 1993, en Ohio, E.U.A. encontró una prevalencia de 100% en corderos diarreicos recién nacidos de 5- 10 días de edad, una prevalencia de 78.3% en corderos de 2 a 3 semanas de edad y 17.4% en ovejas clínicamente sanas mediante la técnica de Ziehl Neelsen e Inmunofluorescencia.

PCR.

Con respecto a corroborar la prevalencia mediante la técnica de PCR, en el presente trabajo no se obtuvo la amplificación de los amplicones de *Cryptosporidium spp* quizás por la inhibición de las DNAsas, presentes en las heces de los corderos.

El análisis genético a partir de ADN extraído de heces es complicado, pues generalmente el ADN obtenido se encuentra contaminado con restos propios del material fecal, de la dieta del animal o suele estar en bajas cantidades o degradado (Deuter *et al.*, 1995). El uso de un método adecuado de extracción es fundamental, no solamente para eliminar impurezas, pero sobre todo, para evitar la inhibición en la amplificación de productos en pruebas de PCR (Maturrano *et al.*, 2012).

El material fecal puede contener DNAsas bacterianas que pueden degradar el material genético liberado. Además, se consideran inhibidores del PCR a las sales biliares, bilirrubina y algunos complejos polisacáridos (Wiedenmann *et al.*, 1998, Scorza 2003, Jaramillo *et al.*, 2008).

Hay que tener en cuenta que una solución al 2,5% de $K_2Cr_2O_7$ puede ser inhibidor para la PCR. Las muestras fecales positivas para oocistos o los oocistos parcialmente purificados almacenados en dicromato potásico y utilizados para la amplificación de ácido nucleico por PCR deberían lavarse en agua desionizada para eliminar el $K_2Cr_2O_7$ residual antes de la extracción de ADN. Una serie de tres lavados seguidos cada uno de ellos de centrifugación (3000 **g** durante 10 minutos), la eliminación del sobrenadante, y la resuspensión del sedimento en agua desionizada debería minimizar la inhibición de la PCR por el $K_2Cr_2O_7$. Debe tenerse en cuenta que los factores inhibidores pueden aún estar presentes después de un largo período de tiempo (>6 meses) de almacenaje (OIE, 2008).

X. CONCLUSIONES:

La prevalencia de *Cryptosporidium spp* en ovinos de menos de un año de edad fue de 62.8% en las plazas comerciales de animales del Estado de México, mediante la técnica de Ziehl Neelsen.

La prevalencia de *Cryptosporidium spp.* Es mayor en hembras lactantes 32.37% que en hembras gestantes que fue de 20.86% vacías 10.07%, corderos 55% y general de 62.81%.

No fue posible la amplificación de los fragmentos de *Cryptosporidium spp* por PCR utilizando de la técnica descrita por Helmy, 2013.

XI. SUGERENCIAS

- Establecer un método para la obtención purificación y extracción de ADN de *Cryptosporidium spp.*, más asequible y práctico para su diagnóstico.
- Realizar la técnica de PCR sin el uso de conservadores.

XII. BIBLIOGRAFIA

- Abou-Eisha, A.M. 1994. Cryptosporidial infection in man and farm animals in Ismailia Governorate. *Veterinary Medical Journal Giza*. 42 (2): 107-111.
- Agudelo S, Montoya M. *Parasitos Intestinales Oportunistas Teoria y Practica*. Medellin: Biogenesis fondo editorial; 2005. p. 31-35, 62.
- Agunyole, C.A., Cadmus, S.I.B. and Sansi, J.A.A. 2001. A survey of *Cryptosporidium parvum* infection in calves, goat, kids and lambs in Ibadan, Nigeria. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*. 49:264-267.
- Alonso-Fresan, M.U., Garcia-Alvarez, A., Salazar-Garcia, F., Vazquez-Chagoyan, J.C., Pescador-Salas, N., Saltijeral-Oaxaca, J. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium spp.* in asymptomatic sheep in family flocks from Mexico State. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 52(10):482-483.
- Atias, A. 1998. *Parasitologia medica*. Ed. Mediterraneo.
- Causapé, A.C., Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., del Cacho, E. and López-Bernad, F. 2002. Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (northeastern Spain). *Veterinary Parasitology*. 104: 287-298.
- Comunicación personal 2015, Maribel Lovera Hernández segunda regidora del H. Ayuntamiento.
- Comunicación personal 2015, J. Taide Iturbe Sánchez.
- Comunicación personal 2015, Lic. Fernando Sánchez Orozco

- Cordero, M.; Rojo, F.A.; Martinez, A.; Sanchez, C.; Hernandez, S.; Navarrete, J.; Diez, P.; Quiroz, H.; Carvalho, M. 1999. Parasitología veterinaria. Ed. Mc Graw- Hill, Interamericana. 213-221 pp.
- Craig, B.H., Pilkington, J.G., Kruuk, L.E.B. and Pemberton, J.M. 2006. Epidemiology of parasitic protozoan infections in Soay sheep on St. Kilda. *Parasitology*, 18: 1-13.
- De la Fuente, R.; Luzon, M.; Ruiz- Santa- Quiteria, J. A.; García, A.; Cid, D.; Order, J.A.; Garcia, S., Sanz, R.,; Gomez- Bautista, M. 1999 *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day- old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet parasitol*, 80(3): 179-185.
- Del Coco, V.F.; Cordoba, M. A.; Basualdo, J.A.2009. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Rev. Argent Microbiol*, 41:185-196.
- Dezfouli, M.R.M. and Mesghi, B. 2002. Epidemiological study of cryptosporidial infestation of man and animals. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran*, 57 (1): 87-92.
- Dillingham, R.; Lima, A.; Guerrant, R.2002. Criptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microb infec*, 4: 1059- 1066.
- El-Hohary, A.H. and Abdel-Latif, A.M. 1998. Zoonotic importance of cryptosporidiosis among some animals at Gharbia Province in Egypt. *Indian Journal of Animal Sciences*. 67(4): 305-307.
- Fatimah, C.T.N.I., Lee, C.C., Azri, A., Rafie, D., Fazlina, B., Salim, N.B., Azizah, D. and Safri, A.H. 1995. The occurrence and epidemiology of enteropathogens and diarrhea in neonatal lambs. *Jurnal Veterinar Malaysia*. 7 (1): 27-29.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water- borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol*. 126:37-57.

- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*. 126: 37-56.
- Gorman, T; Alcain, H; Santelices, J. 1989. *Cryptosporidium* y otras coccidias intestinales en terneros de lechería. Region Metropolitana. Chile. *Arch Med Vet*. 21 (1): 29-34.
- Green, R.E., Amarante, A.F.T. and Mascarini, L.M. 2004. The seasonal distribution of *Cryptosporidium* oocysts in sheep raised in the State of São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 13 (3): 125-127.
- Green, R.E., Amarante, A.F.T. and Mascarini, L.M. 2005. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts by ewes and lambs kept indoors. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 42 (3): 204-209.
- Helmy Y.A, Krucken J, Nockler K, Samson- Himmelstjerna G, Zessin K. (2013): Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in livestock animals and humans in the Ismailia province of Egypt. *Veterinary Parasitology*, 193:15-24.
- <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15042a.html>
visto agosto de 2016
- <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15005a.html>
visto agosto de 2016
- <http://www.nuestro-mexico.com/Mexico/Almoloya-de-Juarez/Cieneguillas-de-Guadalupe/>_visto agosto de 2016
- <http://www.municipios.mx/mexico/texcaltitlan/>_visto agosto de 2016

- Jex A. R, Smith H. V, Monis P.T, Campbell B.E, Gasser R.B. (2008): *Cryptosporidium*. Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation, biotechnology advances, 26:304-317.
- JianMin, Y., JiaMing, B., TingHe, C., Xiao, S., GuoHuo, L., GuoXin, C. and GenMin L. 1999. Investigation of cryptosporidiosis in domestic animals and poultry and experimental infection test. Chinese Journal of Veterinary Medicine. 25 (12): 5-7.
- Johnson D.W., Pieniazek N. J., Griffind D.W., Misener L. Y Rose J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3849-3855.
- Kambarage, D.M., Kimera, S.I., Kusiluka, L.J.M. and Mtambo, M.M.A. 1996. Prevalence of Eimeria and Cryptosporidium oocysts in cattle, sheep and goats in Morogoro region, Tanzania. Journal of Applied Animal Research. 9 (1): 73-78.
- Kaminjolo, J.S., Adesiyun, A.A., Loregnard, R. and Kitson-Piggott, W. 1993. Prevalence of Cryptosporidium oocysts in livestock in Trinidad and Tobago. Veterinary Parasitology. 45 (3/4): 209-213.
- Koinari M, Lymbery A. J, Ryan U.M (2014): *Cryptosporidium* species in sheep and goats from Papua New Guinea. Experimental Parasitology, 141: 134-137.
- Mahdi, N.K. and Ali, N.H. 2002. Cryptosporidiosis among animal handlers and their livestock in Basrah, Iraq. East African Medical Journal. 79(10):550-553.
- Majewska A. L, Werner A, Sulima. P, Luty (2000): Prevalence of Cryptosporidium in sheep and goats bred on five farms in west-central region of Poland. Veterinary parasitology, 89:269-275.

- Martínez, G.A., Vitela, M.I.V., Cruz-Vázquez, C.R. y Ramos, P.M. 2007. Presencia de oocistos de *Cryptosporidium* spp., durante el parto y posparto, en borregas pelibuey y corderos latantes de un rebaño en el Estado de Aguascalientes. Memorias de la XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Sinaloa 2007. Pág. 37.
- Minas, A., Koutsoukou-Hartona, W. and Pappasavvas, M. 1994. Epidemiological survey of diarrhoeic faeces of lambs and kids for cryptosporidial oocysts in the Larissa region. Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society. 44(2):112-114.
- Molina M.V.R, Mercado R, Fredes F. 2010.Importancia de la detección del protozooario zoonotico *Cryptosporidium parvum* en muestras de agua en Chile. Avances en Ciencias Veterinarias. 25(1-2): 129-159.
- Muñoz, M., Álvarez, M., Lanza, I. and Cármenes, P. 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. Epidemiology and Infection. 117 (1): 203-211.
- Nagy, B. 1995. Epidemiological information on *Cryptosporidium parvum* infecti-Sotoon of domestic mammals in Hungary. Magyar Állatorvosok Lapja. 50 (3): 139-144.
- Nassif, M.N., Amer, S.A. and Osman S.A. 2002. Some studies on ovine and caprine cyrtosporidiosis concerning prevalence and electrophoretic pattern of blood serum protein. Assiut Veterinary Medical Journal. 47(94):249-262.
- Nouri, M. and Karami, M. 1991. Asymptomatic cryptosporidiosis in nomadic shepherds and their sheep. Journal of Infection, 23 (3): 331-333.
- Ocampo. G.R.J, Cardozo. L, López. G, Álvarez. M. E, Pérez. J.E, Rivera. P. F. A (2011): Evaluación de métodos moleculares y microscópicos para la detección de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa cryptosporiidae). Biosalud, (10)1657-9550.

- Ocaña-Soto, A.D. 2015. Identificación de *Cryptosporidium spp.* mediante la técnica de Zeihl-Neelsen en corderos de Tlalpujahua, Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Ohaeri, C.C. and Iwu, C.J. 2003. Prevalence of *Cryptosporidium* species in some domestic animals. *Journal of Sustainable Agriculture and the Environment*. 5(2):309-312.
- OIE 2008 Manual de la OIE sobre animales terrestres.
- OIE Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2013.
- Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W. and McAllister, T.A. 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology*, 68: 375-381.
- Özer, E., Erdoğan, S.Z. and Köroğlu, E. 1990. Studies on the incidence of *Cryptosporidium* in calves and lambs in the Eilaziğ area. *Doğa, Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 14 (3): 439-445.
- Plutzer J, Karanis P. 2009: Genetic polymorphism in *cryptosporidium* species An update. *Veterinary parasitology*, 165: 187-199.
- Santos da Silva, N.R., Falci, V.S.N., Coussirat Azevedo, J.S., Chaplin, E.L. and Pacheco de Araujo, F.A. 1990. *Cryptosporidium parvum* em ovinos no município de Guaíba, RS. *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS*. 18: 69-72.
- Sevinç, F., Uslu, U. and Derinbay, Ö. 2005. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* in lambs around Konya. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 29 (5): 1191-1194.

- Thompson, R. C. A y Olson, M. E.; Zhu, G.; Enomoto, S.; Abrahamsen, M.S.; Hijjawi, N.S 2005. *Cryptosporidium*. *Adv parasitol*, 59:77-139.
- Thrusfield M. 1990. *Epidemiología Veterinaria*. Editorial Acribia, S.A. España.
- Ulutaş, B. and Voyvoda, H. 2004. Cryptosporidiosis in diarrhoeic lambs on a sheep farm. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 28(1): 15-17.
- Valenzuela, G., Sci, M.V., Grandón, W., Quintana, I. y Tadich, T.M. 1991. Prevalencia de *Cryptosporidium spp.* en corderos muertos en la provincia de Valdivia, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. XXIII (1): 81- 83.
- Villacorta, Y., Ares-Mazas, E. and Lorenzo, M.J. 1991. *Cryptosporidium parvum* in cattle, sheep and pigs in Galicia (N.W. Spain). *Veterinary Parasitology*, 38: 249-252.
- Xiao L. Ryan UM. 2004. Criptosporidiosis and update in molecular epidemiology. *Curr opin infect Dis*, 17:483-490.
- Xiao, L., Herd, R.P. and Rings, D.M. 1993. Diagnosis of *Cryptosporidium* on a sheep farm with neonatal diarrhea by immunofluorescence assays. *Veterinary Parasitology*, 47: 17-23.
- Xiao, L.; Fayer. R. 2008. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission *Int.J. Parasitol*, 38: 1239-1255.
- Yoder, J; Beach, M. 2010. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the united states. *Exp parasitol*, 124: 31-39.
- Zanaro, N.L.; Garbossa, G. 2008. *Cryptosporidium*: cien años después. (en línea) <http://www.scielo.org.ar /scielo.php?script=sci_arttext.pid=s0325

- Zhuang, J.C., Xie, H.Y., Liu, W.L., Deng, Y.X., Huo, R.S., Pan, X.P., Zeng, P.C., Li, Y.Z., Ma, C.L., Shen, H.X., Li, X.M., Chen, X.Y. and Chen, D.X. 2004. Investigation on six kinds of animals infected with *Cryptosporidium* in the poultry and domestic animals wholesale market of Guangzhou City. *Journal of Tropical Medicine Guangzhou*, 4 (6): 710-711.
- Zorana, M, Katić-Radivojević, S. and Kulišić, Z. 2006. *Cryptosporidium* infection in lambs and goat kids in Serbia. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 56 (1): 49-54

XIII. ANEXOS

SOLUCIONES PARA LA TINCION DE ZIEHL NEELSEN

- Solución de carbolfucsina (cristales de fenol 2.5 g, etanol 96° 5 MI, fucsina básica 0.5 g y agua destilada 50 ml.
- Alcohol ácido (HCl 1% en etanol al 70%)
- Solución de azul de metileno (1.4 g en 100 ml de agua destilada)

SOLUCIONES PARA LA PURIFICACION DE OOCISTOS

- SOLUCION A: 300 ml de agua estéril tipo I y 500 gramos de sucrosa.
- SOLUCION B: PBS (0.025 M salina amortiguada con fosfatos).
- SOLUCION DE SUCROSA 1:2 – una parte de la solución A y una parte de la solución B (Gravedad específica 1.103)
- SOLUCION DE SUCROSA 1:4 – 1 parte de la solución A y 3 partes de la solución B (gravedad específica 1.064)

SOLUCION BUFFER DE LISIS

Colocar 200 µl de tail buffer + 10 µl de proteína K (.001 en 10 µl DIU), Se pone la muestra de cultivo en horno a 23rpm con 42° C toda la noche. Se adiciona NaCl saturada se agita en vortex y se agrega etanol 100%, se agita y se deja un tiempo en precipitación a -85°C por 20 minutos y se centrifuga a 14000 revoluciones por minuto por 10 minutos, se lava el pellet en dos ocasiones y se resuspende el DNA con 20 µl de DIU.